

Atividade antiofídica de *Camellia sinensis* contra a ação tóxica de venenos botrópicos em preparação neuromuscular de ave

Antiphidic activity of *Camellia sinensis* against the toxic action of bothropic venoms in bird neuromuscular preparations

Actividad antiofídica de *Camellia sinensis* contra la acción tóxica de venenos botrópicos en preparación neuromuscular de aves

Lígia Fernanda Ferraz¹ <https://orcid.org/0000-0002-6487-8598>

Raphael Schezaro-Ramos² <https://orcid.org/0000-0002-8832-2543>

Léa Rodrigues-Simioni² <https://orcid.org/0000-0002-8712-6639>

Priscila Randazzo-Moura³ <https://orcid.org/0000-0001-7672-6084>

Sandro Rostelato-Ferreira^{1,2*} <https://orcid.org/0000-0002-8987-434X>

¹Universidade Paulista, Instituto de Ciências da Saúde. Sorocaba, Brasil

²Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas, Departamento de Farmacologia. Campinas, Brasil

³Pontifícia Universidade Católica de Sorocaba, Departamento de Farmacologia. Sorocaba, Brasil

* Autor correspondente: sandrorostelato@yahoo.com.br

RESUMO

Introdução: venenos de serpentes do gênero *Bothrops* são capazes de induzir bloqueio neuromuscular em preparações isoladas de mamífero e ave. O tratamento específico é a soroterapia, porém, nem sempre se mostra eficaz contra a toxicidade induzida pelo veneno. Por outro lado, compostos vegetais têm sido estudados com finalidade antiofídica, como é o caso da *Camellia sinensis* (chá verde).

Objetivo: o objetivo foi de avaliar a atividade do extrato alcoólico de *Camellia sinensis* contra a ação de diferentes venenos botrópicos em preparações neuromusculares de ave.

Métodos: foram utilizadas preparações neuromusculares de biventer cervicis de pintainho (BC) que foram incubadas com: venenos de diferentes serpentes do gênero *Bothrops* (*B.*

jararaca, *B. jararacussu*, *B. alternatus* e *B. neuwiedi*, 50-100 µg/mL), extrato alcoólico de *Camellia sinensis* (Cs) 100 µg/ml ou pré-tratadas com Cs (30min) seguida da adição dos diferentes venenos botrópicos.

Resultados: ao final do experimento, foi observado bloqueio da resposta contrátil em $69,7 \pm 4,3\%$ (*B. jararaca*), $83,1 \pm 10\%$ (*B. jararacussu*), $88,1 \pm 4,5\%$ (*B. alternatus*) e $92,4 \pm 5,6\%$ (*B. neuwiedi*). Quando as preparações foram pré incubadas com o extrato de Cs, as proteções foram de: 62%, 89,2%, 75,1% e 78,2%, respectivamente.

Conclusão: conclui-se que o extrato de *Camellia sinensis* se mostrou eficaz contra a neurotoxicidade induzida por venenos botrópicos.

Palavras-chave: *Camellia sinensis*; veneno botrópico; atividade antiofídica; neurotransmissão.

ABSTRACT

Introduction: venoms from snakes of the *Bothrops* genus are capable of inducing neuromuscular blockade in preparations isolated from mammals and birds. The specific treatment is serum therapy, but it is not always effective against the toxicity induced by the venom. On the other hand, some plant compounds have been studied for antiophidic purposes, as is the case with *Camellia sinensis* (green tea).

Objective: evaluate the activity of the alcoholic extract from *Camellia sinensis* against the action of various bothropic venoms in bird neuromuscular preparations.

Methods: Chick biventer cervicis (BC) neuromuscular preparations were used which were incubated with venoms from various snakes of the *Bothrops* genus (*B. jararaca*, *B. jararacussu*, *B. alternatus* and *B. neuwiedi*, 50-100 µg/ml), *Camellia sinensis* (Cs) alcoholic extract, 100 µg/ml, or previously treated with Cs (30 min), followed by the addition of the various bothropic venoms.

Results: blockade of the contractile response was observed in $69.7 \pm 4.3\%$ (*B. jararaca*), $83.1 \pm 10\%$ (*B. jararacussu*), $88.1 \pm 4.5\%$ (*B. alternatus*) and $92.4 \pm 5.6\%$ (*B. neuwiedi*). When the preparations were previously incubated with Cs extract, results were 62%, 89.2%, 75.1% and 78.2%, respectively.

Conclusion: *Camellia sinensis* extract was found to be effective against neurotoxicity induced by bothropic venoms.

