



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO VALE DO SÃO FRANCISCO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA NO  
SEMIÁRIDO**

**Álvaro Santos Lisboa Neto**

**AVALIAÇÃO DA RESPOSTA ANTI-INFLAMATÓRIA DO  
ÓLEO DA COPRA DO COCO (*Cocos nucifera* L) FRENTE NA  
INFLAMAÇÃO INDUZIDA PELA TOXINA DE *Bothrops  
jararacussu* E OS MEDIADORES FLOGÍSTICOS: HISTAMINA,  
SEROTONINA, BRADICININA, SUBSTÂNCIA P E  
PROSTAGLANDINA E<sub>2</sub>.**

**ALVARO SANTOS LISBOA NETO**

**AVALIAÇÃO DA RESPOSTA ANTI-INFLAMATÓRIA DO  
ÓLEO DA COPRA DO COCO (*Cocos nucifera* L) FRENTE NA  
INFLAMAÇÃO INDUZIDA PELA TOXINA DE *Bothrops  
jararacussu* E OS MEDIADORES FLOGÍSTICOS: HISTAMINA,  
SEROTONINA, BRADICININA, SUBSTÂNCIA P E  
PROSTAGLANDINA E<sub>2</sub>.**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária no Semiárido da Universidade Federal do Vale do São Francisco – UNIVASF, Campus de Ciências Agrárias, como requisito para obtenção do título de Mestre em Medicina Veterinária.

Orientador: Prof. Dr. Raimundo Campos Palheta Junior

Petrolina – PE  
2015

	Lisboa Neto, Álvaro Santos.
L769a	Avaliação da resposta anti-inflamatória do óleo da copra do coco ( <i>Cocos nucifera</i> L) frente na inflamação induzida pela toxina de <i>Bothrops jararacussu</i> e os mediadores flogísticos: histamina, serotonina, bradicinina, substância P e prostaglandina E <sub>2</sub> / Álvaro Santos Lisboa Neto. – Petrolina, 2015.
	52f.: 29 cm.
	Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias no Semiárido) – Universidade Federal do Vale do São Francisco, Campus Ciências Agrárias, Petrolina-PE, 2015.
	Orientador: Raimundo Campos Palheta Junior.
	1. <i>Cocos nucifera</i> L. 2. Inflamação. 3. <i>Bothrops jararacussu</i> I. Título II. Universidade Federal do Vale do São Francisco.  CDD 581.192

Ficha Catalográfica elaborada pelo Sistema Integrado de Biblioteca SIBI/UNIVASF.

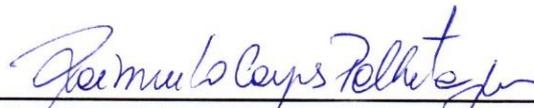
Bibliotecária: Ana Cleide Lucio

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO VALE DO SÃO FRANCISCO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA VETERINÁRIAS NO  
SEMIÁRIDO**

FOLHA DE APROVAÇÃO

**AVALIAÇÃO DA RESPOSTA ANTI-INFLAMATÓRIA DO  
ÓLEO DA COPRA DO COCO (*Cocos nucifera* L) FRENTE NA  
INFLAMAÇÃO INDUZIDA PELA TOXINA DE *Bothrops  
jararacussu* E OS MEDIADORES FLOGÍSTICOS: HISTAMINA,  
SEROTONINA, BRADICININA, SUBSTANCIA P E  
PROSTAGLANDINA E<sub>2</sub>.**

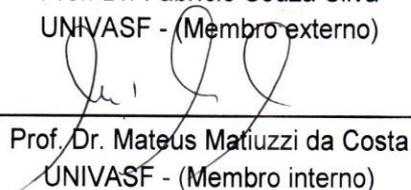
Dissertação apresentada à Universidade Federal do Vale do São Francisco – UNIVASF, Campus Ciências Agrárias, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Veterinárias no Semiárido.



Prof. DSc. Raimundo Campos Palheta Junior  
UNIVASF/ Presidente da banca (Orientador)



Prof. Dr. Fabrício Souza Silva  
UNIVASF - (Membro externo)



Prof. Dr. Mateus MatiuZZi da Costa  
UNIVASF - (Membro interno)

**Petrolina – PE, 2015.**

*A Deus, aos meus pais e irmãos, minha  
filha e esposa, sem vocês não te  
conseguido.*

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus;

Aos meus pais, Ângela Maria e Gutemberg Lisboa, pelo amor, pelo exemplo de vida que sempre me passaram e sempre confiando no meu potencial, aos meus irmãos Thiago Lisboa e Amanda Lisboa. Amo vocês incondicionalmente;

A minha filha, Júlia Machado Lisboa, razão do meu viver, meu amor, minha vida. Te amo mais que tudo;

Agradeço a Emmylena Machado, minha esposa, companheira e amiga. Obrigado pelo amor, força, carinho, pela companhia, tolerância e paciência. Te amo incondicionalmente;

Agradeço a minha sogra e sogro, Marluce e Inaldo Machado, pelo cuidado com minha filha.

Ao meu orientador Prof. Dr. Raimundo Campos Palheta Junior, pela sua amizade e orientação, obrigado por ter me dado à oportunidade de adquirir novos conhecimentos através dos seus ensinamentos;

A minha parceira de experimento, Anita Eugênia, pela dedicação, recepção e pelo auxílio durante a realização dos experimentos, obrigado;

Á meu grande amigo-pai Seldon Almeida e sua esposa Patrícia Borges, por todo carinho, aprendizado e amizade, obrigado;

Á equipe do Laboratório de Farmacologia e Biofísica (LAFABI) da UNIVASF, obrigado pelo auxílio para a execução do experimento.

Á UNIVASF, pela estrutura.

Não que eu tenha que crer em  
tudo, mas não duvido de nada.

## RESUMO

Acidentes ofídicos envolvendo serpentes do gênero *Bothrops* desencadeiam manifestações locais como edema, dor e equimose na região da picada, que podem progredir ao longo do membro acometido. Aliado à terapêutica convencional, surgiu a proposta do uso de produtos naturais como alternativa para tratamento destes acidentes ofídicos. Neste contexto, decidiu-se avaliar o efeito do óleo de coco (OC) no edema de pata induzido com a toxina da serpente *Bothrops jararacussu* (TBJ), bem como seu efeito sobre o edema provocado por outros agentes flogísticos. Foram utilizados camundongos, fêmeas (n=102, ± 40g), que após jejum de 12 horas foi medido o volume inicial (VI) da pata posterior direita através do pletismômetro. Em seguida os animais foram tratados com 0,2 mL de solução salina 0,15 M por via oral (v.o) ou OC na dose de 100, 200 ou 400 mg e, decorridos 60 minutos foi infiltrado na região dorsal do membro posterior direito por via intraplantar, TBJ na dose de 8 µg ou 30 µL de solução salina 0,15 M (veículo). Ao longo de 5 horas o volume final (VF) da pata foi determinado. Além disto, um grupo separado de animais foram pré-tratados com OC 200 mg ou salina 0,15 M (controle) e após 60 minutos, foi infiltrado 30 µL dos seguintes mediadores flogísticos: histamina (100 µg); serotonina 1%; bradicinina; substância P e prostaglandina 3 ng. Por fim, avaliou-se a migração leucocitária através da inoculação de carragenina 500 µg em camundongos pré-tratados com OC 200 mg ou salina 0,15 M. Os dados foram expressos em percentagem (média ± E.P.M) e seguido do teste de TWO-WAY-ANOVA, seguido do teste de student Newman-keuls. Em relação ao grupo controle, o OC diminuiu o edema induzido pela TBJ, histamina, serotonina e bradicinina. Além disto, o OC reduziu a migração leucocitária ao peritônio induzida pela carragenina. Entretanto este produto não reduziu o edema desencadeado pela substância P e prostaglandina. Portanto, baseado nas doses estudadas o OC apresentou atividade anti-inflamatória sobre o edema plantar induzido pela inoculação de TBJ em camundongos. Tal efeito está relacionado à inibição da migração leucocitária local, e inibição da histamina, serotonina e bradicinina.

**PALAVRAS CHAVE:** *Bothrops jararacussu*, Inflamação, *cocos nucifera*.

## ABSTRACT

Snakebites involving *Bothrops* trigger local events such as swelling, pain and bruising at the bite area, which can progress over the affected limb. Combined with conventional therapy was proposed the use of natural products as an alternative to treatment of these snakebites. In this context, it was decided to evaluate the effect of coconut oil (CO) in paw edema induced by snake toxin *Bothrops jararacussu* (BJT), as well as its effect on the edema caused by other phlogistic agents. Female mice were used ( $n = 102 \pm 40g$ ) which, after fasting for 12 hours was obese the initial volume (VI) of the right hind paw by plethysmometer. Then the animals were treated with 0.2 ml of 0.15 M saline orally (po) or Ocna dose of 100, 200 or 400 mg and after 60 minutes was infiltrated into the dorsal region of the right hind limb by intraplantar way, TBJ at 8  $\mu g$  dose or 30  $\mu L$  of 0.15 M saline (vehicle). Over 5 hours, the final volume (VF) of the foot was determined. In addition, a separate group of animals were pre-treated with OC 200 mg or 0.15M saline (control) and after 60 minutes, 30  $\mu L$  of infiltration following phlogistic mediators: histamine (100  $\mu g$ ); serotonin 1%; bradykinin; substance P and 3 ng prostaglandin. Finally, we evaluated the leukocyte migration by inoculating by carrageenan 500  $\mu g$  in mice pretreated with OC 200 mg or saline 0.15 M. Data were expressed as the percentage (average  $\pm$  E.P.M) and followed by the TWO-WAY- ANOVA test followed by the Student-Newman-Keuls test. In the control group, the OC decreased edema induced by TBJ, histamine, serotonin and bradykinin. Moreover, the OC reduced to the peritoneum leukocyte migration induced by carrageenan. However this product did not reduce the edema triggered by substance P and prostaglandin. Therefore, based on the OC doses studied showed anti-inflammatory activity on footpad edema induced by inoculating mice TBJem. This effect is related to the inhibition of local leukocyte migration, and inhibition of histamine, serotonin and bradykinin.

**KEYWORDS:** *Bothrops jararacussu*, Inflammation, *cocos nucifera*.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1- Óleo de coco extra virgem (Copra) (Fonte: <http://www.coprasul.com/products/oleo-de-coco-extra-virgem-1>). 27
- Figura 2- Aferição do volume inicial da pata (A) e posterior infiltração com *TBj* (B) (Fonte: Adaptado de Wanderley, 2012). 28
- Figura 3- Representação esquemática do protocolo utilizado para avaliar o efeito do óleo de coco sobre o edema de pata induzido por *TBj* em camundongos. 29
- Figura 4- Efeito do tratamento com óleo de coco sobre o edema de pata induzido por histamina, serotonina, substância P ou prostaglandina. 30
- Figura 5- Efeito do tratamento com óleo de coco sobre o edema de pata induzido por bradicinina. 30
- Figura 6- Migração de leucocitos através da inoculação da carragenina, em animais pré-tratados com óleo de coco. 31
- Figura 7- Demonstração representativa do efeito anti-inflamatório do óleo de coco sobre o edema de pata induzido por toxina de *Bothrops jararacussu* em camundongos. Os dados foram expressos em média  $\pm$  E.P.M.,  $n = 5$ , \*  $p < 0,05$  vs. *TBj*  $8 \mu\text{g.pata}^{-1}$ ;  $\Psi$   $p < 0,05$  vs. OC 100, 200 ou 400 mg. 32
- Figura 8- Efeito do pré-tratamento com OC 200mg sobre edema induzido pela inoculação de  $30 \mu\text{l}$  de Histamina (Hist, Box A), Serotonina 1% (5-HT, Box B) ou bradicinina (BK, BOX C) em camundongos. Os dados são expressos em % do volume inicial e cada ponto representa a média  $\pm$  E.P.M.,  $n = 5$ , \*  $p < 0,05$  vs. controle (NaCl 0,15 M). 33
- Figura 9- Efeito do pré-tratamento com OC 200mg em animais submetidos ao edema induzido pela inoculação da substancia P, SP 20 nM/pata, Box A; ou prostaglandina PGE<sub>2</sub>, 3 nM/pata, Box B. em camundongos. Os dados são expressos em % do volume inicial e cada ponto representa a média  $\pm$  E.P.M.,  $n = 7$ ,  $p < 0,05$  vs. controle (NaCl 0,15 M). 35

Figura 10- Efeito do pré-tratamento com OC 200mg ou solução salina sobre a migração leucocitária frente a indução com carragenina 500 µg. Os dados foram expressos em média  $\pm$  E.P.M., n = 7, \*  $p < 0,05$  vs. controle (NaCl 0,15 M).

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AA – Ácido araquidônico

AINES - Anti-inflamatórios não-esteroidais

ANOVA – Análise de variância

BK Bradicinina

BJV - *Bothrops jararaca*

OC – Óleo de coco

COX – Ciclooxigenase

CID – Coagulação intravascular disseminada

HIS - Histamina

i.pl. – intra-plantar

LT<sub>s</sub>- Leucotrienos

LIPOX - Lipoxigenase

MS – Ministério da Saúde

PLA<sub>2</sub>- Fosfolipase A<sub>2</sub>

PG – Prostaglandina

PGE<sub>2</sub> – Prostaglandina E<sub>2</sub>

SP – Substancia P

TBj –Toxina *Bothrops jararacussu*

V.F. – Volume final

V.I. – Volume inicial

V.O. – Via oral

5-HT - Serotonina

<b>SUMÁRIO</b>	<b>PAG</b>
1.INTRODUÇÃO.....	14
2.REVISÃO BIBLIOGRAFICA .....	15
2.1 Acidentes ofídicos.....	15
2.2 Acidentes Botrópicos.....	16
2.3 Acidentes Botrópicos <i>Jarracussu</i> .....	18
2.4 toxicodinâmica da <i>Bothrops</i> .....	19
2.5 Principais mediadores envolvidos no processo inflamatório agudo .....	20
2.6 Tratamentos farmacológicos.....	22
2.7 Potencial do <i>cocos nucifera</i> L. como agente anti- inflamatorio.....	23
3. OBJETIVOS.....	26
3.1 GERAL.....	26
3.2 ESPECÍFICOS.....	26
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	27
4.1 OBTENÇÃO DO ÓLEO DE COCO DO <i>cocos nucifera</i> L.....	27
4.2 VENENO <i>Bothrops jararacussu</i> .....	27
4.3 ANIMAIS EXPERIMENTAIS.....	28
4.4 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	28
4.4.1 Efeitos do óleo de coco sobre o edema de pata induzido por toxina <i>Bothrops jararacussu</i> .....	28
4.4.2 Efeito do tratamento com óleo de coco sobre o edema de pata induzido por histamina, serotonina, bradiginina, substancia P ou prostaglandina.....	29
4.4.3 Migração de leucócitos peritoneais através da inoculação da carragenina, em animais pré-tratados com óleo de coco.....	31
4.5 ANALISES ESTATÍSTICAS.....	31
5. RESULTADOS.....	32
5.1 Efeitos do óleo de coco sobre o edema de pata induzido por toxina <i>Bothrops jararacussu</i> em camundongos.....	32
5.2 Efeitos do tratamento com óleo de coco sobre o edema de pata induzido por prostaglandina, histamina, serotonina, substancia P e bradiginina.....	33
5.3 Migração leucocitária através da inoculação da carragenina em animais pré-tratados com óleo de coco 200 mg.....	36

6. DISCUSSÃO.....	38
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	44
REFERÊNCIAS .....	45

## 1 INTRODUÇÃO

Com o avanço da etnofarmacologia tem proporcionado a elucidação de efeitos terapêuticos ou preventivos de substâncias provenientes de produtos naturais, além disto, vem contribuindo para a compreensão de eventos biológicos como a inflamação (ALMEIDA *et al.*, 2013). Dentre estes produtos de origem vegetal com potencial bioativo e/ou nutracêutico o coco têm recebido destaque (DEBMANDAL e MANDAL, 2011). Do ponto de vista experimental, foi descrito a ação anti-inflamatória e antipirética do extrato de coco frente aos mediadores carragenina e formalina, respectivamente, em roedores (ZAKARIA *et al.*, 2006; SILVA *et al.*, 2013).

