

ACÇÃO PROTETORA DA *CALENDULA OFFICINALIS* (ASTERACEAE; COMPOSITAE) SOBRE A ATIVIDADE MIOTÓXICA DO VENENO DE *BOTHROPS LEUCURUS* (SERPENTES; VIPERIDAE)

PROTECTIVE ACTION OF *CALENDULA OFFICINALIS* (ASTERACEAE, COMPOSITAE) ON THE MYOTOXIC ACTIVITY OF THE VENOM OF *BOTHROPS LEUCURUS* (SERPENTES; VIPERIDAE)

Yukari F. Mise¹, Luciana L. Casais-e-Silva^{2,3} e Rejâne M. Lira-da-Silva¹

¹Núcleo Regional de Ofiologia e Animais Peçonhentos da Bahia (NOAP); ²Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública (EBMSP); ³ Universidade do Estado da Bahia (UNEB); Salvador, BA, Brasil

Objetivamos verificar a ação protetora da *Calendula officinalis* sobre a atividade miotóxica do veneno da *Bothrops leucurus*, *in vivo*, em camundongos, através da liberação da creatina quinase (CK) e análise histológica. Foi feita a incubação prévia do veneno com o extrato aquoso de *C. officinalis*. Após 20 minutos, foi feita a inoculação intramuscular *in vivo* (50 µL) dessa solução em músculo gastrocnêmio posterior direito. Outro método foi à inoculação de veneno (50µm/mL) e subsequente aplicação tópica do extrato aquoso no membro previamente depilado de camundongos. Colheu-se o sangue por punção orbital 1, 3, 6, 12 e 24 horas após a injeção. Separou-se o plasma e determinou-se a atividade da CK utilizando o teste CK-NAC Liquiform (LABTEST Diagnóstica®). Para análise histológica, o músculo foi removido, fixado em formol (10%) e processado. A liberação da CK e a lesão histopatológica se mostraram diminuídas em animais tratados com *C. officinalis*, tanto topicamente quanto com a incubação. A inoculação do veneno incubado com *C. officinalis* sugere que existe alguma fração anti miotóxica no extrato aquoso, uma vez que este inibiu o aparecimento de lesões musculares após a inoculação do veneno de *B. leucurus* e induziu regeneração muscular.

Palavras-chave: *Bothrops*. *Bothrops leucurus*. Miotoxicidade. Histopatologia. *Calendula officinalis*. Fitoterapia.

In order to verify the protecting action of the Calendula officinalis on the miotoxic activity of the poison of the Bothrops leucurus in vivo in mice through the liberation of the creatina quinase (CK) and analysis histological, it was made the previous incubation of the poison with the aqueous extract of C. officinalis. After 20 minutes, it was made the intramuscular inoculation in vivo (50µL) of that solution in into the right gastrocnemius muscle. Another method was the poison inoculation (50um/mL) and subsequent topical application of the aqueous extract in the member previously waxed of mice. It was picked the blood by orbital puncture 1, 3, 6, 12 and 24 hours after the injection. The plasma was separated and was made the determination of the activity of CK using the test CK-NAC Liquiform (LABTEST Diagnóstica®). In order to make histological analysis, the muscle was removed, fastened in formol (10%) and processed. The liberation of CK and the histopathological lesion were shown decreased in animals treaties with C. officinalis as much topically as with the incubation. The inoculation of the poison incubated with C. officinalis suggests that some exists fraction anti miotoxic in the aqueous extract, once this inhibited the muscular lesions after the inoculation of the poison of B. leucurus and it induced muscular regeneration.

Key words: *Bothrops*. *Bothrops leucurus*. Miototoxicity. Histopatology. *Calendula officinalis*. Phytotherapy.

O envenenamento causado por *Bothrops leucurus*, principal agente etiológico do ofidismo na Bahia, causa lesão local caracterizada por edema, dor, calor, eritema, equimose e flictena, podendo, em alguns casos, evoluir com mionecrose^(1,2). A mionecrose é responsável por aparecimento de danos locais e teciduais^(3,4) sendo, por conseguinte, associado à atividade citotóxica, a causa mais importante das perdas teciduais permanentes, seqüelas e amputações^(5,6). Essas manifestações locais são utilizadas como critério de gravidade no envenenamento botrópico⁽⁷⁾. A atividade miotóxica não é bem neutralizada pela soroterapia antiofídica

⁽⁸⁾, embora os efeitos sistêmicos do envenenamento sejam bem neutralizados pelo soro antiveneno brasileiro, considerado um dos melhores do mundo⁽⁵⁾.

A despeito da existência do soro antiofídico, a busca por um antídoto que cure o paciente acidentado por serpente tem sido uma constante na vida do homem, seja por meio de práticas que utilizem as mais diversas substâncias, desde animal, vegetal ou mineral, até rezas ou invocações do sobrenatural⁽⁹⁾.

Plantas e seus extratos têm sido utilizados pela medicina popular no tratamento do ofidismo onde existem serpentes peçonhentas de importância médica^(10,15). Tendo em vista o número de mortes causadas pelo ofidismo, particularmente em comunidades de difícil acesso, o desenvolvimento de medicamentos de baixo custo e termoestáveis para o tratamento emergencial é extremamente importante⁽¹⁵⁾.

