

UNIVERSIDADE DE SOROCABA
PRÓ-REITORIA ACADÊMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Natália Tribuiani

**USO DO VENENO DE *Bothrops jararacussu* COMO FERRAMENTA
FARMACOLÓGICA NA AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIOFÍDICO DE
Terminalia fagifolia (CAMAÇARI) PELO PARÂMETRO DA SINAPSE NERVO-
MÚSCULO (CAMUNDONGO / AVE)**

**Sorocaba/SP
2016**

Natália Tribuiani

**USO DO VENENO DE *Bothrops jararacussu* COMO FERRAMENTA
FARMACOLÓGICA NA AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIOFÍDICO DE
Terminalia fagifolia (CAMAÇARI) PELO PARÂMETRO DA SINAPSE NERVO-
MÚSCULO (CAMUNDONGO / AVE)**

Dissertação apresentada à Banca
Examinadora do Programa de Pós-
Graduação em Ciências Farmacêuticas da
Universidade de Sorocaba, como exigência
parcial para obtenção do título de Mestre em
Ciências Farmacêuticas

Orientador: Prof^a Dr^a Yoko Oshima Franco

**Sorocaba/SP
2016**

Ficha Catalográfica

Tribuiani, Natália
T743u Uso do veneno de *Bothrops jararacussu* como ferramenta farmacológica na avaliação do potencial antiofídico de *Terminalia fagifolia* (camaçari) pelo parâmetro da sinapse nervo-músculo (camundongo/ave) / Natália Tribuiani. – 2016.
50 f.: il.

Orientadora: Profa. Dra. Yoko Oshima Franco
Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) –
Universidade de Sorocaba, Sorocaba, SP, 2016.

1. Plantas medicinais. 2. Neurofarmacologia. 3. Cobra venenosa – Veneno. I. Franco, Yoko Oshima, orient. II. Universidade de Sorocaba. III. Título.

Natália Tribuiani

Uso do veneno de *Bothrops jararacussu* como ferramenta farmacológica na avaliação do potencial antiofídico de *Terminalia fagifolia* (camaçari) pelo parâmetro da sinapse nervo-músculo (camundongo/ave)

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade de Sorocaba

Aprovado em: 29/02/2016

BANCA EXAMINADORA:

Yoko Oshima Franco
Profa. Dra. Yoko Oshima Franco
Universidade de Sorocaba

Denise Grotto
Profa. Dra. Denise Grotto
Universidade de Sorocaba

Sandro Rostelato Ferreira
Prof. Dr. Sandro Rostelato Ferreira
Universidade Paulista

Agradecimentos

Primeiramente a Deus, por propiciar o dom da vida, da sabedoria e da sede de conhecimento.

Aos meus pais, Vânia e Giancarlo, minha gratidão é tão grande e eterna, impossível de ser expressa em palavras por tudo que são na minha vida. MUITO OBRIGADA, eu AMO vocês!

Ao meu marido Clayton pelo apoio, compreensão e amizade. Por todos os momentos que me ajudou a passar e que foi meu alicerce durante todo meu mestrado. Te amo!

À minha filha Laura que é a minha maior motivação, fonte de recarga de energias. Por você sempre farei tudo que for preciso.

À minha QUERIDA orientadora Yoko, por toda paciência, pelos momentos de ensinamentos, de retenções, de conversas, de orientações, de amizade e de sabedoria. Minha inspiração de profissional e ser humano.

Aos professores Magali e Jorge pela contribuição e parceria, muito obrigada!

Aos professores e grandes colegas Valquíria e Edson, por todos os ensinamentos, por todas as dicas e pelas excelentes conversas, o carinho e a amizade de vocês prevalecerá para sempre! Muito Obrigada!

Às mestres Miriéle e Adriana, que tomei como exemplo de mestrandas, cada uma com suas dificuldades e batalhas, mas ambas com a vontade de vencer e crescer! Obrigada pelo apoio, mesmo que distante!

À professora e farmacêutica Valéria, responsável pelos laboratórios, pela dedicação e auxílio para que o projeto fosse realizado. Aos técnicos e assistentes Rosenéia (Néia), Gustavo, Evandro e Henrique e aos estagiários Victória, Miréla e Diego, por serem tão prestativos, pelos momentos de conversas, risos e aprendizagens.

À Marylu que veio para me ajudar no momento de sufoco e que por fim, aconteceram tantas coisas, que além de companheira de trabalho também ficou uma grande amizade.

A todos os professores e funcionários que me acompanharam, torceram e confiaram no meu esforço e trabalho. Muito obrigada pelo incentivo!

À Bioclin que com seu projeto para escolas e pesquisadores deu-me a oportunidade de enriquecer este trabalho com suas doações.

A todos os amigos e familiares que estiveram comigo quando eu precisei ou quando gostaria. Obrigada por cada momento.

Aos colegas mestrandos que de uma forma ou outra, participaram da minha formação.

Ao corpo docente do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da UNISO

À CAPES e UNISO pela bolsa concedida para a realização do mestrado.

Cabe ao homem compreender que o solo fértil, onde tudo que se planta dá, pode secar; que o chão que dá frutos e flores pode dar erva daninha, que a caça se dispersa e a terra da fartura pode se transformar na terra da penúria e da destruição. O homem precisa entender, que de sua boa convivência com a natureza, depende sua subsistência e que a destruição da natureza é sua própria destruição, pois a sua essência é a natureza; a sua origem e o seu fim.

(Elizabeth Jhin – Amor Eterno Amor)

RESUMO

O veneno de *Bothrops jararacussu* (Bjssu) induz paralisia irreversível *in vitro* e mionecrose em preparações neuromusculares, sendo ideal para testar a habilidade inibitória desses efeitos tóxicos em plantas etnobotânicas. Neste trabalho, o extrato hidroalcoólico de entrecascas e caules de *Terminalia fagifolia* (EHTf) em concentrações de 100 e 500 µg/mL (isto é, 2,5 X maior que a quantidade do veneno) foram ensaiadas contra 40 e 200 µg/mL de Bjssu em preparações nervo frênico-diafragma (NFD) de camundongos e biventer cervicis (BC) de pintainhos, respectivamente. Dois protocolos, modelos de pré incubação e pós veneno foram testados para avaliar a ação antineurotóxica do EHTf. A antimiotoxicidade de EHTf foi avaliada via microscopia de luz em músculos resultantes de experimentos em NFD e pela determinação da creatinoquinase (CK) dos experimentos com BC. A resposta muscular evocada de estímulos indiretos mostrou a habilidade de EHTf em impedir o bloqueio *in vitro* do veneno de Bjssu. As contraturas frente à adição exógena de acetilcolina em preparações de aves das linhagens HY-Line brown e W36 mostraram que EHTf age sobre receptores nicotínicos extrínsecos, preservando totalmente os intrínsecos. EHTf melhora a membrana do sarcolema em uma correlação positiva com os resultados de CK e histologia. O elevado conteúdo de saponina (índice afrosimétrico=1333,33) pode explicar o sucesso de EHTf em neutralizar os efeitos tóxicos deste veneno. Em conclusão, EHTf mostrou efeitos antineurotóxico e antimiotóxico contra o veneno de Bjssu.

Palavras-chave: Biventer cervicis de pintainho. Camaçari. Nervo frênico-diafragma de camundongos. Miotoxicidade. Neurotoxicidade.

ABSTRACT

Bothrops jararacussu venom (Bjssu) induces an irreversible *in vitro* paralysis and myonecrosis in neuromuscular preparations, being ideal for testing the inhibitory ability these toxic effects in ethnobotanical plants. In this work, the hydroalcoholic extract from stem barks of *Terminalia fagifolia* (TfHE) at 100 and 500 µg/mL concentrations (i.e, 2.5 X higher than venom amount) were assayed against 40 and 200 µg/mL Bjssu venom in mouse phrenic nerve-diaphragm (PND) and chick biventer cervicis (BC) preparations, respectively. Two protocols, preincubation and post venom models were tested to evaluate the antineurotoxic action of TfHE. Antimyotoxicity of TfHE was evaluated via light microscopy in resulting muscles from PND and by creatine kinase (CK) determination from BC experiments. The evoked muscular response indirectly elicited showed the ability of TfHE to avoid the *in vitro* blockade of Bjssu venom. The contractures to exogenous addition of acetylcholine at avian preparations (brown and W36 varieties) showed that TfHE acts on extrinsic, preserving totally the intrinsic nicotinic receptors. TfHE meliorates the sarcolemmal membrane in a positive correlation with CK and histological results. The high saponin content (foam index=1333.33) can explain the TfHE success in neutralizing the toxic effects of this venom. In conclusion, TfHE showed antineurotoxic and antimyotoxic actions against Bjssu venom.

Keywords: Chick biventer cervicis. *Camaçari*. Mouse phrenic nerve-diaphragm. Myotoxicity. Neurotoxicity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Fotografia de um espécime de <i>Bothrops jararacussu</i>	9
Figura 2 – Foto ilustrativa de um espécime de <i>Terminalia fagifolia</i>	12
Figura 3 – Imagem ilustrativa das células musculares consideradas lesionadas.....	18
Figura 4 – Fluxograma do desenho experimental para os protocolos de neutralização do veneno de <i>B. jararacussu</i>	20

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACh – Acetilcolina

BC – Biventer cervicis

B. jararacussu – *Bothrops jararacussu*

brown – HY-line Brown

CK – Creatinoquinase

EHTf – Extrato hidroalcoólico de *Terminalia fagifolia*

EtOH – Etanol

IA – Índice Afrosimétrico

n – Número de experimentos

NFD – Nervo frênico-diafragma

OMS – Organização Mundial de Saúde

Pós – Pós veneno

Pré – Pré incubação

PVC – Policloreto de vinila

SINAN – Sistema de Informação de Agravos de Notificação

W36 – HY-line W36

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	6
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	7
2.1. Acidentes ofídicos	7
2.2. Gênero <i>Bothrops</i> e <i>Bothrops jararacussu</i>.....	8
2.3. Tratamento antiofídico.....	10
2.4. Plantas - Tratamento alternativo.....	11
3. OBJETIVOS.....	14
3.1. Objetivos gerais	14
3.2. Objetivos específicos	14
4. MATERIAL E MÉTODOS	15
4.1. Obtenção do Extrato	15
4.2. Determinação do Índice Afrosimétrico (I.A.).....	15
4.3. Solubilização de EHTf.....	16
4.4. Veneno bruto	16
4.5. Animais	16
4.6. Preparação nervo frênico-diafragma de camundongos (NFD)	17
4.7. Análise morfológica.....	17
4.8. Preparação biventer cervicis (BC)	18
4.9. Avaliação enzimática de creatinoquinase (CK) em preparação BC.....	19
4.10. Desenho experimental	20
4.11. Análise estatística	21
5. RESULTADOS	22
6. CONCLUSÃO	39
REFERÊNCIAS.....	40
ANEXO A – CEUA – UNISO.....	45
ANEXO B – CEUA - UFSCAR.....	46
ANEXO C – COMPROVANTE DE SUBMISSÃO	48

1. INTRODUÇÃO

Os acidentes ofídicos são importantes problemas de Saúde Pública, principalmente em países tropicais, por sua alta ocorrência e índice de letalidade que ocasionam (PINHO; PEREIRA, 2001). É difícil estimar a verdadeira incidência mundial de envenenamento por picada de serpente. Tem-se relatado que há 5 milhões de picadas de serpente, resultando em 2,5 milhões de envenenamentos, 125.000 mortes e talvez três vezes esse número de sequelas permanentes no mundo por ano (CHIPPAUX, 1998). Esses números levaram a OMS a enquadrar o acidente ofídico na lista de doenças tropicais negligenciadas, que reúne enfermidades erradicadas ou praticamente erradicadas nos países desenvolvidos, mas que persistem naqueles em desenvolvimento (WHO, 2009).