A partir desse conhecimento e considerando que no Brasil a incidência de acidente ofídico, é um problema de saúde pública (FERREIRA *et al.*, 2004), dentre os quais, a intoxicação por serpentes do gênero *Bothrops* é responsável por mais de 90% dos casos no território brasileiro, e que esta intoxicação caracteriza-se pela presença de edema, dor e equimose local (NASCIMENTO *et al.*, 2010), há uma procura de tratamentos alternativos e complementares, como a utilização de AINES, uma vez que a soroterapia não atua sobre as manifestações locais ocasionadas pelo envenenamento por serpentes do gênero *Bothrops* (QUEIROZ *et al.*, 2008).

Entretanto, alguns efeitos adversos graves como gastropatias e nefropatias têm sido observados com a utilização dos AINES (CARVALHO *et al.*, 2004). Portanto, estudos envolvendo substâncias obtidas de produtos naturais e que tenham poucos efeitos colaterais são necessários, sendo que os princípios ativos obtidos de produtos naturais mostraram-se promissores no tratamento de episódios inflamatórios induzidos pela toxina botrópica (da SILVA *et al.*, 2015).

Neste sentido, como foi descrito a atividade anti-inflamatória e analgésica do extrato bruto obtido do coco da Bahia (*Cocos nucifera*), em modelos experimentais de inflamação e dor em ratos (RINALD *et al.*, 2009; SILVA *et al.*, 2013), decidiu-se avaliar o possível mecanismo anti-inflamatório produzido pelo óleo de coco sobre o edema de pata induzido com a toxina de *Bothrops jararacussu*, através da utilização de diversos agentes flogísticos, como: carragenina, serotonina, prostaglandina, histamina e substancia P.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. Acidentes Ofídicos

De forma geral, as serpentes são animais vertebrados, ectotérmico, de corpo alongado coberto de escamas que compõem a classe Reptília, ordem Squamata, subordem Ofídica, sendo a maioria produtora de veneno (ZUG et al., 2000).

No mundo, existem aproximadamente 3 mil espécies de serpentes registradas que podem ser encontradas em todos os continentes com a exceção dos pólos. Dentre as quais destacam-se a Família Viperidae constituída pelo gênero *Bothrops* (jararaca), *Crotalus* (cascavel) e *Lachesis* (surucucu), a Família Elapidae representada pelo gênero *Micrurus* (cobra coral) (KOLESNIKOVAS, 2001). No Brasil, são conhecidas 366 espécies, das quais, 55 espécies (15%) são classificadas como peçonhentas (BERNILS et al., 2010). A ocorrência do acidente ofídico está, em geral, relacionada a fatores climáticos e aumento da atividade humana nos trabalhos no campo (SILVA et al., 2007).

Segundo Silva et al. (2007), nos países tropicais, os acidentes ofídicos representam um sério problema de saúde pública, principalmente pela frequência com que ocorrem e pela mortalidade que ocasionam, excedendo a 2,5 milhões de acidentes por ano no mundo.

No Brasil a prevalência dos acidentes ofídicos varia de região para região, de acordo com Araújo et. al., (2003), as regiões Sudeste e Sul são as que registram um maior número de acidentes, devido à maior densidade populacional e o acesso a serviços de saúde e sistemas de informações sobre notificações.

Ocorre, por ano, no Brasil entre 19.000 a 22.000 acidentes ofídicos com aproximadamente 115 óbitos (GUTIÉRREZ et al, 2005). Os números de acidentes ofídicos ocorridos entre 2000 a 2010 apresentaram aumento de 200%, onde somente em 2010 foram registrados 30 mil casos de ofidismo em todo o território nacional (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014). Dados do Ministério da Saúde, (2005), mostram que a letalidade do acidente ofídico está ligada a quantidade de toxina inoculada, ao tipo de envenenamento, e ao tempo de atendimento médico após o acidente, podendo aumentar em até oito vezes essa taxa se o tempo de atendimento for maior que seis horas após picada.

Há frequência de acidentes ofídicos, nos animais domésticos, no Brasil, ainda é imprecisa, visto que a notificação não é obrigatória na medicina veterinária (BARNI et al., 2012). Apesar da grande importância econômica que os animais possuem, raramente os casos são notificados e a causa de morte estabelecida a campo, culminando com poucos dados sobre o quadro clínico e a patologia provocada pela toxina dessas serpentes aos animais (SAKATE, 2008).

## 2.2 Acidentes Botrópicos

Com mais de 60 espécies encontradas em todo território brasileiro, o gênero *Bothrops* destaca-se também por ser o grupo de maior importância dentre as serpentes peçonhentas, tendo como as principais espécies *Bothrops moojeni*, *Bothrops alternatus*, *Bothrops jararaca*, *Bothrops atrox*, *Bothrops jararacussu* e *Bothrops erythromelas* (CAMPBELL & LAMAR, 2004; ARAÚJO et al., 2003). Considerando a média dos últimos dez anos, no Brasil, o número aproximado de acidentes ofídicos chegaria a 25 mil por ano, sendo que deste total a proporção dos casos anuais e as respectivas taxas de letalidade revelam que 90,5% são acidentes botrópicos cujo a letalidade gira em torno de 0,31%, seguido de crotálicos (cascavéis) 7,7% (com 1,87% de letalidade), laquéuticos (surucucus) 1,4% (0,95% de letalidade) e elapídicos *Micrurus* (“corais verdadeiras”) 0,4% (0,52% de letalidade) (ARAÚJO et al., 2003).

Os efeitos das toxinas ofídicas são classificados de acordo com suas atividades fisiopatológicas em nível local e sistêmico. Considerando o gênero *Bothrops* as principais manifestações sistêmicas relacionadas são caracterizadas por distúrbios da homeostasia, coagulação intravascular disseminada, cardiopatia, nefropatia, hemorragia e choque. Já os efeitos locais descritos são necrose, edema, e dor intensa (GUTIERREZ; RUCAVADO, 2000; BONAVITA et al., 2006). As principais complicações locais dos acidentes botrópicos são decorrentes da necrose e da infecção secundária que podem levar à amputação e/ou déficit funcional do membro (SINAN, 2014). Sendo que a intensidade destes sintomas pode estar relacionada diretamente com a quantidade de veneno inoculado (FERREIRA; BARRAVIEIRA, 2004; PINHO; PEREIRA, 2001; CARDOSO et al., 2003.)

Na literatura, a participação de mediadores na resposta inflamatória induzida por serpentes do gênero *Bothrops*, assim como a interação biológica entre substâncias presentes no veneno e componentes da resposta imune, já está bem caracterizada (Tabela 1) (TREBIEN; CALIXTO, 1989; BARBOSA et al., 2003; ARAÚJO et al., 2000)

Tabela 1. Mediadores da resposta inflamatória envolvidos no edema induzido por venenos botrópicos.

Agentes flogísticos	Serpentes do gênero <i>Bothrops</i>			
	<i>Bothrops jararaca</i>  (TREBIEN; CALIXTO, 1989; GONÇALVES; MARIANO, 2000)	<i>Bothrops insulares</i>  (BARBOSA et al., 2003).	<i>Bothrops moojeni</i>  (NASCIMENTO et al., 2009)	<i>Bothrops lanceolatus</i>  (ARAÚJO et al., 2000)
<b>Prostanoides</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>+</b>
<b>Histamina</b>	<b>-</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>-</b>
<b>Serotonina</b>	<b>+</b>	<b>-</b>	<b>Na</b>	<b>-</b>

**No                      Na                      +                      -                      Na**

Fonte: Adaptado: (WANDERLEY et al., 2014).

Não analisados (NA)

A toxicodinâmica da toxina botrópica está relacionada à composição da toxina botrópica que contém 90% do peso seco de proteínas, compreendendo grande variedade de enzimas como: fosfolipases, fosfodiesterases, cininogenases, acetilcolinesterases, hialuronidases, fatores relacionados à coagulação, inflamação e necrose local (MÉNDEZ, 2001). Além destas enzimas há também carboidratos, lipídeo, aminas biogênicas, lecitina e outros componentes inorgânicos (ESCARSO et al., 2000; KETELHUT et al., 2003; PANUNTOA et al., 2006).

### **2.3. Acidentes Botrópicos *jararacussu***

A *Bothrops jararacussu* pode ser encontrada nas regiões Sul, Sudeste e Nordeste do Brasil, e é considerada uma das maiores espécies do gênero podendo alcançar 2,2 m de comprimento, e em um único bote pode inocular até 1200 mg de veneno. É conhecida por sua coloração característica á região frontal da cabeça negra e as laterais amarelas, possui o dorso de coloração negra com intervalos oblíquos de coloração amarela forte e o ventre predominantemente amarelo (CAMPBELL; LAMAR, 2004; MELGAREJO, 2003; ARCOLINE 2006).

Sendo considerada a mais importante dentre as espécies do gênero *Bothrops*, a *Bothrops jararacussu* é a espécie que produz maior quantidade de toxina, ocasionando acidentes graves. E apesar de sua difusão ao longo do território brasileiro, as pesquisas com sua toxina ainda são escassos (JUNQUEIRA, 2005), diante disto, recentemente foi investigado a possível toxicodinâmica envolvida no edema local induzido por esta toxina (WANDERLEY et al. 2014).

## 2.4. Toxicodinâmica da *Bothrops*

Os venenos botrópicos possuem uma composição mais complexa que os venenos de espécies de outros gêneros. Aproximadamente 90% das substâncias encontradas nos venenos botrópicos são constituídos por peptídeos, proteínas, compreendendo uma grande variedade de enzimas, além da existência de carboidratos, lipídeos, aminas biogênicas, lectinas (principalmente do tipo C), e outros componentes inorgânicos. Sua composição, em geral, contém fosfolipases (PLAs), que alteram a permeabilidade da membrana e liberam histaminas e bradicininas, as hemotoxinas e citolisinas, que causam por sua vez uma inflamação local, necrose e dano ao epitélio vascular, hialuronídeses, que explica a rapidez da absorção pelo aumento da perfusão através dos tecidos, fosfodiesterases, fosfatases, acetilcolinesterases, L-aminoácidos oxidases (LAAOs), nucleotidasas, metaloproteases e fatores relacionados a coagulação (ESCARSO et al., 2000; KETELHUT et al., 2003; KASHIMA et al., 2004; MENDEZ; RIET-CORREA, 1995 apud RIVERO, 2010 p. 6; PANUNTOA et al., 2006).

Mecanismos fisiopatológicos induzidos pela injeção intraplantar da toxina do Gênero *Bothrops*, em ratos, demonstraram que participam diferentes mediadores no processo inflamatório (TREBIEN; CALIXTO, 1989; GONÇALVES; MARIANO, 2000; ARAÚJO et al., 2000; BARBOSA et al., 2003). Segundo Calixto et al. (1989), com relação aos efeitos locais induzidos pela toxina da *Bothrops jararaca*, constatou-se a ação de mediadores oriundos da atividade da cicloxigenase (COX) e lipoxigenase (LIPOX) e o envolvimento dos receptores  $\alpha_1$  e  $\alpha_2$ - adrenérgicos como os principais agentes envolvidos nas ações edematogênicas da toxina, sendo que, a hemorragia observada foi parcialmente atribuída a atividade da serotonina e de mediadores neuro-humorais.

Contudo, Moreira et al. (2009) demonstrou que a incubação da toxina bruta da *Bothrops asper* com neutrófilos ou macrófagos induz a expressão da COX-2. Além disso, a lectina purificada a partir do veneno da *Bothrops jararacussu*, pode reconhecer glicoligantes na superfície de neutrófilos e promover a polarização e a migração de neutrófilos *in vitro* (ELIFIO-ESPOSITO et al. 2011). Portanto, a ação biológica da toxina botrópica pode estar relacionada a uma interação direta com células do sistema imune (WANDERLEY et al., 2014).

De acordo com Sakater et al. (2008), as substâncias responsáveis pela ação coagulante da toxina botrópica, em animais, são a botrojararacina, a botrompina e a jararagina C. Experimentos, em ratos, relataram que a inflamação local induzida pelo veneno *Bothrops jararacussu* e *Bothrops jararaca* é responsável também pelo dano muscular (PATRÃO-NETO et al., 2013). Contudo, estudos sugerem que dentro do mesmo gênero podem ocorrer variações quanto a participação de mediadores e mecanismos envolvidos na resposta inflamatória local, devido a um possível efeito espécie-específico das toxinas que seriam capazes de modular a resposta inflamatória endógena por diferentes vias (WANDERLEY et al., 2014).

## **2.5. Principais mediadores envolvidos no processo inflamatório agudo.**

O processo inflamatório é desencadeado através da resposta vascular, celular e humoral, responsável pelo processo defensivo dos organismos vivos frente a agentes agressores. Os mediadores da inflamação podem agir solitariamente, em conjunto ou em sequência, ampliando assim sua resposta inflamatória que só terminará quando o agente agressor é eliminado e os mediadores secretados são destruídos (PEREIRA, 2004). Este processo fisiológico envolve uma ação coordenada entre o sistema imunológico e o tecido no qual ocorreu a lesão. Assim as reações vasculares e celulares da inflamação aguda e crônica estão relacionadas a fatores químicos derivados de proteínas ou células plasmáticas, que por sua vez são produzidos ou ativados pelo estímulo inflamatório de agentes agressores (PEREIRA, 2004).

Os mediadores químicos da inflamação são substâncias que podem ser sintetizadas no local da inflamação, pelas células, ou ainda, podem ser produzidas pelo fígado e encontrar-se circulando no plasma sanguíneo na forma de precursores inativos que são ativados no local da inflamação (COLLINS, 2000). Esses mediadores também podem estimular a liberação de moléculas efetoras secundárias pelas células-alvo. Os mediadores químicos distintos podem apresentar ações similares, amplificando a resposta, além disso, podem, apresentar efeitos opostos, funcionando, desta forma, no controle da resposta inflamatória (PEREIRA, 2004).

De acordo com Abbas et al. (2008), os mediadores químicos derivados de células são encontrados nos grânulos intracelulares, sendo estes sintetizados em resposta a um estímulo ou liberados após ativação celular. Entre os principais

mediadores liberados, estão as aminas vasoativas (histamina e serotonina) e os metabólitos do ácido araquidônico (prostaglandinas, leucotrienos e lipoxinas), além das citocinas (fator de necrose tumoral-TNF, interleucina-1 e quimiocinas).

A histamina e serotonina encontram-se pré-formadas nos grânulos citoplasmáticos das células e apresentam efeitos similares. A histamina é sintetizada por diferentes tipos celulares, especialmente pelos mastócitos adjacentes aos vasos, pelos basófilos e plaquetas circulantes, sendo liberada das células em resposta a um estímulo físico, imune ou químico, advindo de citocinas, anafilatoxinas e neuropeptídeos. Este mediador leva à dilatação arteriolar, aumentando a permeabilidade do vaso e, conseqüentemente, facilitando a saída de leucócitos para o sítio inflamatório. A serotonina, também chamada de 5-hidroxitriptamina (5-HT), é encontrada primariamente em grânulos plaquetários e liberada durante a agregação das plaquetas (ABBAS et al., 2008). A 5-HT contribui para a sensibilização das fibras nervosas, além do extravasamento de plasma observável na inflamação da pata de ratos (PIERSE, 1995). A partir de um processo inflamatório agudo a 5-HT modula a sinalização quimiotáxica responsável pela migração de neutrófilos durante uma resposta imune inata (DUERSCHMIED et al., 2013). Esta migração celular, em resposta a processos inflamatórios, pode ser observada em poucas horas após um estímulo responsável pela injúria tecidual (BRESNIHAN, 2002; SHIN et al., 2009).

