



Efeito do extrato hidroalcoólico de *Tabernaemontana catharinensis* em camundongos inoculados experimentalmente com veneno botrópico

Effect of hydroalcoholic extract of *Tabernaemontana catharinensis* in mice experimentally inoculated with bothropic venom

Recebido em 17/10/2010

Aceito em 20/05/2011

Ana Paula Boni*, Ana Lúcia Bertarello Zeni, Claudia Almeida Coelho de Albuquerque

Departamento de Ciências Naturais, Universidade Regional de Blumenau, FURB, Blumenau, SC, Brasil

RESUMO

O uso de plantas medicinais no tratamento de acidentes botrópicos é muito difundido entre a população e diversas espécies vegetais têm sido descritas como antiofídicas. Assim, este estudo teve o objetivo de analisar o efeito do extrato hidroalcoólico de *Tabernaemontana catharinensis* em camundongos submetidos ao envenenamento botrópico experimental. Utilizou-se 48 camundongos, divididos em 6 grupos (n=8), subdivididos nos tempos 2 e 24 h: controle, extrato, soro anti-ofídico, veneno, veneno e extrato e veneno e soro anti-ofídico. Após os tempos de 2 e 24 h de tratamento, através do sangue foram analisados os seguintes parâmetros bioquímicos: aspartato aminotransferase, alanina aminotransferase, creatinina, uréia, albumina, ácido úrico e proteínas totais. Foram analisados músculo esquelético, rins e fígado e as seções histológicas foram coradas com hematoxilina-eosina. Observaram-se alterações no tratamento com o extrato após o envenenamento experimental, no tempo de 2 h na atividade da aspartato aminotransferase e nível de ácido úrico, demonstrando potencial de neutralização e, em 24 h, houve uma diminuição significativa no ácido úrico. O extrato atuou positivamente na diminuição das alterações no tecido muscular esquelético provocadas pelo veneno. Este trabalho mostra pela primeira vez efeitos sistêmicos e morfológicos do extrato de *Tabernaemontana catharinensis* em camundongos envenenados.

Palavras-chave: Extratos vegetais, venenos de Viperídeos, *Bothrops jararacussu*, *Tabernaemontana catharinensis*, antivenenos

ABSTRACT

The use of medicinal plants for snakebite treatment is widespread among the population, and several plant species have been described as antiophidic. In this sense this study aimed to analyze the neutralizing effect of the *Tabernaemontana catharinensis* hydroalcoholic extract in mice submitted to experimental bothropic poisoning. Forty eight mice were used and divided into 6 groups with 8 animals each, and subdivided into 2 and 24 h: control, extract, anti-ophidic serum, venom, venom and extract and venom and anti-ophidic serum. After 2 and 24 h of treatment the animals were sedated and the blood was collected. The biochemical parameters analyzed were: aspartate aminotransferase, alanine aminotransferase, creatinine, urea, albumin, uric acid and total protein. Some organs were analyzed, skeletal muscle, kidney and liver, and histological sections that were stained with hematoxylin-eosin. Alterations were observed in venom and extract group (2 h) in aspartate aminotransferase release, showing a venom neutralizing potential. The level of uric acid was reduced after 24 h. Moreover the extract was able to protect tissues of alterations induced by the venom. This work, for the first time, shows morphological and systemic effects of *Tabernaemontana catharinensis* hydroalcoholic extract in envenomated mice.

Keywords: Plant Extracts, Viper venoms, *Bothrops jararacussu*, *Tabernaemontana catharinensis*, Antivenins

INTRODUÇÃO

O Brasil possui uma riquíssima fauna de ofídios, dentre as quais a família dos viperídeos representa o mais relevante grupo de serpentes devido a sua importância médica, pois são responsáveis pela maioria dos acidentes

ofídicos registrados. Segundo França & Málaque (2003), as serpentes do gênero *Bothrops* são responsáveis por 90% destes acidentes. Pelo Ministério da Saúde são relatados, anualmente, cerca de 18.000 acidentes botrópicos, com

* **Contato:** Ana Paula Boni, Universidade Regional de Blumenau, FURB, Departamento de Ciências Naturais, Rua Antônio da Veiga, 140, Victor Konder, CEP: 89012-900, Blumenau/SC, Brasil, e-mail: aninhaboni@hotmail.com

letalidade em torno de 0,3% nos casos tratados. Os locais do corpo mais acometidos são os pés e as pernas, representando 70,8% do total de casos. É importante ressaltar que esses acidentes ocorrem predominantemente nas áreas rurais, constituindo-se frequente agravamento à saúde dos trabalhadores, em geral, o acesso aos serviços de saúde é precário (França & Málaque, 2003). Dentre os acidentes botrópicos podem-se destacar os ocasionados pela espécie *Bothrops jararacussu*. Geralmente, esta espécie causa acidentes graves pela quantidade de veneno que pode inocular em sua presa. O veneno é constituído por uma complexa mistura de componentes protéicos e não-protéicos (aminoácidos livres, enzimas, toxinas, peptídeos, carboidratos, lipídios, nucleotídeos, aminas biogênicas, vários cátions e ânions) que produzem um quadro fisiopatológico caracterizado por alterações locais e sistêmicas. Estas alterações incluem inflamação, edema, halo hemorrágico, eritema, intensa dor, cicatrização lenta das lesões devido à isquemia local e necrose, que constitui a complicação local de maior importância, podendo limitar-se ao tecido subcutâneo ou comprometer estruturas mais profundas, como músculos, tendões e ossos (Fonseca et al., 2004).

No veneno botrópico, as principais frações são: Botropsina I e II, Trombocitina, Jararacina, fator ativador da Bradicinina, metaloproteinases, Jararacafibrase, fração IV e V com ação miotóxica e outras enzimas pro-coagulantes. Por outro lado, sabe-se que uma das principais frações da peçonha da *B. jararacussu* – a Bothropstoxin-1 (Bthtx-1), é uma fosfolipase A2-“like”. As fosfolipases A2 são enzimas que podem ocasionar a perda permanente de tecido, se a necrose local for intensa, assim como, neurotoxicidade, miotoxicidade, citotoxicidade e efeitos anticoagulantes, entre outros (Spencer et al., 1998).

Preston e colaboradores (1990), também demonstraram em seus trabalhos que existe uma relação dose-dependente entre perda de fibras musculares e a quantidade de veneno inoculado. No qual determinou que a inoculação de 1µg de veneno provoca perda de 50% fibras musculares.

O veneno botrópico, em concentração subletal causa alterações funcionais renais, como diminuição da filtração glomerular, da diurese e do fluxo plasmático renal em ratos. O efeito direto do veneno botrópico em estudo de rim isolado, demonstrou diminuição da pressão de perfusão, do fluxo urinário, da reabsorção proximal de sódio e da redução do clearance osmolar. Outros estudos demonstraram na análise histológica a ocorrência de dilatação de túbulos proximais e necrose tubular aguda. A ocorrência da insuficiência renal aguda se dá em processos de envenenamento em que há comprometimento circulatório intenso, bem como o da hemostasia, levando a formação de trombos principalmente pela ação da hemorragina. Ocorre também a participação das miotoxinas e das frações proteolíticas do veneno sobre o rim (Boer-Lima et al., 2002).

Outras frações do veneno botrópico parecem estar envolvidas na nefrotoxicidade renal, como a lecitina que inibe a proliferação de células renais (Pereira-Bittencourt et al., 1999). A lecitina poderia ter um papel prejudicial na isquemia renal causada pelo acidente botrópico, através da inibição da regeneração.