A *Calendula officinalis* (Asteraceae; Compositae) é originária da Europa meridional⁽¹⁶⁾, embora, atualmente, já

Recebido em 11/05/2009

Aceito em 08/06/2009

Endereço para correspondência: Profa. Dra. Rejâne M. Lira-da-Silva, Departamento de Zoologia, Instituto de Biologia, Universidade Federal da Bahia, Campus Universitário de Ondina, Salvador, Brasil, 40.170-210. Tel: 71 32836564. FAX: 71 32836511. E-mail rejane@ufba.br.

esteja distribuída em todo o Brasil⁽¹⁷⁾. A calêndula é uma planta anual que pode atingir até 50 cm de altura⁽¹⁶⁾. Suas folhas são alternas, simples, do tipo oblongo-lanceoladas ou espatuladas, podendo apresentar bordo liso ou ligeiramente denteado. Suas flores estão dispostas em uma inflorescência do tipo capítulo, com receptáculo plano e flores marginais liguladas, femininas, e as do disco masculinas, com corola tubulosa⁽¹⁷⁾. É indicada quase que totalmente ao uso tópico, combatendo irritações cutâneas, queimaduras superficiais⁽¹⁸⁾, contusões, no tratamento de feridas purulentas e de difícil cicatrização, assim como conjuntivite⁽¹⁹⁾. Na homeopatia, é um dos mais poderosos vulnerários, e seu poder sobre a cicatrização das feridas tem sido demonstrado por profissionais da área, dentre outras indicações⁽²⁰⁾.

O presente trabalho trata do estudo da neutralização da ação miotóxica do envenenamento experimental induzido pelo veneno da jararaca-do-rabo-branco *Bothrops leucurus* pelo uso da planta *Calendula officinalis*. Objetiva verificar as alterações induzidas pela *C. officinalis* na miotoxicidade do veneno de *B. leucurus* *in vivo* nos soros de camundongos injetados por via intramuscular com veneno total e tratados com extrato aquoso de *C. officinalis*, e injetados com a incubação do veneno com o extrato.

Material e Métodos

Como animais-teste, foram utilizados camundongos albinos machos (*Mus musculus*), 18-22g, linhagem Balb/C. Os animais foram mantidos no biotério do Instituto de Biologia da Universidade Federal da Bahia (UFBA), com água e ração *ad libitum*, iluminação das 6 às 18h, um dia antes dos experimentos, para sua ambientação.

O extrato de *C. officinalis* foi adquirido através da Extranatus S.A.®, que fabrica o extrato a partir de plantas colhidas em São Paulo. Foram utilizadas inflorescências da planta fresca. As mesmas foram colhidas, limpas com água corrente e imersas em etanol a 80%, por sete dias. Nesse período, foi feita a maceração do material imerso em etanol. Após esse período, foi adicionado, ao volume, 40% de etileno propileno. O material foi, então, testado e aprovado, de acordo com as especificidades da Farmacopéia Brasileira⁽²¹⁾. A amostra foi liofilizada, raspada manualmente, acondicionada em frascos de vidro e mantida à temperatura ambiente ao abrigo da luz e do calor. A concentração do extrato foi expressa em termos de peso seco.

O veneno de *B. leucurus* foi extraído de serpentes mantidas em cativeiro no Núcleo Regional de Ofiologia e Animais Peçonhentos da Bahia (NOAP/UFBA) e provenientes de vários municípios da Bahia. O pool de amostras de veneno foi seco em dessecador a vácuo, raspado, pesado em balança analítica, enfrascado e mantido a uma temperatura constante de -20° C.

Para a avaliação da atividade anti-miotóxica do extrato aquoso de *C. officinalis* foram feitos experimentos de pré-incubação e de inoculação independente. Para os experimentos de pré-incubação, as amostras foram divididas em três grupos: No grupo I, o veneno de *B. leucurus* (V) foi

incubado com *C. officinalis* (C) (V + C; n = 5); no Grupo II, o veneno foi incubado com solução salina a 0,85% (V + S; n = 5), e no Grupo III, a *C. officinalis* foi incubada com solução salina (C + S; n = 5), sempre na proporção 1:10 (veneno: *Calendula*). A dose de veneno utilizada foi de 50 µg/mL, a ser neutralizada por 500µg/mL do extrato da planta. As amostras foram incubadas, em banho-maria, durante trinta minutos antes da inoculação do veneno, a 37°C, por 20 minutos. O volume total inoculado foi de 50µL/animal.

Nos experimentos de inoculação independente, a avaliação da atividade anti-miotóxica do extrato aquoso de *C. officinalis* foi feita mediante a aplicação tópica do extrato após a inoculação intramuscular do veneno de *B. leucurus*⁽²²⁾. Previamente à inoculação, foi feita a depilação do membro posterior direito dos animais-teste (n=5), utilizando creme depilatório. Vinte e quatro horas após a remoção dos pêlos, foram aplicados (i.m.) 50µL de veneno no músculo gastrocnêmio direito, na concentração de 50µg/mL. Após 20 minutos, o músculo injetado foi imerso durante 1 minuto em uma solução com 500µg/µL de *C. officinalis* (Grupo I: V + C). Os controles foram formados por animais inoculados com veneno e banhados com solução salina (Grupo II: V + S), e animais inoculados com solução salina e banhados com solução de *C. officinalis* (Grupo III: S + C).