No Brasil, tais ocorrências tornaram-se agravos de notificação obrigatória a partir de 1986, o que permitiu uma melhor compreensão de sua epidemiologia (ROJAS; ALMEIDA SANTOS; GONÇALVES, 2007). Em 2010 foram notificados 29.635 casos de acidentes ofídicos (BRASIL, 2011).

O tratamento antiofídico é realizado com soroterapia específica e de acordo com a gravidade. O soro consiste em imunoglobulinas heterólogas, que pode gerar reações de hipersensibilidade, tais como urticária, náuseas/vômitos, rouquidão e estridor laríngeo, broncoespasmo, hipotensão e choque, bem como reações tardias (doença do soro) como, febre baixa, artralgia e adenomegalia (BRASIL, 2005). As tentativas de compreender o mecanismo de ação das toxinas do veneno de *Bothrops jararacussu* (*B. jararacussu*) e a busca de formas alternativas para os tratamentos com acidentes ofídicos são alvo frequente de diversos pesquisadores (BELLINI, 2004).

As plantas e seus derivados podem ser utilizados como alternativa ou complemento de tratamentos convencionais para combater os efeitos causados pelos envenenamentos. O estudo de plantas com efeitos antiofídicos tem sido pouco explorado cientificamente, uma vez que a flora brasileira pode compreender uma variedade de plantas com tais efeitos e pode, também, favorecer a descoberta de novas alternativas e/ou tratamentos para vítimas de envenenamentos por animais peçonhentos (DE SOUZA; FELFILI, 2006).

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Acidentes ofídicos

O acidente ofídico (ou ofidismo) é caracterizado pelo quadro de envenenamento proveniente da inoculação de toxinas através do aparelho inoculador (presas) de serpentes. Somente é caracterizado envenenamento quando ocorre a injeção do conteúdo das glândulas venenosas no indivíduo, o que significa que nem toda picada resulta em envenenamento. Há muitas espécies de serpentes que não possuem presas ou, quando presentes estão localizadas na porção posterior da boca, o que dificulta a injeção de veneno ou toxina (BRASIL, 2014).

As serpentes peçonhentas de interesse na saúde pública são aquelas da Família Viperidae, que são representadas por três gêneros: as serpentes do grupo *Bothrops* e *Bothrocophias* (jararaca, jararacuru, urutu, comboia, cruzeira, caissaca); *Crotalus* (cascavel); *Lachesis* (surucucu-pico-de-jaca, surucucu-de-fogo, surucutinga); e o da família Elapidae a do gênero *Micrurus* (coral-verdadeira) (NELSON, 1989).

O número total de acidentes no mundo varia de aproximadamente 5 milhões de acidentes / ano, sendo que 2 % desses resultam em óbitos, atingindo um índice de mortalidade de 100.000 mortes / ano a nível mundial (BRUNDA; SASHIDHAR, 2007). O número de notificações de ofidismo no Brasil vem aumentando com os anos, sendo as serpentes peçonhentas as maiores responsáveis pelos números de casos, alcançando em 2010 uma porcentagem de 85 % de acidentes (BRASIL, 2011). A importância médica dos acidentes ofídicos se dá pela grande frequência e gravidade que ocorre (CARDOSO; WEN, 2003). A padronização atualizada de condutas de diagnóstico e tratamento dos acidentados é imprescindível, pois as equipes de saúde, com frequência considerável, não recebem informações desta natureza durante os cursos de graduação ou no decorrer da atividade profissional (BRASIL, 2001).

Os acidentes ofídicos foram incluídos, pela OMS, na lista das Doenças Tropicais Negligenciadas que acometem na maioria dos casos, populações pobres que vivem em áreas rurais (WHO, 2009). No Brasil, as notificações são registradas no Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN). O Sistema Nacional de Informações Tóxico – Farmacológicas registrou, em 2012, a segunda principal

causa de intoxicações em humanos que foram originadas por envenenamento de animais peçonhentos (26,85 %), perdendo apenas para as intoxicações provocadas por medicamentos (27,27 %) dos casos notificados (SINITOX, 2012).

2.2. Gênero *Bothrops* e *Bothrops jararacussu*

Em todo território brasileiro existem 250 espécies de serpentes, sendo 70 delas peçonhentas. O maior número de acidentes é representado pelo gênero *Bothrops*, com cerca de 90 % dos casos envolvidos (PINHO; PEREIRA, 2001).

O gênero *Bothrops* representa o grupo mais importante de serpentes peçonhentas, com mais de 60 espécies encontradas em todo o território brasileiro (incluindo os gêneros *Bothriopsis* e *Bothrocophias*). As principais espécies são: *B. atrox* – o ofídio mais encontrado na Amazônia, principalmente em beiras de rios e igarapés; *B. erythromelas* – abundante nas áreas litorâneas e úmidas da região Nordeste; *B. jararaca* – tem grande capacidade adaptativa, ocupa e coloniza tanto áreas silvestres como agrícolas e periurbanas, sendo a espécie mais comum da região Sudeste; *B. moojeni* – principal espécie dos cerrados, capaz de se adaptar aos ambientes modificados, com comportamento agressivo e porte avantajado; *B. alternatus* – vive em campos e outras áreas abertas, da região Centro-Oeste ao Sul; *B. jararacussu* – é a espécie que pode alcançar o maior comprimento (até 1,8 m) e que produz a maior quantidade de veneno dentre as serpentes do gênero, predominante nas regiões Sul e Sudeste (BRASIL, 2014).

A *B. jararacussu* (Figura 1) possui cabeça grande, negra e estrias amarelas pós-oculares, exibindo no dorso de tom aveludado, o contraste entre o negro e o amarelo – dourado.

Figura 1 – Fotografia de um espécime de *Bothrops jararacussu*



Fonte: <http://static.panoramio.com/photos/original/9179345.jpg>

Está distribuída geograficamente pelo território sul-americano: Bolívia, Paraguai, Uruguai, Argentina e no Brasil, principalmente nas regiões Sul e Sudeste. Tem hábitos predominantemente noturnos ou crepusculares. Podem apresentar comportamento agressivo quando se sentem ameaçadas, desferindo botes sem produzir ruído (MELGAREJO; CARDOSO; FRANÇA, 2003).

Os venenos de serpentes são considerados misturas complexas, sendo 90% do seu peso seco constituído de toxinas, enzimas e proteínas que estão envolvidas na captura e digestão das presas, bem como defesa contra predadores. As frações não proteicas são representadas por carboidratos, lipídios, aminas biogênicas, nucleotídeos e aminoácidos livres (HODGSON; WICKRAMARATNA, 2002; CARDOSO et al., 2003).

A peçonha da *B. jararacussu* possui importantes atividades fisiopatológicas, com lesões locais e destruição tecidual (ação proteolítica), ativa a cascata da coagulação podendo induzir incoagulabilidade sanguínea por consumo de fibrinogênio (ação coagulante), promove liberação de substâncias hipotensoras e provoca lesões na membrana basal dos capilares por ação das hemorraginas (ação hemorrágica), que associada à plaquetopenia e alterações da coagulação, promove as manifestações hemorrágicas, frequentes neste tipo de acidente (AMARAL et al., 1986; JORGE; RIBEIRO, 1990).

No caso de serpente do gênero botrópico há uma diferença entre o veneno do filhote, que é predominantemente coagulante, e do adulto, com maior ação proteolítica e menor ação coagulante (JORGE; RIBEIRO, 1990).

Logo nas primeiras horas após a inoculação do veneno, as manifestações locais começam a aparecer. A presença de edema, dor e equimose na região atingida, que progride ao longo do membro acometido são alguns dos sinais e sintomas. As marcas da picada bem como o sangramento nos pontos de inoculação das presas podem não ser visíveis. Também podem ocorrer bolhas com conteúdo seroso ou sero-hemorrágico, evoluindo para necrose cutânea, que é a principal complicação, pois pode levar à amputação e/ou déficit funcional do membro (BRASIL, 2014).

As manifestações sistêmicas podem causar sangramentos em pele e mucosas (gengivorragia, equimoses distantes do local da picada), hematúria, hematêmese; e hemorragia em outras cavidades pode determinar risco de morte ao paciente. A hipotensão pode ser decorrente de sequestro de líquido no membro picado ou hipovolemia consequente a sangramentos, que podem contribuir para a instalação de insuficiência renal aguda (BRASIL, 2014).

O conhecimento da composição dos venenos e seus principais efeitos sobre o organismo humano permitem ao médico reconhecer o gênero da serpente responsável pelo acidente e selecionar a soroterapia adequada, mesmo na ausência da serpente (AZEVEDO-MARQUES; CUPO; HERING, 2003).

2.3. Tratamento antiofídico

O diagnóstico é eminentemente clínico-epidemiológico, não sendo empregado na rotina clínica, o exame laboratorial para confirmação do tipo de veneno circulante. Nos acidentes botrópicos, laquéticos e crotálicos, exames de coagulação devem ser realizados para confirmação diagnóstica e avaliação da eficácia da soroterapia. Para as áreas onde há superposição na distribuição geográfica de serpentes do grupo *Bothrops* e do gênero *Lachesis*, o diagnóstico diferencial somente é possível com a identificação do animal ou, no caso de acidente laquético, pela possibilidade de desenvolvimento de manifestações vagas (BRASIL, 2014).