Para minimizar tais efeitos o único tratamento disponível para o envenenamento por *B. jararacussu* consiste na administração do soro antiofídico específico (Fonseca et al., 2004), e se esta for iniciada rapidamente após o envenenamento, a neutralização dos efeitos sistêmicos normalmente é alcançada com sucesso, porém, a neutralização das lesões locais é ainda uma tarefa difícil (Ferreira et al., 2003). Para que esta terapêutica seja eficaz no combate aos efeitos danosos e até mesmo letais ocasionados pelo veneno, além do tempo é necessário que a administração do soro antiofídico seja realizada em doses e por vias adequadas (Cupo et al., 1991).

A prospecção de novos fármacos pode trazer a tona pesquisas sobre a nossa biodiversidade animal e vegetal. As plantas estão presentes na natureza em abundância e são de fácil acesso, por isso tornaram-se uma alternativa farmacológica importante para uma série de patologias e formas diferentes de lesões teciduais ou alterações fisiológicas, relevantes no tratamento aos efeitos danosos do veneno de serpentes, devido a uma série de componentes farmacológicos ativos, como os flavonóides e taninos (Borges et al., 2001). O uso de plantas medicinais no tratamento de acidentes ofídicos é bastante difundido entre a população, acarretando na necessidade de estudos mais aprofundados. Neste sentido diversas espécies tem sido descritas como promissoras no tratamento antiofídico e alguns princípios ativos foram isolados e caracterizados, como por exemplo de, *Tabernaemontana catharinensis*, *Mandevilla velutina* entre outras (Borges et al., 2001; Almeida et al., 2004; Biondo et al., 2003).

Veronese e colaboradores (2005) estudaram a capacidade do extrato aquoso de *T. catharinensis* em inibir a atividade miotóxica do veneno de *B. jararacussu* e de duas das suas principais miotoxinas, BthTX-I e II e verificaram que o extrato aquoso foi capaz de diminuir a atividade miotóxica, demonstrando que esta planta representa uma promissora fonte na inibição de miotoxinas, podendo eventualmente ser utilizada na terapia anti-ofídica, amenizando sintomas.

Rates (1988) e Almeida et al. (2004) mostraram potente atividade antitumoral in vitro e que as frações podem neutralizar a letalidade, mas não inibir totalmente os sinais de envenenamento. Outros estudos realizados demonstraram que extratos metanólicos e etanólicos do tronco de *T. catharinensis* tem atividade anti-bacteriana, anti-inflamatória e analgésica (Guida et al. 2001). Batina et al. (2000) demonstraram que o extrato aquoso e etanólico das raízes de *T. catharinensis* inibem a atividade letal e miotóxica do veneno de *Crotalus durissus terrificus*.

Contudo, ainda é escasso o conhecimento científico a respeito das prováveis características fármaco-químicas apresentadas por estas plantas e somente nos últimos anos o potencial de plantas bioativas vem ganhando maior atenção científica.

Assim sendo, diante dos trabalhos oriundos e do forte potencial promissor da *T. catharinensis*, esta foi utilizada no presente estudo. Esta planta é conhecida como jasmim, jasmim-pipoca, leiteira-dois-irmãos, casca de cobra ou “palo de vibora” (Rates, 1988), é um arbusto (Guida et al., 2001), podendo ser encontrada na Argentina, Uruguai, Paraguai e Sul do Brasil, tendo muitos relatos a respeito de

seus usos, como antídoto para mordedura de serpentes, calmante em dor de dentes e tratamento de verrugas. Outras espécies do gênero são utilizadas para tratamento de feridas, herpes, tumores e ainda como hemostática, hipotensora e cardiotônica (Rates, 1988). No nordeste da Argentina ainda é utilizada para desinfecção de feridas, infecções de garganta, unhas, olhos, gonorréia e também em diarreias frente a infecções por parasitas (Guida et al., 2001).

Diante das informações obtidas sobre os efeitos do extrato desta planta e sua relação com acidentes ofídicos buscou-se investigar sua atividade sistêmica e morfológica sobre camundongos envenenados experimentalmente com veneno de *B. jararacussu*.

MATERIAL E MÉTODOS

Peçonha e Soro Antiofídico

O veneno de *Bothrops jararacussu* foi proveniente de um indivíduo adulto do Parque Zoológico de Brusque. Para a extração do veneno, comprimiram-se manualmente as glândulas de veneno. A serpente teve suas presas apoiadas em um becker de vidro envolto por filme plástico por onde o veneno fluiu.

O veneno foi congelado e liofilizado no Laboratório de Frutas e Hortaliças da Universidade Federal de Santa Catarina, sendo preparada uma solução mãe (10 mg do veneno diluído em 5 mL), da qual foram retiradas alíquotas específicas contendo a quantidade desejada (100 µg) de veneno para posterior utilização.

O soro antiofídico fornecido pelo Instituto Butantan foi administrado (1,0 mL) via intraperitonal nos animais.

Material vegetal

Para o preparo do extrato foram utilizadas folhas de *Tabernaemontana catharinensis*, coletadas no Campus I da Fundação Universidade Regional de Blumenau - FURB, onde um exemplar está armazenado no Herbário Dr. Roberto Miguel Klein, sob o número 12906.

As amostras vegetais foram secas em estufa a temperatura inferior a 50°C, e efetuada moagem em um Micro Moinho tipo Willye Te-648. Após secagem e trituração, o material foi submetido à maceração com solução hidroalcoólica 70%, por uma semana (168 horas). Em seguida, foi filtrado e submetido a mais duas extrações por igual período. Os filtrados foram reunidos e o solvente foi evaporado sob pressão reduzida em evaporador rotatório, fornecendo um material escuro. Parte do material foi diluído em solução Tween® 5%, resultando na dose desejada de 500 mg/kg para os devidos tratamentos.

Animais e tratamento experimental

Foram utilizados 48 camundongos adultos Swiss, machos, com peso médio de 35-40g, oriundos do Biotério Central da Universidade Regional de Blumenau - FURB, mantidos em gaiolas plásticas, em temperatura ambiente, sem acesso à água e ração específica para roedores após a aplicação dos tratamentos.

Os animais foram divididos aleatoriamente em 6 grupos experimentais com 8 animais cada, e subdivididos em dois tempos, 2 e 24 horas, de acordo com o tratamento instituído: Grupo Controle (GC) tratado com 1,0 mL de solução salina estéril 0,9%, via intraperitonal; Grupo

Veneno e Soro (GVS): Administração do veneno por via intramuscular (100 µg) e após 15 minutos, tratados com soro antibotrópico na dose de 1,0 mL por via intraperitonal; Grupo Veneno e Extrato (GVE): Tratado com veneno via intramuscular (100 µg) e após 15 minutos, tratados com o extrato de *T. catharinensis* na dose de 500 mg/kg (Badilla et al. 2006) por via intraperitonal; Grupo Veneno (GV): Injetado com veneno via intramuscular (100 µg); Grupo Extrato (GE): Tratado com extrato de *T. catharinensis* por via intraperitonal na dose de 500 mg/kg (Badilla et al. 2006); Grupo Soro (GS): Tratado com 1,0 mL de soro antibotrópico por via intraperitonal.