Após 1, 3, 6, 12 e 24 horas da inoculação das amostras, o sangue foi coletado via plexo orbital utilizando pipeta Pasteur, através da capilaridade. O soro foi separado do sangue por centrifugação a uma temperatura de 4° C, a 1000 r.p.m. por 20 minutos. Os níveis individuais de CK foram quantificados utilizando o KIT de dosagem sérica de CK (CK-NAC – Labtest Diagnóstica®), utilizando-se 0,02mL de amostra e 1mL de reagente. Após estes tempos amostrais, também foram coletados os músculos gastrocnêmios dos animais (n= 3 por Grupo) para a análise histopatológica.

O material coletado foi fixado em formol a 10%, sendo posteriormente desidratado, *overnight*, em série crescente de sete baterias de álcool (1 hora em cada bateria). Após esta etapa, o material foi diafanizado em duas baterias de xilol e embebido em duas baterias de parafina, utilizando-se o Automatic Tissue/Histokinette 2000®. Depois, fez-se a confecção dos blocos, que foram feitos os cortes histológicos em micrótomo Leica® (modelo Jung RM2045) e as secções (4mm de espessura) foram mantidas em estufa Fabre® por 30 minutos, a 40°C. As amostras foram, então, coradas com hematoxilina-eosina (HE). O material foi montado em lâminas, utilizando-se bálsamo na lamínula que cobriu a lâmina.

Os resultados foram apresentados através de medida de tendência central (média aritmética) e de dispersão (desvio padrão e erro padrão da amostra). Para comparação das médias, utilizou-se a Análise de Variância (ANOVA), seguido do teste de Turkey, através do programa GraphPad Instat Software®.

Resultados

Os resultados demonstraram que o extrato de *Calendula officinalis* apresenta atividade anti-miotóxica observada em

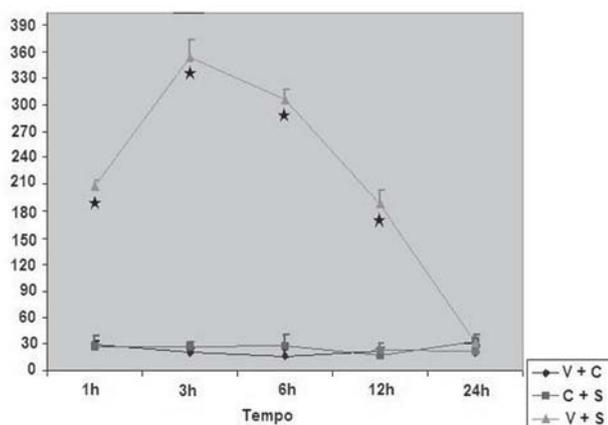
testes de incubação prévia e nos ensaios de inoculação do veneno e tratamento tópico com extrato da planta.

Nos ensaios de pré-incubação, nos quais o veneno foi previamente incubado *in vitro* com o extrato de *C. officinalis* (Grupo I), observou-se uma inibição completa do desenvolvimento da atividade miotóxica do veneno, demonstrada pela não liberação da enzima creatino quinase (CK). Os resultados mostraram diferença significativa do Grupo I (V + C) em relação ao Grupo II (V + S) em todos os tempos avaliados com exceção das 24 horas (1h: $p < 0,0001$; 3h: $p = 0,0024$; 6h: $p = 0,0016$; 12h: $p = 0,0131$; 24h: $p = 0,1849$). O perfil de liberação de CK do Grupo I (V + S) foi semelhante à inoculação apenas do veneno de *B. leucurus* (dados não mostrados). A aplicação i.m. do extrato previamente incubado com salina (Grupo III: C + S) não provocou lesão tecidual ou desencadeou a liberação de CK, demonstrando que o extrato da planta não possui atividade miotóxica (Figura 1).

A regeneração muscular foi observada em nossos experimentos apenas no Grupo II (V + C), 24h após a inoculação, caracterizada pela presença de mioblastos no meio da fibra muscular (Figura 2).

Quando o extrato foi independentemente administrado por via tópica, após a administração do veneno de *B. leucurus*

Figura 1. Cinética temporal da liberação da enzima Creatina Quinase (CK) em camundongos (*Mus musculus*) linhagem Balbi/C (n=5/grupo) inoculados *i.m.* com 50µl de solução incubada *in vitro* em músculo gastrocnêmio direito. Os dados foram representados como média ± erro padrão da amostra. U significa a fosforilação de 1 nanomol de creatina/minuto em 25°C. A dose de veneno utilizada foi de 50 µg/mL a ser neutralizado por 500 µg do extrato de *C. officinalis*.