Os metabólitos do ácido araquidônico (AA), prostaglandinas, tromboxanos e leucotrienos, também chamados de eicosanoides, são substâncias lipídicas derivadas do metabolismo do AA, que podem mediar, praticamente, cada etapa do processo inflamatório agudo. Diversos estímulos fisiológico ou mesmo patológico podem desencadear a biossíntese dos metabólitos do AA através da ativação das fosfolipases  $A_2$  (PLA<sub>2</sub>), que uma vez ativadas clivam os fosfolípidios da membrana liberando o AA. As principais células fontes de metabólitos do AA na inflamação são os leucócitos, mastócitos, células endoteliais e plaquetas (LONE; TASKEN, 2013).

O metabolismo do AA é realizado por duas vias principais: Via da COX e LIPOX. Via da COX resulta na produção de prostaglandinas (PGE<sub>2</sub>, PGF<sub>2</sub> e PGD<sub>2</sub>), prostaciclina (PGI<sub>2</sub>) e tromboxano (TXA<sub>2</sub> e TXB<sub>2</sub>). As duas primeiras levam à vasodilatação, inibição da agregação plaquetária e estão envolvidas na patogenia da dor e febre no processo inflamatório. O último está relacionado com o processo de coagulação, uma vez que leva à vasoconstrição e promove a agregação plaquetária (ABBAS et al., 2008).

As COX apresentam três isoformas denominadas COX-1, que é uma enzima constitutiva e está presente na maioria das células, a COX-2 que é uma forma induzível da enzima e está presente em vários tipos de células e tecidos sendo expressa principalmente a partir da sinalização das citocinas como o TNF e a IL-1 durante a resposta inflamatória e a COX-3, que parece desempenhar uma atividade semelhante a da COX-1 no Sistema Nervoso Central (SNC), mas, o seu papel em processos patológicos ainda não é bem elucidado (COLLINS, 2000, NETO et al., 2011, LONE; TASKEN, 2013).

Já a via da LIPOX resulta na produção de leucotrienos e lipoxinas. Os leucotrienos são produzidos por neutrófilos e alguns macrófagos, sendo quimiotático para neutrófilos, causam broncoespasmo, vasodilatação e aumento da permeabilidade vascular (ABBAS et al., 2008).

A inflamação aguda local apresenta três fases distintas, onde na primeira fase ocorrem alterações no calibre vascular, levando ao aumento no fluxo sanguíneo; na segunda fase iniciam-se as alterações estruturais na microcirculação, que permite a passagem de proteínas plasmáticas e leucócitos através do endotélio; na terceira fase ocorre a migração de leucócitos da microcirculação para o foco da lesão (COLLINS, 2000; RINGLER, 2000).

Esse conjunto de alterações vasculares leva a formação de edema e infiltração celular nos tecidos. No edema inflamatório, ocorre inicialmente uma vasoconstrição, logo em seguida, uma vasodilatação reflexa. A transição de constrição para dilatação vascular é mediada por fatores derivados de mastócitos como leucotrienos (LTs), prostaglandinas (PGs) e, particularmente, a histamina e a 5-HT contribuem para a vasodilatação. Com o aumento no calibre do vaso gera uma intensificação do fluxo sanguíneo local, levando a um extravasamento do fluido intravascular e infiltração de células para o interstício (ALLER, 2006).

## **2.6. Tratamento Farmacológico para a intoxicação botrópica.**

O tratamento farmacológico mais utilizado para a intoxicação botrópica é a terapia com soro anti-botrópico (antiveneno), soro obtido de equinos imunizados com um *pool* de venenos nativos, na qual a dose de antiveneno administrada é determinada pela sintomatologia do envenenamento, seja classificada como leve, moderada ou grave (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2001).

O soro antiofídico constitui-se de uma mistura de cinco venenos botrópicos com as seguintes composições: 50% de veneno de *Bothrops jararaca*, e outros 50% constituídos de 12,5% de veneno de *Bothrops alternatus*, 12,5% *Bothrops jararacussu*, 12,5% *Bothrops moojeni* e 12,5% *Bothrops neuwiedi* (RAW et al., 1991). Entretanto, estudos realizados *in vitro*, com várias espécies do gênero *Bothrops*, demonstraram que a soroterapia é ineficiente em neutralizar completamente a atividade da PLA<sub>2</sub> e da Hialuronidase presentes na toxina (CARDOSO et al., 1993; QUEIROZ, et al., 2008), com isso, mesmo com a utilização do soro antiofídico, a medida que há progressão no processo inflamatório local, o restabelecimento da integridade tecidual torna-se comprometida, devido a presença de elementos espécie-específicos, que não são neutralizados pela ação do soro polivalente (JORGE; RIBEIRO, 1997; CARDOSO et al., 1993; DOIN-SILVA R, et al., 2008; QUEIROZ et al., 2008).

Esta baixa neutralização do veneno da *Bothrops jararacussu* por antiveneno botrópico deve-se a diferenças imunológicas entre as proteinases desta peçonha e os anticorpos presentes no antiveneno botrópico (QUEIROZ et al., 2008). A intoxicação botrópica, por ser um processo multifatorial com participação direta de componentes endógenos relacionados com o processo inflamatório, por isso, se tem investigado tratamentos alternativos e complementares, visando dessa maneira a utilização de agentes com atividade anti-inflamatórias, uma vez que a soroterapia não atua sobre as manifestações locais ocasionadas pela toxina do gênero *Bothrops* (NASCIMENTO et al., 2010).

## **2.7. Potencial do *Cocos nucifera* L como Agente Anti-inflamatório.**

Nos últimos anos, com o avanço da etnofarmacologia, pesquisas voltadas para a elucidação de eventuais efeitos terapêuticos ou preventivos de substâncias provenientes de produtos naturais estão em expansão, e a partir disto, novas descobertas estão contribuindo para a compreensão da modulação de eventos biológicos dentre os quais a inflamação (ALMEIDA *et al.*, 2013; da SILVA *et al.* 2015).

A grande maioria das substâncias obtidas da natureza com potencial anti-inflamatório são extraídas de plantas. Dentre estes produtos de origem vegetal com potencial etnofarmacológico temos os produtos obtidos do coco, cujo o fruto pode ser considerado um alimento funcional, pois é rico em proteínas, carboidratos, óleos e

minerais e vários componentes benéficos à saúde, sendo portanto, classificados como nutracêuticos (DEBMANDAL e MANDAL, 2011). Na gordura do albúmen do coco predominam ácidos graxos saturados de cadeia média com uma relação entre ácidos graxos insaturados e saturados (I:S) de 0,15, constituída basicamente dos seguintes ácidos graxos, pela ordem de quantidade: Ácido láurico 44-52%, Ácido mirístico 13-19%, Ácido palmítico 7,5-10,5%, Ácido oléico 5,8%, Ácido caprílico 5,5-9,5%, Ácido cáprico 4,5-9,5%, Ácido linoléico 1,5-2,5%, Ácido esteárico 1-3%, Ácido caprótico 0,3-0,8% e Ácido araquídico até 0,04% (LI et al., 1990).

Em dietas convencionais e terapêuticas com reconhecidas propriedades benéficas ao metabolismo de cães e gatos, há uma variedade de derivados lipídicos. Sendo que os lipídios são constituintes orgânicos importantes na alimentação, não só pelo seu elevado valor energético, mas também pela composição de ácidos graxos essenciais que participam de mecanismos funcionais importantes no organismo dos animais (RIVERS et al., 1975).

Dentre estes os ácidos graxos essenciais tem-se, os ácidos graxo  $\omega$ -3 que possui ação anti-inflamatória, mediante a redução na síntese de derivados do ácido araquidônico: PGE<sub>2</sub>, TXA<sub>2</sub>, PGI<sub>2</sub> e LTB<sub>4</sub> (SARDESAI, 1992). Portanto, estima-se que a suplementação com ácidos graxos eicosapentaenóico (EPA) e docosahexaenóico (DHA) ( $\omega$ -3), pode atenuar os efeitos advindos destes eicosanoides envolvidos no processo inflamatório (SARDESAI, 1992).

A partir destes achados, surge a possibilidade de mitigar a utilização de substâncias sintéticas como os anti-inflamatórios não esteroidais (AINES), hora utilizados como ferramenta farmacológica para diminuir a atividade das COXs, e a partir disto, reduzir os efeitos adversos provenientes da utilização destes AINES em animais domésticos (de SANTIS et al., 2009).

De acordo com Adebayo et al. (2012), as diversas variedades de *Cocos nucifera* são encontrados em todas regiões tropicais. O extrato aquoso da fibra bruta da casca do *Cocos nucifera* é amplamente utilizada no nordeste brasileiro na medicina tradicional para tratar a diarreia e artrite (ESQUENAZI et al., 2002). Durante os últimos anos, tem sido mostrado, através de várias pesquisas, que a variedade do *Cocos Nucifera* possui atividade antibacteriana, antiviral, antioxidante, anti-neoplásica, e anti-inflamatória. (ESQUENAZI et al., 2002; ALVIANO et al., 2004; KIRSZBERG et al., 2003; KOSCHEK et al., 2007; RINALDI et al., 2009).

Baseado nesta rica composição, alguns estudos foram conduzidos para elucidar o potencial bioativo e/ou nutracêutico do coco. Dentre os quais o líquido originário deste fruto nos últimos anos vem sendo utilizado como substância nutritiva em protocolos de diluição de sêmen na reprodução animal (UCHOA et al., 2002), e recentemente foi descrito seu potencial científico como solução de reidratação hídrico-eletrolítica em seres humanos (KALMAN et al. 2012; REIS et al., 2012). Já o óleo obtido do coco vem sendo utilizado, na medicina popular como adjuvante no combate a febre, dor de cabeça e de estômago, e eventos como a diarreia (ESQUENAZI et al., 2002). Estudos mais recentes comprovam, também, ações anti-inflamatória e antipirética, em animais alimentados com o óleo de coco (ZAKARIA et. al., 2006).

Do ponto de vista bioquímico, vale ressaltar que a utilização do óleo de coco, reduz o nível plasmático de colesterol total, triacilgliceróis, fosfolipídios, lipoproteína de baixa densidade (LDL) e (VLDL), e ter elevado os níveis de lipoproteína de alta densidade no soro e tecidos de animais (NEVIN & RAJAMOHAN, 2008). Além disto, tem sido relatado que o óleo de coco é capaz de aumentar a atividade de enzimas antioxidantes como a glutathione peroxidase, diminuindo os níveis de peróxidos de lipídios além de ter atividade antitrombótica (NEVIN & RAJAMOHAN, 2008).

Recentemente foi descrito a atividade antiinflamatória e analgésica do extrato bruto obtido do coco da Bahia (*Cocos nucifera*), em modelos experimentais agudos de inflamação e dor em ratos (RINALD et al 2009; SILVA et al. 2013). Sendo que até o presente momento acredita-se que o efeito anti-inflamatório seja mediado em parte pelo bloqueio de receptores serotoninérgicos e histaminérgicos, e o efeito analgésico seja por uma ação opióide (RINALD et al 2009). Diante disto, decidimos avaliar o possível mecanismo anti-inflamatório produzido pelo óleo de coco sobre o edema de pata induzido com a toxina de *Bothrops jararacussu*, através da utilização de diversos agentes flogísticos, ex. histamina, serotonina, prostaglandina, substancia P e carragenina.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1. GERAL**

Avaliar o efeito do óleo de *Cocos nucifera* L. (OC) sobre o processo inflamatório induzido com a toxina da serpente *Bothrops Jararacussu* (TBj) e investigar os possíveis mecanismos de ação anti-inflamatório advindos deste óleo.

#### **3.2. ESPECÍFICOS**

- Avaliar o efeito do OC sobre o edema de pata induzido pela histamina, serotonina, bradicinina, substancia P e prostaglandina E<sub>2</sub> em camundongos, bem como, avaliar a migração de leucócitos ao peritônio induzida pela inoculação da carragenina, em camundongos pré-tratados com OC.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi desenvolvido no Campus de Ciências Agrárias, da Universidade Federal do Vale do São Francisco – UNIVASF. Os procedimentos foram conduzidos após aprovação no comitê de ética no uso de animais de experimentação (protocolo 12081038) da Instituição, seguindo as normas do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal.

### 4.1. OBTENÇÃO DO ÓLEO COCO DO *Cocos nucifera* L.

O óleo de coco extra virgem (figura 2) utilizado neste experimento foi obtido a partir da película do endosperma do fruto do coqueiro (*cocos nucifera* L.) adequadamente prensada através de processos tecnológicos adequados, não passando por nenhum tratamento químico nem refinamento. Com composição: Carotenóides totais (mg/100g, máx. 1,0), Ácidos graxos saturados (Mín. 85), ácidos graxos (g/100g, C 6:0 caprício 0,4 - 0,6; C 8:0 caprílico 5 – 10; C 10:0 cáprico 4,5 - 8,0; C 12:0 láurico 43,0 - 51,0; C 14:0 mirístico 16,0 - 21,0; C 16:0 palmítico 7,5 – 10; C 18:0 esteárico 2,0 - 4,0; C 18:1 Ômega 9 oléico 5 – 10; C 18:2 Ômega 6 linoléico 1 - 2,5) (<http://www.coprasul.com/info/especificacoes>). O mesmo foi mantido na temperatura ambiente para utilização, por via oral, nos animais.

Figura 1 Óleo de coco extra virgem (Copra)



(Fonte <http://www.coprasul.com/products/oleo-de-coco-extra-virgem-1>)

### 4.2. VENENO *Bothrops jararacussu*

O veneno liofilizado de *Bothrops jararacussu* (TBj) utilizado neste experimento foi cedida pelo Instituto Butantan, São Paulo, Brasil. O TBj foi mantida a -20 ° C e diluído em 0,9% de solução salina estéril para utilização (WANDERLEY et al., 2014).

### 4.3. ANIMAIS EXPERIMENTAIS

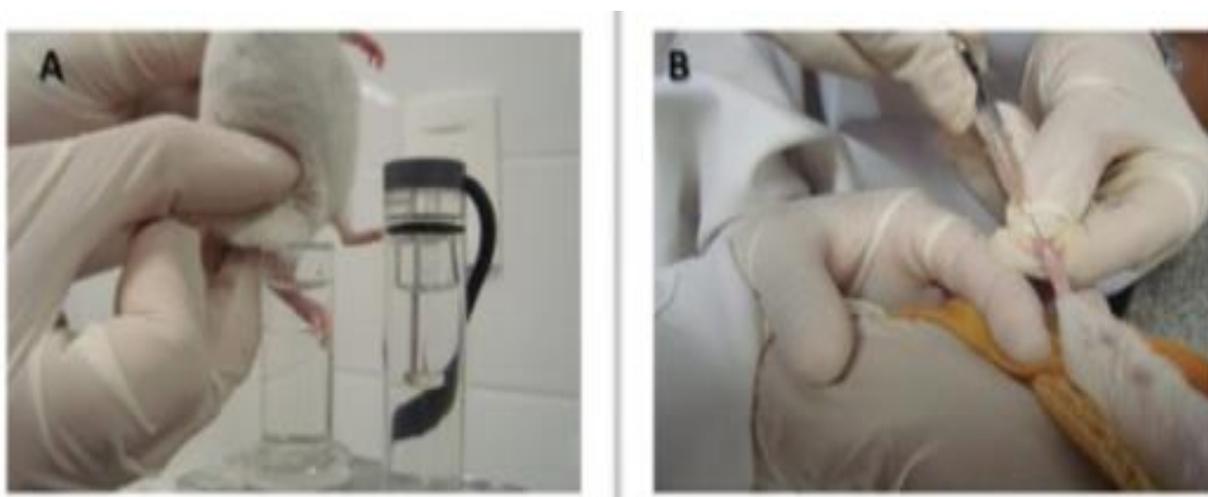
Foram utilizados camundongos Swiss, fêmeas, pesando de 30 a 40 g provenientes do Biotério Central da UNIVASF, mantidos em sala com controle do ciclo claro/escuro de 12 horas, a temperatura ambiente de 22°C, com livre acesso a ração (Presence Linha Roedores) e água.

