

**UNIVERSIDADE DE SANTO AMARO**  
**CURSO DE MEDICINA VETERINÁRIA**

**LOREN D'APRILE**

**EFICÁCIA DE DIFERENTES PREPARAÇÕES HOMEOPÁTICAS DE  
*Arnica montana* NO TRATAMENTO DO ENVENENAMENTO  
EXPERIMENTAL COM VENENO DE *Philodryas olfersii*.**

**São Paulo  
2014**

**LOREN D'APRILE**

**EFICÁCIA DE DIFERENTES PREPARAÇÕES HOMEOPÁTICAS DE  
*Arnica montana* NO TRATAMENTO DO ENVENENAMENTO  
EXPERIMENTAL COM VENENO DE *Philodryas olfersii*.**

“Trabalho de Conclusão de Curso apresentado para obtenção do título de Bacharel em Medicina Veterinária da Universidade de Santo Amaro – UNISA, sob orientação da Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Leoni Villano Bonamin e coorientação de Marisa Maria Teixeira da Rocha.”

**São Paulo  
2014**

**LOREN D'APRILE**

**EFICÁCIA DE DIFERENTES PREPARAÇÕES HOMEOPÁTICAS DE *Arnica montana* NO TRATAMENTO DO ENVENENAMENTO EXPERIMENTAL COM VENENO DE *Philodryas olfersii*.**

Monografia apresentada para obtenção do título de Bacharel em Medicina Veterinária ao Curso de Medicina Veterinária da Universidade de Santo Amaro – UNISA sob orientação da Área de Concentração: **Patologia**

Data de Aprovação: 26. 05. 2014

**BANCA EXAMINADORA**

---

**Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Leoni Villano Bonamin**

---

**Prof.<sup>a</sup>Dr.<sup>a</sup>Cidéli de Paula Coelho**

**CONCEITO FINAL:** \_\_\_\_\_

## DEDICATÓRIA

Dedico, especialmente, a Deus, ao meu irmão, André, ao meu grande amigo, Alex e à minha cachorrinha linda, que pra mim é uma filha: a Meg.

À Deus, que plantou em mim a semente de amor pelos animais desde pequena e junto com ela, a semente da coragem e da resiliência, para que eu não desistisse dos meus sonhos, mesmo frente as maiores adversidades, e para que eu não fraquejasse, mesmo frente aos mais fortes inimigos.

Ao meu irmão, sangue do meu sangue, carne da minha carne, a quem dedico não só esse trabalho, mas minha vida e todas as vitórias que conquistarei: você é a minha família.

Ao Alex, braço direito, porto seguro e amigo verdadeiro, sem o qual eu jamais teria conseguido!

À minha cachorrinha, que me mostrou o real significado da expressão AMOR INCONDICIONAL. Se não fosse você e tudo o que significa pra mim, eu já teria desistido.

Dedico também a todos àqueles que, de alguma maneira, me ajudaram a chegar até aqui.

Aos que me deram a mão, aos que me incentivaram, enxugaram minhas lágrimas nos momentos de dor e estiveram ao meu lado, incondicionalmente.

Àqueles que sonharam meu sonho e lutaram, comigo, para que ele se realizasse.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço principalmente à Deus, que me mantem de pé, viva e com forças pra lutar pelos meus sonhos, mesmo durante as maiores e piores adversidades. Obrigada meu Pai por ser minha rocha, minha luz, apoio e esperança, sempre.

À minha orientadora, amiga e professora, doutora Leoni Villano Bonamin, que desde o início me respeitou, escutou, ajudou, entendeu, apoiou e me trilhou pelos caminhos que hoje sigo. Não há agradecimentos que possam ser suficientes. Obrigada por acreditar em mim! Nós conseguimos!

À minha co-orientadora Marisa Rocha, que teve uma paciência sem limites. Obrigada por toda a ajuda, por tudo o que me ensinou, por sua amizade, broncas e bons conselhos. Cada dia valeu à pena. Nada disso teria sido possível sem você!

Aos camundongos utilizados nesse trabalho, que cederam sua vida em prol de um bem maior. Gostaria que a pesquisa pudesse ter ocorrido sem vocês.

À Cideli de Paula Coelho, pelo apoio, carinho, contribuição, por sua apresentação no GIRI e também por ter cedido os anestésicos utilizados nesse experimento.

Ao Caio dos Santos, por ter sido tão útil, prestativo e por ter colaborado de forma impar para que chegássemos aonde chegamos.

À Priscila Dias Motta, por sua contribuição acadêmica e ajuda.

Ao Instituto Butantan por ter me concedido um espaço para realização do meu trabalho, contribuindo, assim, para mais uma vitória em minha vida.

Aos funcionários do laboratório de Herpetologia que de alguma maneira me ajudaram. A vocês, o meu muito obrigada.

Ao CNPQ por seu apoio financeiro (projeto 153288/2012-4), sem o qual não conseguiria realizar minha pesquisa. A contribuição de vocês foi fundamental.

Ao Alex Vieira de Assis, amigo, porto seguro, ponto de apoio e sem o qual, eu não teria chegado aonde cheguei. Obrigada por tudo o que fez por mim, eu jamais conseguiria sem você. Essa vitória é nossa!

Ao André Candiani D'Aprile, meu irmão, meu tudo, que com seu jeito único sempre me apoiou e ajudou. Obrigada por existir! Você é o meu orgulho, o meu amor maior!

A minha cachorrinha Meg, o resumo do que é o amor. Não me imagino sem você filha!

A todos os animais que passaram em minha vida, agradeço de coração, sempre agradecerei. Vocês são a razão do meu viver. Por vocês, é que eu continuo aqui. Luto e lutarei sempre, até meu último suspiro de vida!

Ao meu pai de coração e professor, Celso Martins Pinto: obrigada por ser quem é pra mim e por tudo o que fez. Quando crescer, quero ser como você! Te amo!

A um anjo disfarçado de ser-humano, que tem me mostrado o verdadeiro sentido da palavra amizade e amor incondicional: professora Renata Savarino Levenhagen, se não fosse seu apoio e carinho, principalmente nesses últimos tempos, eu teria largado tudo. Nem todas as palavras serão suficientes pra dizer o quanto eu sou grata. Amo você!!

A Paula de Carvalho Papa, por ser aquela que inspira os meus sonhos. Sua amizade enche meu coração de alegria e esperança. Você me mostrou outro mundo, e é desse mundo que eu quero fazer parte. Muito obrigada, por tudo!

A querida professora e amiga, Alexandra Nicolau: obrigada por ter participado de maneira tão especial em minha vida. Você é muito importante pra mim!

As professoras Kátia Stracieri de Oliveira, Viviani de Marco , Cláudia Brito e Adriana Cortez, por se preocuparem comigo e procurarem me ajudar, sempre. O que me ensinaram, levarei pela vida inteira. Vocês acreditaram em mim, quando nem eu mesma acreditava. Nunca serei grata o suficiente!

A todos do ITEC: Rita de Cassia Garcia, Vania Plaza Nunes, Adriana Vieira, Néstor Calderón, Evelyn Nestori, Ana Liz: vocês foram minha luz no fim do túnel e são o exemplo de humanos e veterinários que eu quero ser um dia. Obrigada por me deixar fazer parte dessa família!

Ao Projeto Santuário, que reúne o que será o bom futuro da veterinária. Vocês são meus fofinhos, e serão sempre!

A todos da Medicina do Coletivo, por criarem na veterinária, o que foi meu sonho de uma vida inteira: a saúde única! Vocês são o resumo da minha felicidade!

Aos professores que estiveram comigo, ajudando, apoiando, ensinando e orientando pelo melhor caminho: vocês foram fundamentais!

Aos meus amigos, que estiveram ao meu lado sempre, me levantando e puxando pra cima! Vocês são tudo pra mim!! Amo vocês!!

A todos que de alguma forma contribuíram para que esse sonho fosse possível, muito obrigada!

O sonho foi meu, mas a vitória é nossa!

“Acredite em si próprio e chegará um dia em que os outros não terão outra escolha  
senão acreditar em você”

*Cynthia Kersey*

## RESUMO

A administração do soro antiofídico não é preconizada nos envenenamentos causados por serpentes da espécie *Philodryas olfersii*. Assim, todo e qualquer tratamento alopático ou homeopático pode vir a contribuir para o breve reestabelecimento dos pacientes. O objetivo desse trabalho é o estudo dos efeitos de diferentes preparações de *Arnica montana* 6cH no envenenamento experimental com o veneno de *P. olfersii* em camundongos. Para tanto, camundongos Swiss, machos e adultos, foram inoculados no coxim plantar com veneno de *P. olfersii* e tratados **em cego** com *Arnica montana* 6cH preparada por método convencional e por aparelho simulador de uso comercial. A evolução do edema inflamatório gerado em até 24 horas foi avaliada nesta fase do estudo. Na segunda fase, a cinética celular e os padrões histométricos dos tecidos inflamados foram avaliados em diferentes tempos. Os resultados mostraram ação anti-edematosa e inibidora da migração celular tanto no grupo tratado com Arnica 6cH convencional quanto naquele tratado com Arnica preparada em simulador. Observa-se, portanto, que ambas as preparações foram eficientes na ação anti-inflamatória ao veneno, porém com características cinéticas particulares.

**Palavras chave:** *Philodryas olfersii*, *Arnica montana* 6cH, tratamento alopático, tratamento homeopático, camundongos Swiss.

## ABSTRACT

The administration of antivenom is not recommended in poisonings caused by snakes of the species *Philodryas olfersii*. Thus, any homeopathic or allopathic treatment may ultimately contribute to the brief recovery of patients. The aim of this work is to study the effects of different preparations of *Arnica montana* 6cH in experimental poisoning with the venom of *P. olfersii* in mice. To do so, type Swiss mice, males and adults were inoculated in the footpad with venom *P. olfersii* blind and treated with *Arnica montana* 6cH prepared by conventional method and device simulator commercial use. The development of inflammatory edema generated within 24 hours was evaluated in this phase of the study. In the second phase, cell kinetics and patterns histometric inflamed issues were evaluated at different times. The results showed an anti-edematous and inhibiting cell migration in both the group treated with *Arnica* 6cH conventional as that treated with *Arnica* prepared in a simulator. It is noted, therefore, that both preparations were effective in anti-inflammatory action of the poison, but with a particular kinetic characteristics.

**Keywords:** *Philodryas olfersii*, *Arnica montana* 6cH, allopathic, homeopathic treatment, Swiss mice.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> - <i>Philodryas olfersii</i> (foto cedida por Marisa Rocha).....	21
<b>Figura 2</b> - (A) Dinamizador para preparação de produtos homeopáticos. (B) Aparelho simulador magnético (OAK ®) para produção de medicamentos homeopáticos em série. No primeiro recipiente (output) insere-se frasco de tintura-mãe de Arnica montana. No segundo recipiente (input) insere-se frasco contendo o veículo. O regulador central define a potência homeopática desejada. Os frascos são mantidos no aparelho por 15 minutos, conforme orientação do fabricante (Foto cedida por Leoni Bonamin). .....	22
<b>Figura 3</b> - Contenção de camundongo: treinamento.....	23
<b>Figura 4</b> - Inoculação do veneno de <i>Philodryas olfersii</i> no coxim plantar esquerdo de camundongo. ....	24
<b>Figura 5</b> - Frascos contendo as preparações de Solução hidro-alcóolica 5% ou Arnica montana preparada de maneira convencional ou Arnica montana preparada com o aparelho simulador magnético.....	25
<b>Figura 6</b> - Método de aferição da espessura da pata com micrômetro. ....	25
<b>Figura 7</b> - Evolução do edema inflamatório induzido pela inoculação subcutânea de veneno de <i>P. olfersii</i> em função do tempo, nos diferentes grupos. Os valores representam a media. ANOVA.....	30
<b>Figura 8</b> - Gráfico comparativo que revela diferentes escores atribuídos por dois observadores sobre diferentes parâmetros do processo inflamatório – análise 30 minutos .....	37
<b>Figura 9</b> - Gráfico comparativo que revela diferentes escores atribuídos por dois observadores sobre diferentes parâmetros do processo inflamatório – análise 180 minutos .....	38
<b>Figura 10</b> - Gráfico comparativo que revela diferentes escores atribuídos por dois observadores sobre diferentes parâmetros do processo inflamatório – análise 24 horas.....	40
<b>Figura 11</b> - Evolução do edema subcutâneo nos diferentes grupos, nos diferentes tempos.....	41
<b>Figura 12</b> - Evolução do edema muscular nos diferentes grupos, nos diferentes tempos.....	42
<b>Figura 13</b> - Marginação leucocitária nos diferentes grupos, nos diferentes tempos.....	43