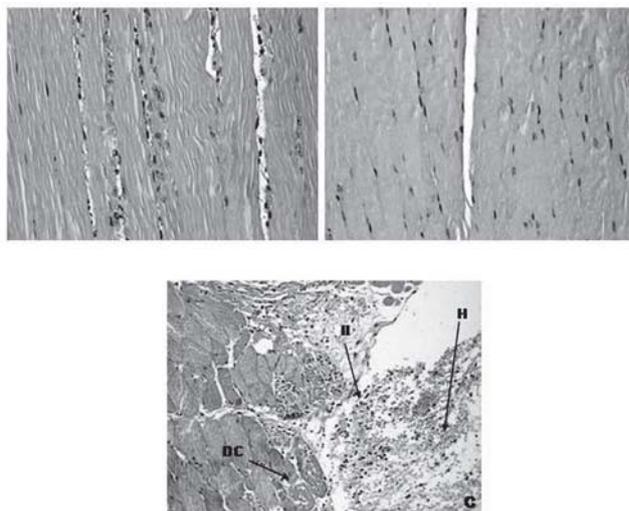
V + C: Grupo inoculado com a incubação entre veneno e *C. officinalis*;

C + S: Grupo tratado com a incubação entre *C. officinalis* com solução salina (0,85%);

V + S: Grupo inoculado com veneno e solução salina (0,85%);

Salina: Grupo tratado com solução salina (0,85%).

Figura 2. Corte histológico de músculo gastrocnêmio de camundongo *Mus musculus* inoculado com diferentes soluções incubadas, 24h após a injeção. (A) Veneno + Calêndula *in vitro*, aumento de 200x. Fibras com aspecto normal, observação de regeneração muscular (RM); (B) Calêndula + Solução salina *in vitro*, aumento de 400x. Fibras normais. (C) Veneno + Solução salina *in vitro*, aumento de 200x. Hemorragia (H), Infiltrado inflamatório (II) e Degeneração muscular (DC). Foto: Aryon Barbosa Júnior.



i.m., houve a inibição da liberação de CK nos tempos de 1 a 6 horas. A resposta foi semelhante ao grupo inoculado com salina e tratado com *C. officinalis*. Os animais tratados com solução salina tópica, após a inoculação de veneno, apresentaram perfil semelhante à administração isolada do veneno (dados não mostrados) (Figura 3).

Nos grupos inoculados com veneno e tratados com calêndula tópica, e inoculados com solução salina e tratados com calêndula tópica, não foram observadas quaisquer alterações histopatológicas (Figura 4).

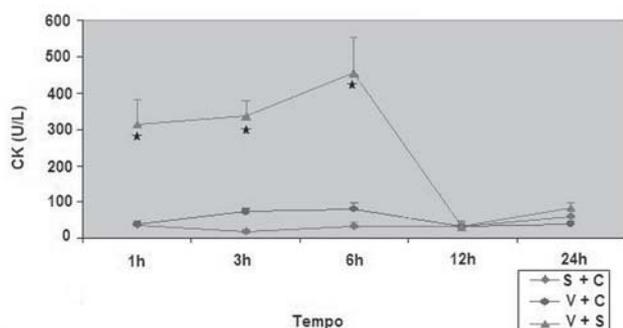
Discussão

Muitas pesquisas têm sido feitas na tentativa de tratar melhor e de forma mais eficiente os efeitos locais decorrentes de acidentes botrópicos. Isso ocorre porque as lesões locais, particularmente a atividade miotóxica, não é bem neutralizada pelo soro anti-botrópico, a despeito de sua grande eficiência na neutralização dos efeitos sistêmicos.

A utilização de plantas é uma prática comum na medicina popular e algumas pesquisas já demonstraram a ação inibitória de algumas atividades de venenos por extratos de plantas. Neste artigo, demonstramos a inibição da atividade miotóxica do veneno de *Bothrops leucurus* pelo extrato de *Calendula officinalis*.

A neutralização desta atividade sugere que a *C. officinalis* apresenta, em sua composição alguma fração anti-miotóxica, uma vez que o veneno, quando incubado com a *C. officinalis*, não apresentou ação miotóxica observada através da liberação

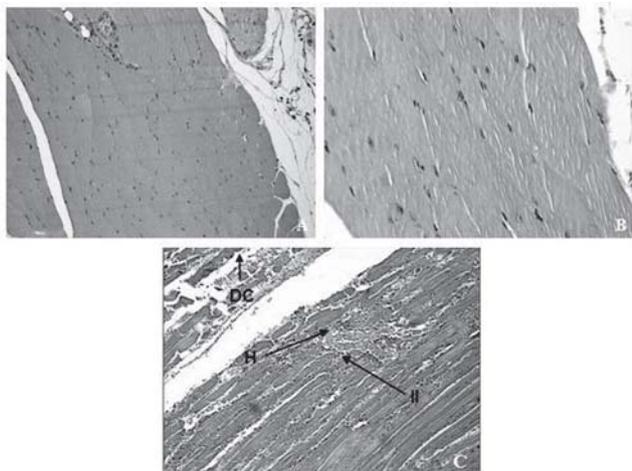
Figura 3. Cinética temporal da liberação da enzima Creatina Quinase (CK) em camundongos (*Mus musculus*) linhagem Balbi/C (n=5/grupo) inoculados *i.m.* com 50mL de solução em músculo gastrocnêmio direito e tratados topicamente com diferentes soluções. Os dados foram representados como média \pm erro padrão da amostra. U significa a fosforilação de 1 nmol de creatina/minuto em 25°C. A dose de veneno utilizada foi de 50 μ g/mL.