O protocolo experimental foi aprovado pelo Comitê de Ética e Experimentação Animal (CEEA) da Universidade Regional de Blumenau sob nº 104/08 em reunião no dia 18/06/2008.

Determinações bioquímicas

Após 2 e 24 horas dos tratamentos, os animais foram sedados com éter etílico. A coleta de sangue foi realizada via punção cardíaca, utilizando-se agulha 25mmX7mm e seringa descartável de 3 mL, sendo armazenado em microtubos de 2 mL contendo anticoagulante EDTA 5%.

O plasma foi obtido por meio de centrifugação do sangue coletado a 5000 rpm, por 10 minutos. Em seguida, o mesmo foi armazenado em microtubos de 2 mL para sua utilização nas dosagens. As determinações bioquímicas foram realizadas através de fotolorímetro da marca BIOPLUS, modelo BIO 2000, do Laboratório de Bioquímica da FURB, utilizando-se kits específicos para determinação de proteínas totais, pelo método do biureto; ureia, pelo método urease/salicilato; ácido úrico, pelo método enzimático colorimétrico; creatinina, pelo método cinético picrato alcalino; albumina, pelo método colorimétrico verde de bromocresol; aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT) pelo método cinético otimizado.

Análise morfológica microscópica

Após a eutanásia dos animais foram removidos fígado, rins e músculo esquelético, que foram fixados em formalina 10% por 24 horas. Posteriormente, os órgãos foram submetidos ao processamento histológico de rotina no Laboratório de Anatomia Patológica da FURB, que consiste em desidratação com séries crescentes de álcool (70 a 100%), diafanização em xilol, impregnação e inclusão em parafina. Foram seccionados fragmentos tissulares na espessura de 5 µm com auxílio de um micrótomo rotativo e, subsequentemente, submetidos à coloração de hematoxilina e eosina. Foram confeccionadas para cada órgão duas lâminas, totalizando para cada animal 12 lâminas, sendo que todas estas foram analisadas igualmente.

As lâminas foram analisadas em microscópio óptico Olympus CX3 e fotos documentadas através de câmera digital Olympus C7070 acoplada.

Análise dos dados e estatística

Os resultados das análises bioquímicas nos diferentes grupos foram representados como média ± erro padrão da média (E.P.M.), analisados através do Programa SPSS para Windows, versão 12 (SSPS, Chicago, IL, USA),

utilizando-se a análise de variância (ANOVA), seguida do teste post-hoc de Duncan, para comparação entre os grupos, sendo que os valores de $P < 0,05$ foram considerados significativos.

RESULTADOS

Observou-se que os grupos GV, GVE e GVS quando comparados ao grupo controle, tanto para o período de 2 horas quanto para o período de 24 horas, apresentavam necrose muscular (Figura 1B, 1C, 1D) e alterações hepáticas observadas nos achados histopatológicos, associadas com significativo aumento da enzima AST. Este fato pode significar lesão muscular, além de outras condições clínicas como toxicidade hepática leve (Mariz et al., 2006).

Nos achados histopatológicos do GV após 2 horas de tratamento observou-se que no fígado alguns hepatócitos apresentavam-se binucleados, grandes e volumosos, pouco granuloso, com presença de neutrófilos (segmentados) na luz da veia centrolobular (Figura 2C). Após 24 horas evidenciou-se no fígado pouca congestão vascular, com veia centrolobular bem preservada e hepatócitos sem granulação grosseira e núcleo não muito volumoso (Figura 2D). A análise histológica revelou que o rim, em 2 horas no GV, demonstrava região medular com muitas hemácias no espaço intersticial, apresentando corpúsculo renal muito celular (Figura 3C). Em 24 horas, a região medular do rim apresentava-se íntegra, observando que a região cortical também estava preservada com presença de alguns vasos congestos, apresentando corpúsculo renal com aspecto morfológico normal (Figura 3D).

No GVS após 2 horas de tratamento notou-se que no fígado, os hepatócitos apresentavam modera da granulação

com núcleos globosos, e presença de vasos congestos. Já para o tratamento após 24 horas percebeu-se que o fígado apresentava as mesmas características morfológicas visualizadas em 2 horas. Em relação ao efeito do soro antiofídico, percebe-se que este não foi capaz de neutralizar os efeitos do veneno com consequente elevação da AST. Em 2 horas e 24 horas, no grupo GVS os rins apresentavam as mesmas características, com região medular íntegra, entretanto na região cortical foram observados vasos congestos, com glomerúlos renais muito celulares, porém apresentando morfologia de aspecto normal. Porém 25% dos animais do período de 24 horas apresentaram corpúsculo renal com infiltrações inflamatórias.

Na análise histológica do GVE pode-se evidenciar que após 2 horas de tratamento, o fígado continha certa congestão vascular em algumas áreas, com presença de segmentados – aglomerações inflamatórias, caracterizando processo inflamatório agudo, próximos da veia centrolobular e do espaço porta-portite aguda (Figura 2E). Os hepatócitos apresentavam aspecto morfológico normal sem granulação evidente. Após 24 horas do tratamento, o fígado já apresentava pouca congestão vascular, com hepatócitos pouco vacuolizados e alguns com núcleos volumosos (Figura 2F), porém pode-se constatar decréscimo nos níveis de albumina com diferenças estatísticas significativas quando comparado ao grupo GC, que juntamente com elevação de AST mais os achados histológicos sugere certa toxicidade hepática (Figura 2E, 2F). Já a análise histológica dos rins dos tratamentos de 2 horas e 24 horas evidenciou vasos congestos na região cortical, porém os corpúsculos renais apresentavam-se bem preservados (Figura 3E e 3F).

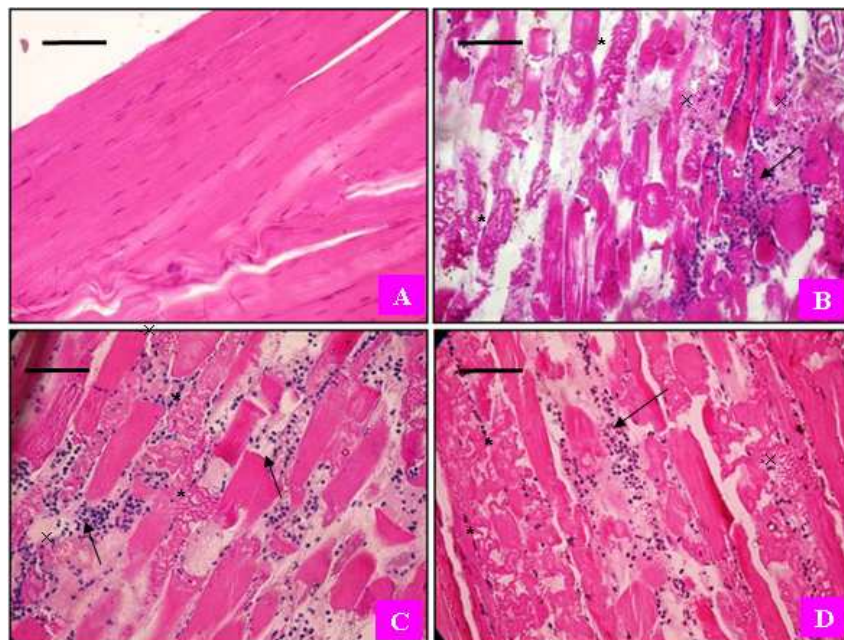


Figura 1. A: Músculo estriado esquelético do GC onde as fibras musculares apresentam aspecto morfológico normal, sem presença de células de defesa no tecido conjuntivo adjacente; B: Corte de músculo estriado esquelético do GV com presença de infiltrado inflamatório (segmentados - seta), com hemácias (x) e presença de fibras musculares degeneradas (*); C: visão do músculo estriado esquelético do GVE com muitas células de defesa no tecido conjuntivo adjacente (neutrófilos jovens - seta) e hemácias (x), aparentes fibras musculares degeneradas (*); D: Tecido muscular estriado esquelético do GVS com presença de células degeneradas (*), sem evidência das estrias, células de defesa em especial neutrófilos no tecido conjuntivo adjacente (seta) e hemácias (x), a barra de aumento corresponde a 100 μ m.