**Figura 14** - Quantidade de polimorfonucleares nos diferentes grupos, nos diferentes tempos ..... 44

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> - Evolução da espessura das patas nos diferentes grupos após (A) 30 minutos, (B) 1 hora, (C) 2 horas, (D) 3 horas e (E) 24 horas da inoculação do veneno. ....	28
<b>Tabela 2</b> - Representação dos diferentes escores atribuídos por dois observadores sobre diferentes parâmetros do processo inflamatório– análise 30 minutos.....	36
<b>Tabela 3</b> - Representação dos diferentes escores atribuídos por dois observadores sobre diferentes parâmetros do processo inflamatório– análise 180 minutos.....	38
<b>Tabela 4</b> - Representação dos diferentes escores atribuídos por dois observadores sobre diferentes parâmetros do processo inflamatório– análise 24 horas. ....	39
<b>Tabela 5</b> - Comparação da evolução do edema subcutâneo nos diferentes grupos, nos diferentes tempos .....	41
<b>Tabela 6</b> - Comparação da evolução do edema muscular nos diferentes grupos, nos diferentes tempos. ....	42
<b>Tabela 7</b> - Comparação da marginação leucocitária nos diferentes grupos, nos diferentes tempos. ....	43
<b>Tabela 8</b> - Comparação da quantidade de polimorfonucleares nos diferentes grupos, nos diferentes tempos. ....	43

## Sumário

1.Introdução.....	14
1.1 Homeopatia.....	14
1.2 <i>Arnica montana</i> .....	14
1.3 Acidentes ofídicos e venenos.....	15
2. Objetivos.....	18
2.1 Geral.....	18
2.2 Específicos.....	18
3. Justificativa.....	19
4 Materiais e Métodos.....	21
4.1 Materiais.....	21
4.2 Métodos.....	22
5. Resultados.....	27
Conclusões parciais da fase 1:.....	30
6. Resultados finais.....	31
7. Discussão e conclusão.....	45
Referências Bibliográficas.....	46
8.Cronograma cumprido.....	50
Anexos.....	51

## 1. Introdução

### 1.1 Homeopatia

A homeopatia, ciência médica complementar, surgiu no final do século XVIII, na busca de terapias diferentes das utilizadas tradicionalmente que se baseavam na medicina heroica, a qual tinha como objetivo eliminar os venenos endógenos do indivíduo (DANTAS, 1987). Os métodos, baseados na realização de sangrias, utilização de substâncias que provocavam o vômito, a diarreia e que causavam lesões na pele, eram pouco eficazes e muitas vezes levavam o paciente a óbito (DANTAS, 1987; FONTES, 2001).

Samuel Hahnemann (1755-1843), médico alemão traduzindo obras científicas, nas áreas de medicina e química, deu início à homeopatia com o estudo do efeito da *Cinchona officinalis* ou *quinina/quina*, um medicamento utilizado para a malária. Testando em si mesmo, observou que, em doses recomendadas, utilizadas em indivíduo saudável, produzia efeitos semelhantes aos produzidos pela malária (DANTAS, 1987; BRUNINI& SAMPAIO, 1993; FONTES, 2001).

Os achados de Hahnemann corroboraram a tese de Hipócrates “*Simila similibus curentur*” ou “semelhantes curam semelhantes”. Este postulado tem como hipótese básica a ideia de que toda substância capaz de provocar determinados sintomas em uma pessoa sadia, sejam estes de ordem física ou psíquica, é também capaz de curar um indivíduo doente (DANTAS, 1987; BRUNINI& SAMPAIO, 1993; REBER **et al.**, 1996; ERNEST &PITTLER, 1998; FONTES, 2001). Com estes resultados foi possível estabelecer e definir a homeopatia como uma terapia complementar, que tem como alicerce e conceito básico o princípio da similitude.

### 1.2 Arnica montana

Samuel Hahnemann realizou a experimentação patogenética com diversas substâncias, dentre elas a *Arnica montana*, de amplo uso e espectro (FONTES, 2001). Pertencente à família *Asteracea*, a *Arnica montana* é encontrada em solos ácidos, nas regiões montanhosas do leste e centro europeus, a maioria em

regiões temperadas da América do Norte ocidental (LATHOUD, 2002; MACÊDO *et al.*, 2004).

Os seus constituintes principais são óleos essenciais, terpenos, princípios amargos, flavonóides, taninos, resinas, cumarinas, arnicina, ácidos orgânicos, alcalóides(DINIZ & SILVA, 2006; BONAMIN, 2008).

O fitocomplexo bloqueia a inflamação desencadeada por traumas, diminuindo a formação de exsudato e incrementando a ação das células responsáveis pela destruição dos fragmentos biológicos necróticos. Os terpenos são espasmolíticos, além de estabilizarem a membrana celular, associado aos flavonóides(DINIZ & SILVA, 2006).

Devido à diversidade de princípios ativos, foram descritos classicamente efeitos sobre o processo inflamatório (CARVALHO & BONAMIN, 2001), bem como ação analgésica, anti-ulcerativa, anti-hipertensiva, anti-genotóxica e de efeitos anti-hemorragicos (GENET, 1980; CERQUEIRA *et al.*, 1987; CHAKRABARTI, 1991; ROBLES *et al.*, 1995; RIGAMONTI, 1995; CHAKRABARTI *et al.*, 2001; JEFFREY & BELCHER, 2002; MACÊDO *et al.*, 2004). Foram observados também efeitos anti-neoplásicos(ROBLES *et al.*, 1995), cardiotônicos, anti-cefaléicos (ROBLES *et al.*, 1995) e promoção da mineralização óssea e ação anti-lipidêmica (HALL *et al.*, 1980).

Age efetivamente em músculos e no tecido celular, atua sobre traumatismos, além de determinar alterações na circulação arterial e capilar (LATHOUD, 2002). Além disto, tem sido utilizada topicamente em contusões, entorses, hematomas, distensões musculares, flebites e artrites(DINIZ & SILVA, 2006).

Em indivíduos saudáveis provoca hemorragias, aborto, cólicas e vômitos (DINIZ & SILVA, 2006). Também provoca sensação de dor e quadros semelhantes aos de contusão ou traumatismo (LATHOUD, 2002).

### **1.3 Acidentes ofídicos e venenos**

Os acidentes por animais peçonhentos são um dos grandes problemas de Saúde Pública na América Latina, ainda assim são consideradas como Doenças Tropicais Negligenciadas pela Organização Mundial de Saúde (TAMBOIURGI, 2010). No Brasil, as serpentes peçonhentas são os principais agentes etiológicos (BOLAÑOS, 1984; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 1998). Porém, dados epidemiológicos têm demonstrado

que 20 a 40% do total de acidentes são causados por serpentes peçonhentas sem interesse médico (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 1998; SALOMÃO et al., 2003), principalmente as das famílias Dipsadidae e Colubridae, que correspondem a aproximadamente 65% do total de serpentes descritas.

Embora a maioria das serpentes ***sem interesse médico***, realmente não ofereça riscos ao homem, aquelas da série opistóglifa apresentam uma glândula de veneno especializada que produz secreção tóxica, e que está ligada a dentes inoculadores posteriores. Casos descrevendo a gravidade dos acidentes causados pelas Xenodontineas *Philodryas olfersii* e *P. patagoniensis* tem sido descritos (MARTINS, 1916; NICKERSON & HENDERSON, 1976; SILVA & BUONONATO, 1983/84, NISHIOKA & SILVEIRA, 1994; ARAÚJO & SANTOS, 1997), assim como a ocorrência de óbito de uma criança no Estado do Rio Grande do Sul após ser mordida por um espécime de *P. olfersii* (SALOMÃO & DI BERNARDO, 1995).

As serpentes do gênero *Philodryas*, com distribuição restrita à América do Sul, apresentam quinze espécies (THOMAS, 1976; GREENE, 1997), destas, somente as espécies *P. olfersii* e *P. patagoniensis* tem recebido maior atenção quanto à elucidação da composição de suas secreções.

Os envenenamentos causados por serpentes do gênero *Philodryas* caracterizam-se pela ação local intensa com dor, edema e hemorragia. Dentro deste gênero *Philodryas olfersii* é a espécie mais importante, no diz respeito aos acidentes, apresentando veneno de atividade hemorrágica, edematogênica, fibrinolítica e miotóxica, nociceptiva, hialuronidásica, entre outras (MACKESSY, 2002; ROCHA & FURTADO, 2007).

Estudos recentes demonstraram a grande similaridade bioquímica e fisiopatológica deste veneno com o de *Bothropoides jararaca*, porém menos ativo e sem ação sistêmica, e a utilização de soro antiofídico para sua neutralização é dispensável. Por outro lado, fazem-se necessários cuidados médicos devido ao intenso processo inflamatório que se instala rapidamente (ROCHA & FURTADO, 2007).

ROCHA e colaboradores (2006) demonstraram que o soro antibotrópico comercial é capaz de neutralizar a ação letal e hemorrágica do veneno de *P. olfersii*. Devido à grande porcentagem de metaloproteinases presentes em sua composição, o EDTA também foi capaz de neutralizar sua ação (CHING et al., 2006; ROCHA et al., 2006).

Tendo em vista que não é preconizada a administração do soro antiofídico nos envenenamentos causados por serpentes da espécie *P. olfersii* e tão pouco de outras espécies de serpentes da família Dipsadidae, todo e qualquer tratamento alopático ou homeopático podem vir a contribuir para o breve restabelecimento dos pacientes. Assim, tivemos como objetivo o estudo dos efeitos da *Arnica montana* 6cH no envenenamento experimental com o veneno de *Philodryas olfersii* em camundongos.

## **2. Objetivos**

### **2.1 Geral**

Estudo dos efeitos da *Arnica montana* 6cH sobre o envenenamento experimental com o veneno de *Philodryas olfersii*.

### **2.2 Específicos**

**2.2.1** Análise dos efeitos da *Arnica montana* 6cH sobre as atividades edematogênica e inflamatória do veneno de *P. olfersii*

**2.2.2** Análise comparativa dos efeitos da *Arnica montana* preparada de acordo com a farmacopeia homeopática e da *Arnica montana* preparada em aparelho simulador magnético (EDS).

### 3. Justificativa

No Brasil, a fauna ofídica de interesse médico está representada pelos gêneros: *Bothrops* “*sensu lato*”, *Crotalus*, *Lachesis*, *Micrurus* e por algumas das famílias Dipsadidae e Colubridae (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 1998).

Os principais Dipsadídeos de importância médica pertencem ao gênero *Philodryas*, sendo as mais comuns, *P. offersii* e *P. patagoniensis* (NICKERSON & HENDERSON, 1976; SILVA & BUONONATO, 1983/84, SILVEIRA & NISHIOKA, 1992).

Muito pouco se conhece das ações dos venenos dos colubrídeos e dipsadídeos. Atualmente, as instituições de pesquisa tem se ocupado com o estudo das serpentes consideradas “venenosas” na classificação médica. Entretanto, o veneno das serpentes ainda oferece muito campo para estudos, pois estes podem variar em função de diferentes fatores intrínsecos e extrínsecos, como também sua composição química é pouco conhecida.

Os acidentes causados pelas serpentes do gênero *Philodryas* caracterizam-se por, principalmente, lesões locais como edema, equimose e também por manifestações sistêmicas, tais como vômitos, elevação da temperatura, entre outros (SALOMÃO **et al.**, 2003). As semelhanças destes acidentes com aqueles causados por serpentes do gênero *Bothrops* “*sensu lato*”, por vezes, podem confundir os médicos (FAN & CARDOSO, 1995; FRANÇA & MÁLAQUE, 2003), levando-os a administração do soro antiofídico (BUCARETCHI **et al.**, 1993; NISHIOKA & SILVEIRA, 1994; ARAÚJO & SANTOS, 1997; RIBEIRO **et al.**, 1994 e 1999). Isto indica a necessidade de uma melhor avaliação dos pacientes quanto à terapêutica a ser adotada, sendo interessante a adoção de métodos alternativos para o pronto reestabelecimento dos pacientes.