### 4.4. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

#### 4.4.1. Efeitos do óleo de coco sobre o edema de pata induzido por toxina *Bothrops jararacussu* (TBj)

Para este estudo, os animais foram submetidos ao jejum de 12 h, e seguir foi mensurado o volume inicial (VI) da pata posterior direita até a articulação tarsometatársica através do pletismômetro digital (Pan Lab, LE 7500, Figura 3).

**Figura 2.** Aferição do volume inicial da pata (A) e posterior infiltração com TBj (B).



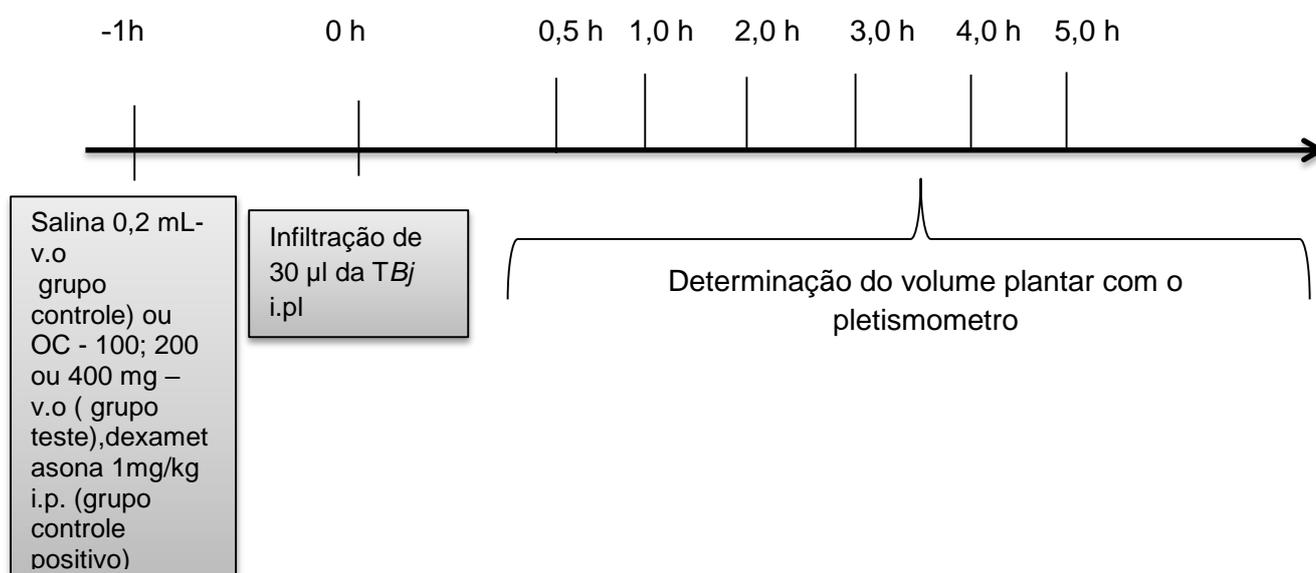
FONTE: WANDERLEY, 2012.

A toxina total da TBj foi dissolvida em solução NaCl 0,15 M na dose de 8  $\mu\text{g}/30 \mu\text{l}$ . Como representado pela figura 4, 60 min. antes da indução do edema plantar, os animais foram pré-tratados por via oral (v.o) com 0,2 mL de solução salina (grupo controle), óleo de coco na dose de 100, 200 ou 400mg (v.o) (grupo teste), para o grupo controle positivo, os animais receberam dexametasona, intraperitoneal na

dose 1mg/kg. Após 60 min, 30 µl da solução de NaCl 0,15 M estéril ou TBj 8 µg foram injetadas na região intra-plantar (i.pl.) do membro posterior direito transcorridos 0,5; 1; 2; 3; 4 e 5 horas da administração da toxina ou salina o volume final (VF) da pata foi determinado com o uso do pletismômetro. A percentagem de aumento no volume plantar (edema) foi calculada para cada grupo, em comparação com o VI obtido, e foi expresso através da seguinte fórmula:

$$\Delta \text{ de volume podal (\%)} = \frac{(\text{VF} - \text{VI}) \times 100}{\text{VI}}$$

**Figura 3:** Representação esquemática do protocolo utilizado para avaliar o efeito do óleo de coco sobre o edema de pata induzido por TBj em camundongos.

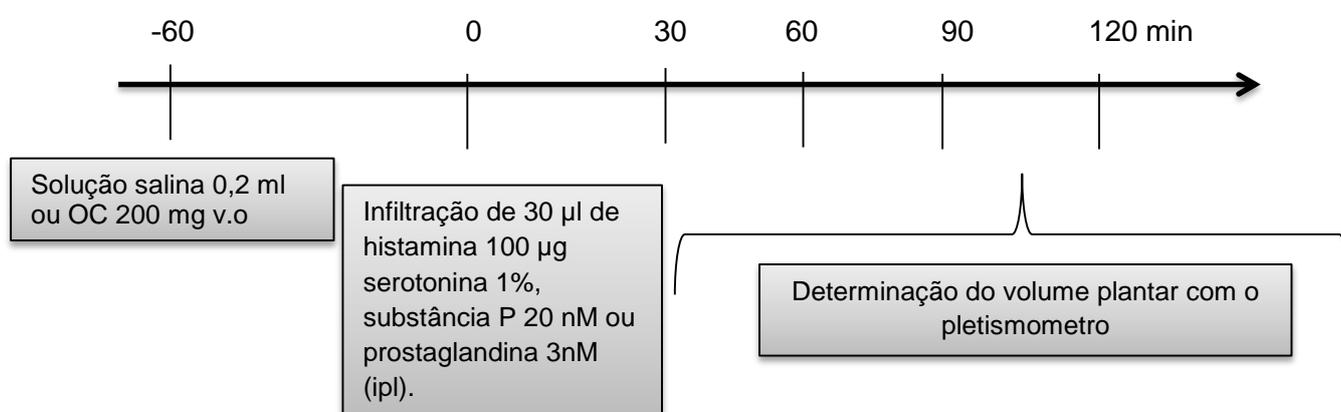


#### 4.4.2. Avaliação do efeito do tratamento com óleo de coco sobre o edema de pata induzido por histamina, serotonina, bradicinina, substância P ou prostaglandina.

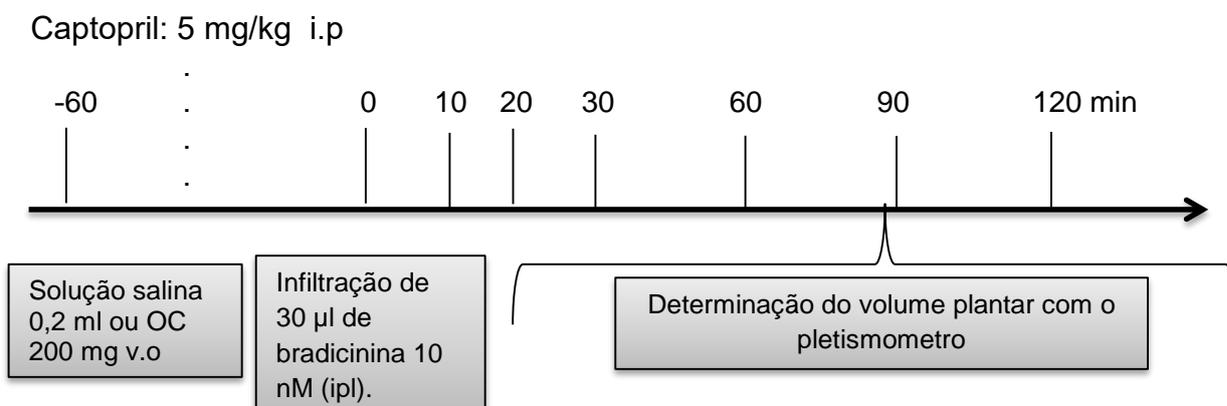
Para esta investigação, como representado na figura 5, após determinação do volume plantar inicial, os animais foram submetidos ao tratamento (v.o.) com 0,2 mL de NaCl 0,15 M (grupo controle), já o grupo teste recebeu óleo de coco (200 mg, v.o). a partir deste momento para esta dose será designado de OC. Decorridos 60 min, foi realizada a inoculação na pata direita dos animais (ipl.) com 30 µl de histamina (100 µg/pata), serotonina 1 %, substância P (20 nM/pata), ou prostaglandina (3 nM/pata) Após 30, 60, 90 e 120; minutos da administração destes agentes flogísticos o VF da

pata foi determinado com o uso do pletismógrafo (ver item 4.4.1). Considerando a biodisponibilidade da bradicinina, ela foi administrada na dose de 10 nM/pata, e as avaliações do volume plantar foram feitas ao no período de 10, 20, 30, 60, 90 e 120 min. após a infiltração deste autacóide, sendo que os animais deste grupo receberam tratamento prévio com captopril 5mg/kg, 30 minutos antes da administração da bradicinina.

**Figura 4:** Avaliação do efeito do tratamento com óleo de coco sobre o edema de pata induzido por histamina, serotonina, substância P ou prostaglandina.



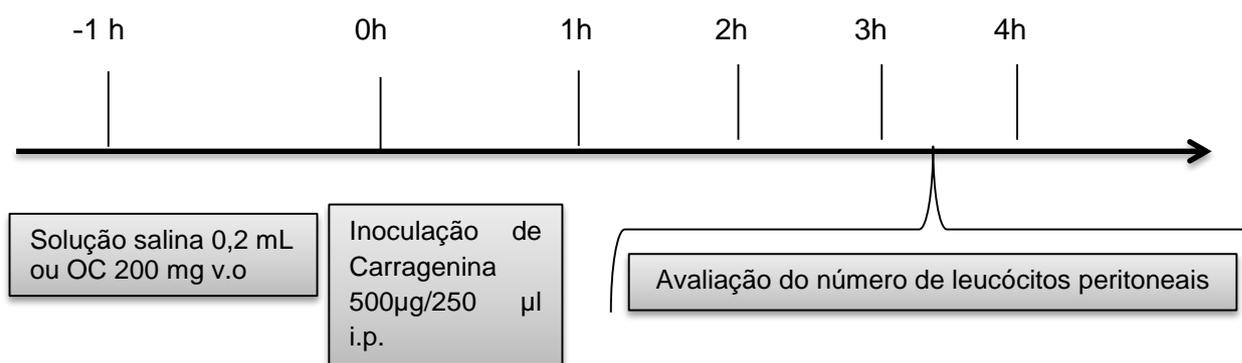
**Figura 5:** Avaliação do efeito do tratamento com óleo de coco sobre o edema de pata induzido por bradicinina.



#### 4.4.3. Avaliação da migração de leucócitos peritoneais através da inoculação da carragenina, em animais pré-tratados com óleo de coco.

Para esse protocolo de determinação da migração de leucócitos para a cavidade peritoneal, foi adaptado a partir de Chaves et al.(2013), onde os animais foram submetidos a jejum de 12 h, a seguir, como representado pela figura 7, os animais foram pré-tratados com OC 200 mg ou salina 0.15 M. por via oral (v.o), transcorridos 60 minutos foi injetado por via intraperitoneal carragenina (250  $\mu$ l; 500  $\mu$ g / cavidade). Decorridos 4 horas, os animais foram eutanaziados, por deslocamento cervical, para procedimento de lavagem da cavidade peritoneal com 1,5 ml de solução salina tamponada (PBS) heparinizada (2%), e com auxílio da pipeta realizou-se a coleta do liquido peritoneal contendo células sanguíneas. O volume recuperado foi semelhante em todos os grupos experimentais e foram equivalentes a ~ 95% do volume injetado. A seguir 20  $\mu$ L do lavado foi adicionado a 400  $\mu$ l de solução de turk para realização da contagem total de células realizada em uma câmara de Neubauer. Os resultados foram apresentados como o número de leucócitos totais no exsudato peritoneal.

**Figura 6:** Avaliação da migração de leucócitos através da inoculação da carragenina, em animais pré-tratados com óleo de coco.



#### 4.5. Análise estatística

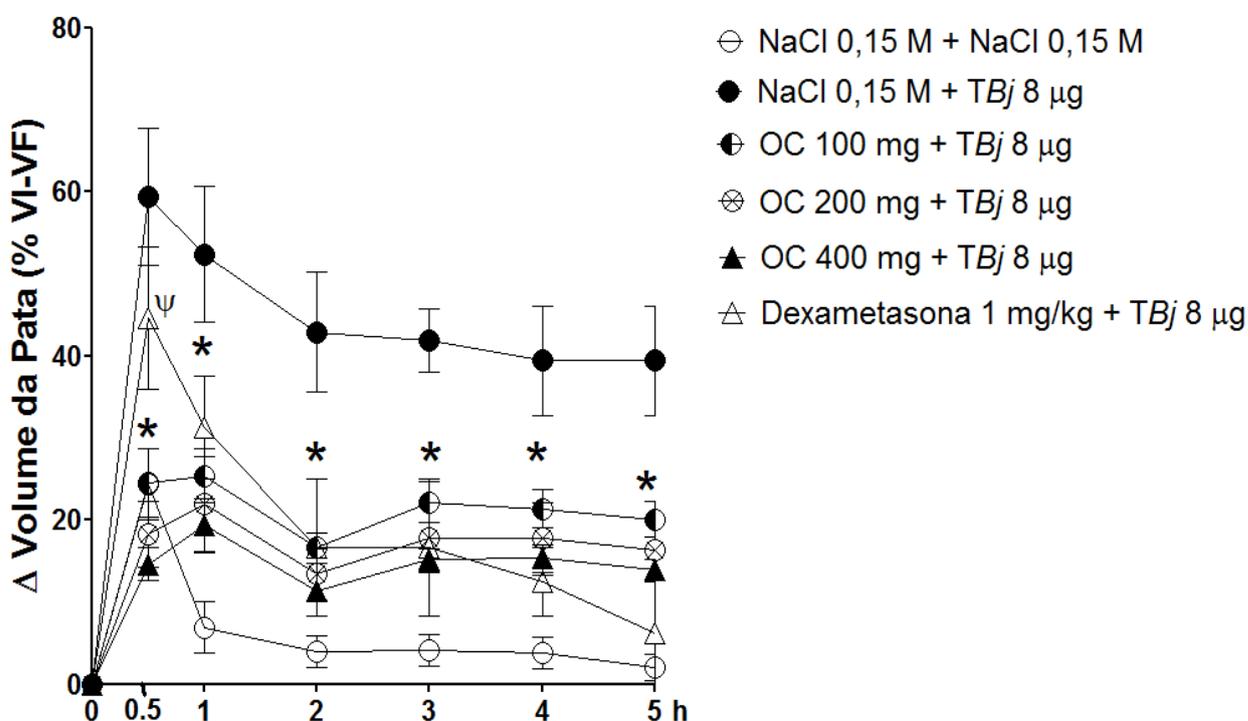
Os resultados referentes aos parâmetros obtidos durante a execução dos protocolos instituídos foram expressos no texto como média  $\pm$  erro padrão da média. Após análise de variância TWO-WAY-ANOVA e a comparação estatística dos dados foram realizadas pelo teste post hoc de student Newman-keuls.