A análise histológica do grupo GE do período de 2 horas e 24 horas após o tratamento demonstrou que o fígado apresentou as mesmas características morfológicas, com parênquima hepático com células pouco vacuolizadas, apresentando alguns hepatócitos com núcleos bem volumosos e moderada congestão vascular, o endotélio se manteve bem preservado.

O grupo GS demonstrou na análise histológica que o rim apresentava região medular íntegra, com região cortical demonstrando vasos congestionados, glomérulo renal muito celular apresentando morfologia de aspecto normal. Já em 24 horas o rim apresentava região cortical pouco congestionada, com corpúsculo renal bem celular, de aspecto morfológico normal.

No GVE após 2 horas de tratamento observou-se que a AST foi 34,11% menor do que o GV, demonstrando que o extrato de *T. catharinensis* administrado após inoculação do veneno tem uma tendência em diminuir o efeito sistêmico do veneno, mesmo não sendo estatisticamente significativo.

Os níveis de creatinina observados apresentaram-se elevados constatando-se diferença estatística significativa para o grupo GVE quando comparado ao GC e ao GV, sugerindo que a planta pode exercer função tóxica sobre a atividade renal na dose testada.

O GS quando comparado ao GV apresentou acréscimo na quantidade de creatinina no tempo de 2 horas, sendo esta diferença estatisticamente significativa. Assim sugerindo que o soro antiofídico administrado sozinho provocou alteração neste parâmetro podendo este estar relacionado com a dose e a via de administração. Após 24 horas verificou-se que não houve diferenças significativas estatisticamente para os parâmetros de creatinina nos diferentes tratamentos.

Em relação aos níveis de ácido úrico pode-se constatar diferenças estatisticamente significativas para o GVE quando comparado ao GC tanto para o período de 2 horas quanto para o período de 24 horas, sendo que esta diferença deve-se ao fato de um incremento do teor de ácido úrico no tratamento de 2 horas e um decréscimo da atividade no

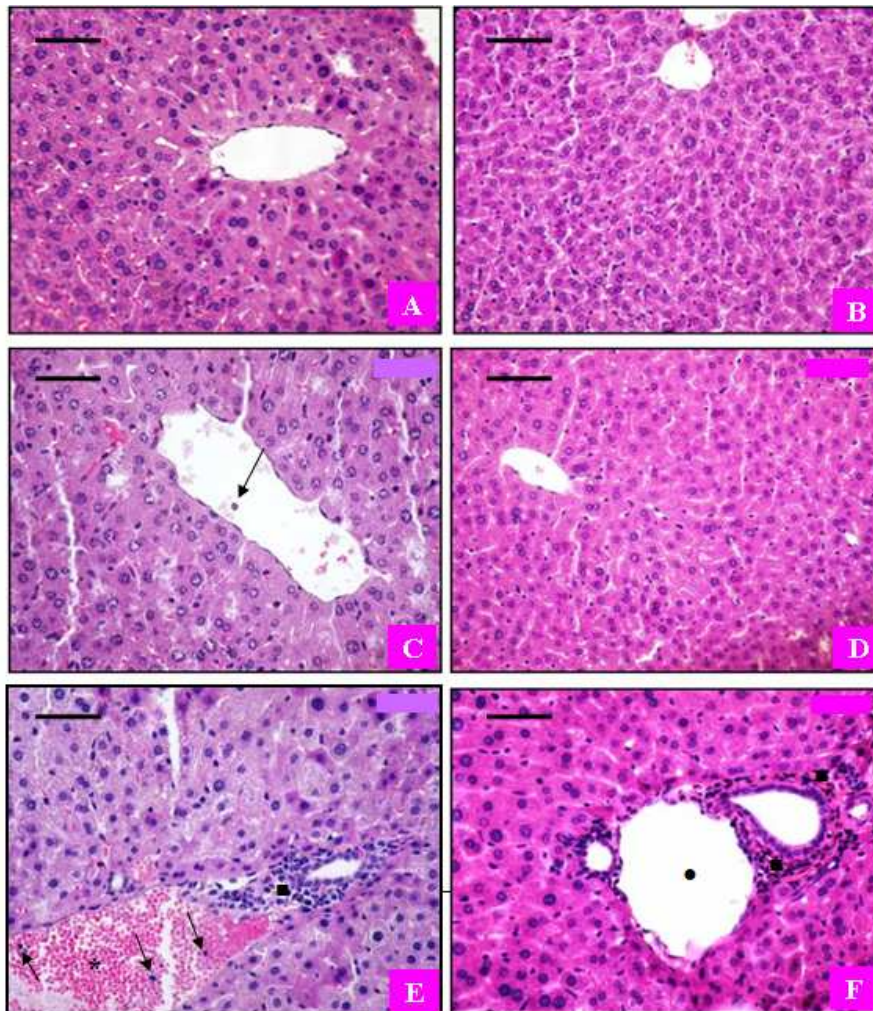


Figura 2. A: Fígado do GC 2 horas sem congestão vascular e com hepatócitos pouco vacuolizados; B: Fígado GC 24 horas, mostrando alguns hepatócitos com núcleos mais volumosos pouco vacuolizados; C: Fígado do GV 2 horas alguns hepatócitos apresentam-se binucleados, grandes e volumosos, pouco granuloso, com presença de neutrófilo (segmentados) na luz (seta); D: Fígado GV 24 horas apresentando hepatócitos sem granulação grosseira, pouco congestionado, veia centrolobular bem preservada; E: visão do fígado GVE 2 horas apresentando hepatócitos com aspecto normal, congestão vascular (*), presença de segmentados na luz da veia centrolobular (seta) e no espaço porta com (portite aguda - ■); F: visão do fígado GVE 24 horas com hepatócitos pouco vacuolizados e pouca congestão vascular, na veia centrolobular bem como no espaço porta(●), porém a portite permanece (■), a barra de aumento corresponde a 100μm.

tratamento de 24 horas. Embora o GVE quando comparado ao GC em 2 horas do tratamento apresentou elevação deste parâmetro, percebeu-se que este grupo apresentou valores menores tanto nos tratamentos de 2 horas (30,62% menor) quanto no de 24 horas (48,22% menor) em relação ao grupo GV, sendo que em 24 horas esta diferença foi considerada estatisticamente significativa, sugerindo que o extrato administrado de *T. catharinensis* pode exercer uma atividade benéfica em relação a este parâmetro, onde nota-se que o efeito agudo da planta ainda está acontecendo em 24 horas após a administração, um efeito não observado em nenhum parâmetro pelo soro (Tabela 1 e Tabela 2).