Com base nos resultados obtidos anteriormente com o uso da *Arnica Montana* 6cH sobre processo inflamatório (CARVALHO & BONAMIN, 2001; BONAMIN, 2008; KAWAKAMI **et al.**, 2011), bem como seus efeitos na redução do edema, da hemorragia e de outros processos associados (MACÊDO **et al.**, 2004), temos como proposta de trabalho a avaliação da eficácia da *Arnica montana* 6cH na redução dos efeitos pró-inflamatórios provocados pelo veneno da serpente *Philodryas offersii* baseando-nos no clássico princípio da similitude (DANTAS, 1987; FONTES, 2001).

Paralelamente, tem-se observado na prática clínica homeopática o uso crescente de medicamentos preparados de forma não convencional, através de equipamentos de transferência magnética fabricados por diferentes empresas e vendidos por diversos recursos de mídia, inclusive por *sites* de venda na internet. A utilização de tais recursos, a princípio, parece ser interessante, sobretudo em locais remotos e pouco habitados, ou em que o acesso a medicamentos é muito restrito. Medicamentos preparados dessa forma foram sistematicamente utilizados pela associação “Homeopatas sem fronteiras”, nos anos 80, em vários países da África (GAUCHER, C. - comunicação pessoal). Por esse motivo, tal possibilidade aparece como uma alternativa para o tratamento de envenenamentos por animais peçonhentos. Contudo, tais métodos carecem profundamente de demonstração científica. Uma pesquisa no *Pubmed* feita por nós, utilizando as palavras-chave: *homeopathy, electronictransfer, electroniccopy, magnetictransfer, magneticcopy*, resultaram em **ZERO** artigos publicados. Tal número reflete o completo “escuro” em que tais recursos se encontram, sob o ponto de vista científico.

Tendo em vista que os conhecimentos acumulados até o momento sobre os efeitos moduladores da inflamação pela *Arnica montana* 6cH são sólidos o suficiente para identificarmos sua ação biológica, bem como seus mecanismos sobre o processo inflamatório (CARVALHO&BONAMIN, 2001; MACÊDO *et al.*, 2004; BONAMIN, 2008; KAWAKAMI *et al.*, 2011), entendemos que tal modelo experimental foi uma ferramenta útil tanto para o estudo de seus efeitos na lesão inflamatória provocada pelo envenenamento por peçonha de *Philodryas offersii* quanto para o estudo comparativo entre a eficácia deste medicamento preparado de forma convencional (segundo a Farmacopéia Homeopática Brasileira, 3ª edição, 2011) e o mesmo preparado em um aparelho simulador de uso comercial (Oak®).

## 4. Materiais e Métodos

### 4.1 Materiais

#### 4.1.1 Venenos

Exemplares adultos de *Philodryas olfersii*, medindo de 90 a 120 mm, foram extraídos por meio da introdução de suas presas em micropipetas de 100 µl, e durante esta operação a cabeça do animal foi massageada de modo a estimular a serpente a movimentar a maxila e assim liberar o veneno das glândulas de Duvernoy, segundo o método de FERLAN **et al.** (1983). Estas amostras passaram pelo processo de secagem em liofilizador e posteriormente foram armazenadas em freezer (-20°C). (Figura 1)



Figura 1 – *Philodryas olfersii* (foto cedida por Marisa Rocha)

#### 4.1.2 Animais

Conforme FURTADO **et al** (1991) e THEAKSTON&REID (1983), os testes foram realizados em camundongos (*Mus musculus*) cedidos pelo Biotério Central do Instituto Butantan, de acordo com as normas da Comissão de Ética de Utilização de Animais Experimentais do Instituto Butantan.

## 4.2 Métodos

### 4.2.1 Efeitos da *Arnica montana* 6CH e *Arnica montana* 6CH-S sobre a atividade edematogênica do veneno de *Philodryas olfersi* i: fase 1.

O estudo comparativo entre medicamento preparado segundo a farmacopeia homeopática brasileira (tradicional) (Figura 2A) e medicamento preparado em aparelho simulador magnético (OAK®), de mesma potência é feito por meio da comparação dos resultados obtidos de ambos os tratamentos, comparados ao controle (veículo/solução hidroalcoólica 5%).

A preparação da *Arnica montana* 6CH-S foi realizada pela exposição do veículo por 15 minutos a campo magnético estabelecido de acordo com os padrões definidos pelo fabricante para obtenção da potência homeopática desejada (Figura 2B).

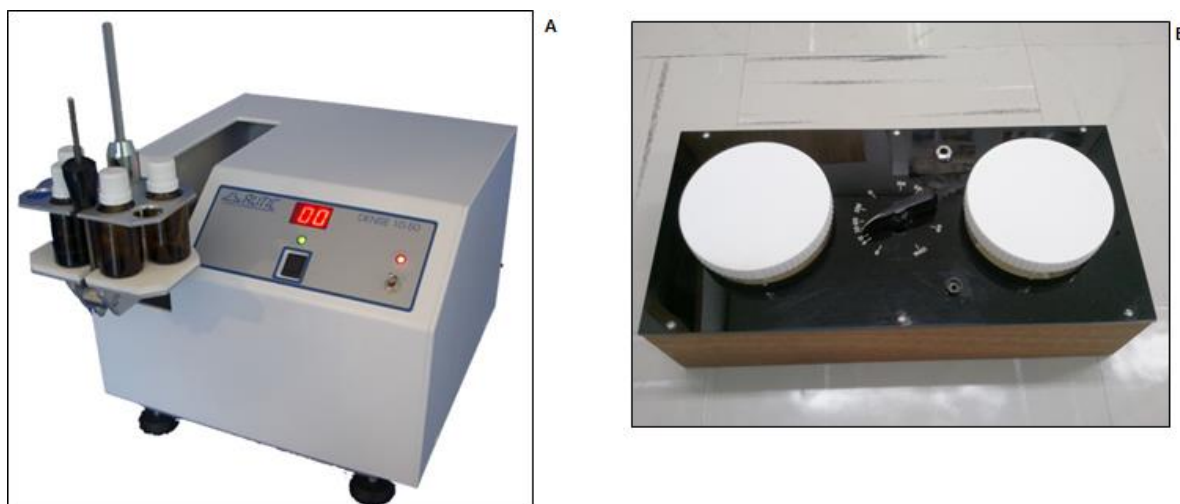


Figura 2 - (A) Dinamizador para preparação de produtos homeopáticos. (B) Aparelho simulador magnético (OAK®) para produção de medicamentos homeopáticos em série. No primeiro recipiente (output) insere-se frasco de tintura-mãe de *Arnica montana*. No segundo recipiente (input) insere-se frasco contendo o veículo. O regulador central define a potência homeopática desejada. Os frascos são mantidos no aparelho por 15 minutos, conforme orientação do fabricante (Foto cedida por Leoni Bonamin).

O estudo da ação da *A. montana* sobre o edema induzido pelo veneno de *P. olfersii* foi realizado com base no método descrito por YAMAKAWA *et al.* (1976), utilizando a Dose Mínima Edematogênica (DME), que é definida como a menor quantidade de veneno necessária para induzir 30% de aumento máximo da espessura da pata injetada (experimental).

Para realização adequada de contenção, inoculação e medicação durante a fase experimental, foi realizado treinamento prévio com a finalidade de aprimorar as técnicas e possibilitar desenvoltura durante os testes (Figura 3).



Figura 3 - Contenção de camundongo: treinamento.

Grupos de 06 camundongos albinos, não isogênicos, pesando de 18 a 28 g, foram injetados, subcutâneo, no coxim da pata esquerda com 1,0  $\mu\text{g}$  em 50  $\mu\text{l}$  da solução de veneno, diluído em salina 0,85% estéril (Figura 4).

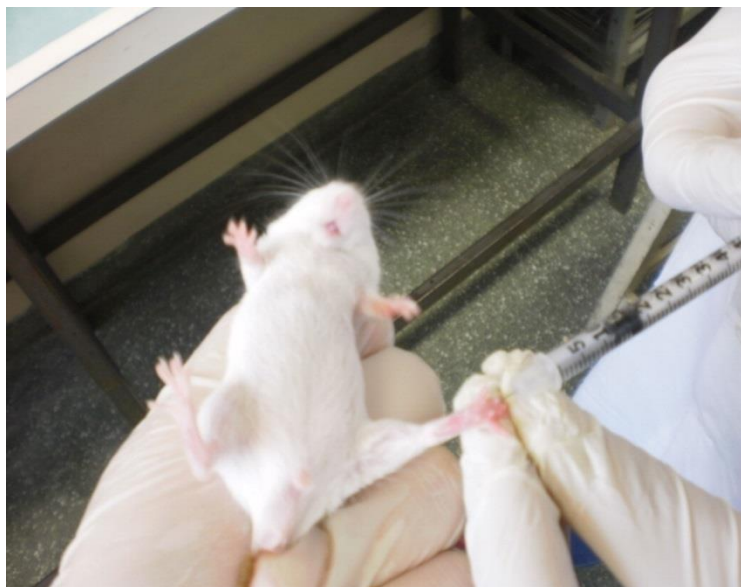


Figura 4 - Inoculação do veneno de *Philodryas olfersii* no coxim plantar esquerdo do camundongo.

Os ensaios com *Arnica montana* 6cH (preparação tradicional), *Arnica montana* 6cH-S (preparação com o simulador magnético) e solução hidro alcóolica 5% foram realizados em cego e os códigos foram revelados somente após a análise estatística. Os animais foram divididos em quatro grupos: A, B, C e D, de acordo com os códigos estabelecidos (Figura 5), exceto os animais do grupo D que não receberam nenhum tipo de tratamento, sendo este o grupo controle. O conteúdo das soluções somente foi revelado ao final dos experimentos da fase 2.

Os códigos revelados foram os seguintes:

- A- Arnica 6cH-S (simulador)**
- B- Solução hidro-alcóolica 5% (veículo)**
- C- Arnica 6cH (método convencional)**
- D- Controle não tratado**



Figura 5 - Frascos contendo as preparações de Solução hidro alcóolica 5% ou Arnica montana preparada de maneira convencional ou Arnica montana preparada com o aparelho simulador magnético.

Os testes foram realizados com um animal de cada grupo por dia, totalizando seis animais por grupo.

As substâncias-teste (A, B, C) foram administradas a cada 15 minutos, por via oral, com o auxílio de pipeta automática.

A espessura dos coxins foi medida com espessímetro (Mitutoyo – sensibilidade 0,01 mm) após 30 minutos, 1 hora, 2 horas, 3 horas e 24 horas (Figura 6).



Figura 6 - Método de aferição da espessura da pata com micrômetro.

O edema foi expresso pela diferença entre os aumentos de espessura no coxim da pata experimental antes e após a inoculação, dividida pelos valores das espessuras da pata antes da inoculação do veneno, multiplicado por 100. Os resultados foram expressos em médias  $\pm$  erro padrão.

#### **4.2.2 Efeitos do extrato de *Arnica montana* 6cH e *Arnica montana* 6cH-S sobre parâmetros histométricos do processo inflamatório: fase 2**

Após a tomada das medidas, os animais foram eutanasiados com uma mistura 1:2 de Xilazina® e Ketamina®, sendo esta diluída em solução salina 0,85 % estéril na proporção 1:2, fornecidos em *overdose* (0,198 mg/kg de xilazinae 2,298 mg/kg de ketamina), com realização de deslocamento cervical em seguida, por segurança, e os coxins plantares inoculados foram colhidos e fixados em formol 10% tamponado por 24 horas e transferidos para álcool 70%, para posterior análise histológica.

Dessa forma, foram posteriormente processados pelos métodos convencionais de inclusão em parafina e coloração de Hematoxilina-Eosina (HE). A distribuição das células inflamatórias e o número de mastócitos degranulados ou não no tecido foram analisados por método semi-quantitativo na fase 2, em um sistema de escores atribuídos por dois observadores independentes, a fim de evitar vieses subjetivos nas análises.

Por motivos técnicos ligados à infraestrutura laboratorial, não foi possível fazer a análise do diâmetro dos vasos linfáticos por método computacional (Image Tool 3.0).

#### **4.2.3 Análise estatística**

Os métodos estatísticos utilizados foram a ANOVA seguida do teste de médias TuckeyKrammer para comparação da variância entre os grupos, sendo valores de  $p \leq 0,05$  considerados significativos.