Key words: *Camellia sinensis*, bothropic venom, antiophidic activity, neurotransmission

RESUMEN

Introducción: los venenos de serpientes del género *Bothrops* son capaces de inducir un bloqueo neuromuscular en preparaciones aisladas de mamíferos y aves. El tratamiento específico es la sueroterapia, sin embargo, no siempre se muestra eficaz contra la toxicidad inducida por el veneno. Por otro lado, algunos compuestos vegetales han sido estudiados con finalidad antiofídica, como es el caso de *Camellia sinensis* (té verde).

Objetivo: evaluar la actividad del extracto alcohólico de *Camellia sinensis* contra la acción de diferentes venenos botrópicos en preparaciones neuromusculares de aves.

Métodos: se utilizaron preparaciones neuromusculares de biventer cervicis de pollitos (BC) que fueron incubados con: venenos de diferentes serpientes del género *Bothrops* (*B. jararaca*, *B. jararacussu*, *B. alternatus* y *B. neuwiedi*, 50-100 µg/mL), extracto alcohólico de *Camellia sinensis* (Cs) 100 µg/ml o previamente tratadas con Cs (30min), seguido de adición de los diferentes venenos botrópicos.

Resultados: se observó un bloqueo de la respuesta contráctil en $69,7 \pm 4,3$ % (*B. jararaca*), $83,1 \pm 10$ % (*B. jararacussu*), $88,1 \pm 4,5$ % (*B. alternatus*) y $92,4 \pm 5,6$ % (*B. neuwiedi*). Cuando las preparaciones fueron previamente incubadas con el extracto de Cs, los resultados fueron de: 62 %, 89,2 %, 75,1 % y 78,2 %, respectivamente.

Conclusión: el extracto de *Camellia sinensis* se mostró eficaz contra la neurotoxicidad inducida por venenos botrópicos.

Palabras claves: *Camellia sinensis*; veneno botrópico; actividad antiofídica; neurotransmisión.

Recibido: 06/10/2017

Aceptado: 29/01/2018

Introdução

Os acidentes ofídicos representam um sério problema de Saúde Pública, devido a elevada frequência de morbimortalidade que ocasionam,⁽¹⁾ e no Brasil a maioria dos acidentes são provocados por serpentes do gênero *Bothrops*.⁽²⁾

O método mais eficaz para o tratamento dos envenenamentos ofídicos é a soroterapia que, no entanto, é restrita às espécies de serpentes cujos venenos foram utilizados no processo de imunização, não havendo um soroantiofídico universal. Além disto, os soros

antiofídicos não são capazes de neutralizar a miotoxicidade causada por miotoxinas presentes nos venenos.⁽³⁾ Assim, inúmeras pesquisas vêm sendo realizadas com o objetivo de se obter algum progresso no tratamento dos acidentes ofídicos,⁽⁴⁾ dentre elas, várias espécies de plantas.

A *Camellia sinensis* (chá verde) é constituída por diversas classes de compostos fenólicos e flavonóides, tais como flavonóis e ácidos fenólicos, além de cafeína, pigmentos, carboidratos, aminoácidos e certos micro-nutrientes (vitaminas B, E, C e minerais como o cálcio, magnésio, zinco, potássio e ferro). Os principais flavanóides presentes na *Camellia sinensis* são os monômeros de catequinas, e o seu teor no vegetal depende da forma do processamento das folhas antes da secagem, localização geográfica do plantio e condições de cultivo.⁽⁵⁾

Os compostos bioativos da *Camellia sinensis* possuem capacidade de promover benefícios à saúde, devido aos seus componentes fenólicos que apresentam atividade antioxidante, antiangiogênica, antiproliferativa e antitumoral.⁽⁶⁾

A ação antiofídica de *Camellia sinensis* tem sido mostrada com eficácia quando testada contra a ação tóxica do veneno de *Crotalus durissus terrificus*,⁽⁷⁾ e também contra a ação do veneno de *Bothrops jararacussu* e sua miotoxina, bothropstoxina-I,⁽⁸⁾ ambos em preparação diafragma de camundongo.

Assim sendo, o presente trabalho tem como objetivo verificar a capacidade antiofídica do extrato de *Camellia sinensis* contra a ação neurotóxica induzida pelos venenos de *B. jararaca*, *B. jararacussu*, *B. newiedi* e *B. alternatus* em preparação neuromuscular de ave.

Métodos

Animais

Foram utilizados pintainhos de 3 a 8 dias, fornecidos pela Granja Globo Aves (Mogi Mirim/SP). Os animais foram mantidos em gaiolas abastecidas com água e ração *ad libitum*, em ambiente com temperatura constante e iluminação controlada (12 horas com luz e 12 horas sem luz). O projeto foi submetido à Comissão de Ética em Experimentação Animal (SBCAL-COBEA) e aprovado sob o protocolo nº 3712-1 (CEEA/Unicamp).