S + C: grupo inoculado com solução salina e, 20 minutos após a inoculação, submetido à aplicação tópica de *C. officinalis*;
V + C: grupo inoculado com veneno (50 μ g/ml) e, 20 minutos após a inoculação, submetido à aplicação tópica de *C. officinalis*;

V + S: grupo inoculado com veneno (50 μ g/ml) e, 20 minutos após a inoculação, submetido à aplicação tópica de solução salina.

Figura 4. Corte histológico de músculo gastrocnêmio de camundongo *Mus musculus* inoculado com diferentes soluções, 24h após a injeção. (A) Veneno + Calêndula uso topico, aumento de 200x. Disposição de fibras normal; (B) Calêndula + Solução salina uso tópico, aumento de 400x. Feixes de fibras sem alterações; (C) Veneno + Salina uso tópico, aumento de 100x. (H) Hemorragia, (II) Infiltrado inflamatório, (AF) Alteração de miofibrilas. Foto: Aryon Barbosa Júnior.



da CK. Entretanto, como a aplicação tóxica do extrato também inibiu a progressão da lesão muscular podemos sugerir que a planta também apresenta mecanismos que inibem a atividade miotóxica durante são progresso no organismo.

Estudos de neutralização *in vitro* da ação miotóxica do veneno de *Crotalus durissus terrificus* (cascavel) com extrato de *Eclipta prostrata* (erva-botão), da mesma família da *C. officinalis* (Asteraceae) mostraram a diminuição dos níveis séricos de CK em músculos expostos a 150 μ g/ml de veneno e na presença de 8,5 μ g/ml de extrato aquoso^(13,22). A pré-incubação de 0,25 μ g/g de veneno de serpentes e 250 μ g/g deste extrato aquoso por 15 minutos, e a subsequente inoculação intramuscular dessa solução, não aumentaram os níveis de CK no plasma⁽¹²⁾. O veneno da *B. jararaca*, *B. jararacussu* e *Lachesis muta* (surucucu) causam, em condições normais, um aumento dos níveis de CK do plasma sanguíneo. Esse efeito miotóxico foi inibido pelo extrato aquoso de *E. prostrata*, que também apresenta atividade contra a bothropasina, crotocina e BthTX, toxinas isoladas do veneno de crotalídeas Sul Americanas⁽²³⁾. A *E. prostrata* já foi referida como uma planta com ação comprovadamente antiinflamatória, o que justificaria essa resposta antiveneno⁽²⁴⁾.

Experimentos com o veneno puro de jararacas (*B. jararaca* e *B. jararacussu*), e com miotoxinas isoladas resultaram em neutralização parcial quando havia a incubação prévia de veneno ou miotoxina e extrato aquoso de *Casearia sylvestris* (guaçatonga), numa proporção de 1:5^(25,26). Quando a miotoxicidade foi associada à liberação de CK, foi observada uma significativa inibição do dano muscular, verificada pela diminuição dos níveis de CK no sangue, o que justifica a atividade antipeçonha atribuída à *C. silvestris*⁽²⁷⁾. Estudos com o extrato aquoso de *C. silvestris* incubado com venenos de jararacas (*B. neuwiedi* e *B. jararacussu*), também observaram a inibição dos efeitos miotóxicos do veneno dessas serpentes em músculo gastrocnêmio de camundongos (*Mus musculus*)⁽²⁶⁾.

O veneno de *Naja naja* inibiu, em experimentos *in vitro*, 95,8% da resposta neuromuscular. O veneno da naja (*N. naja*), quando incubado com o extrato aquoso do rizoma de “wan ngu” (*Curcuma* sp), não bloqueou a transmissão nervosa, significando uma inibição da ação neurotóxica da peçonha dessa serpente⁽²⁸⁾. A *Aristolochia shimadai*, conhecida na China como “Ma-tou-ling”, é extremamente utilizada na medicina popular no combate às picadas de serpentes. Além de possuir propriedades eméticas e expectorantes, o extrato aquoso, quando incubado com veneno de serpentes Crotalídeas a 37°C, 1h antes da inoculação, neutralizava a ação da peçonha⁽²⁹⁾.

O grupo inoculado com veneno e tratado com calêndula apresentar resposta similar ao grupo inoculado com solução salina sugere uma ação protetora da *C. officinalis* em relação à miotoxicidade do veneno de *B. leucurus*, confirmando a atividade antiinflamatória atribuída à *C. officinalis*⁽²⁰⁾.

O óleo da *Calendula arvensis* já foi relatado na literatura como um agente eficaz na reconstrução epitelial de feridas

cirúrgicas na secção cesariana pós-parto⁽³⁰⁾. Esta pode ser uma alternativa para o tratamento da ação local do veneno botrópico, uma vez que o soro anti-botrópico não neutraliza bem esta ação do veneno^(3,8,31), limitando-se apenas a impedir o aumento das lesões locais, que se manifestam rapidamente.