## 5. Resultados

### Fase 1

Durante os ensaios os seguintes dados comportamentais foram registrados:

- Os animais dos grupos *Arnica 6cH-S* e veículo (solução hidro alcoólica) mantiveram-se calmos, tranquilos, comiam pouco, bebiam pouca água e dormiram a maior parte do tempo;
- Os animais do grupo *Arnica 6cH* sempre ficavam mais agitados quando comparados com os animais dos demais grupos durante a manipulação e lambiam a pata onde o veneno foi inoculado. Comiam e bebiam bastante, corriam de um lado para o outro da gaiola, brigavam nas duas primeiras horas de experimento, acalmando-se somente após a segunda hora;
- Os animais do grupo controle eram os mais agitados quando comparados aos outros grupos. Lambiam a pata onde o veneno foi inoculado, o tempo todo, denotando sinal de dor. Movimentavam-se muito, brigavam, comiam e bebiam bastante, cavavam, tentavam fazer ninho, penduravam-se na grade. Acalmaram um pouco também após a segunda hora do início do experimento, mas ainda assim, continuavam muito agitados se comparados aos animais dos outros grupos.

Esse comportamento se repetiu todos os dias, em de todos os grupos, sendo que cada animal seguiu o padrão descrito acima.

A Tabela 1 mostra os valores de média e desvio padrão da espessura das patas (edema) nos diferentes grupos.

Tabela 1 - Evolução da espessura das patas nos diferentes grupos após (A) 30 minutos, (B) 1 hora, (C) 2 horas, (D) 3 horas e (E) 24 horas da inoculação do veneno.

**A**

Tempo 30 minutos - Fase 1- Evolução do Edema - %				
animal	A (mm)	B(mm)	C(mm)	D(mm)
1	43,9	34,5	12,6	46,5
2	22,2	64,1	69,2	55,3
3	40,6	38	45	47,4
4	42,2	46,2	53,9	48,2
5	34,7	43,2	39,8	39,4
6	52,1	58	56,6	58,3
<b>Media</b>	<b>39,28333</b>	<b>47,33333</b>	<b>46,18333</b>	<b>49,18333</b>
<b>Dp</b>	<b>10,08631</b>	<b>11,5332</b>	<b>19,32774</b>	<b>6,746678</b>

**B**

Tempo 1 hora - Fase 1 - Evolução do Edema - %				
animal	A (mm)	B(mm)	C(mm)	D(mm)
1	23,5	12,8	23	48,4
2	21,3	41,8	48,5	67,8
3	18,3	17,2	34,1	27,4
4	30	25,5	30,3	38,1
5	36,5	37,5	26,2	23,4
6	29,3	29,1	27	29,4
<b>Media</b>	<b>26,48333</b>	<b>27,31667</b>	<b>31,51667</b>	<b>39,08333</b>
<b>Dp</b>	<b>6,683836</b>	<b>11,25192</b>	<b>9,140988</b>	<b>16,66522</b>

**C**

Tempo 2 horas - Fase 1 - Evolução do Edema - %				
animal	A (mm)	B(mm)	C(mm)	D(mm)
1	11,3	8,84	15,9	52,1
2	13,3	34,5	33,8	13,8
3	10,9	11,9	19,1	2,8
4	19,2	12,7	11,8	21,1
5	32,9	31	29,1	32,7
6	17,7	16,5	21,7	26,5
<b>Media</b>	<b>17,55</b>	<b>19,24</b>	<b>21,9</b>	<b>24,83333</b>
<b>Dp</b>	<b>8,242754</b>	<b>10,80259</b>	<b>8,238204</b>	<b>16,90724</b>

**D**

Tempo 3 horas - Fase 1 - Evolução do Edema - %				
animal	A (mm)	B(mm)	C(mm)	D(mm)
1	9,95	7,1	0	45,1
2	10,2	25,9	14,1	9,8
3	3	8,8	12,3	3,2
4	7,5	7,1	3,5	7,8
5	0	9,6	12,6	21,2
6	14,4	13,6	11,3	24,6
<b>Media</b>	<b>7,508333</b>	<b>12,01667</b>	<b>8,966667</b>	<b>18,61667</b>
<b>Dp</b>	<b>5,242177</b>	<b>7,208167</b>	<b>5,768766</b>	<b>15,33785</b>

**E**

Tempo 24 horas - Fase 1 - Evolução do Edema - %				
animal	A (mm)	B(mm)	C(mm)	D(mm)
1	2,7	0	0	2,3
2	0	17,7	9,6	4,5
3	0	0,4	5,91	0
4	0	0,5	0,9	1,4
5	0	0	7,2	11,06
6	1,9	1,4	2,3	12,8
<b>Media</b>	<b>0,766667</b>	<b>3,333333</b>	<b>4,318333</b>	<b>5,343333</b>
<b>Dp</b>	<b>1,214359</b>	<b>7,056817</b>	<b>3,824659</b>	<b>5,335847</b>

mm = milímetro

**Resumo**

min/mm	A	B	C	D
<b>30</b>	<b>39,28333</b>	<b>47,33333</b>	<b>46,18333</b>	<b>49,18333</b>
<b>60</b>	<b>26,48333</b>	<b>27,31667</b>	<b>31,51667</b>	<b>39,08333</b>
<b>120</b>	<b>17,55</b>	<b>19,24</b>	<b>21,9</b>	<b>24,83333</b>
<b>180</b>	<b>7,508333</b>	<b>12,01667</b>	<b>8,966667</b>	<b>18,61667</b>
<b>1440</b>	<b>0,766667</b>	<b>3,333333</b>	<b>4,318333</b>	<b>5,343333</b>

min = minuto  
mm = milímetro

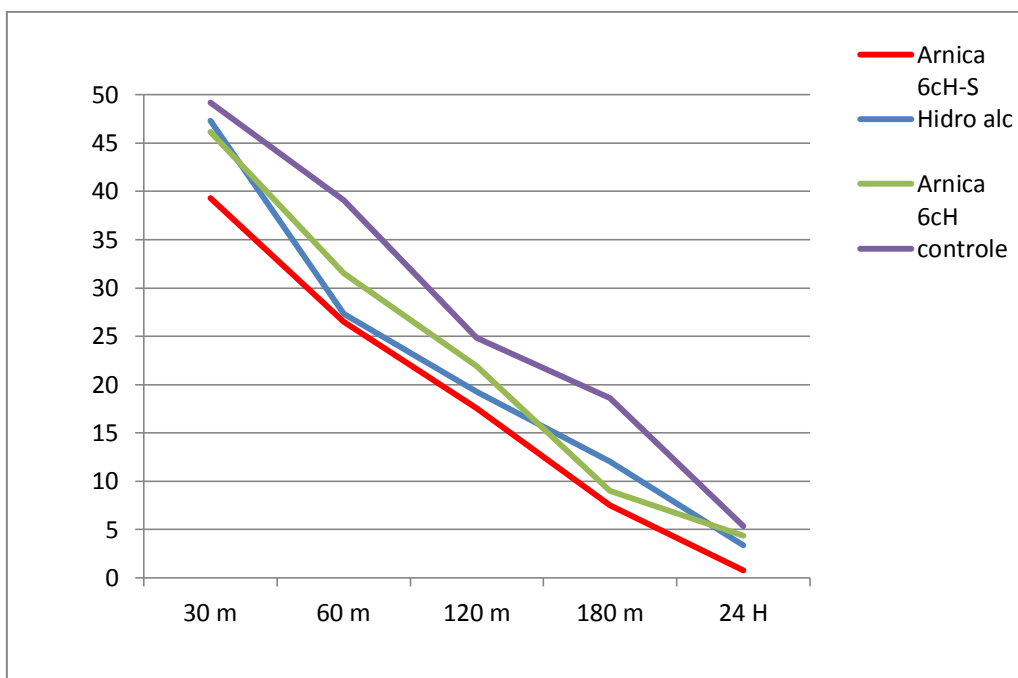


Figura 7 - Evolução do edema inflamatório induzido pela inoculação subcutânea de veneno de *P. olfersii* em função do tempo, nos diferentes grupos. Os valores representam a média. ANOVA.

### Conclusões parciais da fase 1:

- Os animais do grupo *Arnica 6cH-S* obtiveram menor edema, sendo essa a preparação mais eficaz sobre os efeitos do veneno de *Philodryas olfersii*;
- Os animais dos grupos *Arnica 6cH* e Veículo (solução hidro-alcoólica) obtiveram resultado intermediário quanto à evolução do edema;
- Os animais do grupo controle, que não receberam nenhum tipo de tratamento, apresentaram a maior média de porcentagem de edema que os outros grupos, validando o modelo experimental.

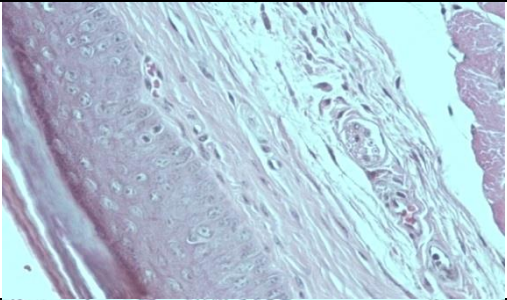
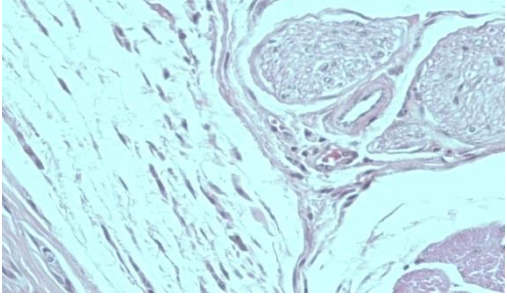
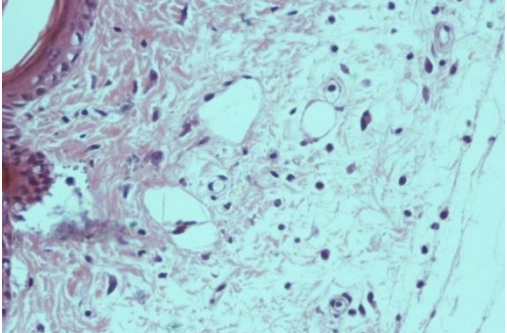
## 6. Resultados finais

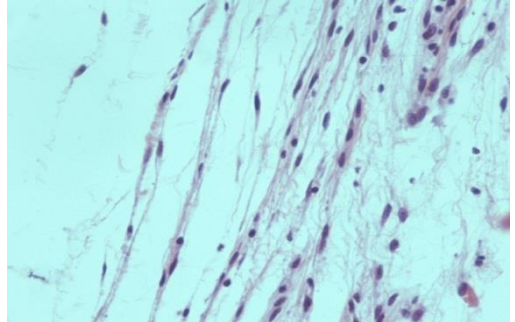
### Fase 2

Na segunda etapa do experimento, as lâminas submetidas à coloração de Hematoxilina - Eosina foram avaliadas por um sistema de escores, buscando padronizar uma classificação dos itens de acordo com o grau de lesão apresentado.