O soro antiveneno é a terapêutica mais eficiente e disponível para o tratamento e contra os efeitos tóxicos que causam. É impreterível ser administrado

em tempo hábil, doses e vias adequadas (CUPO et al., 1991). As entidades governamentais são as responsáveis pela produção nacional do soro. Em SP é compromisso do Instituto Butantan, em MG da fundação Ezequiel Dias, no RJ do Intituto Vital Brasil e no PR cabe ao Centro de Produção e Pesquisa de Imunobiologia suprir a necessidade de atender aos casos de intoxicação por envenenamentos (BRASIL, 2001).

Quando administrado intravenosamente, o soro antiveneno garante maior rapidez e eficácia de neutralização do veneno circulante. Porém, essa prática leva a uma grande preocupação pelas manifestações de hipersensibilidade que podem advir de seu uso. Quatro tipos de reações de hipersensibilidade estão relacionadas com a soroterapia: imediata, precoce, tardia e pirogênica, onde somente a primeira é considerada preocupante devido à gravidade (CUPO et al., 1991).

A efetividade da soroterapia em prevenir o dano tecidual local é limitada, pelo menos em parte, pela rápida ação das toxinas comparada com a distribuição lenta de anticorpos (LOMONTE; LEÓN; HANSON, 1996).

O soro é caracterizado como neutralizador do veneno, não determinando a regeneração das hemácias, do endotélio e dos tecidos em geral, apenas evitando a progressão destes fenômenos, fazendo-se necessário instituir medidas de suporte como elevação do membro afetado, uso de analgésicos, hidratação e antibioticoterapia (ARAÚJO et al., 2003).

2.4. Plantas - Tratamento alternativo

Algumas alternativas como o uso de extratos de plantas medicinais têm sido propostas como coadjuvantes dos antivenenos, devido a várias plantas apresentarem atividade antiofídica (MORS et al., 2000). No entanto, é função da pesquisa investigar e comprovar se uma planta é realmente dotada de ações farmacológicas.

A Combretaceae é uma família botânica, constituída de 600 espécies distribuídas em 18 gêneros, sendo a *Terminalia* composta por aproximadamente 200 espécies. A *Terminalia fagifolia* (Figura 2), conhecida popularmente como camaçari, capitão-do-mato, mirindiba e pau-de-bicho, é encontrada no cerrado brasileiro (MASOKO; PICARD; ELOFF, 2007).

Figura 2 – Foto ilustrativa de um espécime de *Terminalia fagifolia*



Fonte: http://www.virboga.de/Terminalia_fagifolia.htm

Sua madeira é utilizada na carpintaria (vigas, caibros, ripas e tábuas para assoalho, carrocerias e confecções de móveis), como lenha e carvão, e como ornamental em projetos paisagísticos (LORENZI, 1992).

Na medicina popular, a casca do caule e entrecaule da *T. fagifolia* é usada como digestivo (FREIRE; LOPES; MENESSES, 1992), citotóxica contra células tumorais (GARCEZ et al., 2006), no combate contra aftas e tumores (AYRES; CHAVES, 2009), antiulcerogênica (NUNES et al., 2014), antibiofilme e atividade anticitotóxica (de ARAUJO et al., 2015).

Da madeira e das cascas do caule de *T. fagifolia* foram isolados 1,3-diarilpropanos, 1-(4'-hidroxi-2'-metoxifenil)-3-(3"-metoxi-4"-hidroxifenil)-propano e 1-(2'-hidroxi-4',6'-dimetoxifenil)-3-(3"-metoxi-4"-hidroxifenil)-propano, sete flavanonas, naringenina, 5-hidroxi-4',7- dimetoxiflavanona, sakuranetina, isosakuranetina, 7,4'-dimetoxiflavanona, 7-hidroxi-4'-metoxiflavanona, 7-metoxi-4'-hidroxiflavanona, duas chalconas, 2',4'-diidroxi-4-metoxichalcona e 2'-4-diidroxi-4'-metoxichalcona, uma flavana, 7,4'-diidroxi-3'-metoxiflavana e nove triterpenos pentacíclicos, ácido arjúnico, arjunetina, arjungenina, arjunglucosídeo I, ácido arjunólico, arjunglucosídeo II, 23-galoilarjunglucosídeo (isolado como seus derivados mono-, di- e trimetilados

após metilação com diazometano), ácido betulínico e acetato do ácido ursólico, além de ácido gálico e sitosterol (GARCEZ et al., 2006).

A utilização de plantas medicinais para tratamento, cura e prevenção de doenças, é uma das mais antigas formas de prática medicinal da humanidade (VEIGA-JUNIOR; PINTO; MACIEL, 2005). Essa tendência pode ser explicada por diferentes fatores, destacando-se entre eles o custo elevado e os efeitos indesejáveis dos fármacos sintéticos, preferência dos consumidores por “produtos naturais”, a certificação científica das propriedades farmacológicas de espécies vegetais, o desenvolvimento de novos métodos analíticos colocados à disposição do Controle de Qualidade, o desenvolvimento de novas formas de preparação e administração de produtos fitoterápicos, um melhor conhecimento químico, farmacológico e clínico das drogas vegetais e seus derivados (DI STASI, 1996; VIEIRA, 2001; CANIGUERAL; DELLACASSA; BANDONI, 2003).

A aplicabilidade de plantas medicinais com poder antiofídico vem sendo registrada em diversos estudos e acredita-se que isso se deva à presença dos inúmeros compostos ativos presentes nas mesmas (SOARES et al., 2002), podendo citar *Casearia sylvestris* Swartz (RUPPELT et al., 1991; BORGES et al., 2000; CINTRA-FRANCISCHINELLI et al., 2008) a *Casearia gossypiosperma* Briquet (CAMARGO et al., 2010; SILVA, 2012), a *Diospyros kaki* (CHILPA; ESTRADA, 1995), a *Plathymenia reticulata* Benth (FARRAPO et al., 2011), a *Mikania glomerata* (MAIORANO et al., 2005), a *Mikania laevigata* (COLLAÇO et al., 2012) e a *Velozia flavicans* (TRIBUIANI et al., 2014). Neste sentido, a premissa deste trabalho foi avaliar os efeitos farmacológicos do extrato hidroalcoólico de entrecascas (parte mais interna da casca da árvore) e caules de *T. fagifolia* utilizando-se como ferramenta farmacológica, o veneno de *Bothrops jararacussu*, cujos efeitos tóxicos (bloqueio neuromuscular e mionecrose) na junção neuromuscular são amplamente descritos na literatura e validados cientificamente.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivos gerais

Verificar a capacidade de inibição dos efeitos neurotóxico *in vitro* e miotóxico do veneno de *Bothrops jararacussu* na junção neuromuscular de mamíferos e aves pelo extrato hidroalcoólico de entrecascas e caules de *Terminalia fagifolia* (EHTf).

3.2. Objetivos específicos

- Avaliar a capacidade neutralizante do EHTf contra o bloqueio neuromuscular irreversível induzido pelo veneno bruto de *B. jararacussu*, em preparações isoladas de nervo frênico-diafragma (NFD);
- Executar a análise histológica dos protocolos resultantes das preparações de NFD;
- Avaliar a capacidade neutralizante do EHTf contra o bloqueio neuromuscular irreversível induzido pelo veneno bruto *B. jararacussu*, em preparações isoladas de biventer cervicis (BC), em duas linhagens Hy-Line Brown e W36;
- Avaliar a ação contraturante da acetilcolina (ACh) e cloreto de potássio (KCl) frente à concentração selecionada do EHTf em preparações BC;
- Avaliar por análise bioquímica a atividade enzimática de creatinoquinase (CK) em preparação BC;
- Avaliar fitoquímicamente o EHTf pela determinação do índice afrosimétrico.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Obtenção do Extrato

Entrecascas e caules de *Terminalia fagifolia* foram coletados em junho de 2011, na cidade de Porto Nacional ($S10^{\circ} 44'10.2''$; $W 048^{\circ} 21'49.7''$), no Estado de Tocantins (TO), Brasil. O estudo etnobotânico foi realizado na Comunidade de Quilombola Mumbuca na cidade de Mateiros - TO, Brasil, que compreende a região do Jalapão. A planta seca foi depositada no Herbário da Universidade Federal do Tocantins (UFT) em Porto Nacional - TO, Brasil, comprovante espécime nº 4208, de acordo com o Código Internacional de Nomenclatura Botânica (ICBN).

O material foi seco em local protegido de umidade, à temperatura ambiente, durante 7 dias, para ser, em seguida, colocado em estufa a 40°C , a fim de se obter um padrão de umidade de 20 %. O material foi fragmentado e após, triturado, até atingir a forma de pó homogêneo. O pó resultante foi percolado em solução hidroalcoólica (etanol 70 %, v/v), na concentração de 10 % (m/v) e a preparação acondicionada em frasco de vidro protegido da luz, por 72 h (FARMACOPÉIA PORTUGUESA, 2002). Em seguida, as preparações foram filtradas, o solvente evaporado com auxílio de rotaevaporador a 45°C , o material pastoso formado foi liofilizado resultando no extrato seco, que foi acondicionado em frasco vedado com filme de PVC, protegidos da luz, em freezer à temperatura de -20°C .

Este foi gentilmente doado pelo prof. Dr. Marcio Galdino dos Santos da Universidade Federal de Tocantins à profa Drª Yoko Oshima Franco da Universidade de Sorocaba.

4.2. Determinação do Índice Afrosimétrico (I.A.)

A presença de espuma durante os ensaios experimentais remeteu à determinação da quantificação indireta de saponinas pela técnica da determinação do I.A. (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010). O EHTf liofilizado (1 g) foi diluído em balão volumétrico de 100 mL, com água purificada. A solução obtida foi distribuída em 10 tubos de ensaio com tampa (16 mm de diâmetro por 16 cm de altura), em série sucessiva de 1, 2, 3, até 10 mL. O volume do líquido em cada tubo foi ajustado

a 10 mL com água, tampados e agitados com movimentos verticais por 15 segundos, com duas agitações por segundo. Após 15 minutos em repouso a altura da espuma foi medida, sendo registrado o tubo que permaneceu com 1 cm de espuma densa. O I.A. foi calculado segundo a equação 1000 / A, sendo A o volume, em mililitros, do extrato liofilizado.