Apesar da efetividade do extrato da *C. officinalis* no tratamento do envenenamento ofídico não ser um consenso entre os cientistas⁽³²⁾, já são conhecidas algumas ações da *C. officinalis* contra diversos sintomas. Mais de 35 propriedades já foram atribuídas a seus extratos e tinturas, tais quais atividade antiinflamatória, analgésica, antitumoral, bactericida e anti-HIV⁽³³⁾, confirmadas por experimentos farmacológicos^(33,35). Os compostos terpenóides apresentam amplo espectro de utilização como agentes terapêuticos, possuindo propriedades farmacológicas. Destas, a *C. officinalis* apresenta triterpenos pentacíclicos, com atividade antiinflamatória e anti-hepatotóxica^(13,36,37).

A correlação entre a liberação de CK e a lesão histopatológica é concordante aos resultados obtidos em experimentos com *B. asper*⁽³⁸⁾, com níveis de CK e intensidade de mionecrose de *Hydrophis cyanocinctus* (chittul)⁽³⁹⁾ e com pacientes acidentados por cascavel (*C. durissus terrificus*)⁽⁴⁰⁾.

Diversos autores da literatura concordam que, após dias ou mesmo semanas da inoculação, da presença de lesão muscular visível, a fibra muscular sofre um início de regeneração^(3,41-43). O uso mais difundido da calêndula na medicina está relacionado com sua atividade reepitelizante e cicatrizante, onde atua em conjunto com as mucilagens, flavonóides, triterpenos e carotenos⁽⁴⁴⁾, o que é coerente à regeneração observada nesse estudo. Esta atividade ativaría o metabolismo das glicoproteínas e o tecido colágeno, promovendo uma marcante epitelização em modelos de feridas experimentais em ratos, com uma maior intensidade no metabolismo de glicoproteínas, nucleoproteínas e fibras colágenas durante a regeneração tissular^(20,45).

A ausência de lesões teciduais no grupo inoculado com a incubação entre solução salina e calêndula confirma dados da literatura, que já afirmam que esta não é lesiva ao músculo esquelético^(18,20).

A ausência de lesões nos grupos inoculados com veneno e tratados com calêndula tópica, e inoculados com solução salina e tratados com calêndula tópica deve estar associada à ação cicatrizante da *Calendula*, uma vez que investigações recentes feitas na Grã-Bretanha sugeriram um papel indutor da microvascularização dos extratos aquosos das flores de *Calendula* aplicados sobre feridas de pele, contribuindo assim para uma cicatrização mais rápida⁽⁴⁶⁾. Isso pode contribuir para que o tempo decorrido entre a picada e liberação médica do paciente seja menor, uma vez que as manifestações locais são utilizadas como critério de gravidade no envenenamento botrópico⁽⁷⁾. Além disso, a calêndula é uma planta de fácil acesso, hoje de ocorrência mundial e seu extrato pode ser utilizado a baixo custo ou ser distribuído gratuitamente pelos órgãos de saúde dos estados

e prefeituras, assim como é feito com os soros anti-peçonhentos.

Dessa maneira, neste trabalho, resgatamos os trabalhos iniciais de Dr. Vital Brazil no estudo de extratos vegetais contra picadas de serpente. Estes trabalhos foram interrompidos pela descoberta de Albert Calmette, que produziu, em 1894, o primeiro soro antiofídico que, entretanto, não protege totalmente da lesão local provocada pelo veneno das jararacas (*Bothrops*), que provocam cerca de 80% dos acidentes ofídicos no país⁽⁷⁾. De acordo com nossos resultados, sugerimos que continuem os estudos com vistas a, em seguida, iniciar estudos clínicos para que enfim, a calêndula seja amplamente utilizada como uma terapêutica associada, ajudando a livrar o nosso trabalhador rural de lesões graves, até seqüelas incapacitantes, temporárias ou permanentes.

Com esse trabalho, podemos concluir que *C. officinalis* parece proteger contra a ação miotóxica do veneno de *B. leucurus*, tanto quanto previamente incubada com o veneno quanto quando aplicada topicamente. A incubação do veneno de *B. leucurus* e *C. officinalis* sugere que existe alguma fração anti-miotóxica presente no extrato aquoso de *C. officinalis*, porém são necessários mais estudos para se determinar quais são os componentes químicos da fração ativa.

Agradecimentos

Agradecemos à Prof^a Dra. Josanídia Lima, coordenadora do LAVIET/UFBA, Prof^a Dra. Iracema Nascimento, do Laboratório de Biomarina (UFBA), a Prof^a Dr. Eduardo Mendes da Silva, coordenador MARENBA/UFBA, a Dr. Aryon Barbosa Júnior, do Centro de Pesquisa Gonçalo Muniz (FIOCRUZ-BA), por auxiliarem no período experimental do projeto.