Material Botânico

O material foi obtido comercialmente, limpo e esterilizado na estufa com circulação e renovação de ar a 90 °C por trinta minutos e depois seco para obter um peso constante. Em seguida, o material foi moído até ficar em forma de pó que foi acondicionado a luz num recipiente fechado.⁽⁹⁾

Preparação do extrato

O extrato foi obtido através do método de percolação, descrito na Farmacopéia Brasileira II (1959):

Percolação: “Processo geral A” - foi utilizado um percolador de vidro e etanol a 95 % (p/v) como líquido extrator. Os extratos foram concentrados em evaporador rotatório em temperatura inferior a 30 °C e, liofilizados, assim obtendo os extratos das folhas da *Camellia sinensis*.

Obtenção dos venenos botrópicos

Os venenos das serpentes do gênero *Bothrops* (*B. jararaca*, *B. jararacussu*, *B. alternatus* e *B. neuwiedi*) utilizados foram fornecidos pelo Departamento de Farmacologia, Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP. Os venenos são mantidos em baixa temperatura (-8 °C) para conservação de seus compostos.

Preparação neuromuscular de ave - biventer cervicis de pintainho

A preparação biventer cervicis de pintainho foi isolada e montada de acordo com o método Ginsborg e Warriner.⁽¹⁰⁾ Os animais foram anestesiados por atmosfera saturada de isoflurano e após isolamento, o músculo foi suspenso em uma cuba de 5 mL, contendo solução nutritiva de Krebs (NaCl 17,25 ml, KCl 1,75 ml, CaCl₂. 2H₂O 1,4 ml, KH₂ PO₄ 0,8 ml, MgSO₄. 7H₂O 1,45 ml, glicose 1,0 g, bicarbonato 1,0 g, H₂O 500 ml). A solução foi areada de modo constante com carbogênio (mistura de 95 % O₂ e CO₂) e mantida a 37 °C. A preparação foi submetida a uma tensão constante de 1 g e estimulada por meio de eletrodos bipolares (estimulação de campo). Foram aplicados estímulos de 7 V com pulsos supramaximais de 0,1 Hz de frequência e 0,2 ms de duração para estimulação indireta (estimulador Grass S48). As contrações musculares resultantes dos estímulos elétricos máximas e as contraturas em resposta de adição exógena de Acetilcolina (ACh, 110 µM) e Cloreto de Potássio (KCl, 20 mM) foram registrados em fisiógrafo de Gould RS3400, por meio de transdutores isométricos Load Cell BG-10GM. O registro das contraturas para

ACh e KCl foram realizados com a ausência de estimulação elétrica, no início (antes da adição dos venenos) e após o período de 120 minutos de incubação. Tais respostas contraturantes indicam a presença de neurotoxicidade e/ou miotoxicidade.⁽¹¹⁾

Para os protocolos de neutralização, foi realizada a pré incubação do veneno com o extrato de *Camellia sinensis*, por 30 min a 37 °C, para posterior adição à cuba contendo a preparação neuromuscular, e observado por um tempo de 120 min.

Para análise dos resultados, os dados foram transformados em porcentagem, considerando o tempo zero (0) como 100 %, e comparando os controles com seus respectivos tratamentos.

Os valores estão apresentados como Média \pm Desvio Padrão, utilizando o teste t-Student (OriginPro), considerando significativo $p < 0,05$.

Resultados

A concentração eleita de *Camellia sinensis* foi de 50 ug/mL, de acordo com De Jesus Reis Rosa,⁽⁷⁾ que verificou ser a maior concentração com menor alteração na resposta basal de preparações nervo frênico-diafragma de camundongo. Os dados aqui obtidos com a incubação da preparação neuromuscular de ave com o extrato de *Camellia sinensis*, foram similares aos observados com a preparação neuromuscular de mamífero (Fig. 1A). Não havendo diferença significativa em relação ao Controle Krebs.