4.3. Solubilização de EHTf

O extrato liofilizado foi solubilizado com 30 µL (COLLAÇO et al., 2012) ou 15 µL de etanol (EtOH) 70 % (Cinética Solução Química, Londrina, PR) para os experimentos em NFD e BC respectivamente, em todos os ensaios farmacológicos antes de se completar o volume desejado com solução nutritiva.

4.4. Veneno bruto de serpente

O veneno bruto de *B. jararacussu* foi coletado de duas espécimes adultos mantidos no Serpentário do Centro de Estudo da Natureza. O veneno foi liofilizado e certificado pelo Professor Dr. José Carlos Cogo, da Universidade do Vale do Paraíba, Univap, SP, Brasil e gentilmente doado para a profª Drª Yoko Oshima Franco da Universidade de Sorocaba.

4.5. Animais

Camundongos machos pesando entre 25 - 30 g, da linhagem Swiss foram adquiridos na Anilab Paulínia, SP e ambientados em gaiolas no Biotério da UNISO. Foram colocados 5 camundongos por gaiola com exaustão e ventilação apropriada, com maravalha utilizada como cama e livre de substâncias químicas, recebendo ração e água *ad libitum*.

Pintainhos machos das linhagens Brown e W36 com idade entre 5 – 12 dias, foram adquiridos na Avicultura Santa Bárbara em Sorocaba – SP e ambientados no laboratório de Biociências da UNISO. Foram colocados 10 pintainhos por gaiola,

cujo assoalho fora forrado com papelão grosso e permanecram com exaustão e ventilação apropriada.

O projeto foi realizado segundo normas preconizadas pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade de Sorocaba CEUA-UNISO aprovado em 13/08/2014 sob protocolo nº 027/2014 (Anexo A) e pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de São Carlos CEUA-UFSCar, aprovado em 28 de maio de 2013, sob protocolo de nº 070/2012 (Anexo B).

4.6. Preparação nervo frênico-diafragma de camundongos (NFD)

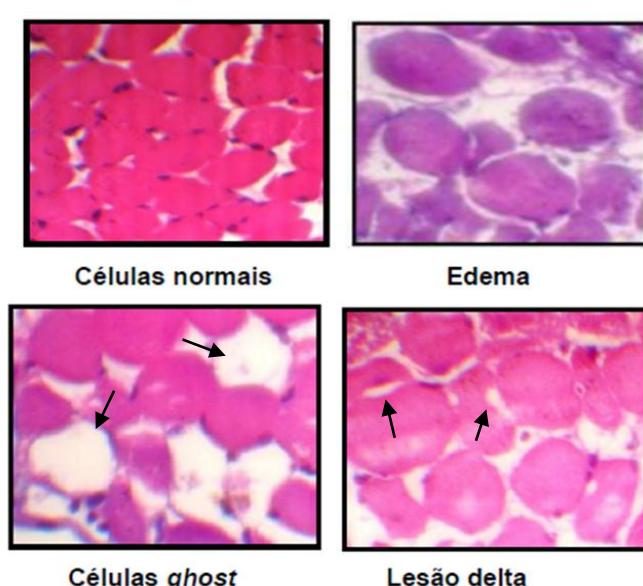
Os camundongos foram anestesiados com halotano, por via inalatória e posteriormente exsanguinados pela secção e sangria dos vasos cervicais. A preparação NFD foi retirada conforme o protocolo proposto por Bülbring (1946) adaptado para camundongos e montada em cuba com capacidade para 5 mL contendo solução de Tyrode. A solução de Tyrode é uma solução nutritiva de pH 7,0; composta por (em mM): NaCl 137; KCl 2,7; CaCl₂ 1,8; MgCl₂ 0,49; NaH₂PO₄ 0,42; NaHCO₃ 11,9 e glicose 11,1. A temperatura foi mantida a 37 °C e a preparação aerada com carbogênio (95 % O₂, 5 % CO₂). Uma tensão de 5 g/cm foi aplicada por meio de um fio preso a porção tendinosa. O nervo frênico ficou sobreposto a um eletrodo e em contato com a superfície da solução nutritiva. O registro da contração muscular foi alcançado através do transdutor isométrico cat. 7003, acoplado a um fisiógrafo 2-Channel Recorder Gemini cat.7070, contendo amplificadores Basic Preamplifiers cat.7080 (Ugo Basile®). Em seguida, a preparação foi estimulada indiretamente através do nervo frênico (estimulador fisiológico duplo ESF-15D), usando-se estímulos supramaxis (0,06 Hz; 0,2 ms). Após o registro em condições controle durante 15 minutos de estabilização da preparação foram realizados os protocolos experimentais.

4.7. Análise morfológica

As preparações dos ensaios de pré - incubação e pós veneno foram analisadas por método morfométrico e quantitativo em relação ao controle de Tyrode, EHTf e veneno de *B. jararacussu*. Ao final de cada experimento (após 120 min), três preparações de cada grupo foram fixadas com uma solução de formalina a

10 %, e processadas conforme a rotina histológica convencional. Cortes transversais (5 mm de espessura) de músculo do diafragma foram coradas com 0,5 % (w / v) de hematoxilina - eosina , para exame de microscopia. A lesão dos tecidos (Figura 3) (edema, mionecrose intensa caracterizada por atrofia das fibras musculares, aspecto hialino, perturbações do sarcolema e a lise das miofibrilas) foi expressa como índice de miotoxicidade (IM), ou seja, a percentagem do número de células musculares danificadas dividido pelo número total de células em três áreas não sobrepostas e não-adjacentes de cada preparação (FERRAZ et al., 2014).

Figura 3 – Imagem ilustrativa das celulas musculares consideradas lesionadas.



Fonte: Ferraz et al. (2014)

4.8. Preparação biventer cervicis (BC)

A preparação BC foi isolada e montada de acordo com o método descrito por Ginsborg e Warriner (1960). Os pintainhos foram anestesiados com halotano e, após a dissecção do músculo este foi montado em uma cuba de 5 mL, contendo solução nutritiva de Krebs composta por (em mM): NaCl 118,1, KCl 4,8, CaCl₂ 2,5, MgSO₄ 1,2, NaHCO₃ 25 e glicose 11,1. A solução foi aerada de modo constante com carbogênio (95 % O₂; 5 % CO₂) e mantida a 37 °C. A preparação foi submetida à tensão constante de 1 g/cm e estimulada por meio de eletrodos bipolares (estimulação de campo).

Para observar a contratura do músculo como resposta da ativação dos receptores, foi administrado 100 µL de KCl (10 %) sobre a preparação, na ausência

de estimulação elétrica, após atingir o platô a preparação foi lavada com solução de Krebs (5 vezes) para garantir a retirada total da substância e observada a estabilização das contrações. Após a estabilização o procedimento foi repetido com 40 µL de ACh (2 %). Assim que estabilizado procedeu-se com os protocolos experimentais.

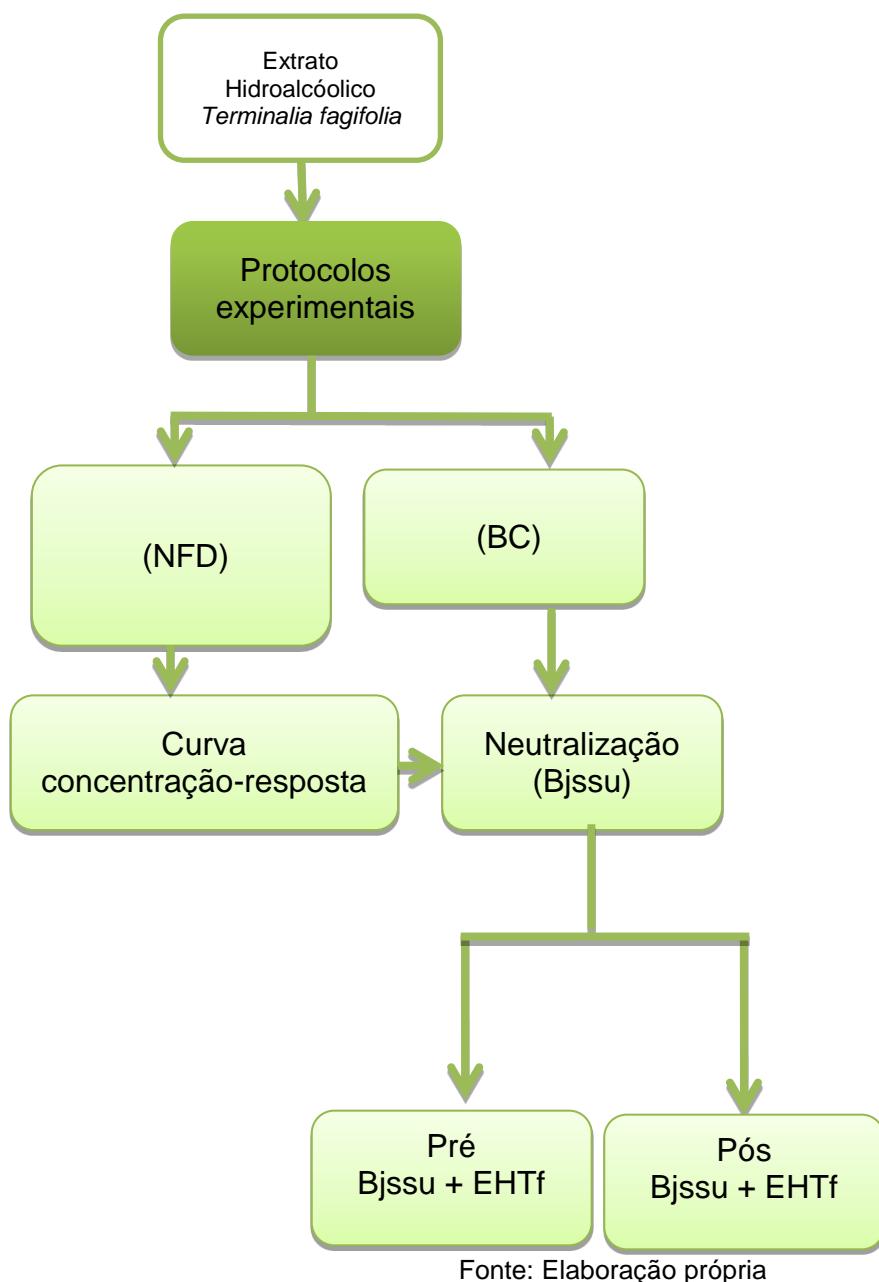
4.9. Avaliação enzimática de creatinoquinase (CK) em preparação BC

Uma vez que para obter hemidiafragmas das preparações NFD ocorre a liberação espontânea de CK resultando em níveis basais elevados, esta atividade foi medida apenas em preparações BC, cujos músculos já são separados naturalmente não havendo liberação espontânea de CK (RANDAZZO-MOURA et al., 2006). Foi coletada uma alíquota de 100 µL da solução de Krebs, após adição de KCl e ACh, antes do início dos protocolos com BC para controle e outra após a finalização do ensaio (120 minutos), anteriormente à adição de ACh e KCl. O volume retirado foi substituído com igual volume de solução de Krebs. As amostras recolhidas foram armazenadas durante 2 h a 4 °C até o início da análise da atividade de CK (expressos em unidades / L), medida a 340 nm (espectrofotômetro da marca Shimadzu ® modelo MultiSpec-1501), 37 °C, usando um kit comercial (CK-NAC; REF K010-1 Bioclin ®, Belo Horizonte, MG, Brazil).