Os valores estão expressos em média \pm E.P.M. aEstatisticamente diferente do grupo controle. bEstatisticamente diferente do grupo veneno de *B. jararacussu*. cEstatisticamente diferente do grupo veneno de *B. jararacussu* e extrato hidroalcoólico de *T. catharinensis* (ANOVA, seguida do teste post-hoc de Duncan).

Pode-se perceber que GVE apresentou valores mais baixos (47,09% menor em 2 horas de tratamento e 42,00% menor em 24 horas após o tratamento) que o GVS nos níveis de ácido úrico. Estas diferenças foram consideradas estatisticamente significativas, assim demonstrando que o extrato hidroalcoólico de *T. catharinensis* diminuiu os níveis deste parâmetro exercendo um efeito positivo em relação aos efeitos do veneno. Considerando o soro, houve um aumento do teor de ácido úrico, portanto, não exercendo um resultado protetor (Tabela 1 e Tabela 2).

Os valores estão expressos em média \pm E.P.M. aEstatisticamente diferente do grupo controle. bEstatisticamente diferente do grupo veneno *B. jararacussu*. cEstatisticamente diferente do grupo veneno de *B. jararacussu* e extrato hidroalcoólico de *T. catharinensis* (ANOVA, seguida do teste post-hoc de Duncan).

Em relação ao GVS observaram-se diferenças nos níveis de ácido úrico estatisticamente significativas em relação ao GC e ao GV em 2 horas de tratamento. Em 24 horas após o

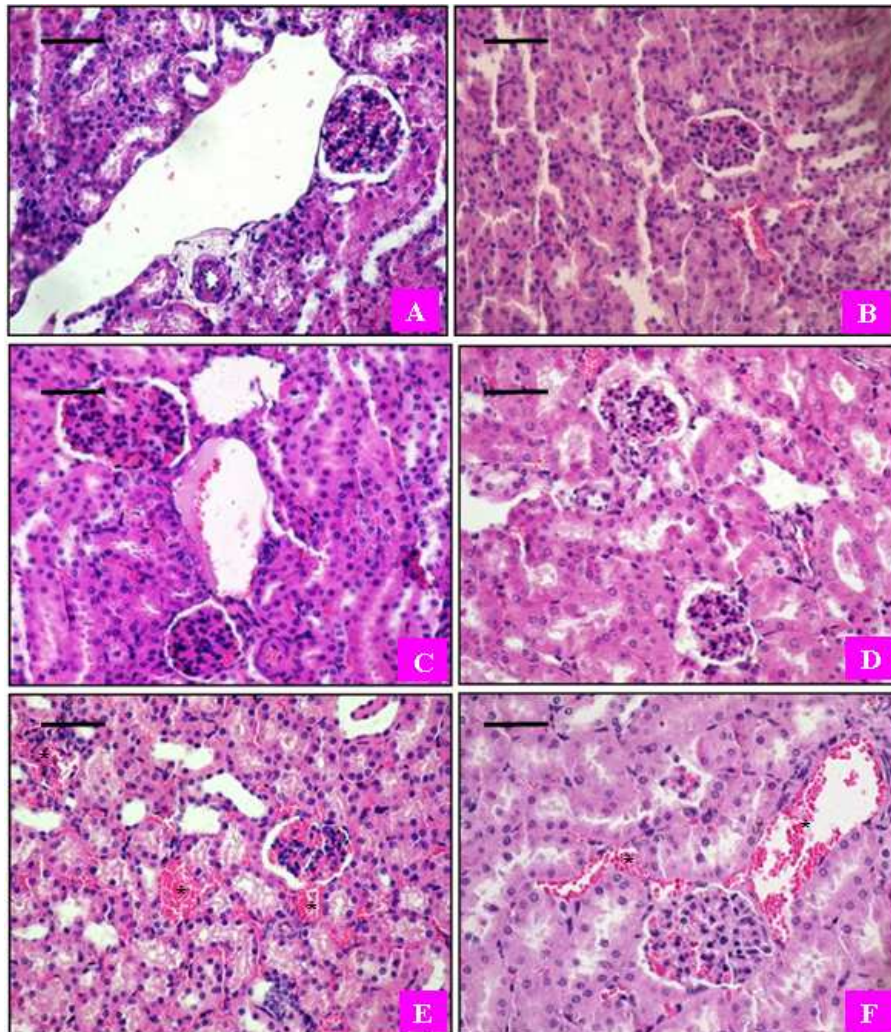


Figura 3: A: Rim do GC 2 horas com túbulos renais preservados, apresentando corpúsculo renal e glomérulo bem preservados e não muito celular; B: Rim do GC 24 horas, região cortical pouco congestionada, túbulos renais preservados; C: Rim do GV 2 horas apresentando corpúsculo renal muito celular, com aspecto morfológico preservado; D: Rim do GV 24 horas, com região cortical preservada com presença de alguns vasos congestionados (*), corpúsculo renal com aspecto normal; E: visão do rim do GVE 2 horas apresentando vasos congestionados na região cortical (*), corpúsculo com aspecto normal; F: visão do rim do GVE 24 horas com algumas áreas corticais com congestão vascular (*) e corpúsculo renal bem preservado, a barra de aumento corresponde a 100 μ m.

tratamento além do GC e GV houve diferença também em relação ao GVE. Todas as diferenças observadas devem-se ao aumento da quantidade deste, sugerindo que nestes tratamentos e nestes tempos, o soro antiofídico não foi suficiente para neutralizar os efeitos danosos do veneno sobre vários órgãos e sistemas corporais.

No grupo GV foram constatadas diferenças estatísticas significativas em relação ao GC tanto para o tratamento de 2 horas quanto no tratamento de 24 horas, onde se observou um incremento na quantidade de ácido úrico, sendo que em 24 horas também se constatou diferença estatística significativa em relação ao GVE, na qual registraram-se valores maiores deste parâmetro para o GV.

Para a determinação do ácido úrico após 24 horas, podem-se perceber diferenças estatísticas no grupo GE em relação ao GC e ao GV, devido a um decréscimo na quantidade deste, sugerindo que a dose testada de 500 mg/kg pode ter ocasionado estas alterações. Já para o grupo GS observou-se aumento deste parâmetro sendo considerado estatisticamente diferente do grupo GC, sugerindo que estas alterações possam ser oriundas da dose e a via de administração testada no presente trabalho.

Sobre os níveis de uréia, duas horas após a aplicação dos diferentes tratamentos, observou-se que os grupos GE, GV, GVE e GVS diferiram estatisticamente quando comparados ao GC, devido à elevação nos níveis deste parâmetro.

O GE também diferiu significativamente quando comparado aos grupos, GV e GVE, na qual se observa um decréscimo de uréia. Entretanto, em 24 horas não foram detectadas diferenças significativas nos diferentes tratamentos.

Em relação à determinação de proteínas totais observou-se para os grupos GE, GS, GV, GVE e GVS diferenças estatisticamente significativas quando comparados ao grupo controle, devido a um acréscimo deste parâmetro após 2 horas da aplicação dos tratamentos. Já na determinação de proteínas totais após 24 horas dos tratamentos observou-se que os grupos GVS, GVE, GV e GE apresentaram um aumento deste parâmetro, sendo esta diferença significativa estatisticamente quando comparada ao grupo GC. Foi observado também que o grupo GE e GS apresentaram diferenças significativas em relação ao GV.