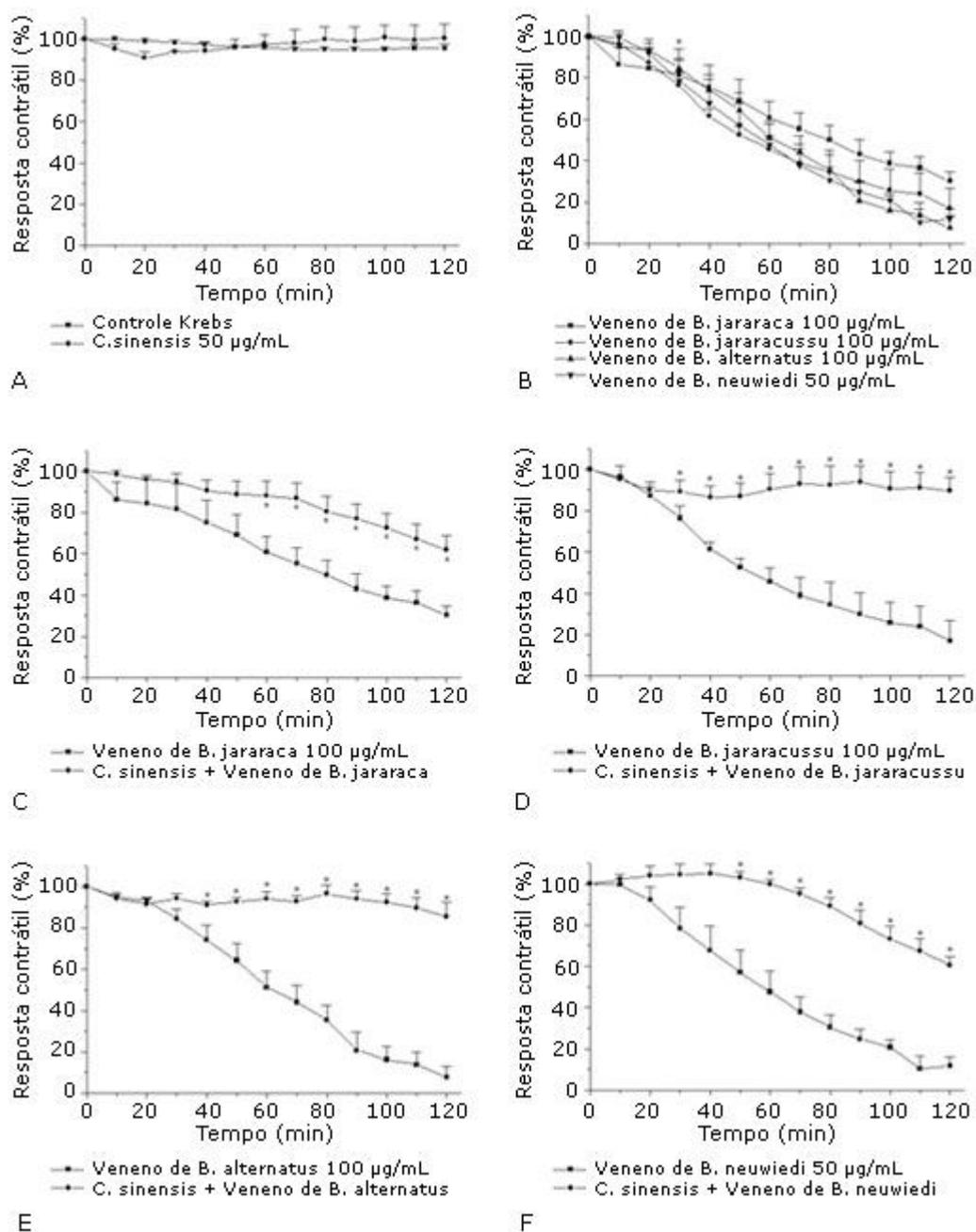


Fig. 1 - Gráfico representativo da resposta contrátil de preparação biventer cervicis de pintainho sob estimulação elétrica indireta.

- 1A** - resposta contrátil ao Controle Krebs e extrato de *Camellia sinensis* (50 µg/mL).
- 1B** - preparação incubada com os venenos de *B. jararaca* (100 µg/mL), *B. jararacussu* (100 µg/mL), *B. alternatus* (100 µg/mL) e *B. neuwiedi* (50 µg/mL).
- 1C** - pré incubação do extrato de *Camellia sinensis* com o veneno de *B. jararaca*.
- 1D** - pré incubação do extrato de *Camellia sinensis* com o veneno de *B. jararacussu*.
- 1E** - pré incubação do extrato de *Camellia sinensis* com o veneno de *B. alternatus*.
- 1F** - pré incubação do extrato de *Camellia sinensis* com o veneno de *B. neuwiedi*. Os pontos marcados com (*) representam $p < 0,05$ quando comparados com o controle Krebs.

As concentrações eleitas para os venenos botrópicos foram de 100 µg/mL para *B. jararaca*, *B. jararacussu*, *B. alternatus* e 50 µg/mL para *B. neuwiedi* por demonstrarem

50% de bloqueio na resposta contrátil durante uma hora de observação, como observado no trabalho de Zamuner et al.⁽¹²⁾

Após 120 min de observação, foi obtido um bloqueio neuromuscular significativo da resposta contrátil em $69,7 \pm 4,3$ % para o veneno de *B. jararaca*, $83,1 \pm 10$ % para *B. jararacussu*, $92,4 \pm 5,6$ % para *B. alternatus* e $88,1 \pm 4,5$ % para *B. newviedi* (Figura 1B), comparados com o controle Krebs.