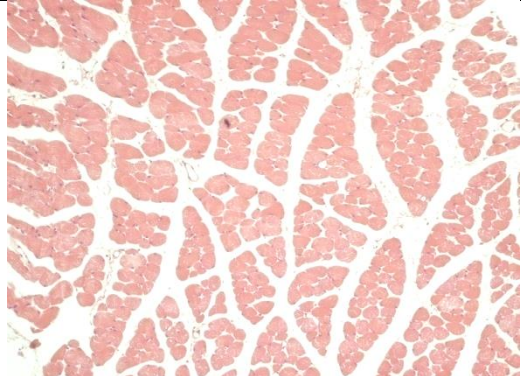
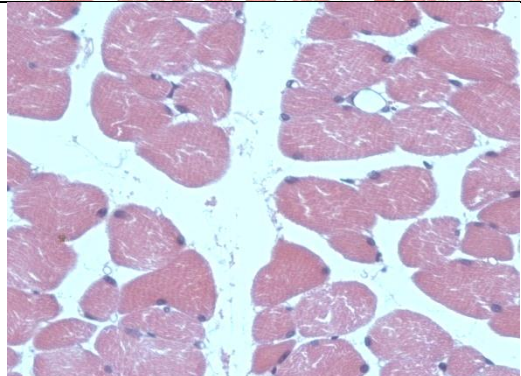
Todas as análises foram feitas em cego. Sendo assim, para avaliarmos, usamos a seguinte classificação:

#### Edema subcutâneo

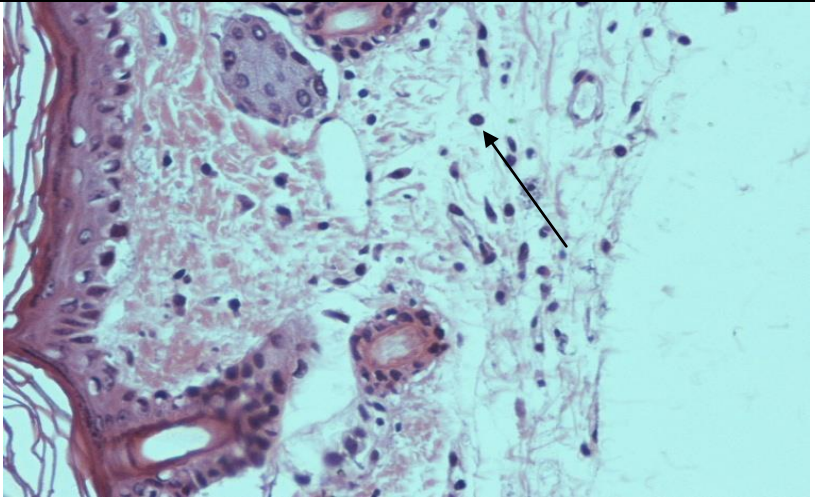
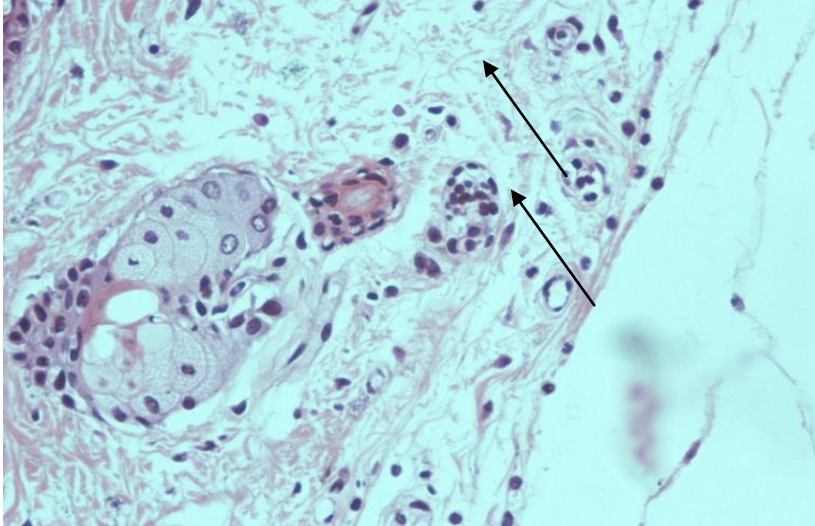
Escore	Descrição	Foto
1	Pequena distensão do colágeno na derme  Poucos vasos linfáticos distendidos	
2	Distensão moderada da derme e vasos linfáticos distendidos e evidentes	
3	Distensão severa da derme e vasos linfáticos bem distendidos e muito evidentes	

4	Distensão severa da derme com ruptura da malha conjuntiva e vasos linfáticos bem distendidos e muito evidentes	
---	--	--

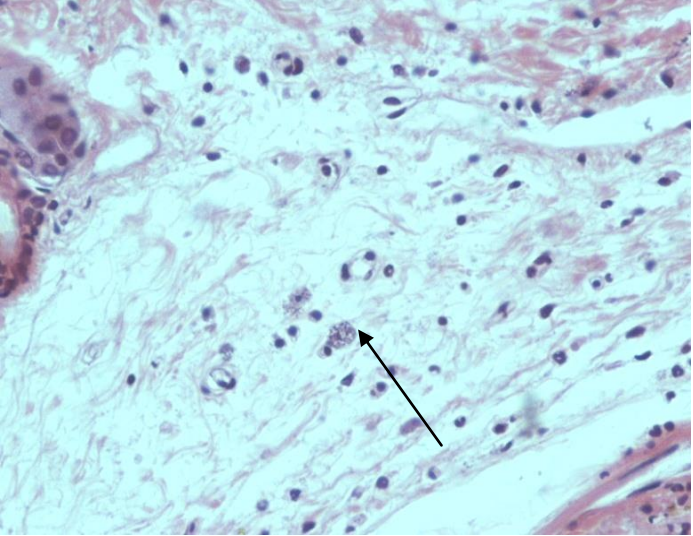
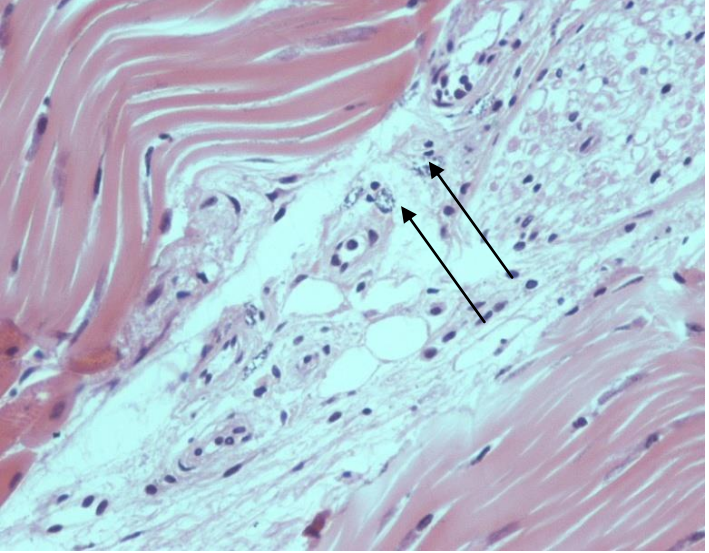
### Edema muscular

Escore	Descrição	Foto
1	Poucos focos de distensão das fibras musculares com formação de espaços vazios entre as fibras	
2	Espaços regulares e bem distribuídos entre as fibras musculares, com distensão do tecido conjuntivo entre os feixes.	
3	Espaços irregulares entre as fibras musculares, com distensão e ruptura do colágeno do tecido conjuntivo entre os feixes.	

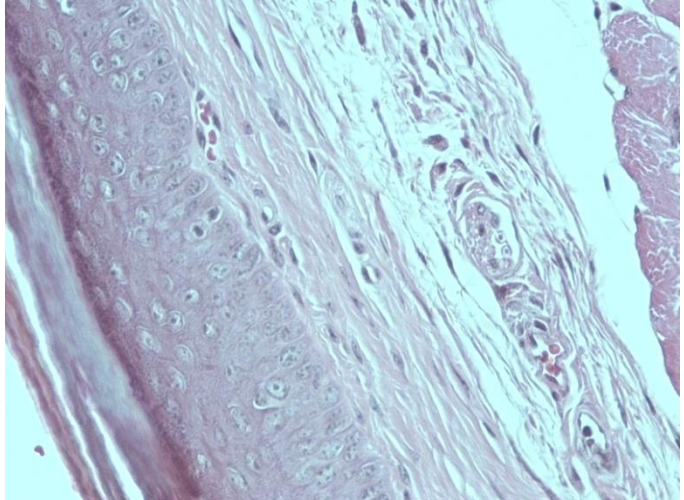
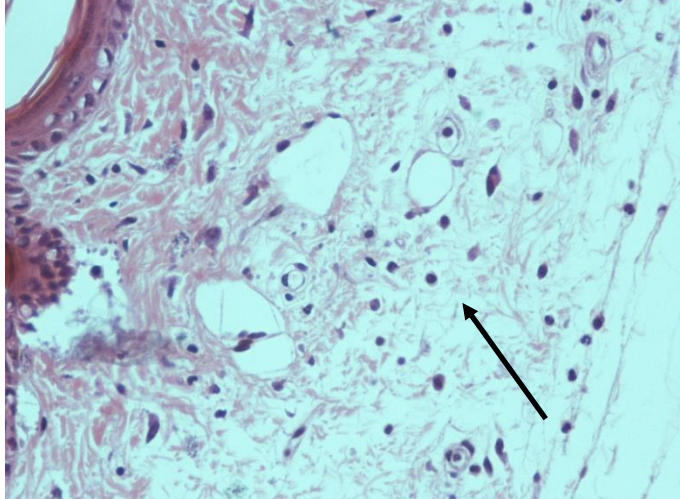
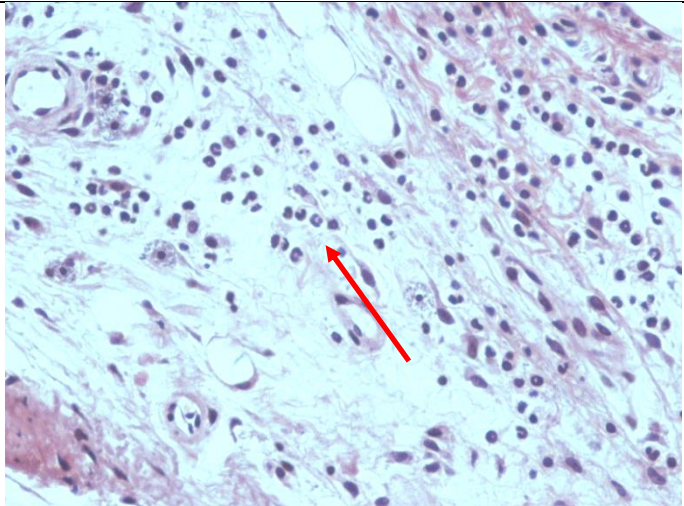
**Marginaçãoleucocitária**

Escore	Descrição	Foto
1	Pouco evidente	
2	Bem evidente	

**Degranulação de mastócitos**

<b>Escore</b>	<b>Descrição</b>	<b>Foto</b>
0	Não degranulado	
1	Degranulado	

### Polimorfonuclear e mononuclear

Escore	Descrição	Foto
0	Sem presença de células inflamatórias no campo.	
1	<p><b>MONONUCLEAR</b></p> <p>Compactação moderada de células inflamatórias na derme</p> <p>(parâmetro também serve para <b>polimorfonuclear</b>)</p>	
2	<p><b>Polimorfonuclear</b></p> <p>Grande compactação de células inflamatórias na derme</p> <p>(parâmetro também serve para <b>MONONUCLEAR</b>)</p>	

Com base nas técnicas de avaliação apresentadas, cada lâmina foi analisada e os padrões estabelecidos classificados. **Todas as lâminas foram analisadas por dois observadores, separadamente, sem que um influenciasse ou participasse da análise do outro.**

Os dados finais foram submetidos à análise da orientadora responsável e consolidados, o que demonstra que as avaliações, mesmo que individuais, foram fidedignas e confiáveis, já que os resultados obtidos foram praticamente os mesmos.

Os tempos analisados foram 30 minutos, 3 horas e 24 horas (Tabelas 2-8; Figuras 8-14).

Tabela 2 - Representação dos diferentes escores atribuídos por dois observadores sobre diferentes parâmetros do processo inflamatório– análise 30 minutos.