DISCUSSÃO

A necrose muscular visualizada nos achados histopatológicos (Figura 1B, 1C e 1D), pode ser evidenciada junto com a presença de infiltrado inflamatório no tecido conjuntivo adjacente, bem como vasos congestos e hemorragia local. Garcia Denegri e colaboradores (2006) verificaram após 24 horas da administração de 800 µg de veneno de *Bothrops alternatus* hemorragia à periferia do músculo necrosado, sendo vistos neutrófilos e macrófagos ao redor e dentro das fibras de músculo necrosadas associadas com edema abundante. O dano no tecido local induzido por veneno de serpentes *Bothrops* inclui uma resposta inflamatória associada com um proeminente infiltrado celular. Os neutrófilos fazem um papel significativo na fagocitose do material necrosado como também no recrutamento de outras células inflamatórias, ambos os eventos são associados com o sucesso na resposta regenerativa do músculo (Teixeira et al., 2003).

Os danos ocorridos no fígado podem ser devido à sobrecarga da sua funcionalidade, visíveis na microscopia pelas alterações nos hepatócitos e na congestão vascular. Lesões endoteliais observadas no fígado normalmente ocorrem devido à ação das hemorraginas, assim como a congestão vascular que se caracteriza pela dilatação dos vasos e conseqüente aglomeração de hemácias em decorrência da ação de substâncias vasoativas presente no veneno (Dourado et al., 2003), onde pode-se notar que o grupo GV além das alterações morfológicas teve significativo aumento da enzima AST. Essa enzima pode ser encontrada no citoplasma e na mitocôndria, com alta atividade no fígado, no coração, no músculo esquelético e nos rins, e baixa atividade no intestino, no cérebro, no pulmão e nos testículos. O aumento da atividade plasmática ou sérica de AST geralmente está associado à lesão de fígado, músculo cardíaco ou músculo esquelético (Thrall, 2007).

Estudos relatam a existência da ação de enzimas proteolíticas presentes no veneno botrópico, destruindo o tecido e causando graves necroses locais, ocasionando o aumento de enzimas, tais como a AST e ALT (Oliveira et al., 2007).

Tabela 1. Parâmetros bioquímicos obtidos após 2 horas de envenenamento de camundongos Swiss grupo controle (GC), grupo extrato hidroalcoólico de *T. catharinensis* (GE), grupo soro antiofídico (GS), grupo inoculado com veneno de *B. jararacussu* (GV), grupo inoculado com veneno de *B. jararacussu* e tratado com extrato hidroalcoólico de *T. catharinensis* (GVE) e grupo inoculado com veneno de *B. jararacussu* e tratado com soro antiofídico (GVS).

	GC 2 hs	GE 2hs	GS 2hs	GV 2hs	GVE 2hs	GVS 2hs
AST (U/L)	119,28 ± 7,23	220,65 ± 35,39 ^a	203,63 ± 51,98	721,40 ± 69,09 ^a	475,4 ± 97,53 ^a	518,8 ± 142,07 ^a
ALT (U/L)	42,88 ± 4,38	38,85 ± 3,23	98,88 ± 52,31	70,48 ± 10,71	63,73 ± 5,46	48,98 ± 9,18
Albumina (g/dL)	2,39 ± 0,45	2,56 ± 0,25	3,16 ± 0,27	2,08 ± 0,13	2,40 ± 0,25	1,93 ± 0,1
Creatinina (mg/dL)	0,25 ± 0,09	0,30 ± 0,04	0,38 ± 0,02 ^b	0,18 ± 0,03	0,45 ± 0,03 ^{a b}	0,23 ± 0,05
Ácido Úrico (mg/dL)	0,88 ± 0,10	2,20 ± 0,05	1,00 ± 0,03	4,05 ± 0,57 ^a	2,81 ± 0,35 ^a	5,31 ± 0,83 ^{a b c}
Uréia (mg/dL)	10,55 ± 0,39	51,08 ± 4,18 ^{a b c}	10,26 ± 0,30	69,18 ± 6,89 ^a	88,86 ± 8,96 ^a	63,45 ± 6,72 ^a
Proteínas Totais (g/dL)	2,15 ± 0,51	5,78 ± 0,48 ^a	3,71 ± 0,23 ^a	4,11 ± 0,23 ^a	4,98 ± 0,27 ^a	4,34 ± 0,37 ^a

Os valores estão expressos em média ± E.P.M., ^aEstatisticamente diferente do grupo controle, ^bEstatisticamente diferente do grupo veneno de *B. jararacussu*, ^cEstatisticamente diferente do grupo veneno de *B. jararacussu* e extrato hidroalcoólico de *T. catharinensis* (ANOVA, seguida do teste post-hoc de Duncan)

Tabela 2. Parâmetros bioquímicos obtidos após 24 horas de envenenamento de camundongos Swiss grupo controle (GC), grupo extrato hidroalcoólico de *T. catharinensis* (GE), grupo soro antiofídico (GS), grupo inoculado com veneno de *B. jararacussu* (GV), grupo inoculado com veneno de *B. jararacussu* e tratado com extrato hidroalcoólico de *T. catharinensis* (GVE) e grupo

	GC 24 hs	GE 24 hs	GS 24hs	GV 24hs	GVE 24hs	GVS 24hs
AST (U/L)	196,80 ± 45,49	113,33 ± 16,37	149,10 ± 18,69	343,35 ± 37,48 ^a	403,85 ± 84,98 ^a	376,60 ± 76,52 ^a
ALT (U/L)	119,00 ± 55,65	36,53 ± 3,44	76,33 ± 24,91	52,07 ± 3,46	42,75 ± 6,77	65,30 ± 7,08
Albumina (g/dL)	3,75 ± 0,69	2,91 ± 0,07	3,82 ± 0,58	2,95 ± 0,03	2,22 ± 0,34 ^a	3,03 ± 0,18
Creatinina (mg/dL)	0,38 ± 0,10	0,33 ± 0,02	0,30 ± 0,00	0,32 ± 0,03	0,25 ± 0,05	0,25 ± 0,03
Ácido Úrico (mg/dL)	2,76 ± 0,11	2,26 ± 0,11 ^{a b}	3,25 ± 0,33 ^{a b}	3,92 ± 0,20 ^{a c}	2,03 ± 0,05 ^{a b}	3,50 ± 0,04 ^{a b c}
Uréia (mg/dL)	57,11 ± 15,68	56,41 ± 1,93	52,94 ± 5,69	52,75 ± 5,98	44,08 ± 1,71	49,75 ± 5,17
Proteínas Totais (g/dL)	3,58 ± 0,23	6,24 ± 0,27 ^{a b}	3,72 ± 0,12 ^b	4,85 ± 0,06 ^a	4,90 ± 0,73 ^a	4,95 ± 0,12 ^a

Os valores estão expressos em média ± E.P.M. ^aEstatisticamente diferente do grupo controle, ^bEstatisticamente diferente do grupo veneno *B. jararacussu*, ^cEstatisticamente diferente do grupo veneno de *B. jararacussu* e extrato hidroalcoólico de *T. catharinensis* (ANOVA, seguida do teste post-hoc de Duncan).