Referências

1. Lira-da-Silva R. Estudo clínico-epidemiológico dos acidentes por *Bothrops leucurus* (SERPENTES; VIPERIDAE) na Região Metropolitana do Salvador, Bahia, Brasil. Universidade Federal da Bahia, 1996.
2. Lira-da-Silva R, Carvalho F. Epidemiology clinical study of envenoming by *Bothrops leucurus* Wagler, 1824 (Serpentes; Viperidae) in metropolitan region of Salvador, Bahia, Brazil. J. Venom. Anim. Toxins 1998;4:80-81.
3. Gutiérrez JM, Lomonte B. Local tissue damage induced by *Bothrops* snake venoms. A review. Mem. Inst. Butantan 1989;51(4):367-379.
4. León G, Estrada R, Chaves F, Rojas G, Ovadia M, Gutiérrez J. Inhibition by CaNa2 ETDA of local tissue damage induced by *Bothrops asper* (terciopelo) venom: application in horse immunization for antivenom production. Toxicon 1998;36(2):321-331.
5. Lira-da-Silva R. Estudo farmacológico do veneno de *Bothrops leucurus* (Serpentes; Viperidae). Universidade de Campinas, 2001.
6. Lira-da-Silva RM, Barbosa-Júnior AA, Prado-Francheschi J. Alterações patológicas induzidas pelo veneno de *Bothrops leucurus* (jararaca do rabo branco) em músculo diafragma de camundongo. Jornal Brasileiro de Patologia 2001;37(2):79.
7. França FOS, Málaque C. Acidente botrópico. In: Cardoso JLC, França FOS, Wen FW, Málaque CMS, V H-J, eds. Animais peçonhentos no Brasil. Biologia, clínica e terapêutica dos acidentes. 1ª ed. São Paulo: Sarvier, 2003;468.