O veneno de *B. jararaca*, 100 µg/mL, induziu um bloqueio da resposta neuromuscular de $69,7 \pm 4,3$ %, contra um bloqueio de $38 \pm 6,9$ % induzido pela incubação do veneno com o extrato de *Camellia sinensis*. Portanto, com uma atividade neutralizante de 54,9 % contra o efeito bloqueador neuromuscular induzido por este veneno (Fig. 1C).

O veneno de *Bothrops jararacussu*, 100 µg/mL, causou um bloqueio neuromuscular de $83,1 \pm 10$ % contra 10,2 % quando pré-tratado com o extrato de *Camellia sinensis*, resultando em proteção de 89,2 % (Fig. 1D).

Experimentos com veneno de *Bothrops alternatus*, 100 µg/mL, resultaram em bloqueio da resposta contrátil de $92,4 \pm 5,6$ % e, quando pré-tratado com o extrato de *Camellia sinensis* obteve-se um bloqueio de 10,2 %, portanto uma proteção de 89,8 % (Fig. 1E).

Com a ação do veneno de *B. newviedi*, 50 µg/mL, pode-se obter um bloqueio da resposta contrátil de $88,1 \pm 4,5$ % e quando incubado a preparação com o extrato vegetal, observou-se proteção significativa de 60,6 % (Fig. 1F).

A figura 2A mostra a ação bloqueadora sobre a resposta contraturante à adição exógena de ACh (110 uM), e a proteção significativa do extrato de *Camellia sinensis* após a incubação com cada veneno botrópico analisado (Fig. 2B).

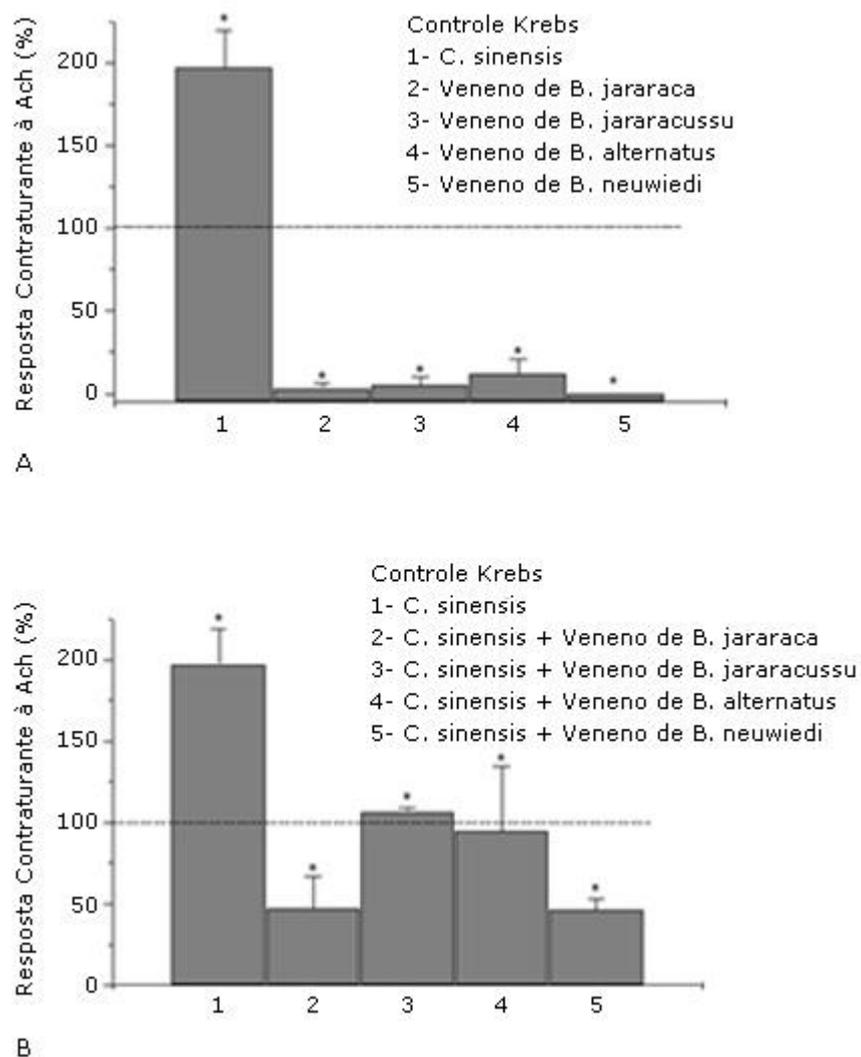


Fig. 2 - Resposta contraturante à adição exógena de ACh após 120 min de incubação.

2A - preparação incubada com os venenos botrópicos.

2B - preparação incubada com os venenos botrópicos + extrato de *Camellia sinensis*. Os pontos marcados com (*) representam $p < 0,05$ em comparação com o controle Krebs.