## 5 RESULTADOS

### 5.1. Efeito do óleo de coco sobre o edema de pata induzido por toxina *Bothrops jararacussu* em camundongos.

Como representado na figura 8, em relação ao grupo controle, o óleo de coco nas doses de 100, 200 e 400 mg/kg reduziu o edema induzido pela *TBj* a partir de 0,5 horas, ( $59,4 \pm 8,4$  vs  $24,54 \pm 4,2$  %;  $59,4 \pm 8,4$  vs  $18,2 \pm 4,0$  %;  $59,4 \pm 8,4$  vs  $14,6 \pm 1,9$  %, para 100, 200 ou 400 mg respectivamente) pós inoculação. Por outro lado, o pré-tratamento com dexametasona (controle positivo) reduziu ( $p < 0,05$ ) o edema somente a partir de 60 min. de avaliação ( $52,4 \pm 8,3$  vs.  $31,2 \pm 6,2$  %). Estes efeitos anti-inflamatórios do OC e dexametasona perdurou ao longo das 4 h de avaliação seguinte.

**Figura 7:** Demonstração representativa do efeito anti-inflamatório do óleo de coco sobre o edema de pata induzido por toxina de *Bothrops jararacussu* em camundongos.



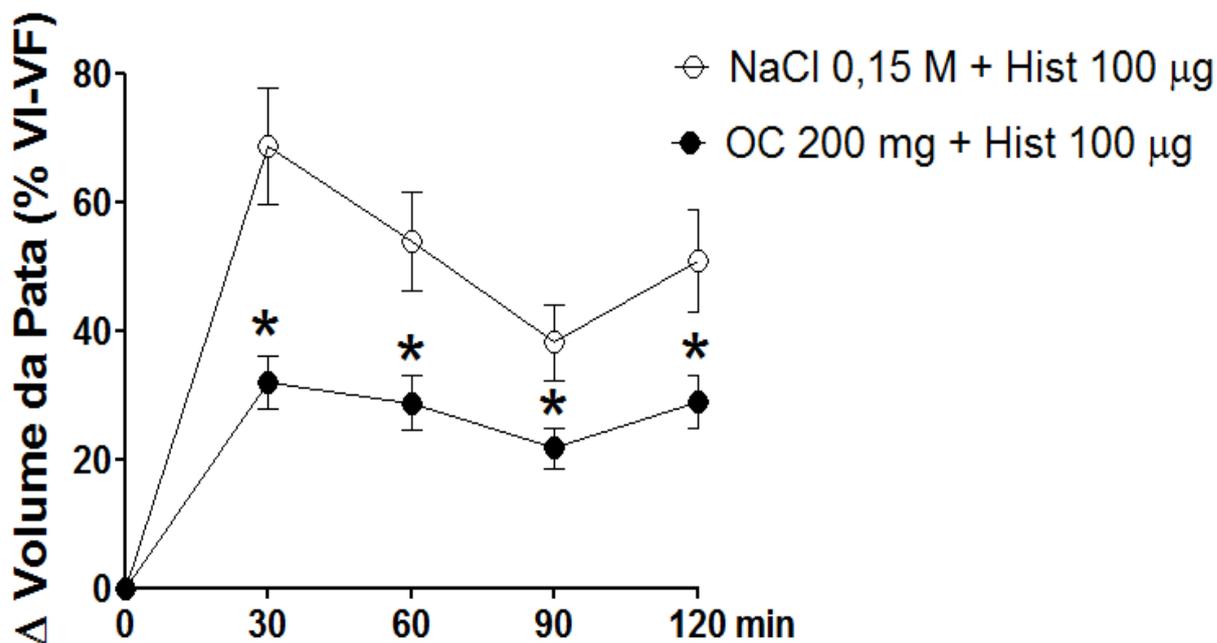
A média  $\pm$  E.P.M estão expressos em % do volume inicial,  $n = 5$ , \*  $p < 0,05$  vs. *TBj* 8  $\mu\text{g.pata}^{-1}$ ;  $\psi$   $p < 0,05$  vs. OC 100, 200 ou 400 mg.

## 5.2. Avaliação do efeito do tratamento com óleo de coco sobre o edema de pata induzido por prostaglandina, histamina, serotonina, substância P e bradicinina.

A figura 9 indica que nos animais tratados com OC 200 mg houve uma redução do edema de pata induzida pela histamina ( $68,8 \pm 9,0$  vs.  $32,0 \pm 4,2$  %;  $53,9 \pm 7,6$  vs.  $28,8 \pm 4,2$  %;  $38,2 \pm 5,9$  vs  $21,8 \pm 3,1$  % e  $50,9 \pm 7,9$  vs.  $29,0$  vs.  $4,1$  %, em 30, 60, 90 e 120 min. pós indução, respectivamente, Fig. 9A), serotonina ( $51,2 \pm 3,4$  vs  $30,0 \pm 5,9$  %;  $43,4 \pm 5,5$  vs  $13,7 \pm 6,3$  %;  $36,6 \pm 6,3$  vs  $11,2 \pm 6,5$  % e  $34,2 \pm 5,2$  vs  $6,4 \pm 4,3$  %, pós indução, respectivamente, Fig. 9B). e bradicinina ( $52,9 \pm 11,4$  vs.  $17,7 \pm 5,1$ ,  $44,9 \pm 2,6$  vs.  $11,2 \pm 4,1$ ,  $42,5 \pm 4,9$  vs.  $14,6 \pm 5,1$ ,  $33,6 \pm 5,4$  vs.  $7,0 \pm 2,9$ ,  $29,8 \pm 6,8$  vs.  $5,0 \pm 1,7$  %,  $14,0 \pm 2,3$  vs.  $3,9 \pm 1,9$  %, respectivamente 10, 20, 30, 60, 90 e 120 min pós inoculação, Fig. 9C).

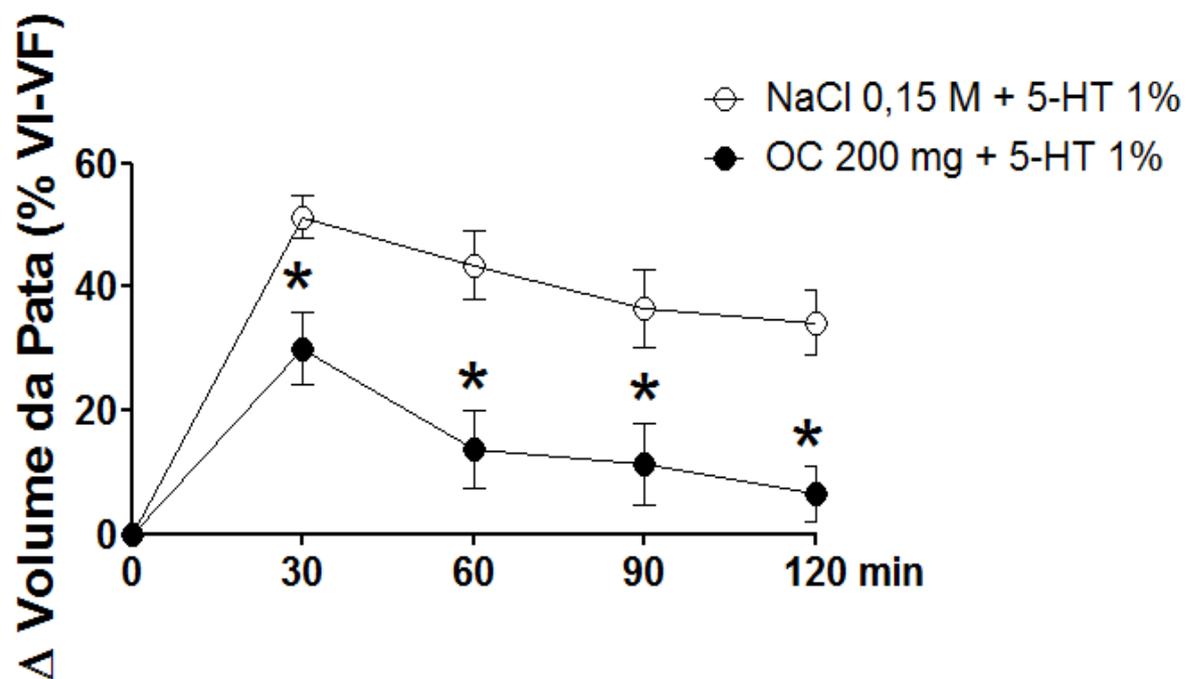
**Figura 8:** Efeito do pré-tratamento com OC 200mg sobre edema induzido pela inoculação de 30  $\mu$ l de Histamina (Hist, Box A), Serotonina 1% (5-HT, Box B) ou bradicinina (BK, BOX C) em camundongos.

A



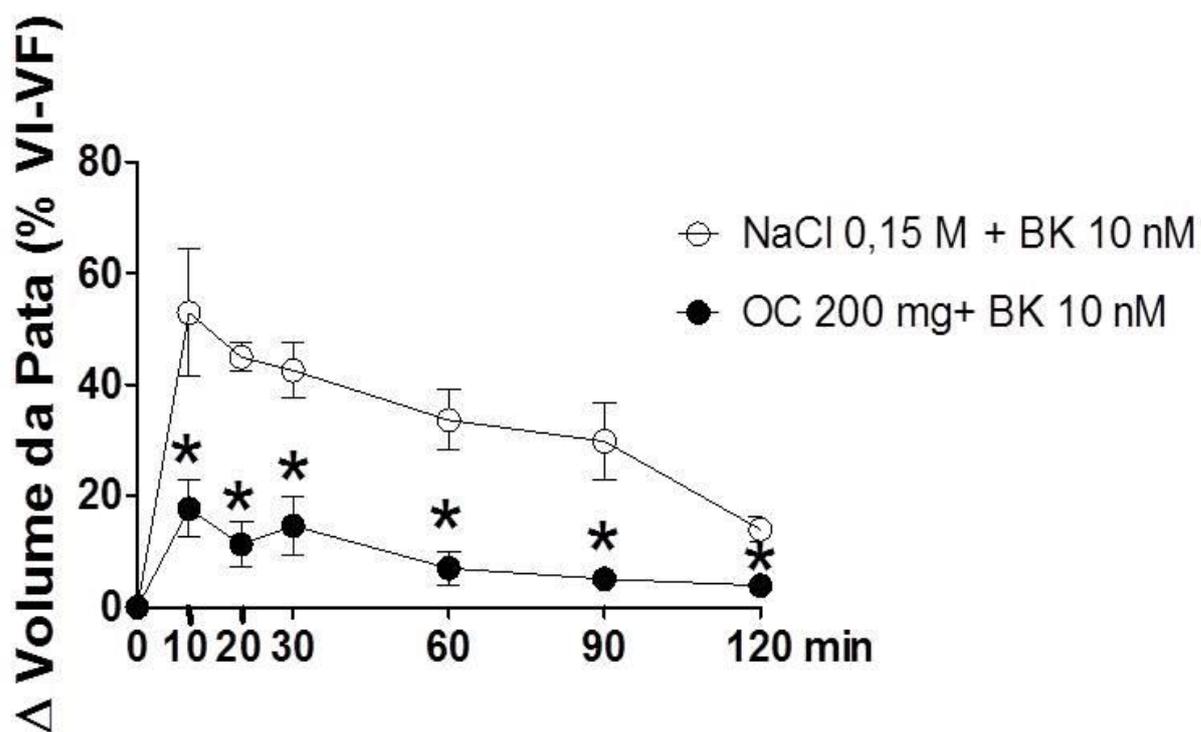
A média  $\pm$  E.P.M estão expressos em % do volume inicial, n = 5, \*p<0,05 vs. controle (NaCl 0,15 M).

B



A média  $\pm$  E.P.M estão expressos em % do volume inicial, n = 5, \*p<0,05 vs. controle (NaCl 0,15 M).

C

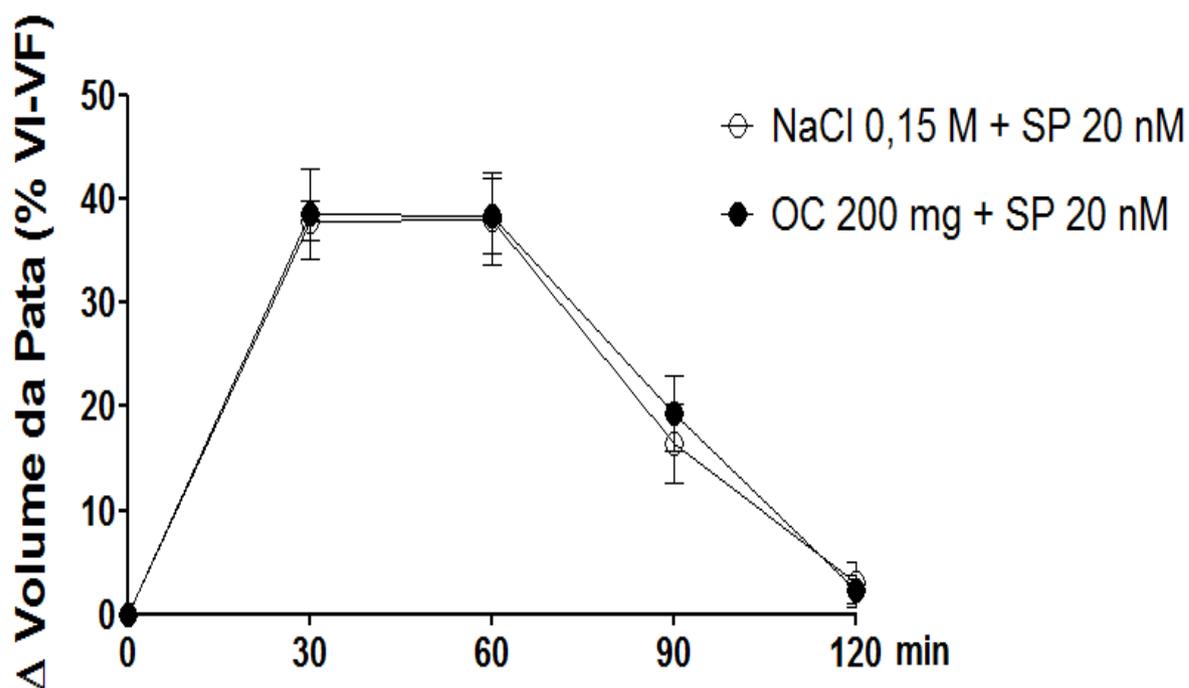


A média  $\pm$  E.P.M estão expressos em % do volume inicial, n = 5, \*p<0,05 vs. controle (NaCl 0,15 M).

Por outro lado, o tratamento com OC 200 mg não alterou o edema induzido pela substância P ( $37,9 \pm 1,9$  vs  $38,6 \pm 4,3$  %,  $38,1 \pm 4,4$  vs  $38,4 \pm 3,6$  %,  $16,4 \pm 3,8$  vs  $19,3 \pm 3,6$  %,  $3,0 \pm 1,9$  vs  $2,2 \pm 1,5$  %, respectivamente 30, 60, 90 e 120 min. pós infiltração, Fig. 10A) e prostaglandina E<sub>2</sub> ( $48,4 \pm 4,3$  vs  $39,6 \pm 5,1$  %,  $32,1 \pm 7,2$  vs  $37,9 \pm 5,2$  %,  $26,8 \pm 2,3$  vs  $20,0 \pm 5,6$  %,  $20,7 \pm 3,7$  vs  $11,5 \pm 2,1$  %, respectivamente 30, 60, 90 e 120 min. pós infiltração, Fig. 10B).