### 30 minutos

	controle	Veículo	Arnica 6cH	Arnica 6cH-S
edema SC	4	4	3	4
edema mm	2	2	2	3
marginção leucocitária	2	1	1	1
mastócitos degranulando	0	0	0	0
PMN	0	0	0	0
Mononuclear	1	1	1	1

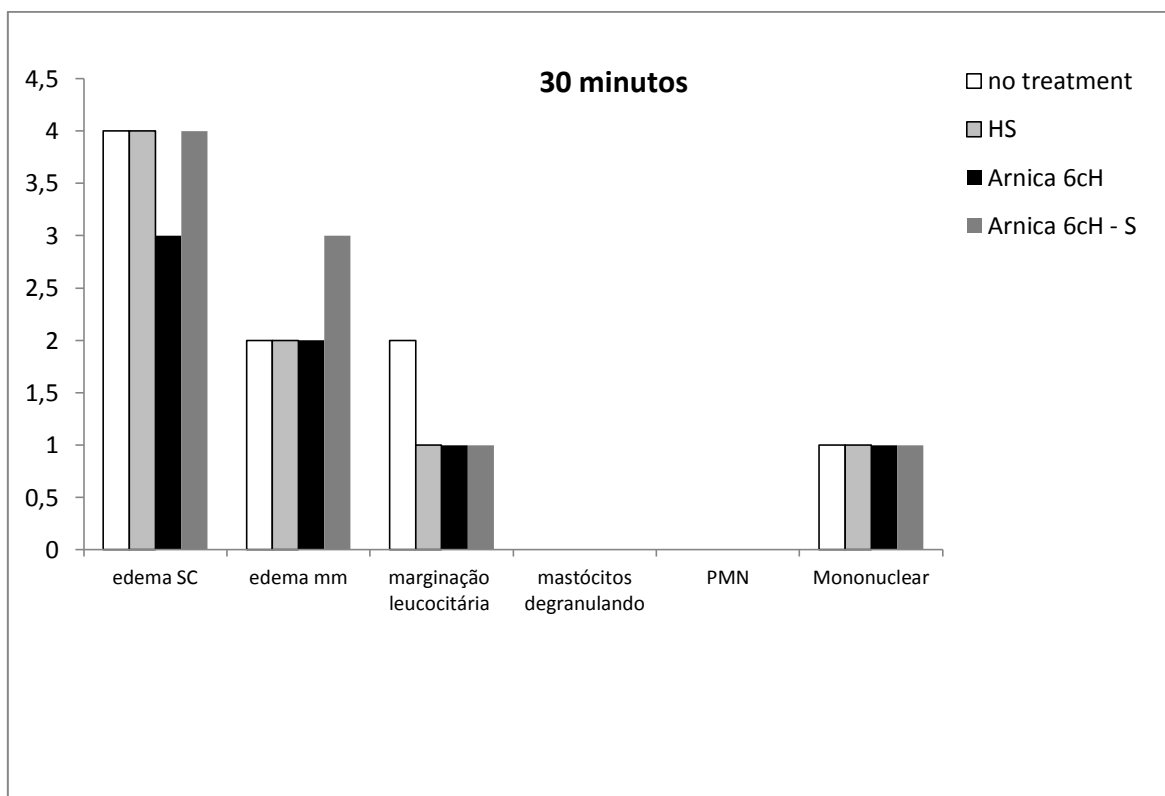


Figura 8 - Gráfico comparativo que revela diferentes escores atribuídos por dois observadores sobre diferentes parâmetros do processo inflamatório – análise 30 minutos

Ao observar a tabela 2 e a figura 8 pode-se concluir que:

- O edema apresentado aos 30 minutos foi menor no grupo de animais submetidos ao tratamento com a *Arnica 6cH* preparada de modo convencional, se comparado as outras soluções e ao grupo que não recebeu tratamento, o que comprova sua eficácia como ação anti-edematogênica;
- Os animais submetidos ao tratamento com a *Arnica 6cH-S*(simulador magnético) tiveram maior edema muscular, inclusive se comparado ao grupo que não recebeu tratamento;
- A marginação leucocitária foi mais evidente nos animais que não receberam nenhum tipo de tratamento (grupo D - controle);
- Para todos os grupos não foi possível observar degranulação de mastócitos, independente se receberam tratamento ou não;
- Não havia a presença de polimorfonucleares contáveis em nenhum dos grupos;

- Em todos os grupos a classificação para mononucleares foi a mesma, apresentando compactação moderada de células inflamatórias na derme.

Tabela 3 - Representação dos diferentes escores atribuídos por dois observadores sobre diferentes parâmetros do processo inflamatório- análise 180 minutos.

### 3 horas

	no treatment	HS	Arnica 6cH	Arnica 6cH-S
<b>Edema SC</b>	3	4	3	3
<b>Edema mm</b>	1	2	2	2
<b>Marginação leucocitária</b>	2	2	2	2
<b>Mastócitos degranulando</b>	0	0	0	0
<b>PMN</b>	1.5	2	1	1
<b>Mononuclear</b>	1	1	1	2

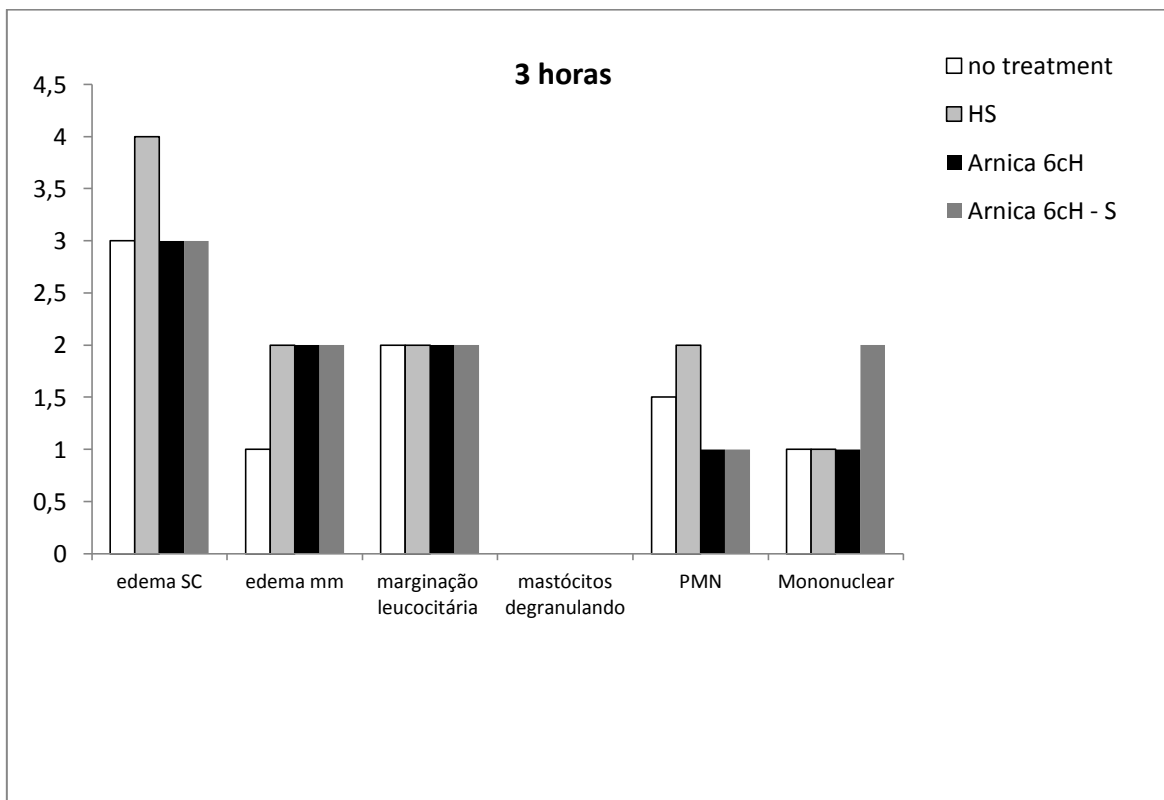


Figura 9 - Gráfico comparativo que revela diferentes escores atribuídos por dois observadores sobre diferentes parâmetros do processo inflamatório – análise 180 minutos

Ao observar a tabela 3 e o gráfico 9 pode-se concluir que:

- O grupo que recebeu a solução hidroalcolica apresentou maior edema subcutâneo se comparado aos outros grupos, inclusive ao grupo que não recebeu nenhum tratamento.
- O grupo que não recebeu nenhum tipo de tratamento obteve o menor escore de edema muscular,
  - A marginação leucocitária foi bem evidente em todos os grupos;
  - Para todos os grupos não foi possível observar degranulação de mastócitos, independente se receberam tratamento ou não;
  - Os animais que foram tratados com a *Arnica 6cH* preparada de modo convencional e os animais tratados com a solução preparada em simulador magnético tiveram o menor escore para polimorfonucleares.
- O grupo tratado com a solução preparada em simulador magnético obteve maior escore de mononucleares, com grande compactação de células inflamatórias na derme.

Tabela 4 - Representação dos diferentes escores atribuídos por dois observadores sobre diferentes parâmetros do processo inflamatório– análise 24 horas.

#### 24 horas

	no treatment	HS	Arnica 6cH	Arnica 6cH - S
edema SC	4	3	3	3,5
edema mm	2	2	2	1
marginação leucocitária	1	1	1	1
mastócitos degranulando	1	1	1	0
PMN	1	1	0.5	1
Mononuclear	2	2	2	2

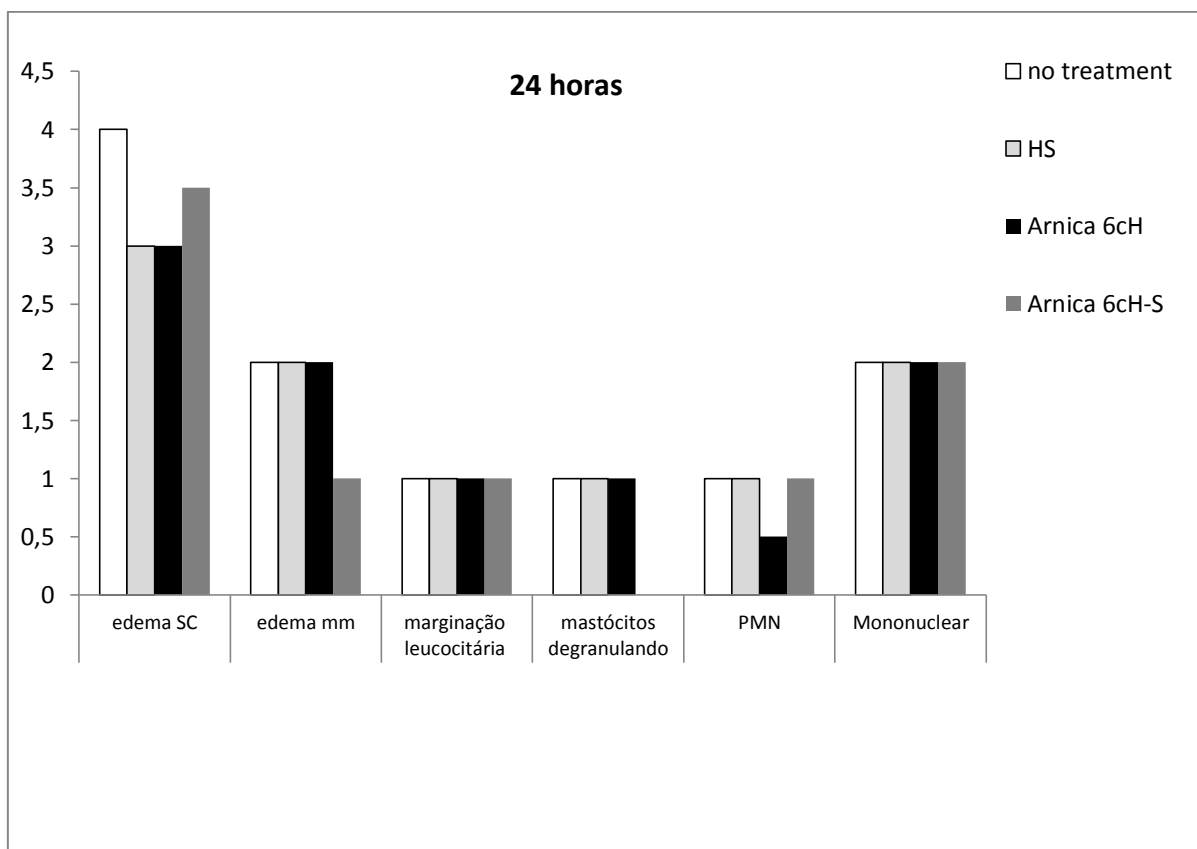


Figura 10 - Gráfico comparativo que revela diferentes escores atribuídos por dois observadores sobre diferentes parâmetros do processo inflamatório – análise 24 horas.

Ao observar a tabela 4 e a figura 10 pode-se concluir que:

- O grupo que recebeu a solução hidroalcoólica e o grupo que foi tratado com a *arnica 6 cH* preparada de modo convencional obtiveram o mesmo escore de edema subcutâneo, menor que o grupo que recebeu tratamento com a solução preparada pelo simulador magnético. O grupo que não recebeu tratamento apresentou o maior escore de edema subcutâneo;
- O grupo que recebeu a solução preparada em simulador magnético apresentou maior eficácia para combater o edema muscular após 24 horas da inoculação do veneno e início do tratamento;
- Todos os grupos obtiveram o mesmo escore de marginação leucocitária, sendo esta pouco evidente;
- Todos os grupos apresentaram mastócitos degranulados, exceto o grupo tratado com a solução preparada em simulador magnético, que apresentou predominantemente mastócitos não degranulados;

- O grupo que recebeu tratamento com a arnica 6cH preparada de forma convencional apresentou um escore menor de PMN, indicando compactação leve a moderada de células inflamatórias na derme, o que demonstra que a solução foi eficaz no controle da migração leucocitária se comparada aos outros grupos;
- O escore para classificação de mononucleares foi igual para todos os grupos, indicando grande compactação de células inflamatórias na derme;

Tabela 5 - Comparação da evolução do edema subcutâneo nos diferentes grupos, nos diferentes tempos.