4.10. Desenho experimental

O desenho experimental segue o fluxograma apresentado na Figura 4.

Figura 4 – Fluxograma do desenho experimental para os protocolos de neutralização do veneno de *B. jararacussu*.



Fonte: Elaboração própria

4.11. Análise estatística

Os resultados foram expressos como média \pm erro-padrão. A significância das diferenças observadas foi determinada pelo teste *t*-Student, com valor $p<0,05$, considerado significante.

5. RESULTADOS

O Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Uniso, conforme reconhecido pela Portaria MEC Nº 1.077, de 31 de agosto de 2012, publicada no Diário Oficial da União em 3 de setembro de 2012, Seção 1, p. 12, dispõe a opção de apresentação da dissertação em formato de artigo(s) científico(s), que será apresentada a partir deste item.

O artigo foi submetido de acordo com as normas da revista Toxins.

Article

Ability of *Terminalia fagifolia* Mart. (Combretaceae) against the toxic effects of *Bothrops jararacussu* venom

Natália Tribuiani¹, Marylu Oliveira Tavares¹, Monique Neves Santana¹, Jorge do Amaral Filho¹, Magali Glauzer Silva¹, Marcio Galdino dos Santos², José Carlos Cogo³, Rafael Stuani Floriano⁴, Karina Cogo-Müller⁵, and Yoko Oshima-Franco^{1,*}

¹ Post-Graduate Program in Pharmaceutical Sciences and Pharmacy Graduate Course, University of Sorocaba, Uniso, Rodovia Raposo Tavares, km 92.5, Zip code 18023-000, Sorocaba, SP, Brazil; E-Mail: natatribuiani@hotmail.com; marylu.tavares@gmail.com; monike_santanna@hotmail.com; jeajoe@globo.com; magali.silva@prof.uniso.br

² Environmental Sciences Post-Graduate Program, (PGCiamb), Tocantins Federal University (UFT), Av NS 15 ALC NO 14, 109 Norte, Zip code 77001-090, Palmas, Tocantins, Brazil; E-Mail: galdino@uft.edu.br

³ Serpentarium of the University of Vale do Paraíba (CEN - UNIVAP), Av Shishima Hifumi 2911, Zip code 12244-000, São José dos Campos, SP, Brazil; E-Mail:jccogo@gmail.com

⁴ Department of Pharmacology, Faculty of Medical Sciences, State University of Campinas (UNICAMP), Rua Tessália Vieira de Camargo, 126, 13083-887, Campinas, SP, Brazil; E-Mail: floriano_rs@yahoo.com

⁵ Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of Campinas (UNICAMP), Rua Sérgio Buarque de Holanda, 250, CB-II – sala E06 – 2º Piso, CEP: 13083-859, Campinas, SP, Brazil; E-mail: karina.muller@fcf.unicamp.br

* Correspondence: yoko.franco@prof.uniso.br; Tel.: +55-15-2101-7197.

Academic Editor: name

Received: date; Accepted: date; Published: date

Abstract: *Bothrops jararacussu* venom (Bjssu) induces an irreversible *in vitro* paralysis and myonecrosis in neuromuscular preparations, ideal for testing the inhibitory ability these toxic effects in ethnobotanical plants. Here, the hydroalcoholic extract from stem barks of *Terminalia fagifolia* (TfHE) at 100 and 500 µg/mL concentrations (i.e., 2.5 X higher than venom amount) were assayed against 40 and 200 µg/mL Bjssu venom in mouse phrenic nerve-diaphragm (PND) and chick biventer cervicis (BC) preparations, respectively. Two protocols, preincubation and post venom models were tested to evaluate the antineurotoxic action of TfHE. Antimyotoxicity of TfHE was evaluated via light microscopy in resulting muscles from PND and by creatine kinase (CK) determination from BC experiments. The evoked muscular response indirectly elicited showed the ability of TfHE to reverse the *in vitro* blockade of Bjssu venom. The contractures to exogenous addition of acetylcholine at avian preparations (brown and W36 varieties) showed that TfHE acts on extrinsic, preserving totally the intrinsic nicotinic receptors. TfHE meliorates the sarcolemmal membrane in a positive correlation with CK and histological results. The high saponin content (foam index=1333.33) can explain the TfHE success in neutralizing the toxic effects of this venom. In conclusion, TfHE showed antineurotoxic and antimyotoxic actions against Bjssu venom.

Keywords: chick biventer cervicis; *camaçari*; mouse phrenic nerve-diaphragm; myotoxicity; neurotoxicity.

1. Introduction

The interest by snake venoms extrapolates the medical question as a neglected disease [1]. Snake venom studies are not only addressed to treat the snake bites or to understand its pathological-induced effects, but also as a source of bioactive compounds with high potential of application in innumerable areas such as pharmaceutical (the discovery of bradykinin) [2], medical (fibrin glue, [3]; anticancer, [4]), chemistry (new molecules), biochemistry (innumerable enzymes and peptides),

bioengineering (batroxobin as exemple; [5]), biotechnology [6], biology (evolutionary aspects), cosmetology (inhibitors of muscle contractions), research, etc. As a consequence of its interest, these animals can be threatened by human hunting and persecution, making necessary a rational use of snake venoms, mainly using the crude venoms potentials.

Bothrops jararacussu venom has been used as a pharmacological tool in view of its well known *in vitro* actions on nerve and on muscle visualized by paralysis and myonecrosis, respectively [7]. Thus, antineurotoxic agents can comprise anticholinesterasic [8]; presynaptic agents [9-11], or facilitatory agents [12]. Cell damage leading to myonecrosis triggers inflammatory reactions [13], therefore it serves to study anti-inflammatory agents. Opportunist infections resulting from snake bite serves to assay antimicrobial agents [14]. The lesion induced by venom is as aggressive as that seen in burns and it serves to study healing agents [15]. Besides, the potentialities of innumerable ethnobotanical plants used as antiphidians can be evaluated.

Terminalia fagifolia Mart. (Combretaceae) is found in the Brazilian cerrado, popularly known as "camaçari", "chapadeiro", "capitão-do-mato", "mirindiba" and "pau-de-bicho" [16]. Popularly its stem barks and bast are used as digestive [17], act as cytotoxic against tumoral cells [18], acts against thrush and tumors [16], it has gastric antiulcerogenic and hypokinetic activities [19], and also antibacterial, antibiofilm and cytotoxic activities [20]. Phytochemical studies in leaves of *T. fagifolia* revealed the presence of pentacyclic triterpenoids and its glycosylated derivatives, saponins, flavonoids, tannins, sitosterol, among other compounds [16].

Crude venoms are responsible for paralysis attack on nerve membrane and branches and neuromuscular junctions [4] due the preferential area of the body bitten, the lower members. Thus, experimental models using myographic techniques are useful in studying antiphidians plants [14], mainly those with high medicinal potential from an important and threatened biome as Brazilian "cerrado". In this study, we evaluated the medicinal potentialities of stem barks and bast from *T. fagifolia* hydroalcoholic extract in mammalian and avian isolated preparations using the known effects of *B. jararacussu* venom on neuromuscular transmission (neurotoxicity and myotoxicity).

2. Results

2.1. Foam index of saponin

TfHE showed be positive to saponin content. Thus, the foam index of saponin (FI) was determined as being 1333.33, i.e., 1.3 L of water is needed to dilute 1g of extract to provide a 1 cm-height foam.

2.2. Inhibition of Bjssu venom neurotoxicity

2.2.1. Mouse phrenic nerve-diaphragm preparation (PND)

Figure 1 shows the concentration-response curve of TfHE at 100, 200, 500 and 2000 µg/mL (n=4, 3, 4 and 7, respectively). Note that the three first concentrations have no significant statistical difference among them, while the major concentration caused a partial blockade after 70 min of exposure. We selected the minor concentration for subsequent assays with Bjssu venom (preincubation and post venom models).

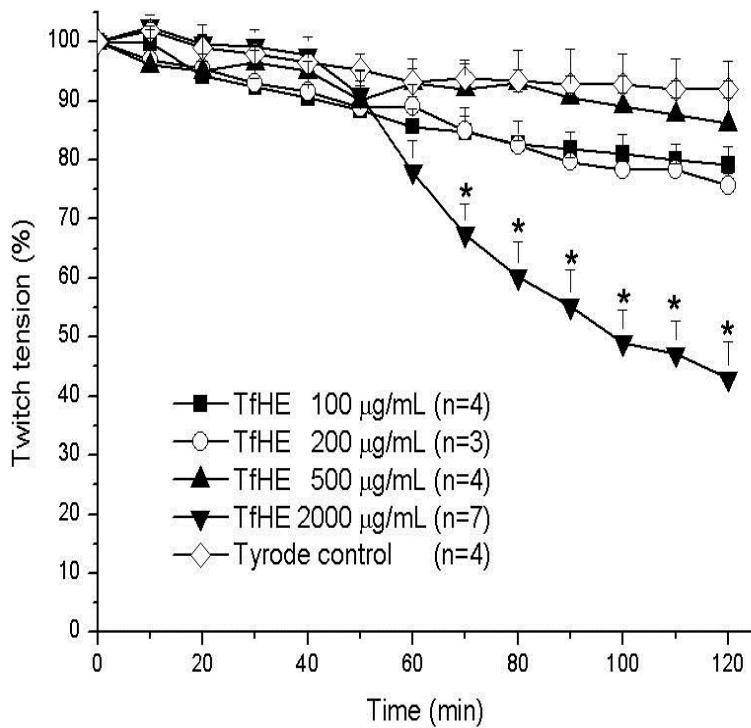


Figure 1. Mouse phrenic nerve-diaphragm preparation, indirect stimuli. The hydroalcoholic extract from *T. fagifolia* (TfHE) at different concentrations was submitted to neuromuscular preparation. The points are the mean \pm SEM of the number of experiments indicated in the figure. * p<0.05 compared to 100, 200, 500 µg/mL and Tyrode control.