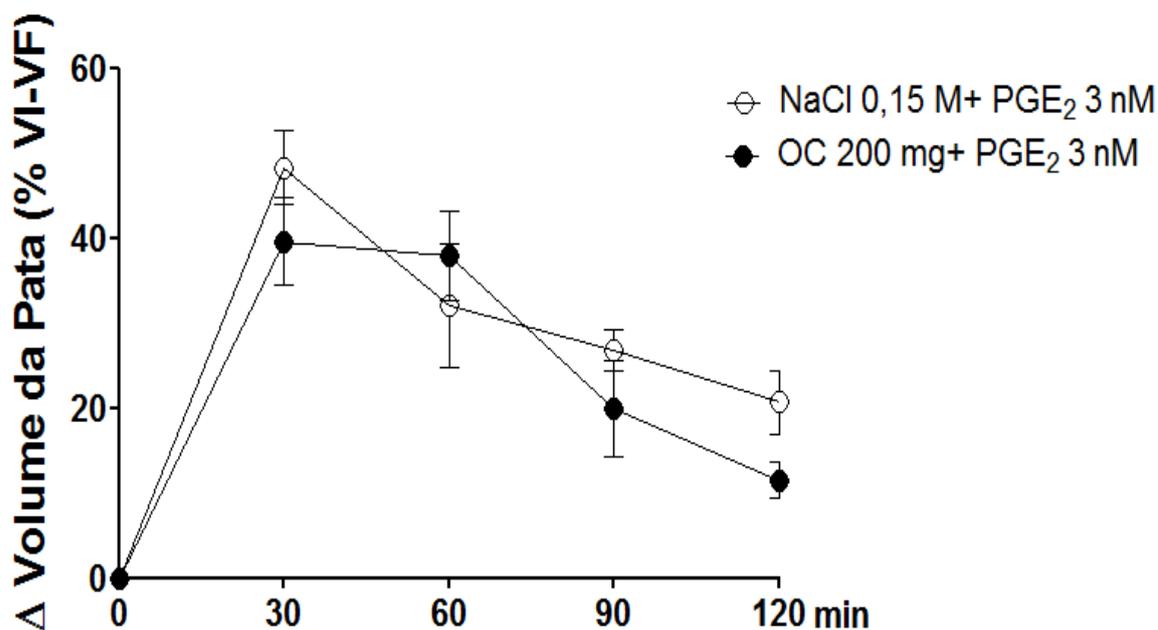
**Figura 9:** Efeito do pré-tratamento com OC 200mg em animais submetidos ao edema induzido pela inoculação da substancia P, SP 20 nM/pata, Box A; ou prostaglandina PGE<sub>2</sub>, 3 nM/pata, Box B . em camundongos.

A:



A média  $\pm$  E.P.M estão expressos em % do volume inicial, n = 7, p<0,05 vs. controle (NaCl 0,15 M).

B:

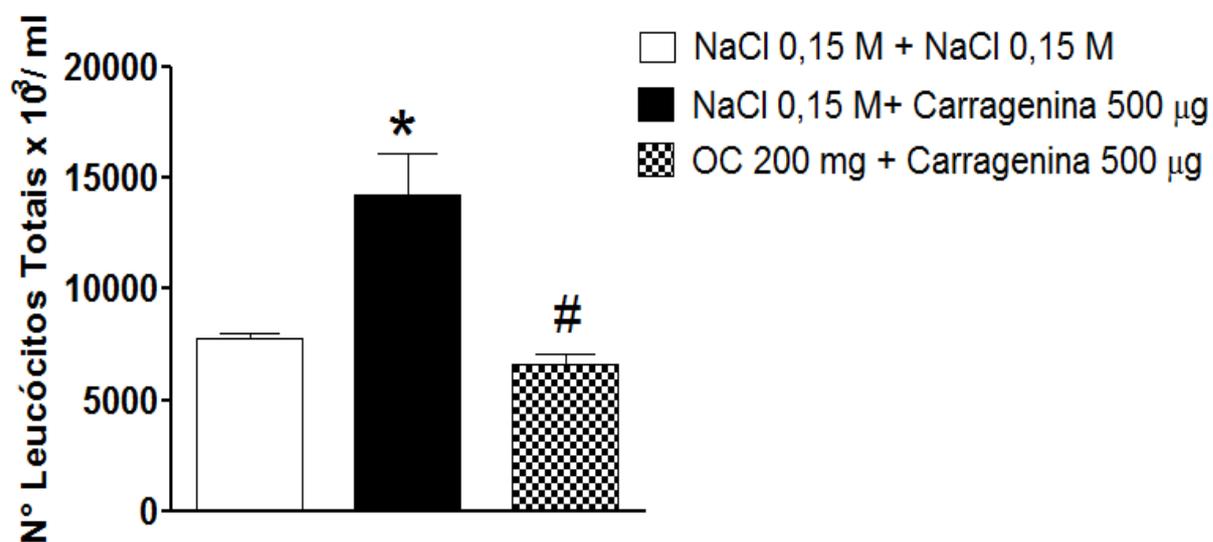


A média  $\pm$  E.P.M estão expressos em % do volume inicial, n = 7, p < 0,05 vs. controle (NaCl 0,15 M).

### 5.3. Avaliação da migração leucocitária através da inoculação da carragenina em animais pré-tratados com OC 200 mg.

No figura 11 pode-se observar que em relação ao grupo controle (NaCl 0,15 M) ocorreu um aumento na quantidade de leucócitos totais obtido do lavado peritoneal de camundongos submetidos a administração intraperitoneal de carragenina 500  $\mu$ g/cavidade ( $7.743 \pm 237,9$  vs.  $14.236 \pm 1.857 \times 10^3$  células/ml). Já o pré-tratamento com OC 200 mg preveniu o aumento do número de leucócitos peritoneais advindos da administração da carragenina intraperitoneal ( $6.579 \pm 494,5 \times 10^3$  células/ml).

**Figura 10:** Efeito do pré-tratamento com OC 200mg ou solução salina sobre a migração leucocitária para o peritônio, frente a indução com carragenina 500 µg.



Os dados foram expressos em média ± E.P.M., n = 7, \*  $p < 0,05$  vs. Controle, #  $p < 0,05$  vs. NaCl + Carragenina (NaCl 0,15 M).

## 6 DISCUSSÃO

No presente estudo avaliou-se o efeito do óleo de coco OC, administrado por via oral nas doses (100, 200 e 400 mg) sobre o edema de pata em ratos induzido pela *TBj*, bem como sua ação perante a inflamação induzida por histamina, 5-HT, bradicinina, substancia P, prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) e na migração de leucócitos induzida pela carragenina. Nesse estudo não houve nenhuma mortalidade, nem indícios de toxicidade letal sobre esses animais. Sendo assim, esse protocolo apresentou-se seguro como fonte de novos estudos. Vale ressaltar que apesar do OC ter sido administrado por via oral, o que poderia alterar a sua biodisponibilidade, devido a influência do pH e ação de enzimas do trato gastrointestinal (RINALDI et al., 2009), porém, isto não interferiu neste estudo, uma vez que foram observados efeitos importantes deste composto orgânico perante a inflamação induzida por *TBj*.

Dentre estes resultados, o OC reduziu a inflamação induzida pela *TBj* em camundongos em todas as doses avaliadas. Estas doses utilizadas foram adaptadas de outros trabalhos da literatura (RINALDI et al 2009; SILVA et al. 2013), e com base em 0.01-0.04 % do consumo diário para um camundongo. Tal resultado, reforça o potencial terapêutico de produtos derivados do coco e traz dados quanto a possível aplicabilidade deste óleo, outrora bastante estimulada sua utilização como produto nutracêutico na medicina humana para diversos processos metabólicos e inflamatórios (DEBMANDAL e MANDAL, 2011). Além disto, como uma das complicações dos acidentes botrópicos são as infecções secundárias e considerando que Silva et al (2013) verificou um potencial antimicrobiano para o extrato de *Coco nucifera* L, não descartamos a possibilidade deste OC, também auxiliar no combate a eventuais infecções, entretanto este não foi o principal foco deste trabalho.

A partir destes resultados, escolhemos a dose intermediária de OC 200 mg para desenvolver os ensaios da possível modulação de alguns mediadores flogísticos envolvidos na toxicodinâmica de *TBj*. Neste sentido, observou-se que o OC diminuiu o edema induzido pela *TBj*, histamina, serotonina e bradicinina. Além disto, o OC reduziu a migração leucocitária ao peritônio induzida pela carragenina. Entretanto, o OC não reduziu o edema desencadeado pela substancia P e PGE<sub>2</sub> exógena.

A escolha da *TBj* como agente flogístico neste estudo foi baseada em estudos prévios desenvolvidos cujo Wanderley et al (2014) demonstrou que a *TBj* induz inclusive a formação do edema mais precocemente, quando comparado com a

inflamação resultante da injeção de carragenina, um agente extraído de algas marinhas e amplamente utilizado com ferramenta farmacológica para induzir edema e dor.

De acordo com os resultados apresentados no figura 8, é possível observar que a administração oral de OC atua contra a inflamação aguda, desencadeada pela administração da *TBj*, mostrando sua atividade na redução do edema de pata já partir da 0,5 horas de avaliação. Reconhecidamente após uma lesão tecidual, seja química ou física, diversos mediadores biológicos são liberados, dando início a uma sequência de eventos pró-inflamatórios em resposta à lesão inicial (TEIXEIRA et al., 2009).

Dentre os mediadores iniciais envolvidos nestes processos inflamatórios a histamina participa da primeira fase do processo inflamatório, Uma vez liberada dos mastócitos, a histamina atuam em receptores do tipo  $H_1$  presentes nas células endoteliais, desencadeando o aumento da permeabilidade vascular, liberação de óxido nítrico (NO) e prostaciclina, além de outros agentes envolvidos na resposta inflamatória (BROW; ROBERTS, 2003; XAVIER, et al. 2011).

De acordo com os resultados apresentados na figura 9A, é possível afirmar que a administração oral de OC diminui a inflamação aguda induzida pela administração da histamina já a partir das 0,5 horas de avaliação, provavelmente por ação em receptores  $H_1$ , diferentemente da dexametasona, que atua na via de ação histaminérgica ao estabilizar a desgranulação mastocitária, por isto não observamos efeito anti-inflamatório significativo da dexametasona nos primeiros 30 min. De acordo com Zakaria et al (2009) a atividade anti-inflamatória do óleo de coco virgem (*Cocos nucifera* L.) pode estar associada a presença de polifenóis e ácidos graxos neste vegetal. Sendo que a presença de ácidos insaturados (ácidos palmítico e esteárico) e monoinsaturados (ácido oleico) influenciam na fluidez da membrana afetando muitas funções celulares que conduzem à supressão de processos inflamatórios (ZAKARIA et al., 2010).

Apesar deste resultado, Wanderley et al. (2014), verificou que a histamina, mastócitos ou as fibras C aferentes não tem um papel preponderante no mecanismo fisiopatológico induzido pela *TBj*, uma vez que mesmo após o uso de loratadina (Antagonista  $H_1$ ) e composto 48/80 (desgranulador/depletor de mastócito) o edema de pata e o infiltrado neutrofílico induzidos pela *TBj* persistiram. Entretanto, em um estudo realizado por Landucci et al. (1998), foi descrito a relevante participação da histamina e dos mastócitos no mecanismo fisiopatológico observado no edema

induzido pela bothropstoxinas I e II isoladas da *Bothrops jararacussu*. Porém, no presente estudo com os protocolos instituídos não podemos afirmar que o efeito anti-inflamatório inicial do OC frente a *TBj* seja exclusivamente advinda do mecanismo anti-histamínico. Apesar disto, os resultados referentes ao efeito anti-histamínico do OC, instiga futuras observações para aplicabilidade deste composto em outros modelos experimentais de enfermidades semelhantes a alergia e asma em roedores.

Semelhante a histamina, a serotonina também encontram-se pré-formadas nos grânulos citoplasmáticos das células (ex. mastócito e plaquetas) e apresenta efeitos pró-inflamatórios similares a histamina, desencadeando o extravasamento de plasma observado em processos inflamatórios, como também contribui para a sensibilização das fibras nervosas (GUIMARÃES et al., 2004). Além disto, a 5-HT modula a sinalização quimiotáxica responsável pela migração de neutrófilos durante uma resposta imune inata (DUERSCHMIED et al., 2013).

O extravassamento de líquido para o local da injúria ocorre em poucos minutos, como representando pela figura 9B, cujo a representação da injeção intraplantar com 30 µL de 5-HT a 1% indica a formação do edema a partir de 30 min. após a inoculação, e este sinal persistiu aos 120 min. de avaliação, como descrito na literatura (DAMASCENO et al., 2014). Sendo que o pré-tratamento com OC diminuiu o edema induzido pela 5-HT nos primeiros 30 min. iniciais, e tal efeito anti-inflamatório perdurou aos 120 min. Como descrito anteriormente por Landucci et al. (1998), a ciproheptadina (antagonista do receptor  $H_1$  e  $5-HT_2$ ) diminui o edema plantar induzido pela bothropstoxinas I e II indicando a possível participação de receptores serotoninérgicos na inflamação induzida pela toxina obtida de *Bothrops jararacussu*, bem como o metilsergide (antagonista  $5-HT_1/5-HT_2$ ) também reduziu a inflamação induzida pelas toxinas de *Bothrops jararaca* e *Bothrops lanceolatus* (GONÇALVES e MARIANO, 2000; GUIMARÃES et al., 2004). Portanto, os resultados obtidos neste trabalho apontam para uma possível aplicabilidade do OC em injúrias teciduais que envolvam a participação da 5-HT, semelhante as observadas em alguns acidentes ofídicos botrópicos.

Entretanto, a 5-HT periférica ao agir em receptores  $5-HT_1$  e  $5-HT_2$  modifica a permeabilidade vascular e, de forma indireta, permite o fluxo de outros elementos pró-nociceptivos e pró-inflamatórios entre eles a bradicinina e eicosanóides (PIERSE, 1995). A bradicinina participa na gênese da inflamação local, necrose, dano ao endotélio vascular e altera a permeabilidade da membrana, que desencadeiam o

edema, além de ser um agente alérgico importante no processo fisiopatológico de acidentes ofídicos envolvendo o gênero *Bothrops* (GUIMARÃES et al., 2004).

No presente trabalho para reproduzirmos estes efeitos desencadeados pela bradicinina, primeiramente os animais foram pré-tratados com captopril, para inibir a atividade de uma enzima chave da degradação biológica da bradicinina, a enzima conversora de angiotensina (ECA), inclusive tal enzima é bloqueada por toxinas do gênero *Bothrops* (FERREIRA, 1985), portanto a partir da utilização do captopril, também mimetizamos o efeito de alguns componentes da toxina de *Bothrops*, proporcionando a potencialização do efeito da bradicinina. Com isto, a injeção intraplantar de bradicinina 10 nM resultou na formação do edema logo após a inoculação, onde seu pico foi observado aos 10min. de avaliação. E o pré-tratamento com OC diminuiu este o edema, portanto, os resultados obtidos neste trabalho apontam para uma possível aplicabilidade do OC em injúrias teciduais que envolvam a participação da bradicinina.

Quanto a contribuição deste resultado para a redução do edema induzido pela *TBj* ainda são incertos, uma vez que segundo Wanderley et al (2014), a bradicinina não contribuiu para a resposta edematogênica induzida pela *TBj*, mediante o uso de ferramenta farmacológica usando um antagonista do receptor B<sub>2</sub>, o HOE 140. Por outro lado, Rioli (2008), verificou por espectrometria de massa, a presença de peptídeos potenciadores de bradicinina na toxina de *Bothrops jararacussu*. Tais compostos aumentam o recrutamento e da adesão de leucócitos, além de serem vasodilatadores.