A figura 3A mostra a ação bloqueadora sobre a resposta contraturante à adição exógena de KCl (20 mM), e a proteção parcial, porém significativa, contra a ação bloqueadora dos venenos de *B. jararacussu*, *B. alternatus* e *B. neuwiedi*, exceto para o veneno de *B. jararaca* que não houve proteção significativa.

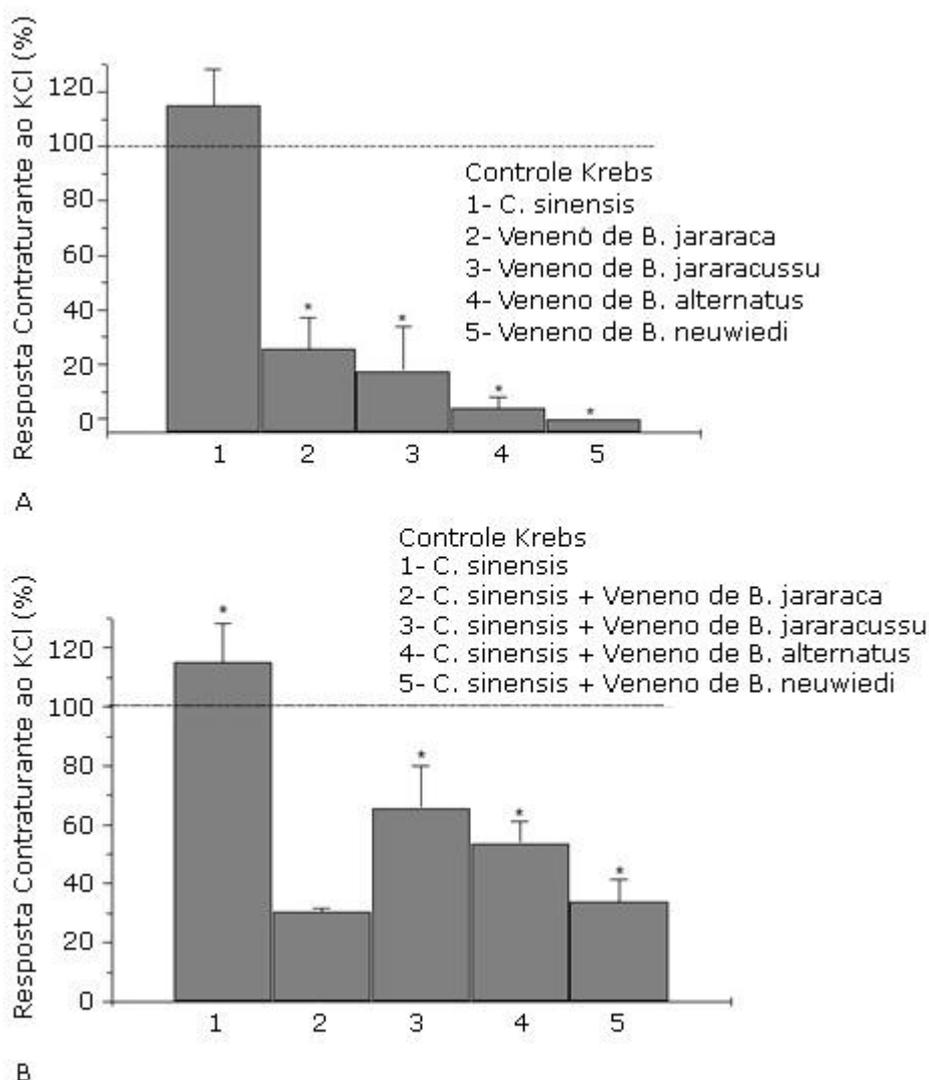


Fig. 3 - Resposta contraturante à adição exógena de KCl após 120 minutos de incubação.
3A - preparação incubada com os venenos botrópicos.
3B - preparação incubada com os venenos botrópicos + extrato de *Camellia sinensis*.
 Os pontos marcados com (*) representam $p < 0,05$ em comparação com o controle Krebs.

Discussão

Quando o extrato de *Camellia sinensis* foi pré incubada com o veneno bruto de *Bothrops jararacussu*, e sua miotoxina, bothropstoxina-I, foi possível obter o efeito de neutralização do efeito neurotóxico,⁽⁸⁾ bem como também, contra a toxicidade induzida pelo veneno bruto de *Crotalus durissus terrificus*.⁽⁷⁾ O efeito antiofídico contra o veneno de jararacuçu foi reproduzido nos experimentos aqui obtidos, utilizando a preparação neuromuscular de ave.

Nos experimentos aqui realizados, o extrato vegetal de *C. sinensis* se mostrou eficaz contra o bloqueio neuromuscular induzido pelos venenos botrópicos, e eficácia parcial

contra a miotoxicidade induzida pelos venenos. Tais parâmetro são confirmados tanto pelo registro miográfico, quanto pelas curvas contraturantes obtidas após a adição exógena de ACh e KCl.