Figure 2 shows the neutralization assays using two preincubation and post venom models. Bjssu venom (40 µg/mL) causes a known irreversible paralysis on muscular response which was significantly abolished (*p<0.05 compared to venom) preincubating during 30 min with TfHE 100 µg/mL or when it was added into the bath immediately after 10 min of pretreated preparation with Bjssu venom, in a post venom model (*p<0.05 compared to venom, #p<0.05 compared to Tyrode control and to preincubation model).

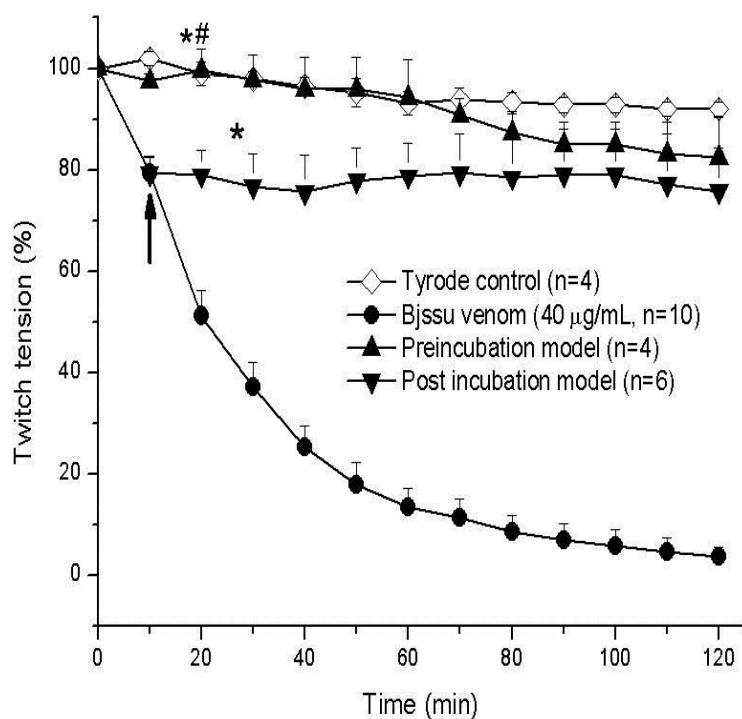


Figure 2. Neuromuscular response of phrenic nerve-diaphragm preparation, indirect stimuli. Preincubation and post venom models did reveal the efficacy of 100 µg/mL TfHE against 40 µg/mL Bjssu venom. The points are the mean S.E.M. for the number of experiments indicated. *p<0.05 and all subsequent points were significantly different compared to the venom. #p<0.05 and all subsequent points were significantly different compared to Tyrode control, whereas only during 40 min compared to preincubation model. Arrow: TfHE time addition.

2.2.2. Chick biventer cervicis (BC)

Figure 3 shows the results obtained with 2 species of chick HY Line: preparations from Brown (A) and W36 (B) varieties.

(a): Note that the facilitatory effect of TfHE at 500 µg/mL (n=9) was immediate but not maintained until the end of experiment. * p<0.05 at least during the first hour of experiment, compared to EtOH alone (n=3) and Krebs control. EtOH and Krebs control were not significantly different between each other (p>0.05).

(b): Contrarily, the facilitatory effect of TfHE (n=4) was not immediate but it was maintained during all the time period one* p<0.05 compared to control (n=4). TfHE and EtOH (n=4) were not significantly different between each other (p>0.05).

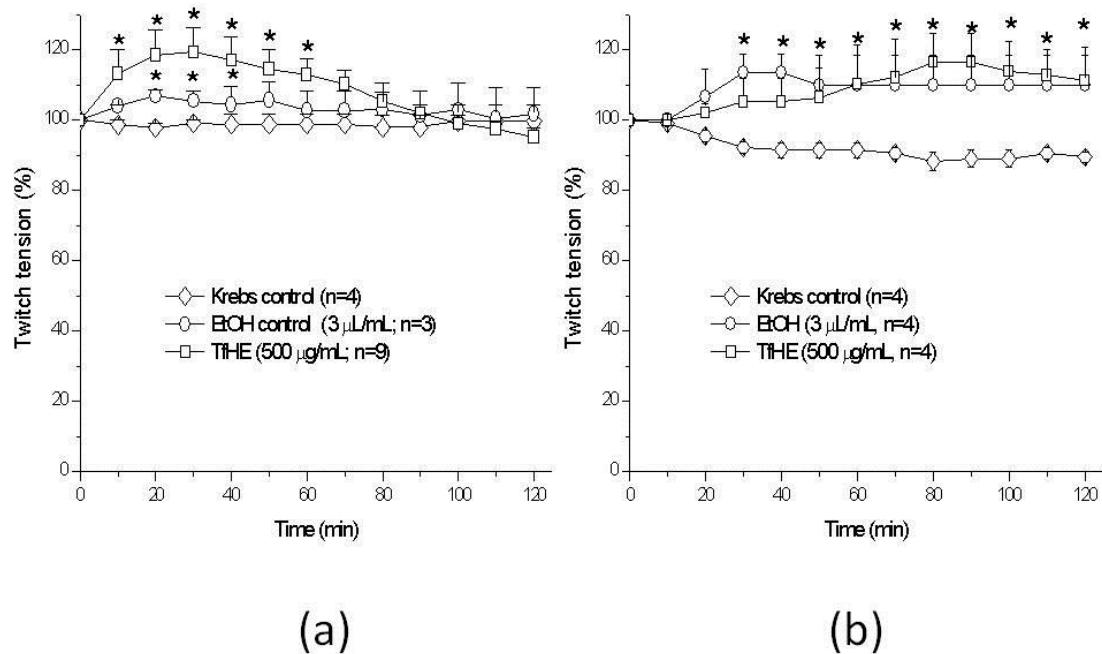


Figure 3. Chick biventer cervicis preparation, indirect stimuli. **(A, brown)** The hydroalcoholic extract from *T. fagifolia* (TfHE) at 500 µg/mL concentration submitted to neuromuscular preparation caused a significantly facilitatory effect during the first 60 minutes. The points are the mean ± SEM of the number of experiments indicated in the figure. * p<0.05 compared to ethanol (EtOH) alone and Krebs control. **(B, W36)** TfHE showed a tardy but maintained facilitatory effect. The points are the mean ± SEM of the number of experiments indicated in the figure.* p<0.05 compared to Krebs control.

Figure 4 shows the neutralization assays in BC preparations from HY-line brown (A) and HY Line W36 (B) using the both, preincubation and post venom models. (a): Bjssu venom (200 µg/mL, n=4) alone did cause a paralysis in more than 60% muscle fibers in a period of 120 min. Preincubating during 30 min TfHE (500 µg/mL) with venom (200 µg/mL) the neuromuscular blockade was totally abolished (*p<0.05 compared to venom). Indistinguishable response from Krebs control and preincubation model were those shown by post venom model (p>0.05 among them). (b): Bjssu venom (200 µg/mL, n=3) alone did cause a paralysis in more than 80% muscle fibers at the end of experiment. Either preincubation (n=3, maximum increase of 58%±16) or post venom (n=3, maximum increase of 38%±18) model expressed an unexpected facilitatory effect. * p<0.05 compared to Krebs control (n=4) and also to venom alone.

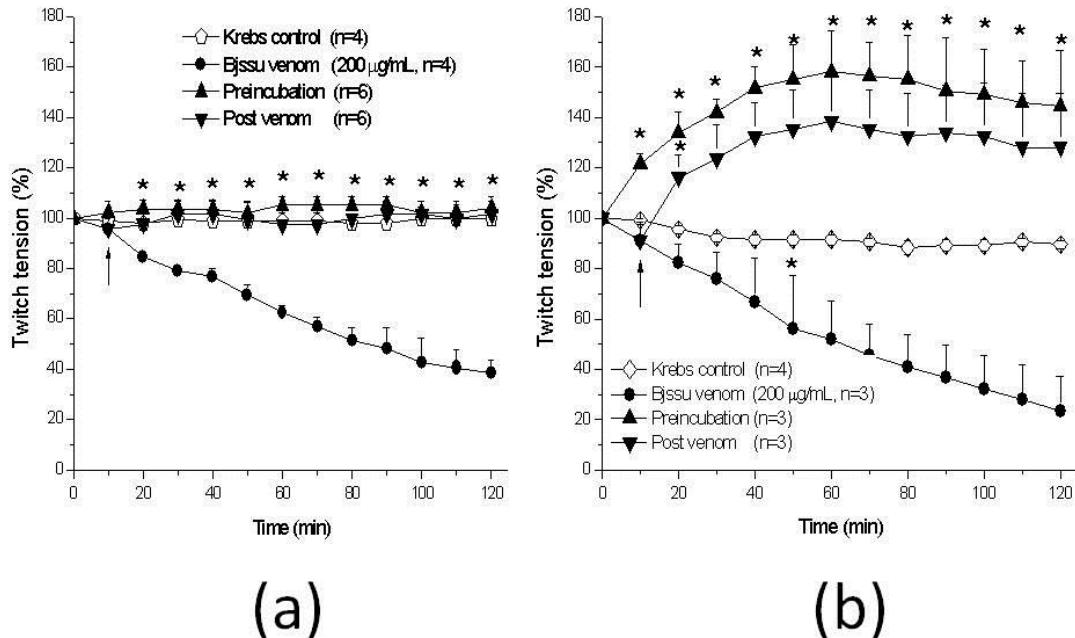


Figure 4. Chick biventer cervicis preparation, indirect stimuli. **(a, brown):** The hydroalcoholic extract from *T. fagifolia* (TfHE) at 500 µg/mL totally abolished the paralysis-induced by Bjssu venom in both, preincubation and post venom models. The points are the mean ± SEM of the number of experiments indicated in the figure. *p<0.05 compared to venom. Arrow: TfHE time addition in post venom model. **(b, W36):** Note the intense facilitatory effect caused by TfHE either in preincubation or in post venom protocols. The points are the mean ± SEM of the number of experiments indicated in the figure. *p<0.05 compared to Krebs control (*put on the post venom and Bjssu venom curves mean that all subsequent points were significantly different from control).