8. Gutiérrez JM, Lomonte B. Efectos locales en el envenenamiento ofídico en América Latina. In: Cardoso JLC, França FOS, Wen FW, Málaque CMS, V H-J, eds. Animais peçonhentos no Brasil. Biologia, clínica e terapêutica dos acidentes. 1ª ed. São Paulo: Sarvier, 2003;468.
9. Andrade-Lima R. Práticas populares empregadas no tratamento de picadas de serpentes na Bahia. Universidade Federal da Bahia, 1997.
10. Rizzini CT, Mors WB, Pereira N. Plantas brasileiras tidas como ativas contra peçonhas animais, especialmente venenos de cobras. Rev. Bras. Farm. 1988;69(82-86):1988.
11. Ruppelt BB, Pereira EFR, Gonçalves LC, Pereira N. Abordagem farmacológica de plantas recomendadas pela medicina folclórica como antiofídicas: I - Atividades analgésicas e antiinflamatória. Revista Brasileira de Farmacologia 1990;71:54-56.
12. Martz W. Review article. Plants with a reputation against snakebite. Toxicon 1992;30(10):1131-1142.
13. Mors WB, Do Nascimento MC, Pereira BMR, Pereira N. Plant natural products active against snake bite - the molecular approach. Phytochemistry 2000;55:627-642.
14. Pereira BMR, Gonçalves LC, Pereira N. Abordagem farmacológica de plantas recomendadas pela medicina folclórica como antiofídicas III - Atividade antiedematogênica. Revista Brasileira de Farmacologia 1992;73:85-86.
15. Houghton PJ, Osibogun I. Flowering plants used against snakebite. Journal of Ethnopharmacology 1993;39:1-29.
16. Schultz A. Introdução à Botânica Sistemática. 6ª ed. Vol. 1. Porto Alegre: Sagra, 1991.
17. Barroso G. Sistemática de angiospermas do Brasil. Vol. 3. Viçosa: Impr. Univ, 1991.
18. Panizza S. Plantas que curam - Cheiro de mato. 27ª ed. São Paulo: Ibrasa, 1997.
19. Mozherenkov VP, Shubina L. Treatment of chronic conjunctivitis with *Calendula*. Med Sestra 1976;35(4):33-34.
20. Klouček-Popova E, Popov A, Pavlova N, Krusteva S. Influence of the physiological regeneration and epithelialization using fractions isolated from *Calendula officinalis*. Acta Physiologica Pharmacologica Bulg 1982;8(4):63-67.
21. Farmacopéia Brasileira. Fascículo 3. 4ª ed. São Paulo: Atheneu, 2002.
22. Mors WB, MC DN, Parente JP, Da Silva MH, Melo PA, Suarez-Kurtz G. Neutralization of lethal and myotoxic activities of South American rattlesnake venom by extracts and constituents of the plant *Eclipta prostrata* (Asteraceae). Toxicon 1989;27:1003-1009.
23. Melo PA, Ownby C. Different sensitivity of fast- and slow- twitch muscles to some snake venoms and myotoxins. Toxicon 1996;34(6):653-669.
24. Arunachalam G, Subramanian N, Pazhani GP, Ravichandran V. Anti-inflammatory activity of methanolic extract of *Eclipta prostrata* L. (Asteraceae). African Journal of Pharmacy and Pharmacology 2009;3(3):097-100.
25. Borges MH, Soares AM, Rodrigues VM, Andrião-Escarso SH, Diniz H, Hamaguchi A, Quintero A, Lizano S, Gutiérrez JM, Giglio JR, MI H-B. Effects of aqueous extract of *Casearia sylvestris* (Flacourtiaceae) on actions of snake and bee venoms and on activity of phospholipase A₂. Comparative Biochemistry and Physiology 2000;127:21-30.
26. Borges MH, Soares AM, Rodrigues VM, Oliveira F, Francheschi AM, Rucavado A, Giglio JR, MI H-B. Neutralization of proteases from *Bothrops* snake venoms by the aqueous extract from *Casearia sylvestris* (Flacourtiaceae). Toxicon 2001;39(12):1863-1869.
27. Cavalcante WLG, Campos TO, Pai-Silva M, Pereira PS, Oliveira CZ, Soares AM, Gallacci M. Neutralization of snake phospholipase A₂ toxins by aqueous extract of *Casearia sylvestris* (Flacourtiaceae) in mouse neuromuscular preparation. Journal of Ethnopharmacology 2007;112:490 - 497.
28. Cherdchu C, Karlsson E. Proteolytic-independent cobra neurotoxin inhibiting activity of *Curcuma* sp (Zingiberaceae). S. E. Asian J. Trop. Med. Public Health 1983;14:176-180.
29. Tsai LH, Liu HJ, Yang CP, Chang C. Inactivation of Formosan snake venoms *in vitro* by crude extract of *Aristolochia radix*. J. Formosan med. Assoc 1975;74:352-360.
30. Lavagna SM, Chimenti P, Ottaviane A, Bizarri B. Efficacy of Hypericum and Calendula oils in the epithelial reconstruction of surgical wounds in childbirth with caesarean section. Farmaco 2001;56(5-7):451-453.
31. Gutiérrez JM, Arroyo O, Bolaños R. Mionecrosis, hemorragia y edema inducidos por el veneno de *Bothrops asper* en ratón blanco. Toxicon 1980;18:603-610.
32. Melo MM, Habermehl GG, Oliveira NJF, Nascimento EF, Santos MMB, Lúcia M. Treatment of *Bothrops alternatus* envenomation by *Curcuma longa* and *Calendula officinalis* extracts and ar-turmerone. Arq. Bras. Med. Vet. Zootec. 2005;57(1):7-17.
33. Kalvatchev Z, Walder R, D. G. Anti-HIV activity of extracts from *Calendula officinalis* flowers. Biomed Pharmacother 1997;51(4):176-180.
34. Dumenil G, Chemli R, Balansar G, Guiraud H, Lallemand M. Étude des propriétés antibactériennes des fleurs de Souci *Calendula officinalis* L. et des teintures mères homéopathiques de *C. officinalis* L. et *C. arvensis* L. Annales Pharmaceutiques Françaises 1980;38:493-494.
35. Shipochliev T, Dimitrov A, Aleksandrova E. Anti-inflammatory action of a group of plant extracts. Vet Med Nauki 1981;18(6):87-94.
36. Della Loggia R, Tubaro A, Sosa S, Becker H, Saar ST, Isaac D. The role of triperpenoids in the topical antiinflammatory activity of *Calendula officinalis* flowers. Planta medica 1994;60:516-520.
37. Di Stasi L. Plantas Medicinais: Arte e Ciência - Um guia de estudo interdisciplinar. Vol. 1. São Paulo: UNESP, 1996.
38. Chaves F, Gutiérrez JM, Lomonte B, Cerdas L. Histopathological and biochemical alterations induced by intramuscular injection of *Bothrops asper* (tercípelo) venom in mice. . Toxicon 1989;10(27):1085-1093.
39. Ali SA, Alam JM, Abbasi A, Zaidi ZH, Stoeva S, Voelter V. Sea snake *Hydrophis cyanocinctus* venom. II. Histopathological changes, induced by a myotoxic phospholipase A₂ (PLA₂ - HI). . Toxicon 2000;38:687-705.
40. Azevedo-Marques MM, Cupo P, Coimbra T, Hering SE, Rossi MA, Laure C. Myonecrosis, myoglobinuria and acute renal failure induced by South American rattlesnake (*Crotalus durissus terrificus*) envenomation in Brazil. Toxicon 1985;4(23):631- 636.
41. Ownby CL, Colberg T. Classification of myonecrosis induced by snake venoms: venoms from the prairie rattlesnake (*Crotalus viridis viridis*), western diamondback rattlesnake (*Crotalus atrox*) and the Indian cobra (*Naja naja naja*). Toxicon 1988;26(5):459-474.
42. Selistre HS, Queiroz LS, Cuha AB, De Souza GEP, Giglio J. Isolation and characterization of hemorrhagic, myonecrotic and edema-inducing toxins from *Bothrops ulyalis* (jararaca ilhoa) snake venom. Toxicon 1990;28(3):261-273.
43. Teibler P, Acosta de Perez O, Marunak S, M SN, Ortega H. Muscular regeneration after myonecrosis induced by *Bothrops jararacussu* snake venom from Argentina. Biocell 2001;25(3):257-264.
44. Graf J. Herbal anti-inflammatory agents for skin disease. Skin Therapy Lett 2000;5(4):3-5.
45. Kartiketan S, Chaturvedi RM, Narkar S. Effect of calendula on trophic ulcers. Lepr Rev. 1990;61(4):399.
46. Patrick KFM, Kumar S, Edwardson PAD, Hutchinson J. Induction of vascularisation by an aqueous extract of the flowers of *Calendula officinalis* L., the European marigold. Phytomedicine 1996;3(1):11-18.