Não foram verificadas diferenças significativas nos níveis de ALT nos tempos de 2 e 24 horas nos diferentes tratamentos, e o mesmo ocorreu no estudo realizado por Zeni e colaboradores (2007) em relação as diferentes doses de veneno e aos diferentes tempos quando comparados ao grupo controle. Este parâmetro se mantendo dentro dos níveis de referência sugere diminuída lesão hepática, levando em consideração as doses, os tempos analisados e os animais testados, pois caso houvesse um grave dano hepático, tanto a AST quanto a ALT deveriam ter aumentos significativos visualizados nas análises bioquímicas e nos achados histopatológicos. Na maioria dos roedores, a atividade sérica ou plasmática de ALT aumenta com lesão hepatocelular, a enzima parece ser específica de fígado de ratos e camundongos (Thrall, 2007).

Sobre o efeito per se da planta em elevar a AST, pode ser em decorrência da presença de alcalóides e de um efeito antioxidante (Rates, 1988; Fumagali et al., 2008; Pereira et al., 2005). A dose administrada de 500 mg pode ter promovido um efeito pró-oxidante semelhante ao alcalóide boldina isolado de *Peumus boldus* Molina (boldo), observado por Konrath e colaboradores (2008), que apesar da atividade pró-oxidante promoveu também diminuição de peroxidação lipídica em evento isquêmico.

Santos (1999) afirma que a albumina constitui a principal proteína do soro e é sintetizada quase toda pelo fígado e possui meia-vida de aproximadamente duas semanas. González & Silva (2006) mencionam que a albumina representa cerca de metade do total de proteínas sanguíneas. A albumina contribui com cerca de 80% da osmolaridade do plasma atuando como importante reserva protéica, transportadora molecular e reguladora de pH sanguíneo. No presente trabalho os diferentes tratamentos não apresentaram diferença estatística significativa nos teores de albumina.

González & Silva (2006) afirmam que a creatina presente no tecido muscular é catabolizada em creatinina cuja concentração pode ser mencionada para avaliar a função desse tecido. O teor de creatinina plasmática é diminuído em casos de atrofia e outras lesões musculares e

aumentado em situações de exercício prolongado uma vez que sua concentração sanguínea é proporcional à massa muscular. A excreção de creatinina só se realiza por via renal, uma vez que ela não é reabsorvida nem reaproveitada pelo organismo. Ela se difunde do músculo para o plasma de onde é removida quase inteiramente e em velocidade relativamente constante por filtração glomerular (Motta, 2003). Por isso, os níveis de creatinina plasmática refletem à taxa de filtração renal, de forma que níveis altos de creatinina indicam uma deficiência na funcionalidade renal.

O ácido úrico participa do metabolismo das purinas e na maioria dos mamíferos é convertido em alantoina (González & Silva 2006). Conforme Santos (1999) a concentração de ácido úrico nos líquidos orgânicos depende do balanço entre produção e a eliminação através dos rins. Valores séricos aumentados desse metabólito podem ser indicativos de neoplasias de células sanguíneas, doença hepática por incompleta conversão à alantoina, insuficiência renal e na ingestão de substâncias tóxicas e drogas (González & Silva, 2006). Portanto, nos grupos onde ocorreu sobrecarga de sua funcionalidade, como no fígado e nos rins, devido à falência de células e a possíveis problemas na filtração glomerular verificaram-se aumento do ácido úrico circulante.

No estudo realizado por Zeni e colaboradores (2007) foi observado diferenças extremamente significativas após 2 e 4 horas da aplicação de 50 µg de veneno quando comparados ao controle. Em outro estudo proposto por Koscinczuk e colaboradores (2004) foi observado diferenças significativas nos grupos de 3, 6, 12, 24 horas e 1 semana inoculados com 700 µg de veneno (i.m) de *Bothrops neuwiedii* diporus em relação ao controle, sendo que em 4 semanas não se observava mais diferença significativa.

Estes trabalhos assemelham-se com as alterações observadas no presente estudo para o grupo GV. Os venenos de serpentes são excretados pelos rins, uma vez que têm um alto fluxo sanguíneo e alta capacidade de concentrar substâncias na urina. Assim, o aumento de uréia no soro ocorre por dificuldades dos rins em excretar

catabólitos nitrogenados, em decorrência de disfunção renal provocada pela ação nefrotóxica do veneno (Lago et al., 2004). Segundo Adebayo e colaboradores (2003) a elevação dos níveis plasmáticos de uréia e creatinina fornece indícios de sobrecarga renal, insuficiência renal aguda ou, ainda, de aumento no catabolismo protéico. Estas agravações clínicas fundamentam as alterações observadas para este parâmetro, na qual foram detectadas aumento nas proteínas totais nos diferentes tratamentos, sugerindo assim que as alterações evidenciadas nos grupos acima mencionados possam ser provenientes de disfunção renal.

Zeni e colaboradores (2007) também observaram incremento na dosagem de proteínas totais quando aplicado 50 µg de veneno após 4 e 24 horas na qual foi estatisticamente diferente e muito significativo em relação ao grupo controle. Assim evidenciando que alterações de proteínas totais se apresentam dose e tempo-dependentes, mostrando intensa degradação de proteína. Este trabalho corrobora com os resultados obtidos no presente estudo. O veneno botrópico possui ação proteolítica, sendo que o processo inflamatório causado pelas frações proteolíticas do veneno caracteriza-se clinicamente por edema e dor na região da picada (Fonseca, 2004).

CONCLUSÃO

Baseados nos resultados obtidos, conclui-se que o tratamento com 500 mg/kg do extrato hidroalcoólico de *Tabernaemontana catharinensis* após o envenenamento experimental provocou alterações nos parâmetros bioquímicos e leves alterações histológicas no fígado e rins.

O extrato hidroalcoólico de *T. catharinensis* demonstrou-se incapaz de inibir a necrose muscular. Este fato pode ter sido ocasionado pelo tipo de administração utilizada neste estudo, onde esta não age localmente e sim sistemicamente.

Entretanto, pode-se constatar que em certos parâmetros bioquímicos, como AST e ácido úrico, o extrato demonstrou um potencial de neutralização para os efeitos sistêmicos do veneno, e em 24 horas, no caso do ácido úrico, quando comparados ao GV houve uma diminuição significativa.

Percebe-se que o soro antiofídico não foi eficiente em neutralizar efeitos do veneno sobre os parâmetros testados em camundongos. Sugere-se que algumas das alterações como nos níveis de creatinina e ácido úrico possam ter sido oriundas da dose administrada do extrato, assim novas doses menores deste extrato necessitam de investigações quanto aos seus efeitos.

Enfatizamos a necessidade de elucidar efeitos sistêmicos e morfológicos ao mesmo tempo, podendo observar o efeito sobre estes dois aspectos muito importantes bem como efeitos do soro antiofídico frente ao envenenamento, pois há escassos dados da literatura sobre o assunto.

REFERÊNCIAS

Adebayo JO, Yakubu MT, Egwim EC, Owoyele VB, Enaibe BU. Effect of ethanolic extract of *Khaya senegalensis* on some biochemical parameters of rat kidney. *J Ethnopharmacol* 88: 69-72, 2003.

Almeida L de, Cintra ACO, Veronese ELG, Nomizo A, Franco JJ, Arantes EC, Giglio JR, Sampaio SV. Anticrotalic and antitumoral activities of gel filtration fractions of aqueous extract from *Tabernaemontana catharinensis* (Apocynaceae). *Comparative Biochemistry and Physiology C* 137(1): 19-2, 2004.

Batina MFC, Cintra ACO, Giglio JR, Pereira OS, Dias DA, França SC, Sampaio SV. Inhibition of the lethal and myotoxic activities of *Crotalus durissus terrificus* venom by *Tabernaemontana catharinensis*: identification of one of the components. *Planta Med* 66: 424-428, 2000.