The responses to exogenously added agonists (KCl and ACh), in the absence of electrical stimulation, is shown in Figure 5. The short dot line at 100% means the taken values before the experiment. The columns mean the taken values at the end of experiment (120 min). Again, the results were expressed in both HY Line chick varieties. The preparations submitted to Krebs control (n=4 each) showed a decreased response to KCl addition (in brown preparations) and contrarily TfHE affects the response to ACh addition (n=9, brown; n=4, W36). Bjssu affects KCl and ACh responses either in brown (n=9) or in W36 (n=3) varieties. Preincubation in brown preparations (n=6) was more sensitive than in W36 ones (n=4). Post venom model (n=6, brown; n=4, W36), however, increased the contracture response of KCl.

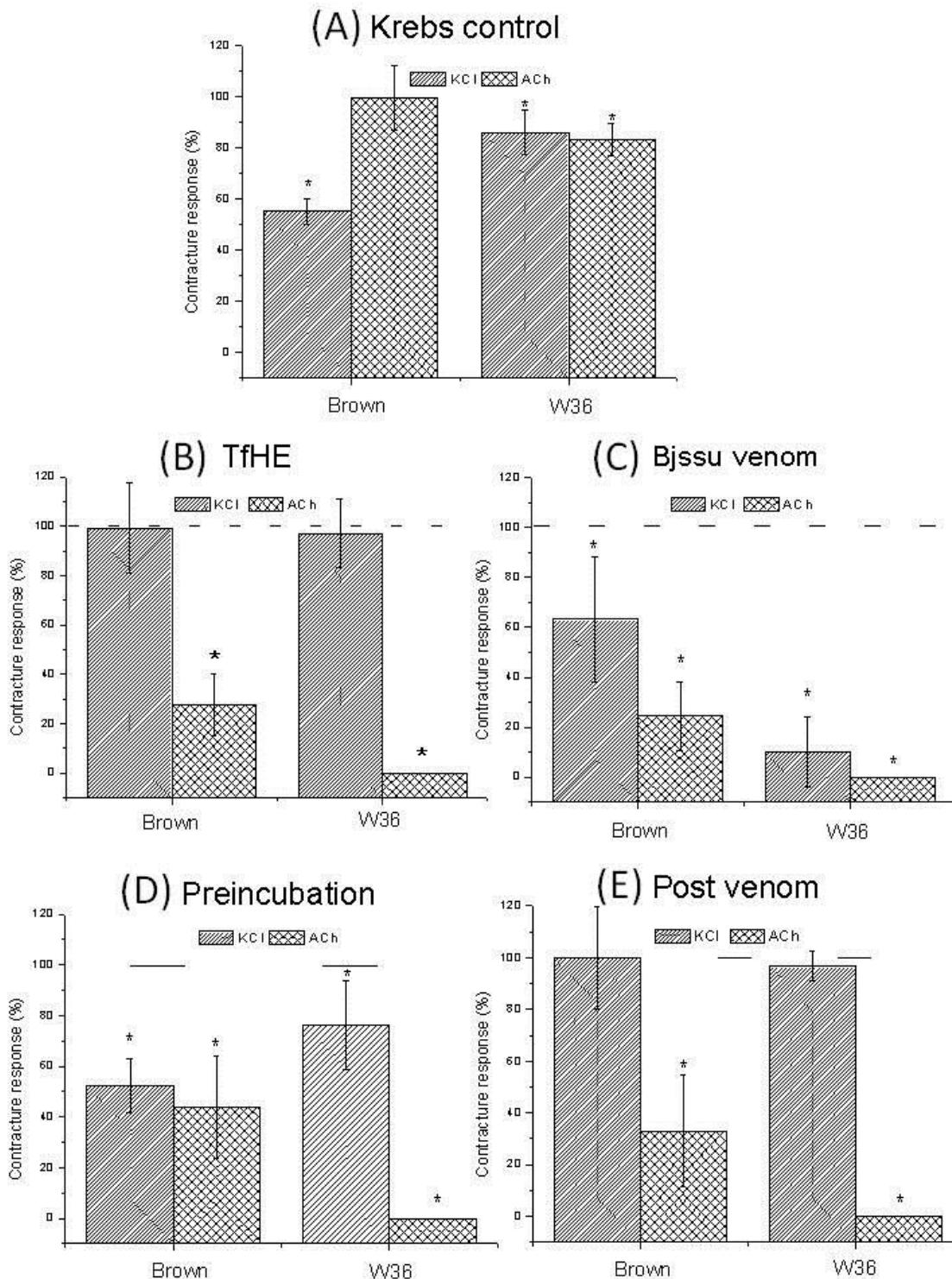


Figure 5. Contracture responses to KCl and ACh. Preparations from HY-line brown male chicks showed a sensitive response to KCl as seen in Krebs controls (A). On the other hand *Terminalia fagifolia* hydroacoholic extract (TfHE, B) affects the contracture response to ACh and meliorates the response to KCl. *Bothrops jararacussu* venom (Bjssu, C) affects both, KCl and ACh, with no significantly difference from preincubation model (D). Post venom model (E) increased the contracture response to KCl. The line at 100% represents KCl and ACh values prior to the treatments. Each result is the mean \pm SEM of the number of experiments indicated in the text. * $p<0.05$ compared to 100%, but not when compared to values of Krebs control.

2.3. Inhibition of *Bjssu* venom myotoxicity

2.3.1. Histological analysis (light microscopy)

Quantitative analysis performed in three preparations from each experimental set resulted in MI (myotoxicity index, in %): Tyrode control (15.9 ± 0.8); TfHE (15.5 ± 1.7); venom (38 ± 6.5); preincubation (12.7 ± 1.2); and post venom (24 ± 1.3). All treatments were significantly different from venom alone ($p < 0.05$). Only post venom assays were statistically different from TfHE and Tyrode ($p < 0.05$). Preincubation and post venom were statistically different one each other ($p < 0.05$).

2.3.2. CK activity

The final CK (U/L) values of samples collected at the end of experiments (120 min) from the bath containing BC preparations (from HY-line brown and W36) are shown in Figure 6. All experiments were performed in triplicate and each protocol had $n=4$. There was statistically difference in all protocols between B and A, except in post venom treatment.

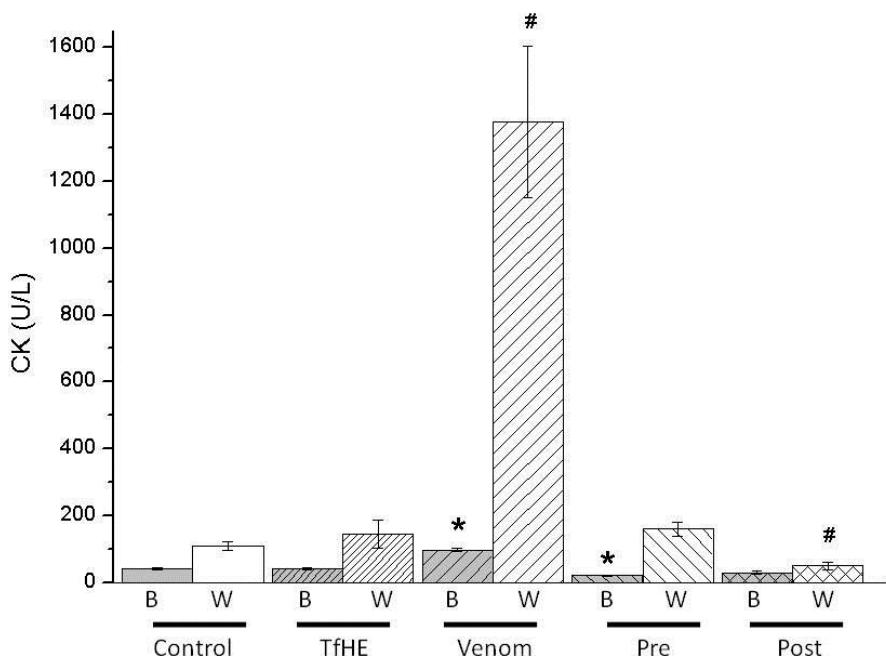


Figure 6. Creatine kinase (CK) activity measures at the end of each experimental protocol from HY-line brown (B) and white (W). Each result is the mean \pm SEM ($n=4$, each protocol). From this biochemical parameter both treatments using *T. fagifolia* hydroalcoholic extract (TfHE) against the myotoxicity of *B. jararacussu* (Bjssu) venom, in the preincubation and post venom models, were efficacious. * $p < 0.05$ compared to brown control. # $p < 0.05$ compared to white control.

3. Discussion

In this study we used a validated myographic technique, mammalian/avian preparations, biochemical/histological analyses and a standardized crude *B. jararacussu* venom for testing the ability of *T. fagifolia* hydroalcoholic extract against the toxic effects of the venom, which was chosen by inducing either an irreversible *in vitro* neuromuscular blockade [7] as also a local myotoxicity similar to those of other *Bothrops* venoms.

Ethnopharmacobotanical data of *T. fagifolia* revealed its tincture use as anti-inflammatory in the folk medicine by "Mumbuca" community (in Parque Estadual do Jalapão, Tocantins state, Brazil [21]. Plants from Brazilian cerrado (a biodiverse woodland/grassland, 20% of Brazil) need be rapidly studied, catalogued, and mainly preserved, since this biome is disappearing faster than the Amazon, due destination to cattle grazing, soy production, and agrofuels (sugar cane expansion for biodiesel leading to deforestation) [22], enough reasons to confirm medicinal properties of *T. fagifolia*.

The analysis of miographic registers in PND, indirectly stimulated, showed that TfHE protects in both – preincubation and post venom – models. This mammalian preparation shows a major sensitivity to crude venom than avian, which can be explained by evolutionary and eating habits, as simple as, rodents are more easy preys than avian. It was well related by Matsuda et al. [23] that rodents that avoid avian predators by foraging close to bushes increase their susceptibility to snakes [24].