A preparação neuromuscular biventer cervicis de pintainho se apresenta de forma multifocal, onde formam-se sinapses em vários pontos distribuídos ao longo do comprimento ou nas extremidades de fibras musculares⁽¹³⁾ e resultam na produção de contraturas (acetilcolina e cloreto de potássio exógenos). Assim, músculos com inervação multi-focal podem ser estimulados por agonistas colinérgicos aplicados de forma exógena, e também pela estimulação de seu nervo-motor, permitindo que os efeitos pré-juncionais sejam distinguidos dos efeitos pós-juncionais. A integridade do receptor nicotínico pode ser avaliada pela adição exógena de ACh, enquanto que a integridade da fibra muscular pode ser avaliada pela adição exógena de KCl.⁽¹¹⁾

Desse modo, pode-se inferir, baseado na literatura e nos dados aqui observados, que o extrato de *Camellia sinensis* induziu proteção contra a atividade neurotóxica induzida pelos venenos de *B. jararaca*, *B. jararacussu*, *B. alternatus* e *B. neuwiedi*, e proteção parcial contra a miotoxicidade induzida por estes venenos.

O mecanismo de ação antiofídico do extrato de *Camellia sinensis* ainda não é bem esclarecido, porém, Oshima-Franco et al.⁽⁸⁾ sugerem que a presença de teaflavinas e epigallocatequina galato apresentam fortes evidências de participarem no papel de inibição da atividade tóxica de veneno botrópico.

Outros compostos vegetais também têm mostrado efeito antiofídico contra a ação tóxica de alguns venenos botrópicos, tais como: extrato de *Casearia sylvestris* que foi capaz de neutralizar os efeitos neurotóxicos e miotóxicos induzidos pelo veneno de *B. jararacussu*; ⁽¹⁴⁾ *Calendula officinalis* promoveu efeito antimiotóxico contra os venenos de *B. neuwiedi* e *B. leucurus*⁽¹⁵⁾ e extrato de *Mikania laevigata* contra a ação neurotóxica do veneno de *Philodryas alfersii*.⁽¹⁶⁾

Além dos compostos vegetais, há estudos sobre a ação neutralizante de compostos não vegetais que também apresentam propriedade antibotrópica, como por exemplo, a heparina em baixa concentração que se mostrou capaz de neutralizar os efeitos de neurotoxicidade e miotoxicidade induzidas pelo veneno de *B. jararacussu* e sua miotoxina, bothropstoxina-I, ^(17,18) além de íons manganês que demonstraram atividade protetora contra a miotoxicidade induzida pela bothropstoxina-I.⁽¹⁹⁾

Como visto, os venenos botrópicos são responsáveis pela maior porcentagem de acidentes ofídicos no Brasil, e o antiveneno é eficaz contra os efeitos sistêmicos no paciente, e

pouco ou nada eficiente contra os efeitos locais. Portanto, é importante buscar alternativas que auxiliam a reversão dos efeitos locais em casos de acidentes botrópicos, dentre elas, o uso de plantas como método alternativo que tem se mostrado com eficácia quando testadas *in vitro*.

Conclui-se que o extrato de *Camellia sinensis* mostrou-se eficaz em inibir a ação neurotóxica dos venenos de *Bothrops jararaca*, *Bothrops jararacussu*, *Bothrops alternatus* e *Bothrops neuwiedi*, em preparações neuromusculares de ave.

Referências

1. Pinho FMO, Pereira ID. Ofidismo. Rev Ass Med Brasil 2001;47(1):24-9.
2. De Oliveira RC, Wen RC, Sifuentes FH. Epidemiologia dos Acidentes por Animais Peçonhentos. In: Cardoso JLC, França SFO, Wen FH, Málaque CMS, Haddad Junior V. (Eds). Animais peçonhentos no Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos envenenamentos. São Paulo: Sarvier 2009. p.6-21
3. Moura da Silva AM, Cardoso DF, Tanizaki M. Differences in distribution of myotoxic proteins in venoms from different Bothrops species. Toxicon 1990. 28:1293-301
4. Cavalcante WLG. Caracterização das atividades de PLA2s Lys49, isoladas de venenos de serpentes do gênero Bothrops, em preparação neuromuscular de camundongos e influência de agentes neutralizadores. 2009. pp. 64. Tese (Doutor em Farmacologia). Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho - Unesp, Botucatu.
5. Yanagimoto K, Ochi H, Lee KG, Shibamoto T. Antioxidative activities of volatile extracts from green tea, oolong tea, and black tea. J Agric Food Chem 2003. 51:7396-401.
6. Cooper R, Morré J, Morré DM. Medicinal benefits of green tea: part II. Review of anticancer properties. The Journal of Alternative and Complementary Medicine 2005. 11:639-52.
7. De Jesus Reis Rosa L, Silva GA, Filho JA, Silva MG, Cogo JC, Groppo FC, *et al.* The inhibitory effect of *Camellia sinensis* extracts against the neuromuscular blockade of *Crotalus durissus terrificus* venom. J Venom Res 2010. 1:1-7.
8. Oshima-Franco Y, De Jesus Reis Rosa L, Silva GAA, Amaral Filho J, Silva MG, Lopes PS, Cogo JC, *et al.* Antithropic Action of *Camellia sinensis* Extract Against the Neuromuscular Blockade by *Bothrops jararacussu* Snake Venom and Its Main Toxin,