Biondo R, Pereira AMS, Marcussi S, Pereira PS, França SC, Soares AM. Inhibition of enzymatic and pharmacological activities of some snake venoms and toxins by *Mandevilla velutina* (Apocynaceae) aqueous extract. *Biochimie* 85(1): 1017-1025, 2003.

Boer-Lima PA, Gontijo JA, Cruz-Hofling MA. *Bothrops moojeni* snake venom-induced renal glomeruli changes in rat. *Am J Trop Med Hyg* 67(2): 217-22, 2002.

Borges MH, Soares AM, Rodrigues VM, Oliveira F, Fransheschi AM, Rucavado A, Giglio JR, Homs-Brandeburgo MI. Neutralization of proteases from *Bothrops* snake venoms by the aqueous extract from *Casearia sylvestris* (Flacourtiaceae). *Toxicon* 39: 1863-1869, 2001.

Cupo P, Azevedo-Marques MM, Menezes JB de, Hering SE. Reações de hipersensibilidade imediatas após uso intravenoso de soros antivenenos: valor prognóstico dos testes de sensibilidade intradérmicos. *Rev. Inst. Med. Trop.* 33 (2): 115-122, 1991.

Dourado DM, Araújo NM, Marinho ML, Matias R, Reis I, Bulhões L. Alterações histopatológicas no fígado de camundongos Swiss sob efeito do veneno (20 mg/ml) de *Bothrops moojeni*. *Rev. Ens e Ciências* 7: 177-182, 2003.

Fonseca FV, Mello MM, Silva J, Pereira GP, Dantas-Barros AM. Extratos de *Curcuma longa* L. e *Kalanchoe brasiliensis* Camb. no tratamento local do envenenamento por *Bothrops alternatus*. *Rev Bras Farmacogn* 14(1): 26-29, 2004.

França FOS, Málaque CMS. Acidente Botrópico. In: CARDOSO, JLC et al. *Animais peçonhentos no Brasil: Biologia, Clínica e terapêutica dos acidentes*. São Paulo: Sarvier, p. 72-86, 2003, 468 p.

Fumagali E, Gonçalves RAC, Machado MFPS, Vidoti GJ, Oliveira AJB. Produção de metabólitos secundários em cultura de células e tecidos de plantas: O exemplo dos gêneros *Tabernaemontana* e *Aspidosperma*. *Rev. Bras. Farmacogn.* 18(4): 627-641, 2008.

Garcia Denegri ME, Rey L, Leiva L, Acosta de Pérez O. Histochemical analyses of muscle injury induced by venom from Argentine *Bothrops alternatus* (víbora de la cruz). *Rev.vet* 17(2): 67-71, 2006.

González FHD & Silva SC. *Introdução à bioquímica clínica veterinária*. 2ed. Porto Alegre: UFRGS, 2006. 358 p.

- Guida A, Kramer F, Jordá G, Amer L, Medvedeff M, Bargardi S. *Staphylococcus aureus* Meticilino-resistentes, sensible a Extractos de *Tabernaemontana catharinensis* A.DC. Acta Farm. Bonaerense 20(3): 205-8, 2001.
- Lago LA, Marques Junior AP, Melo MM, Lago EP, Oliveira NJF.; Alzamora Filho F. Perfil bioquímico sorológico de bovinos inoculados experimentalmente com veneno crotálico iodado livre e iodado incorporado em liposomas. Arq. Bras. Med. Zootec 56(5): 653-657, 2004.
- Konrath EL, Santin K, Nassif M, Latini, A, Henriques A, Salbego C. Antioxidant and pro-oxidant properties of boldine on hippocampal slices exposed to oxygen-glucose deprivation in vitro. Neurotoxicology 29: 1136-1140, 2008.
- Koscinczuk P, Borda JT, Maruñak S, Perez OA de, Coppo NM de. Daño renal em ratas inducido por veneno de *Bothrops neuwiedii* diporus de Argentina. Medicina 64(4): 320-324, 2004.
- Mariz SR, Cerqueira GS, Araújo WC, Duarte JC, Melo AFM, Santos HB, Oliveira K, Melo Diniz MFF, Medeiros IA. Estudo toxicológico agudo do extrato etanólico de partes aéreas de *Jatropha gossypifolia* L. em ratos. Rev. Bras. Farmacogn. 16(3): 372-378, 2006.
- Motta V.T. Bioquímica clínica para o laboratório – princípios e interpretações. Porto Alegre: Missau; São Paulo: Robe editorial; Caxias do Sul: EDUCS, 2003. 419 p.
- Pereira-Bittencourt M, Carvalho DD, Gagliardi AR, Collins DC. The effect of a lectin from the venom of the snake, *Bothrops jararacussu*, on tumor cell proliferation. Anticancer Res. 19(5B): 4023-5, 1999.
- Pereira CG, Leal PF, Sato DN, Meireles MAA. Antioxidant and Antimycobacterial Activities of *Tabernaemontana catharinensis* Extracts Obtained by Supercritical CO₂ Cosolvent. J Med Food 8(4): 533-538, 2005.
- Preston SA, Davis CE, Harris JB. The assessment of muscle fibre loss after the injection of the venom of *Notechis scutatus* (Australian tiger snake). Toxicon; 28(2):201-214.
- Oliveira PCL de, Sakate M, Madruga RA, Barbosa NPU. Biochemical and hematological study of goats envenomed with natural and 60Co-irradiated bothropic venom. J. Venom. Anim. Toxins incl. Trop. Dis. 13(3): 576-597, 2007.
- Rates SM, Cauduro AD, Salazar V, Moreno PRH, Henriques AT. Alcalóides indólicos em *Peschiera australis* (Muell. Arg.) Miers. Var. australis. Caderno de Farmácia 1-2(4): 51-62, 1988.
- Santos L.C. Laboratório Ambiental. Cascavel: Edunioeste, 341 p. 1999.
- Spencer PJ, Aird SD, Boni-Mitake M, Nascimento N, Rogero JR. A single-step purification of bothropstoxin-1. Braz J Med Biol Res 31(9):1125-7, 1998.
- Teixeira CF, Zamunér SR, Zuliani JP, Fernández CM, Cruz-Hofling MA, Fernandes I, Chaves F, Gutiérrez JM. Neutrophils do not contribute to local tissue damage, but play a key role in skeletal muscle regeneration, in mice injected with *Bothrops asper* snake venom. Muscle Nerve 28: 449-59, 2003.
- Thrall AM. Hematologia e bioquímica clínica veterinária. São Paulo: Roca, 2007. 582 p.
- Veronese ELG, Esmeraldino LE, Trombone APF, Santana AE, Bechara GH, Kettelhut I, Cintra ACO, Giglio JR, Sampaio SV. Inhibition of the myotoxic activity of *Bothrops jararacussu* venom and its two major myotoxins, BthTX-I and BthTX-II, by the aqueous extract of *Tabernaemontana catharinensis* A.DC. (Apocynaceae). Phytomedicine 12: 123-130, 2005.
- Zeni ALB, Becker A, Krug M, Albuquerque CAC. Histological and biochemical effects induced by sublethal doses of *Bothrops jararacussu* venom in mice. J. Venom. Anim. Toxins incl. Trop. Dis 13(3): 664-676, 2007.