Por outro lado, as taquicininas, derivadas das fibras sensoriais aferentes desmielinizadas (fibras C), como a substância P, atuam isoladamente ou em conjunto com outros mediadores como: HIS, bradicinina, LT, componentes do complemento, fator ativador de plaquetas (PAF), para auxiliar a chegada de células e fatores solúveis, como anticorpos e proteínas de fase aguda, ao sítio de lesão tecidual (COLLINS, 2000; RINGLER, 2000; ALLER et al., 2006).

A estimulação das fibras aferentes sensoriais, principalmente as do tipo fibras C, conduz a liberação de taquicininas, tais como a substância P, que interage com mastócitos, estimulando ao incremento de liberação de histamina. A substância P e a histamina podem agir sobre os vasos sanguíneos locais induzindo uma vasodilatação importante para a formação do edema e manutenção da resposta inflamatória (SOTER; AUSTEN, 1976; SUZUKI et al., 1999; LI et al., 2012).

De fato, no presente estudo, à injeção intraplantar com substância P 20 nM resultou na formação do edema a partir de 30 min., após a inoculação, e este sinal perdurou aos 60 min. No entanto o pré-tratamento com OC não afetou a formação deste edema. No estudo realizado por Wanderley et al. (2014) em que os animais submetidos a dessensibilização de fibras C aferentes, mediante o uso repetido de altas doses de capsaicina, não afetou a formação do edema e a migração de neutrófilos para o local da lesão induzida pela *TBj*. Podemos sugerir que não há participação da SP no efeito inflamatório induzido pela *TBj*, e por conseguinte, o OC não modula a função da substância P neste modelo experimental.

Segundo Zakaria et al (2010), óleo de coco virgem atua na inibição dos mediadores flogísticos da inflamação aguda como os autacóides, sendo que as prostaglandinas, ao contrário de muitos autacóides descritos, não estão armazenadas em vesículas ou em outros compartimentos orgânicos, sendo sua síntese dependente da ação enzimática da fosfolipase A<sub>2</sub> sobre os ácidos graxos presentes nas membranas celulares, cujo produto desta reação é o ácido araquidônico que a seguir sofre ação das COXs para síntese final das prostaglandinas (NETO et al., 2011).

E considerando que a *TBj* ativa a COX<sub>2</sub>, e por conseguinte, sendo as prostaglandinas um dos principais mediadores inflamatórios envolvidos no edema de pata induzido por esta toxina em camundongos (WANDERLEY et al., 2014), partimos para investigar o efeito do CO frente a inflamação lícitada pela PGE<sub>2</sub>. De acordo com o resultado mostrado na figura 10B, o pré-tratamento com OC 200 mg não preveniu o edema desencadeado pela PGE<sub>2</sub> na dose de 3 nM em camundongos. Diante disto, não descartamos a possibilidade do efeito anti-inflamatório do OC ser proveniente da atenuação da ativação enzimática da COX<sub>2</sub> descrita por Wanderley et al. (2014), e não a simples neutralização da prostaglandina endógena ou exógena pré-formada, a exemplo da utilizada neste trabalho.

Vale salientar que esta inoculação de *TBj*, estimula uma resposta do sistema imune, à migração de neutrófilos para a pata dos camundongos (Wanderley et al., 2014). De fato, os neutrófilos, são as primeiras células a serem recrutados ao local da injúria devido a sua capacidade de migrarem rapidamente pelos capilares (GONZALEZ et al., 2013; CRUVINEL, 2010; LUSTER et al., 2005; SADIK et al., 2011). Diante disto e considerando que vários destes mediadores flogísticos utilizados neste trabalho são sintetizados e secretados a partir de células inflamatórias, outro enfoque desse estudo foi a avaliação do efeito do OC frente a migração de leucócitos ao foco

inflamatório. Para avaliar essa migração, neste trabalho foi utilizado o modelo da peritonite induzida por carragenina (MALECH e GALLIN, 1987; BARROS et al., 2004).

A partir de tal metodologia, houve diminuição da migração de leucócitos no grupo que recebeu o pré-tratamento com OC. Esses resultados sugerem que o OC tem efeito anti-inflamatório, devido, pelo menos em parte, à interação específica com alguma dessas vias que participam da migração leucocitária (GABOR, 2000; RODRIGUES SILVA et al., 2008) Portanto, ao inibir a migração de leucócitos, o OC pode contribuir para o alívio de sinais desencadeados pelas células inflamatórias e mediadores..

Segundo Evangelista et al (2014) e Marina et al (2009), um dos compostos presentes no OC virgem são os compostos fenólicos, tais como o ácido p-cumárico, dando a esse óleo a capacidade antioxidante. Isso faz com que o óleo possa neutralizar as espécies reativas de oxigênio (ROS). Essas ROS são produzidas pelos neutrófilos após esses liberarem proteases múltiplas no processo inflamatório (NATARAJAN, 1996; ZAKARIA, 2010).

Além disso, estudos recentes mostram que a administração de carragenina na cavidade peritoneal induz a liberação de TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  (CHAVES et al., 2013), sendo estes considerados citocinas pró-inflamatórias, que dentre os seus efeitos, estão a ativação da inflamação, podendo estar associado ao efeito quimiotático, no qual ativa células inflamatórias como neutrófilos maduros, e estimula a diapedese para o sítio inflamatório (METCALFE, 2008). E como a *TBj* também induz o aumento da TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  (WANDERLEY et al., 2014), não descartamos a possibilidade deste vegetal modular estas citocinas, para tanto estudos futuros serão conduzidos.

Outros estudos feitos por Rinaldi et al. (2009) utilizaram o extrato bruto do *Cocos nucifera* para avaliar o efeito anti-inflamatório, em que esse efeito foi justificado pela interrupção da formação de mediadores inflamatórios, bem como a inibição de receptores para histamina e serotonina. Essa propriedade anti-inflamatória do OC pode estar associada com a presença dos ácidos graxos encontrados neste óleo, cujo potencial terapêutico frente aos processos inflamatórios semelhantes ao reproduzido neste trabalho foi reportado por outros autores (ZAKARIA et al., 2006; ZAKARIA et al., 2010; SILVA et al. 2013). Contudo, a caracterização dos componentes do óleo de coco se faz importante para a complementação desta pesquisa na busca de futuras terapias complementares em inflamações ocasionadas por envenenamentos botrópicos, bem como, por ação de mediadores flogísticos.

## 7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O óleo da copra de coco tem efeito anti-inflamatório sobre o edema de pata induzido pela toxina de *Bothrops jararacussu*, provavelmente por inibir migração leucocitária, bem como, reduzir a ação de agentes flogísticos histamina, serotonina e bradicinina em camundongos. Entretanto, ainda se faz necessário à continuação do trabalho com a investigação dos componentes deste óleo na resposta anti-inflamatória.

## REFERÊNCIAS

ABBAS, A. R.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. Citoninas. In. ABBAS, A. R.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. **Imunologia celular e molecular**, 6. ed. Rio de Janeiro: **Elsevier**. P. 267-303, 2008.

ADEBAYO J, SANTANA A, KRETTLI A: Evaluation of the antiplasmodial and cytotoxicity potentials of husk fiber extracts from *Cocos nucifera*, a medicinal plant used in Nigeria to treat human malaria. **Hum Exp Toxicol** 2012, 31:244–249.

ALLER, M. A. et al. The inflammatory response: An efficient way of life. **Medical Science Monitor**, v. 12, p. 225-234, 2006.

ALMEIDA, J.R.; SOUZA, G.R.; SILVA, J.C.; SARAIVA, S.R.; JÚNIOR, R.G.; QUINTANS, J.S.; BARRETO, R.S.; BONJARDIM, L.R.; CAVALCANTI, S.C.; JUNIOR, L.J. Borneol, a bicyclic monoterpene alcohol, reduces nociceptive behavior and inflammatory response in mice. **ScientificWorldJournal**. 18;2013:808460. doi: 10.1155/2013/808460.

ALVIANO D.S., RODRIGUES KF, LEITÃO SG, RODRIGUES ML, MATHEUS ME, FERNANDES PD, ANTONIOLLI AR, ALVIANO CS: Antinociceptive and free radical scavenging activities of *Cocos nucifera* L. (*Palmae*) husk fiber aqueous extract. **J Ethnopharmacol** 2004, 92:269–273.

ARAÚJO, A.L., et al. *Bothrops lanceolatus* (Fer de lance) venom induces oedema formation ab increases vascular permeability in the mouse hind paw. **Toxion**, v. 38,p.209-221, 2000.

ARAÚJO, F. A. A.; SANTALÚCIA, M.; CABRAL, R. F. Epidemiologia dos acidentes por animais peçonhentos. In: CARDOSO, J. L. C. et al. **Animais peçonhentos no Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos acidentes**.1.ed. São Paulo: **Sarvier**, p. 6-12 ,2003.

ARCOLINI, T. **Guia de animais brasileiros**: Répteis e Peixes de água doce. 2. Ed. São Paulo, 2006.22-30p.

BARBOSA, A. M. et al. Pharmacological characterization of mouse hind paw oedema induced by *Bothrops insularis* (jararaca ilhoa) snake venom. **Toxicon**, v. 42, p. 515523, 2003.

BARNI, B. S. et al. Incidência e perfil dos animais atendidos devido a acidente ofídico no Hospital de Clínicas Veterinárias da Universidade Federal do Rio Grande do Sul entre os anos de 2005 e 2010. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 40, n. 1, p. 1-2, 2012.

BARROS, F. E. V. et al. Avaliação das atividades analgésica e antiinflamatória do extrato metanólico de *Calotropis Procera* R. BR. (cíume). **Infarma**, Brasília, v. 16, n. 9-10, p. 60-64, 2004.

BÉRNILS, R.S. Brazilian reptiles-List of reptiles-List of species. **Sociedade Brasileira de herpetologia**, 2010. Disponível em: <Http://WWW.sbhenpetologia.ag.br>. Acesso em: 20 de Abril de 2014.

BONAVITA, A. G. C. et al. Contribution of mast cells and snake venom metalloproteinases to the hyperalgesia induced by *Bothrops jararaca* venom in rats. **Toxicon**, v. 47, p. 885-893, 2006.

BRESNIHAN, B. RHEUMATOID, A. Principles of Early Treatment. **The Journal of Rhaumatology**, 29 (Suppl 66): 9-1, 2002.

BROW, N. J.; ROBERTS, J. L. Histamina, bradicinina e seus antagonistas. In: GOODMAN & GILMAN. As bases farmacológicas da terapêutica, Rio de Janeiro: **McGraw-Hill**, ed. 10, p. 485-500, 2003.

CAMPBELL, J. A.; LAMAR, W.W. The venomous reptiles of Western emispher. **Comstock Publishing Associate**, Londres, v. 2, 2004.

CARDOSO, J. L. C. et al. Randomized comparative trial of three antivenoms in the treatment of envenoming by lance-headed vipers (*Bothrops jararaca*) in São Paulo, Brazil. **The Quart Journal o Medicine**, v. 86, p. 315-325, 1993.

CARDOSO, J. L.C. et al. **Animais Peçonhentos no Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos acidentes**. São Paulo: Sarvier, p. 468, 2003.

CARVALHO, W.A., CARVALHO, R.D.S., SANTOS, F.R., et al.. Analgésicos Inibidores Específicos da Ciclooxygenase-2: Avanços Terapêuticos. **Rev Bras Anestesiol**. 54: 3: 448 – 464, 2004.

CHAVES, L.S., NICOLAU, L.A.; SILVA, R.O.; BARROS, F.C.; FREITAS, A.L.; ARAGÃO, K.S.; RIBEIRO, R.A.; SOUZA, M.H.; BARBOSA, A.L.; MEDEIROS, J.V. Antiinflammatory and antinociceptive effects in mice of a sulfated polysaccharide fraction extracted from the marine red algae *Gracilaria caudate*. **Immunopharmacol Immunotoxicol** 35: 93–100, 2013.

COLLINNS, T. Inflamação aguda e crônica. In: COTRAN, R. S.; KUMAR, V. I.; COLLINS, T. **Robbins: Patologia estrutural e funcional**. 6. Ed. Rio de Janeiro: **Guanabara Koogan**, 2000. 44-79 p.

CRUVINEL, W. M.; JÚNIOR, D. M.; ARAÚJO, J. A. P.; CATELANO, T. T. T.; SOUZA, A. W. S.; SILVA, N. P.; ANDRADE, L. E. C. Fundamentos da imunidade inata com ênfase nos mecanismos moleculares e celulares da resposta inflamatória. **Rev Bras Reumatol**. 50(4):434-61, 2010.

da SILVA GA, DOMINGOS TF, FONSECA RR, SANCHEZ EF, TEIXEIRA VL, FULY AL. The red seaweed *Plocamium brasiliense* shows anti-snake venom toxic effects. **J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis**. 2015 Feb 10;21:2.

DAMASCENO, S. R.B. et al. Carvacryl acetate, a derivative of carvacrol, reduces nociceptive and inflammatory response in mice. **Life Sciences**, v.94, p. 58-66, 2014.

de SANTIS, L., FAGUNDES, F., SOARES, V., et al..Modificação na atividade farmacológica da proteína BTHTX-I induzida pelo lapachol. **Revista Multidisciplinar da Saúde**. 1:51, 2009.

DEBMANDAL M, MANDAL S. Coconut (*Cocos nucifera* L.: Arecaceae): in health promotion and disease prevention. **Asian Pac J Trop Med**. 2011 Mar; 4(3):241-7.

DOIN-SILVA, R. et al. The ability of low level laser therapy to prevent muscle tissue damage induced by snake venom. **Photochemistry and Photobiology**, v. 85, p. 63-69, 2008.

DUERSCHMIED D, ET AL. Platelet serotonin promotes the recruitment of neutrophils to sites of acute inflammation in mice. **Blood**, 121(6):1008-15, 2013.

ELIFIO-ESPOSITO, S. et al, Human neutrophil migration and activation by BJcuL, a galactose binding lectin purified from *Bothrops jararacussu* venom. **BMC Immunol**. V. 12, p.1-7, 2011.

ESCARSO, S. H. A. et al. Myotoxic phospholipases A2 in *Bothrops* snake venoms: Effect of chemical modifications on the enzymatic and pharmacological properties of bothropstoxins from *Bothrops jararacussu*. **Biochimie**. v. 82, p. 755-763, 2000.

ESQUENAZI D, WIGG MD, MIRANDA MM, RODRIGUES HM, TOSTES JB, ROZENTAL S, DA SILVA AJ, ALVIANO CS: Antimicrobial and antiviral activities of polyphenolics from *Cocos nucifera* Linn. (Palmae) husk fiber extract. **Res Microbiol** 2002, 153:647–652.

EVANGELISTA, M. T. P.; ABAD-CASINTAHAN; LOPEZ-VILLAFUERTE. The effect of topical virgin coconut oil on SCORAD index, transepidermal water loss, and skin capacitance in mild to moderate pediatric atopic dermatitis: a randomized, double-blind, clinical trial. **International Journal of Dermatology** 53, 100–108, 2014.

FERREIRA J.R, R.S.; BARRAVIEIRA, B. Management of venomous snakebites in dogs and cats in Brazil. **J. Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropica**, v. 10, n. 2, p.112 – 132, 2004.

FERREIRA. S. H. History of the development of inhibitors of angiotensin I conversion. **Drugs**, 30 (Suppl 1), 1-5, 1985.

GABOR, M. Mouse ear inflammation models and their pharmacological applications. Budapest: **Akadémiai Kiadó**, 2000.