Bothropstoxin-I, Pharmacology, Dr. Luca Gallelli (Ed.), InTech. 2012. Available from: <http://www.intechopen.com/books/pharmacology/antibothropic-action-of-camellia-sinensis-extract-against-the-neuromuscular-blockade-of-bothrops-jar>

9. Borges RC. Serpentes Peçonhentas Brasileiras: Manual de Identificação Prevenção e Procedimentos em Caso de Acidentes. Editora Atheneu, 1999.
10. Ginsborg BL, Warriner J. The isolated chick biventer cervicis nerve-muscle preparation. Br J Pharmacol Chemother 1960. 15:410-1.
11. Harvey AL, Barfaraz A, Thomsom E, Faiz A, Preston S, Harris JB. Screening of snake venoms for neurotoxic and myotoxic effects using simple *in vitro* preparations from rodents and chicks. Toxicon 1994. 32:257-65.
12. Zamuer SR, Cruz-Hofling MA, Corrado AP, Hyslop S, Rodrigues-Simioni L. Comparison of the neurotoxic and myotoxic effects of Brazilian Bothrops venoms and their neutralization by commercial antivenom. Toxicon 2004. 1(44):259-71.
13. Coërs C. Structure and organization of the myoneural junction. International review of cytology 1967. 22:239-67.
14. Cintra-Francischinelli M, Silva MG, Andreo-Filho N, Gerenetti M, Cintra ACO, Giglio JR, et al. Antibothropic action of *Casearia sylvestris* Sw. (Flacourtiaceae) extracts. Phytotherapy Research 2008. 22:784-90.
15. Mise YF, Casais-e-Silva L, Lira-da-Silva R. Ação protetora da *Calendula officinalis* (asteracea; compositae) sobre a atividade miotóxica do veneno *Bothrops leucurus* (serpentes; viperidae). Gazeta Médica da Bahia. (Supl.1)2009. 50-5.
16. Collaço RC, Rocha Junior DS, Silva MG, Cogo JC, Oshima-Franco Y, Randazzo-Moura P. Propriedade antiofídica do extrato metanólico de *Mikania laevigata* sobre as ações biológicas induzidas pelo veneno de *Philodryas olfersii* na junção neuromuscular. Revista de Estudos Universitários – REU 2010. 36(2).
17. Rostelato-Ferreira S, Rodrigues-Simioni L, Oshima-Franco Y. Heparin and bothropic commercial antivenom against the paralyzing effect of *Bothrops jararacussu* snake venom. J Venom Anim Toxins incl Trop Dis 2010. 16(1):34-45.
18. Rostelato-Ferreira S, Leite GB, Cintra ACO, Cruz-Höfling MA, Rodrigues-Simioni L, Oshima-Franco Y. Heparin at low concentration acts as antivenom against *Bothrops jararacussu* venom and bothropstoxin-I neurotoxic and myotoxic actions. J Venom Research 2010. 1:54-60.
19. Randazzo-Moura P, Leite GB, Silva GH, Paffaro Junior VA, Cintra ACO, Cruz-Höfling MA, et al. A study of the myotoxicity of bothropstoxin-I using manganese in

mouse phrenic nerve-diaphragm and extensor digitorum longus preparation. Braz J Morphol Sci 2006. 23(2):237-46.

Conflicto de interesse:

Os autores declaram que não há conflito de interesse.

Contribución de los autores

Lígia Fernanda Ferraz: delinearam o projeto, desenvolveram a parte experimental e coleta de dados, analisaram os dados, discutiram e redigiram o artigo científico.

Raphael Schezaro-Ramos: desenvolveram a parte experimental e coleta de dados.

Léa Rodrigues-Simioni: analisaram os dados, discutiram e redigiram o artigo científico.

Priscila Randazzo-Moura: analisaram os dados, discutiram e redigiram o artigo científico.

Sandro Rostelato-Ferreira: delinearam o projeto, analisaram os dados, discutiram e redigiram o artigo científico.