Edema sc	30 min	3 horas	24 horas
no treat	4	3	4
HS	4	4	3
Arnica 6cH	3	3	3
Arnica 6cH-S	4	3	3.5

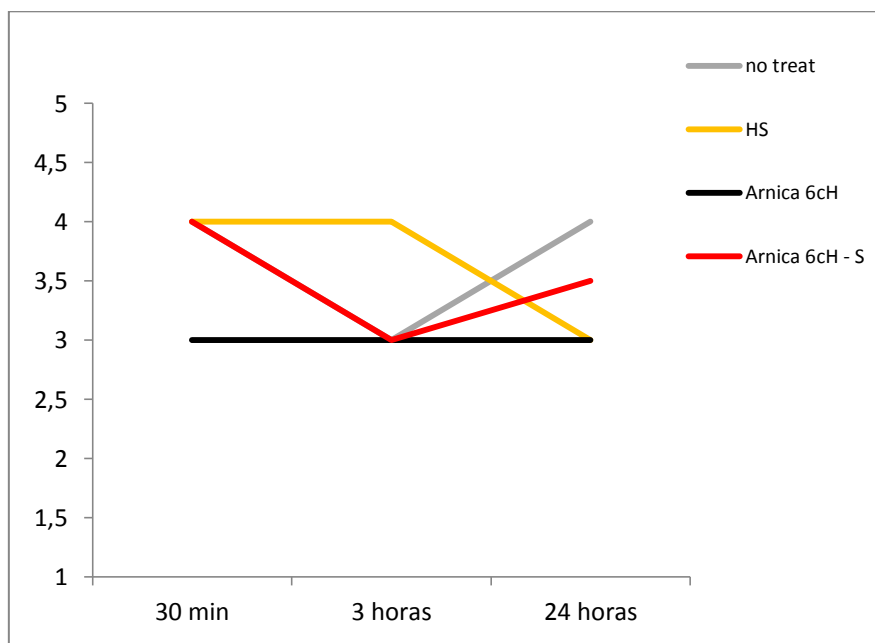


Figura 11 - Evolução do edema subcutâneo nos diferentes grupos, nos diferentes tempos.

Ao se observar a tabela 5 e a figura 11, pode-se concluir que:

- O pico do edema inflamatório medido pelo grau de dissociação tissular se deu entre 3 e 24 horas após a inoculação do veneno, considerando-se o perfil dos grupos controle e veículo. A *Arnica 6cH* preparada de forma convencional

apresentou redução da dissociação tissular em todos os tempos representados, ao contrário do grupo que recebeu *Arnica 6cH-S*, cujos efeitos foram similares ao controle.

Tabela 6 - Comparação da evolução do edema muscular nos diferentes grupos, nos diferentes tempos.

<b>Edema mm</b>	<b>30 min</b>	<b>3 horas</b>	<b>24 horas</b>
<b>no treat</b>	2	1	2
<b>HS</b>	2	2	2
<b>Arnica 6cH</b>	2	2	2
<b>Arnica 6cH-S</b>	3	2	1

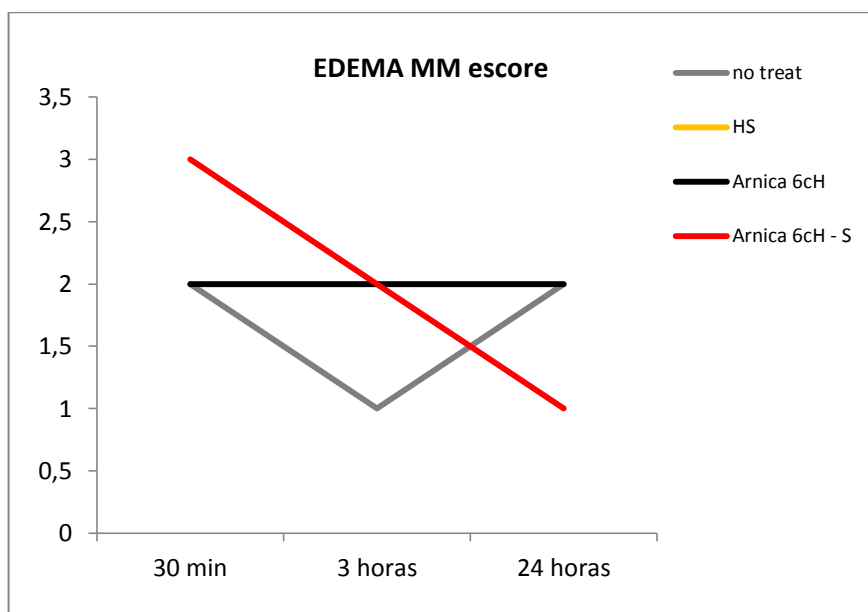


Figura 12 - Evolução do edema muscular nos diferentes grupos, nos diferentes tempos.

Ao observar a tabela 6 e a figura 12, vê-se que os efeitos sobre o edema em planos profundos da musculatura da pele apresentam grande variação entre tempos e grupos, não sendo possível identificar-se efeitos específicos dos medicamentos testados.

Tabela 7 - Comparação da marginação leucocitárias diferentes grupos, nos diferentes tempos.

<b>Marginação</b>	<b>30 min</b>	<b>3 horas</b>	<b>24 horas</b>
<b>no treat</b>	2	2	1
<b>HS</b>	1	2	1
<b>Arnica 6cH</b>	2.5	2	1
<b>Arnica 6cH-S</b>	1	2	1

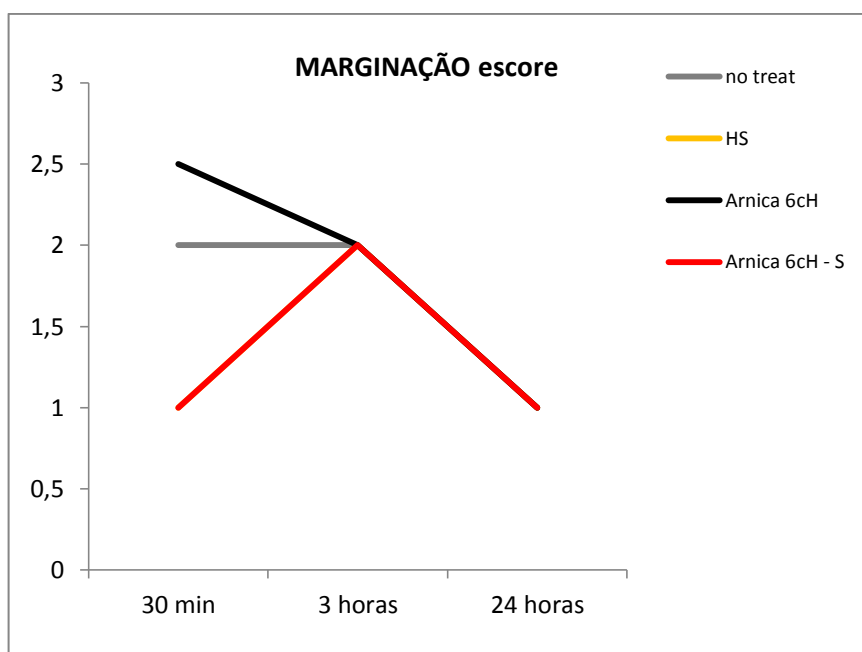


Figura 13 - Marginação leucocitária nos diferentes grupos, nos diferentes tempos.

Ao observar a tabela 7 e a figura 13, observa-se que nos primeiros estágios do processo inflamatório os efeitos da arnica 6cH e 6cH-S foram antagônicos entre si, mostrando mecanismos diferentes. Após 3 horas, os efeitos se igualaram com os controles, no que diz respeito à marginação leucocitária.

Tabela 8 - Comparação da quantidade de polimorfonucleares nos diferentes grupos, nos diferentes tempos.

<b>PMN</b>	<b>30 min</b>	<b>3 horas</b>	<b>24 horas</b>
<b>no treat</b>	0	1,5	1
<b>HS</b>	0	2	1
<b>Arnica 6cH</b>	0	1	0,5
<b>Arnica 6cH-S</b>	0	1	1

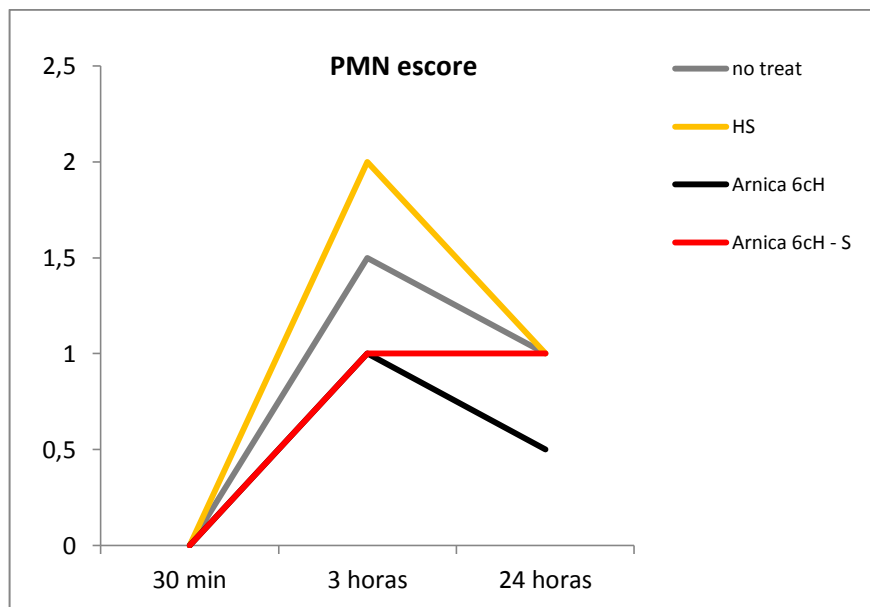


Figura 14 - Quantidade de polimorfonucleares nos diferentes grupos, nos diferentes tempos.

Ao observar a tabela 8 e a figura 14, vê-se diferentes graus de migração de células PMN nos diferentes grupos, sendo tais diferenças mais evidentes após 3 horas da inoculação do veneno.

Os menores escores de migração celular, nesse tempo, foram observados nos grupos tratados com *Arnica 6cH* e *Arnica 6cH-S*, em relação aos controles. Apenas os animais tratados com *Arnica 6cH*, preparada da forma convencional, apresentaram persistência dessa redução mesmo após 24 horas da inoculação do veneno, tendo, portanto, ação mais duradoura.

## 7. Discussão e conclusão

Conclui-se, através deste experimento, que:

- A arnica 6cH preparada de modo convencional tem sua ação reproduzida no combate à inflamação e ao edema, agindo de forma a amenizar os efeitos causadas pelo veneno da serpente *Philodryas olfersii*.

- Tais efeitos podem ser descritos como maior agitação no momento da inoculação, sugerindo maior sensibilidade dolorosa, redução do edema subcutâneo em todos os tempos observados, sendo tal observação mais evidente na análise histológica do que na mensuração macroscópica, redução da presença de células PMN após 3 e 24 horas em seguida à redução da marginação leucocitária vista aos 30 minutos após a inoculação.

- O conjunto dos efeitos observados são compatíveis com a literatura (Bonamin, 2008; Kawakami *et al.*, 2011).

- A solução preparada pelo simulador magnético tem comprovadamente poder eficiente no combate a inflamação e ao edema, sendo observada sua maior ação após 24 horas e principalmente sobre o edema muscular, embora também se observe redução da marginação leucocitária precoce e da migração de células PMN.

- Comparativamente, observa-se que ambas as preparações foram eficientes na ação anti-inflamatória ao veneno, porém com características cinéticas particulares.