GONÇALVES, L.R.; MARIANO, M. Local haemorrhage induced by *Bothrops jararaca* venom: relationship to neurogenic inflammation. **Mediators of Inflammation**, v. 9, n. 2, p. 101-7, 2000.

GONZÁLEZ, C.P.; VEGA, R.S.; GONZÁLEZ-CHÁVEZ, M.; SÁNCHEZ, M.A.Z.; GUTIÉRREZ, S.P. Antiinflammatory activity and composition of *Senecio salignus* Kunth. **BioMed Res Int** ;2013:1–4, 2013.

GUIMARÃES, A.Q. et al. Pharmacological and histopathological characterization of *Bothrops lanceolatus* (Fer de lance) venom-induced edema. **Inflammation Research**, v. 53, n. 7, p. 284-91, 2004.

GUTIÉRREZ, J. M.; RUCAVADO, A. Snake venom metalloproteinases: Their role in the pathogenesis of local tissue damage. **Biochimie**. v. 82, p. 841-850, 2000.

GUTIÉRREZ, J.M.; RUCAVADO, A.; ESCALANTE T, D. C. Hemorrhage induced by snake venom metalloproteinases: biochemical and biophysical mechanisms involved in microvessel damage. **Toxicon**, v.45, p. 997-1011, 2005.

HAND, M. S.; THATCHER, C. D.; REMILLARD, R. M.; ROUDEBUSH, P. **Nutrición Clínica en Pequeños Animales**. 4 Ed. Buenos Aires: Ed. Inter-Médica, 2000. 1368p.

JORGE, M. T.; RIBEIRO, L. A. Dose de soro (antiveneno) no tratamento do envenenamento por serpentes peçonhentas do gênero *Bothrops*. **Revista da Associação Médica Brasileira**. v. 43, n. 1, p. 74-76, 1997.

JUNQUEIRA, M. R. Tese de Mestrado. **Aplicação de técnicas proteômicas na caracterização do veneno da serpente *Bothrops insularis* (Viperidae)**. Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro. P. 63, 2005.

KALMAN, D.S.; FELDMAN, S.; KRIEGER, D.R.; BLOOMER, R.J. Comparison of coconut water and a carbohydrate-electrolyte sport drink on measures of hydration and physical performance in exercise-trained men. **J Int Soc Sports Nutr**. 9(1):2012.

KASHIMA, S., et al. Analysis of *bothrops jararacussu* venomous gland transcriptome focusing on structural and functional aspects: I - gene expression profile of highly expressed phospholipases A<sub>2</sub>. **Biochimie**.V.86, n. 3, p 211-219, 2004.

KETELHUT, D.F.J. et al. Isolation, characterization and biological activity of acidic phospholipase A<sub>2</sub> isoforms from *Bothrops jararacussu* snake venom. **Biochimie**, v. 85, p. 983–991, 2003.

KIRSZBERG C, ESQUENAZI D, ALVIANO CS, RUMJANEK VM: The effect of a catechin-rich extract of *Cocos nucifera* on lymphocytes proliferation. **Phytother Res** 2003, 17:1054–1058.

KOLESNIKOVAS, C.K.M. et al. Biochemical blood profile of Brazilian viperidae snakes kept in captivity. In: REUNIÃO CIENTÍFICA ANUAL DO INSTITUTO BUTANTAN, 2001, São Paulo- SP. **Memórias do Instituto Butantan**, v.59, p.141-142, 2001.

KOSCHEK PR, ALVIANO DS, ALVIANO CS, GATTASS CR: The husk fiber of *Cocos nucifera* L. (Palmae) is a source of anti-neoplastic activity. **Braz J Med Biol Res** 2007, 40:1339–1343.

LANDUCCI, E. C. et al. Mast cell degranulation induced by two phospholipase A2 homologues: dissociation between enzymatic and biological activities. **European Journal of Pharmacology**, v. 343, n.3, p. 257-263, 1998.

LI, D.F.; THALER, R.C.; NELSEN, J.L.; HARMON, D.L.; ALLEE, G.L.; WEEDEN, T.L. Effect of fat sources and combinations on starter pig performance, nutrient digestibility and intestinal morphology. **Journal of Animal Science**, v.68, n.11, p.3694- 3704, 1990.

LI, W., et al. Substance P signaling controls mast cell activation, degranulation, and nociceptive sensitization in a rat fracture model of complex regional pain syndrome. **Anesthesiol.** 116, 892-895, 2012.

LONE, A. M.; TASKÉN, K.. Proinflammatory and immunoregulatory roles of eicosanoids in T cells. **Front. Immunol.** v. 4, p. 1-15, 2013.

LUSTER, A. D.; ALON, R.; ANDRIAN, U. H. V. Immune cell migration in inflammation: present and future therapeutic targets. **Natu. Immunol.** V. 6, p. 1182-1190, 2005.

MALECH, H.L.; GALLIN, J.I. Current concepts: immunology-neutrophils in human diseases. **N Engl J Med**;317:687–94, 1987.

MARINA AM, CHE MAN YB, NAZIMAH AH: Chemical properties of virgin coconut oil. **J Am Oil Chem Soc** 2009; 86: 301–307.

MELGAREJO, A.R. Serpentes Peçonhentas do Brasil. In: CARDOSO, J.L.C. et al. Animais peçonhentos no Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos acidentes. 1. São Paulo: **Sarvier**, 2003. 33-61p.

MÉNDEZ, M.C. Envenenamento Botrópico. In: RIET. CORREA, F. et. Doenças em Ruminantes e equinos. 2. ed. São Paulo: **Varela Editora**, 2001, 169-176 p.

METCALFE, D.D. 2008. Mast cells and mastocytosis. **Blood** 15: 946– 956.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Disponível em [http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/visualizar\\_texto.cfm?idtxt=31494](http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/visualizar_texto.cfm?idtxt=31494). Acesso em: 2 nov. 2014.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Guia de vigilância epidemiológica. Secretaria de Vigilância em Saúde Departamento de Vigilância Epidemiológica.** 6° ed. Brasília, DF. 2001.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Guia de Vigilância Epidemiológica. Secretaria de Vigilância em Saúde, normas e manuais técnicos.** Brasília, ed. 6, 2005.

MOREIRA, V., et al. Effects of *Bothrops asper* snake venom on the expression of cyclooxygenases and production of prostaglandins by peritoneal leukocytes in vivo, and by isolated neutrophils and macrophages in vivo. **Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids**, v.8, p.107-114, 2009.

NASCIMENTO, N.G. et al. Contribution of mast cells to the o edema induced by *Bothrops moojeni* snake venom and a pharmacological assessment of the inflammatory mediators involved. **Toxicon**, v. 55, p. 343–352, 2010.

NATARAJAN, K.; SINGH, S.; BURKE T.R.; GRUNBERGER, D.; AGGARWAL, B.B. Caffeic acid phenethyl ester is a potent and specific inhibitor of activation of nuclear transcription factor NF-kappa B. **Proc Natl Acad Sci USA**; 93: 9090–9095, 1996.

NETO, J. P.; ARRUDA, R. P.; MADUREIRA, E. H. Prostaglandinas. In: SPINOSA, H. S.; GORNIK, S. L.; BERNARDI, M. M. Farmacologia Aplicada a Medicina Veterinária. Rio de Janeiro: **Guanabara**, ed. 5, 2011, 230-244 p.

NEVIN KG, RAJAMOHAN T: Influence of virgin coconut oil on blood coagulation factors, lipid levels and LDL oxidation in cholesterol fed Sprague-Dawley rats. **Eur J Clin Nutr Metab** 2008; 3: 1–8.

PANUNTOA, P.C. et al. Biological activities of a lectin from *Bothrops jararacussu* snake venom. **Toxicon**, 47:21–31, 2006.

PATRÃO-NETO, F. C. et al. Dexamethasone antagonizes the in vivo myotoxic and inflammatory effects of *Bothrops* venoms. **Toxicon**. v. 69, p. 55-64, 2013.

PEREIRA, F. E. L. Inflamação. In: FILHO, G. B. **Bogliolo: Patologia Geral**. Rio de Janeiro: **Guanabara Koogan**, ed. 3, p. 130-170, 2004.

PIERSE, P. A. et al. D. 5- hydroxytryptamine-induced synovial plasma extravasation is mediated via 5- hydroxytryptamine<sub>2a</sub> receptors on sympathetic efferent terminals. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 275, n. 1, p. 502-508, 1995.

PINHO, F.M.O.; PEREIRA, I.D. Ofidismo. **Revista da Associação Médica Brasileira**. São Paulo, v.47, n.1, p. 24 – 29, 2001.

QUEIROZ, G.P; PESSOA, L. A; PORTARO, F.C.V; FURTADO, M.F.D; TAMBOURGI, D.V. Interspecific variation in venom composition and toxicity of Brazilian snakes from *Bothrops* genus. **Toxico**, v. 52, p. 842-851, 2008.

RAW, I. et al. In: TU, A. T. T. Antivenins in Brazil: preparation. Handbook of Natural. **Toxins**. New York: Marcel Dekker Inc. v. 5, 1991, 557-581 p.

REIS, G.S; MENEZES, E. S.; MARINS, D.M.; LAITANO, O. Efeitos da ingestão prévia de água de coco sobre o balanço hídrico e desempenho aeróbio no calor. JORNADA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA EMBRAPA SEMIÁRIDO, 7.; JORNADA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA FACEPE/UNIVASF, Petrolina. **Anais**, p. 511-517. 2012.

RINALDI S, SILVA DO, BELLO F, ALVIANO CS, ALVIANO DS, MATHEUS ME, FERNANDES PD. Characterization of the antinociceptive and anti-inflammatory activities from *Cocos nucifera* L. (Palmae). **J Ethnopharmacol**. 122(3):541-6, 2009.

RINGLER, D. S. Inflamação e Reparo. In: JONES, T. C.; HUNT, R. D.; KING, N. W. **Patologia Veterinária**. 6. Ed. Barueri: Manole, 2000. 119-150 p.

RIOLI, V., et al. A novel bradykinin potentiating peptide isolated from *Bothrops jararacussu* venom using catalytically inactive oligopeptidase EP24. 15. **FEBS J.** v. 275, n. 10, p. 2442-2454, 2008.

RIVERO, José Vitelio Ruiz. **AValiação DA ATIVIDADE NÃO CITOTÓXICA DO VENENO DE BOTHROPS JARARACUSSU EM CÉLULAS MONONUCLEARES DO SANGUE PERIFÉRICO**, 2019. 114f: Dissertação (Mestrado em Ciência) - Pontifícia Universidade Católica de Goiás, Goiás, 2010.

RIVERS, J.P.W.; SINCLAIR, A.J.; CRAWFORD, M.A. **Inability of the cat to desaturate essential fatty acids.** *Nature* , v.258, p.171- 173, 1975.

RODRIGUES SILVA, D.; BARONI, S.; SVIDZINSKI, A.E.; BERSANIAMADO, C.A.; CORTEZ, D.A. Anti-inflammatory activity of the extract, fractions and amides from the leaves of *Piper ovatum* Vahl (Piperaceae). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 116, p. 569-573, 2008.

SADIK, C. D.; KIM, N. D.; LUSTER, A. D. Neutrophils cascading their way to inflammation. **Trend Immunol.** V. 32, p. 452-460, 2011.

SAKATE, M. Zootoxinas. In: SPINOSA, H. S.; GÓRNIK, S. L.; PALERMONETO, J. **Toxicologia Aplicada a Medicina Veterinária**. São Paulo: Manole. p. 209-243, 2008.

SARDESAI VM. **The essential fatty acids.** *Nutr Clin Pract.*1992;7(4):179-86.

SHIN, S. et al. Anti-inflammatory Effects of an Ethanol Extract of *Angelica gigas* in a Carragenan-Air Pouch Inflammation Model. **Experimental Animals**, 58(4): 431-436, 2009.

SILVA RR, E SILVA DO, FONTES HR, ALVIANO CS, FERNANDES PD, ALVIANO DS. Anti-inflammatory, antioxidant, and antimicrobial activities of *Cocos nucifera* var. *typica*. **BMC Complement Altern Med.** 13:107, 2013.

SILVA, C.G.R. et al. Fitoterapia como terapêutica alternativa e promoção da saúde. **Promoção da saúde**, 3(2):15-17, 2007.

SINAN. Casos de ofidismo. **Sistema de Informação de Agravos de Notificação**, disponível em: [http:// http://dtr2004.saude.gov.br/sinanweb/](http://dtr2004.saude.gov.br/sinanweb/) Acesso em: 08 dez. 2014.

SOTER, N. A.; AUSTEN, K. F. The diversity of mast cell-derived mediators: implications for acute, subacute, and chronic cutaneous inflammatory disorders. **J Invest Dermatol.** v. 67, p. 313-319, 1976.

SUZUKI, R, et al. Direct neurite-mast cell communication in vitro occurs via the neuropeptide substance. P. **J Immunol**, v. 163, p. 2410-2415, 1999.

TAKAOKA NY, ALBUQUERQUE MJ, CAMPOS VAFP, GUALTIERI VB, KATZ G, JORGE MT, RIBEIRO LA. Distribuição dos acidentes por *Bothrops*, *Crotalus* e *Micrurus* segundo os Escritórios Regionais de Saúde (ERSAS), SP, 1990/92. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical** 27(supl 1):118, 1994.

TEIXEIRA, C., et al. Toxicoinflammation induced by *Bothrops asper* venom. **Toxicon**, v.54, p 997-998, 2009.

TREBIEN, H. A.; CALIXTO, J. B. Pharmacological evaluation of rat paw edema induced by *Bothrops jararaca* venom. **Agents and Actions**, v. 26, p. 292-300, 1989.

UCHOA, D.C.; SILVA, A.R.; CARDOSO, R.C.S.; PEREIRA, B.S.; SILVA, L.D.M. Conservação do sêmen canino a 37° C em diluentes à base de água de coco. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.32, n.1, p.91-95, 2002.

WANDERLEY, C.W. et al. *Bothrops jararacussu* snake venom-induces a local inflammatory response in a prostanoid- and neutrophil-dependent manner. **Toxicon**, 12; 90C:134-147, 2014.

XAVIER, G. F.; RIGHI, D. A.; BERNARDI, M. M. Histamina, serotonina e seus antagonistas. In: Spinosa, H. S.; Gorniak, S. L.; Bernardi, M. M. *Farmacologia aplicada a medicina veterinária*, Rio de Janeiro: **Guanabara**, ed. 5, p.207-218, 2011.

ZAKARIA ZA, AHMAD Z, SOMCHIT MN, ARIFAH AK, SULAIMAN MR, TEH LK, SALLEH MZ, LONG K: Antihypercholesterolemia property and fatty acid composition of MARDI-produced virgin coconut oils. **Afr J Pharm Pharmacol** 2010;4:636–644.

ZAKARIA ZA, HANAN KUMAR G, RADEN MOHD NOR RNS, SULAIMAN MR, FATIMAH CA, MAT JAIS AM, SOMCHIT MN, ISMAIL MS: Antinociceptive, anti-inflammatory and antipyretic properties of *Corchorus capsularis* leaves aqueous extract in experimental animal models. **Pharm Biol** 2009; 47: 104–110.

ZAKARIA ZA, REEZAL I, MAT JAIS AM, MARMIN AHI, SIDEK H, HUSIN SH, RAHIM MHA, SABTU L, SOMCHIT MN, SULAIMAN MR: The antiinflammatory, antipyretic and wound healing activities of *Cocos nucifera* (MATAG Types) fresh juice and kernel extracts in experimental animals. **J Pharmacol Toxicol** 2006; 1: 516–526.

ZUG, G.R.; VITT, L. J; VITT, L. J; CALOWELL, J.P. *Herpetology: Na introductory biology of amphibians and reptiles*. **Academic Press**, ed. 2, 2000.