## Referências Bibliográficas

- ARAÚJO, ME & SANTOS, ACMCA.1997. Cases of human envenoming caused by *Philodryas olfersii* and *Philodryas patagoniensis* (Serpentes: Colubridae). **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.** **30**(6): 517-519.
- BOLAÑOS, R. 1984. 2. Veneno de Serpientes. Estructura química y actividades biológicas y farmacológicas. **In: Universidad de Costa Rica (Ed.). Serpientes, venenos y ofidismo en Centro América.** San José, p. 45-81.
- BONAMIN, LV. 2008. *Arnica montana* and behavior of connective tissue. **In: BONAMIN, LV (Ed). Signals and Images: Contributions and contradictions of high dilution research.** Dordrecht, The Netherlands, Springer, p. 113-125.
- BRUNINI, C&SAMPAIO, C. 1993. Os precursores de Hahnemann; Hahnemann e a cura pelos semelhantes; Força vital e conceito de saúde **In: BRUNINI, C&SAMPAIO, C(Ed). Homeopatia Princípios, Doutrina, Farmácia IBEHE.** 2 ed., São Paulo, Mythos engenharia de mercado LTDA, p.13-38.
- BUCARETCHI, F.; VIEIRA, R.J.; FERMINO, C.A.; BAVARESCO, A.P.; FONSECA, M.R.C.C.; ZAMBRONE, F.A.D. 1993. Acidentes por *Philodryas olfersii*: Relato de dois casos. **Anais III Congresso Latino Americano de Herpetologia. Universidade Estadual de Campinas.**
- CARVALHO, AC & BONAMIN, LV. 2001. Efeito da administração de *Arnica montana* (tintura-mãe e preparações dinamizadas 6cH) na atividade de diferentes agentes flogísticos em ratos. **Pesquisa Homeopática** **16**(1): 31-43.
- CERQUEIRA, M; SOUZA, J; PEIXOTO, A. 1987. A ação analgésica do extrato bruto aquoso liofilizado do caule e das folhas da *Lychnoporaericoides*(arnica). **Ciência e Cultura****39**: 551-553.
- CHAKRABARTI, A. 1991. Treatment of hematoma in dog: A non surgical approach. **Indian Veterinary Journal****71**(10): 1229-30.
- CHAKRABARTI, J; BISWAS, S.J; KHUDA-BUKHSHAR. 2001. Cytogenetical effects of sonication in mice and their modulations by actionomycin D and a homeopathic drug, Arnica 30. **Indian J. Exp. Biol.** **39**(12):1235- 1242.
- CHING ATC, ROCHA MMT, PAES LEME AF, PIMENTAD DC, FURTADO MFD, SERRANO SMT, HO PL, JUNQUEIRA-DE-AZEVEDO ILM. 2006. Some aspects of the venom

- proteome of the Colubridae snake *Philodryas offersii* revealed from a Duvernoy's (venom) gland transcriptome. **FEBS Letters** 580 (2006): 4417– 4422.
- DANTAS, F. 1987. **O que é homeopatia**. 3 ed., São Paulo, Brasiliense. 120pp.
- DINIZ, R e SILVA, S. 2006. **Protocolo de Fitoterapia**. Londrina, Prefeitura do Município. Autarquia Municipal de Saúde, 1 edição, 89p.
- ERNST, E andPITTLER, MH. 1998. Efficacy of homeopathic *Arnica*.**Arch. Surg.** **133**(11): 1187-1190.
- FAN, HW & CARDOSO, JL. 1995. Clinical Toxicology of Snake Bites in South America. **In: Handbook of Clinical Toxicology of Animal Venoms naPoisons**. MEIER, J. & WHITE, J. (Eds.).CRC Press. Boca Raton. NeW York, p.667-688.
- FONTES, O. 2001. Histórias, princípios e fundamentos da homeopatia. **In: Farmácia Homeopática: Teoria e Prática**.Barueri, São Paulo, Editora Manoele, 1 ed., Cap.1, p.3-22.
- FRANÇA, F.O.S & MÁLAQUE, C.M.S. 2003. Acidente botrópico. **In: CARDOSO, J.L.C.; FRANÇA, F.O.S.; WEN, F.H.; MÁLAQUE, C.M.S. & HADDAD, V.JR. (Ed.).Animais Peçonhentos do Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos acidentes**. 1. ed., São Paulo, Sarvier, p. 72-86.
- FURTADO, MFD; DIAS DA SILVA, W & COLLETO, GMDD. 1991. Controle de Qualidade dos Venenos Animais e dos Correspondentes Antivenenos. I Padronização dos métodos de ensaio das atividades bioquímicas e farmacológicas dos venenos de algumas espécies do gênero *Bothrops* e *Crotalus* usando amostras secas a temperatura ambiente ou liofilizadas. **Memórias do Instituto Butantan** **53** (2): 149-159.
- GENET, L. 1980. *Arnica* - Grandes caracteristiques: contusion, douleur, hypersensibilité. **Les annales Homeopathiques Française**, v.4, p.91.
- GREENE HW. 1997. **Snakes: the Evolution on Mistery in Nature**. Berkeley: University California Press. 351p.
- HALL, IH; LEE, KH; STARNES, CO; MURAOKA, O; SERMIDA, Y; WADDEL, TG. 1980. Antihyperlipidemic activity of sesquiterpene lactones and related Coumpounds. **J. Pharm. Sci.** **69**(6): 694-697.

- JEFFREY, SL & BELCHER, HJ. 2002. Use of *Arnica* to relieve pain after carpal- tunnel release surgery. **Altern. Ther. Health Med**8(2): 66-68.
- KAWAKAMI, AP; SATO, C; CARDOSO, TN; BONAMIN, LV. 2011. Inflammatory process modulation by homeopathic *Arnica montana* 6CH: the role of individual variation. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**. 2011(2011):1-12.
- LATHOUD, JA. 2002. *Arnica montana* In: Lathoud JÁ. Matéria médica homeopática revisada e atualizada. São Paulo, Editora Robe, p.72-76.
- MACÊDO, SB; FERREIRA, LR; PERAZZO, FF; CARVALHO, JC. 2004. Anti-inflammatory activity of *Arnica montana* 6CH: preclinical study in animals. **Homeopathy**93(2): 84-87.
- MACKESSY SP. 2002. Biochemistry and Pharmacology of Colubrid Snake Venoms. **J. Toxicol.-Toxin Reviews**. V.21, 43-83.
- MARTINS N. 1916. **Das Opisthoglyphas Brasileiras e o seu Veneno**. Tese de Doutorado, Faculdade de Medicina do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 111p.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. 1998. **Manual de Diagnóstico e Tratamento de Acidentes por Animais Peçonhentos**. Brasília. Fundação Nacional da Saúde.
- NICKERSON AM & HENDERSON RW. 1976. A case of envenomation by the South American colubrid *Philodryas olfersii*. **Herpetologica** 32(2):197-198.
- NISHIOKA SA & SILVEIRA PVP. 1994. *Philodryas patagoniensis* bite and local envenoming. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo** 36(3): 279-281.
- REBER, A; POITEVIN, B; LEROY, MH; NZOBOUNSA, V. 1996 Optokinetic and vestibulo-oral reflex adjustment by GABA antagonists. **Behavioural Brain Research**81: 89-97.
- RIBEIRO, L.A.; PUORTO, G. & JORGE, M.T. 1994. Acidentes por serpentes do gênero *Philodryas*: avaliação de 132 casos. **Rev. da Soc. Bras. Med. Trop.** 27 (supl. I):87.
- RIGAMONTI, B. 1995. Arnica a magical remedy against any type of trauma. **Obiettivi e Documenti Veterinari**16:67-68.
- ROBLES, M; AREGULLIN, M; WEST, J; RODRIGUEZ, E. 1995. Recent studies on the zoopharmacognosy, pharmacology and neurotoxicology of sesquiterpene lactones. **Planta Medica**61(3):199-203.

- ROCHA, MMT e FURTADO, MFD, 2007. Análise das atividades biológicas dos venenos de *Philodryas as offersii*(Lichtenstein) e *P. patagoniensis*(Girard) (Serpentes, Colubridae). **Revista Brasileira de Zoologia** **24** (2): 410–418.
- ROCHA, MMT, PAIXÃO-CAVALCANTE, D; TAMBOURGI, DV; FURTADO MFD. 2006. Duvernoy's gland secretion of *Philodryas offersii* and *Philodryas patagoniensis* (Colubridae): Neutralization of local and systemic effects by commercial bothropicantivenom (*Bothrops* genus). **Toxicon** **47** (2006) 95–103.
- SALOMÃO EL & DI BERNARDO M. 1995. *Philodryas offersii*: uma cobra comum que mata. Caso registrado na área da 8ª Delegacia Regional de Saúde. **Arquivos da SBZ** **14/15/16**. Sorocaba. p.21.
- SALOMÃO, MG; ALBOLEA, ABP; ALMEIDA-SANTOS, SM. 2003. Colubrid snakebite: a public health problem in Brazil. **Herpet. Review** **34**(4): 307-312.
- SILVA, MV & BUONONATO, MA. 1983/84. Relato clínico de envenenamento humano por *Philodryas offersii*. **Mem. Inst. Butantan** **47/48**: 121-126.
- SILVEIRA, PVP & NISHIOKA, SA. 1992. Non-venomous snake bite and snake bite without envenoming in a brazilian teaching Hospital. Analysis of 91 cases. **Ver. Inst. Trop. S. Paulo** **34**: 499-503.
- TAMBOURGI DV, 2010. Envenenamento por Serpentes: Doença Negligenciada Afetando Países em Desenvolvimento. **Anais da 62ª Reunião Anual da SBPC - Natal, RN - Julho/2010**.
- THEAKSTON, RDG and REID, HA. 1983. Development of simple standard assay procedures for the characterization of snake venoms. **Bull. W.H. Org.** **61**: 949-956.
- THOMAS, RA. 1976. **A Revision of the American Colubrid Snake Genus *Philodryas* Wagler, 1830**. Tese (Doutorado) – Graduate College of Texas A and M University, 338p.
- YAMAKAWA ,SA; NOZAKI, M and HOKAWA, Z. 1976. Fractionation of sakishimababu (*Trimeresurus elegans*) venom and lethal, hemorrhagic and edema-formin activities of the fractins. In: OHSAKA A; HAYASHI K; SAWAY QY. (Eds.). **Animal, Plant and Microbial Toxins**, v.1, New York: Plenum.


## 8.Cronograma cumprido

Tempo total do projeto: 01 ano (setembro/2012 a agosto /2013).

- Primeiro trimestre (setembro, outubro e novembro): revisão bibliográfica e padronização dos métodos;
- Segundo trimestre (dezembro, janeiro e fevereiro): execução dos experimentos *in vivo*;
- Terceiro trimestre (março, abril e maio): repetição dos experimentos *in vivo* (se necessário) e análise histológica;
- Quarto trimestre (junho, julho e agosto): análise histológica, análise estatística e redação de relatório e artigo para publicação.

## Anexos

- Simpósio GIRI 2013

	<b>Groupe International de Recherche sur l'Infinitésimal</b> International Research Group on Very Low Dose and High Dilution Effects
<b>XXVII Annual Symposium of GIRI</b>	
<b>I certify that</b>	
Loren D'Aprile, Marisa Maria Teixeira da Rocha, Priscila Dias Motta, Cidéli de Paula Coelho, Caio Rodrigues dos Santos, Leoni Villano Bonamin	
<b>has taken part in the XXVII GIRI Annual Symposium held in Bern, Switzerland, 03-04 September 2013 presenting a work entitled</b>	
Effectiveness of different preparations homeopathic <i>Arnica montana</i> experimental treatment of poisoning with poison <i>Philodryas olfersii</i> .	
<b>The president of GIRI</b>	
	


- Carta de recomendação

São Paulo, 16 de Julho de 2013

A quem de direito,

Certifico que a aluna Loren D'Aprile, estudante do 9º semestre de Medicina Veterinária da UNISA participou como aluna executora do projeto de IC – PIBIC intitulado: “EFICÁCIA DE DIFERENTES PREPARAÇÕES HOMEOPÁTICAS DE *Arnica montana* NO TRATAMENTO DO ENVENENAMENTO EXPERIMENTAL COM VENENO DE *Philodryas olfersii*”, tendo apresentado ótimo desempenho, dedicação e independência na condução dos experimentos propostos.

Sem mais,

  
Prof. Dr. Leoni V Bonamin  
UNISA