For promoting certain blockade in avian, under indirect stimuli, it was necessary to use 2.5 X higher than venom amount, also corroborated by elsewhere [25,26]. The advantages of avian preparation as chick biventer cervicis are two: it contracts in response to nerve stimulation (intrinsic receptors) as PND does, and additionally, it contracts in response to exogenous acetylcholine (and other agonists) addition, in absence of electrical stimulation (extrinsic receptors) [27], which PND does not.

The contracture response in BC occurs since the muscle is composed of focally-innervated and diffusely-innervated muscle fibers [28]. It is important to know that nerve stimulation lead to both types of muscle fibers to contract, while exogenous acetylcholine causes contraction of only the diffusely-innervated muscle fiber [29]. It is believed that intrinsic receptors are less easily accessible than the extrinsic ones, due to a diffusion barrier in the narrow synaptic cleft.

Differences can also occur between species, as showed in this work with Hy Line avian. Recently, Kim et al. [30] determined the production characteristics and resultant eggshell color of laying hens hatched from different colored eggs, in which the authors state "While the actual color of the eggshell is a genetic factor, it is suggested that eggshell discoloration is also genetically linked. Punnett and Bailey [31] concluded that brown egg shell color is due to a dominant gene that is epistatic to the recessive white shell gene (o+). The presence of various shades indicates incompletely dominant genes that add brown pigment to the egg shell [32]".

Analysing the data of BC preparations under indirect stimuli, either brown or W36 hindered the neurotoxic blockade-induced by venom, in both – preincubation and post venom - models. It is clear that W36 is more sensitive than brown variety showed by intense facilitatory effect, as a result of intrinsic nicotinic receptors recruitment plus the action of TfHE one sarcolemmal membrane increasing its response [28,29]. We recently showed that facilitatory plants help against the neuromuscular damage caused by aggressive agents such as snake venoms [12, 33-36], increasing the safety margin of the neuromuscular junction.

When the contractile response experiments were analysed we showed two facilitation patterns of TfHE alone: a rapid followed by decline (brown) and a late but maintained response (W36). TfHE also inhibits ACh receptors since exogenous ACh addition affects both varieties (brown and W36). Extrinsic nicotinic receptors are affected according to Chang and Tang [27]. This is an evidence for the post synaptic action of this plant, also corroborated by exogenous KCl addition. For the first time post venom assays had a better performance than preincubation. We postulate that in preincubation, the TfHE constituents interact with the venom constituents, only a little TfHE amount is free for acting on sarcolemmal membrane. In post venom assays even considering that the venom can act on membranes, the massive TfHE addition is able to clean (by the saponin action) and remove the impregnate venom from membranes.

In function of the high foam formation when TfHE is added into the aerated bath, characterizing the presence of saponins, the foam index (FI) was calculated and it was found a value of 1333.33. Saponins occur constitutively in a great many plant species, and also confirmed be present in leaves of *T. fagifolia*. Our attempts in recognize other phytochemicals in TfHE (from stem barks and basts) failed

either via thin layer chromatography or immediate qualitative tests (methodologies not include in Material and Methods section).

TfHE also showed be able to counteract the myonecrosis-induced by the crude venom, which in turn causes edema, intense myonecrosis characterized by atrophy of the muscle fibers, hyaline aspect, sarcolemmal disruption and lysis of the myofibrils, as seen after quantitative analysis according to Ferraz et al. [37]. Myonecrosis also causes the efflux of intracellular molecules such as creatine kinase (CK), present in skeletal muscle, causing sarcomere contraction and mitochondria poisoning [38]. It has been used as a marker of cell damage-induced by snake venoms. Again, W36 showed be more sensitive to venom than brown. On the other hand, TfHE protected against the myotoxic action of crude venom either in preincubation or post venom model.

In this study, we established an explanation for protecting role of *T. fagifolia* based on the saponins presence in this extract, since it is well known that saponins are responsible by a large number of the biological effects [39]. Related to our results, TfHE increased the contracture response to exogenous KCl addition, which can be related to an increase in membrane fluidity, resulting from an interaction with membrane cholesterol and displacing it from the immediate environment of ATPases [40]. Besides, the ability of saponins to block membrane ion channels on neurons [41] can be a model by which TfHE affects the contracture response to exogenous ACh.

Proteins of membranes (ion channels, transporters, and receptors) are thought to be restricted selectively in cholesterol-rich domain (acetylcholine receptor) or in cholesterol-poor domain (the sarcoplasmic Ca^{2+} ATPase) [42] both of them can give support to explain the facilitatory effect of TfHE alone or in preincubation or post venom models, in indirectly stimulation of avian preparations..

4. Conclusions

The hydroalcoholic extract of *T. fagifolia* from stem barks and basts showed be an inhibitory – *in vitro* antineurotoxic and antimyotoxic – of *B. jararacussu* venom either in preincubation as in post venom models, in both studied preparations. The avian preparation gave evidences to point TfHE as a post synaptic agent, by its action on extrinsic nicotinic receptors and also sarcolemmal membranes, preserving totally intrinsic nicotinic receptors, which facilitation (indirect stimuli) can be associated to an action on reticulum sarcoplasmic receptor.

5. Materials and Methods

5.1. Plant material collection

Stem barks and basts of *T. fagifolia* were collected in June of the 2011, in Porto Nacional city ($S10^{\circ}44'10.2''$; $W 048^{\circ}21'49.7''$), at Tocantins state (TO), Brazil. The ethnobotanical study was carried out in the *Quilombola Mumbuca* Community of Mateiros city - TO, Brazil, which comprises the Jalapão region. The plant exsiccate was deposited in the Tocantins Federal University (UFT) Herbarium in Porto Nacional - TO, Brazil, voucher specimen #4208, according to the *International Code of Botanical Nomenclature* (ICBN).

5.1.1. Preparation of extract

The collected sample was dried during 7 days at ambient temperature (protected from humidity) and after stored in stove at 40°C until reaching 20% of humidity. Then it was powdered, ground in a mill, and macerated (513 g during 3 days) in 3 L of 70% ethanol. The suspension was percolated (protected from light) at 20 drops/min, resulting in a 10% (m/v) hydroalcoholic extract [43]. *T. fagifolia* was concentrated under reduced pressure and lyophilized, providing 99 g (approximately 19.3% efficiency). It was stored at room temperature, protected from light and humidity, until the assays.

5.2. Pharmacognostical study

5.2.1. Saponin detection

In a test tube, 100 mg of *T. fagifolia* hydroalcoholic extract (TfHE) was added to 5 mL of purified water and strongly shaken during 15 s. After, the tube was maintained in resting for 15 min, and then the results were registered. The test was considered positive when persistent foam was formed on the liquid surface [44].

5.2.2. Foam index (FI) determination

A TfHE solution (0.1g/100 mL of purified water) was distributed in 10 test tubes, in 1, 2, 3 mL and successively to a 10 mL volume. Each tube was adjusted to a final volume of 10 mL with purified water, and shacked for 15 s (twice), during 1 min. After 15 min of resting, the foam height was measured. The tube with remaining dense foam of 1 cm height was registered. The foam index (FI) was calculated as FI=1000/A, being "A" the volume (in mL) of TfHE in the higher foam height registered [45].

5.3. Pharmacological assays (*neuromuscular blockade study*)

5.3.1. Crude snake venom

Bjssu venom was collected from two adults specimens kept in Nature Studies Centre's Serpentary. The venom was lyophilized and certified by Professor Dr. José Carlos Cogo, from University of Vale do Paraíba, Univap, SP, Brazil.

5.3.2. Animals

Male Swiss white mice (26-32 g) were supplied by Anilab (Animais de Laboratório, Paulínia, SP, Brazil) and HY-line brown or HY-line W36 (white) male chicks (4-8 days old) were supplied by Avicultura Santa Bárbara (Sorocaba, SP, Brazil). The animals were housed separately (5 per cage) according to each species at 25 ± 3 °C on a 12 h light/dark cycle and they had water *ad libitum* and access to appropriate food according to each species. This project (protocol nº 70/2012) was approved by the institutional Committee for Ethics in Research of Universidade Federal de São Carlos (UFSCAR), and the experiments were carried out according to the guidelines established by the Brazilian Society for Laboratory Animal Science (SBCAL).

5.3.3. Mouse phrenic nerve-diaphragm muscle (PND) preparation

The phrenic nerve-diaphragm [46] was obtained from mice anesthetized with halothane (Cristália, Brazil) and killed by exsanguination. The diaphragm was removed and mounted under a tension of 5g/cm in a 5 mL organ bath containing aerated Tyrode solution (control) with the following composition (mM): NaCl 137; KCl 2.7; CaCl₂ 1.8; MgCl₂ 0.49; NaH₂PO₄ 0.42; NaHCO₃ 11.9; and glucose 11.1. After equilibration with 95% O₂/5% CO₂ (v/v), the pH of this solution was 7.0. The preparations were indirectly stimulated with supramaximal stimuli (4X threshold, 0.06 Hz, 0.2 ms) delivered from a stimulator (model ESF-15D, Ribeirão Preto, Brazil) to the nerve by bipolar electrodes. Isometric twitch tension was recorded with a force displacement transducer (cat. 7003, Ugo Basile, Italy) coupled to a 2-Channel Recorder Gemini physiograph device (cat. 7070, Ugo Basile) via a Basic Preamplifier (cat. 7080, Ugo Basile). The PND myographic recording was performed according to Farrapo et al. [47]. PND was allowed to stabilize for at least 20 min before the following experiments. A concentration-response curve of TfHE was carried out considering the following concentrations: 100 µg/mL (n=4); 200 µg/mL (n=3); 500 µg/mL (n=4); and 2000 µg/mL (n=7). All concentrations were first solubilized with 30 µL of ethanol 70% (Cinética Solução Química, Londrina, PR) – that causes no change in the basal response of preparation [33], before addition into the bath. The response of Tyrode control solution was also obtained (n=4). The 100 µg/mL TfHE concentration (2.5 X venom concentration) was further assayed with 40 µg/mL Bjssu venom (n=10). Two models were applied: 1) Preincubation: the mixture of venom + TfHE was preincubated during 30 min before the addition into the organ bath (n=4) [12]; 2) Post venom: TfHE was added after 10 min of venom action on neuromuscular preparation (n=6) [48].

5.3.3.1. Quantitative histological study

The preparations from the pre-incubation and post venom assays were analyzed by a quantitative morphometric method and compared to Tyrode control, TfHE and Bjssu venom. At the end of each experiment (after 120 min), three preparations of each group were fixed by a formalin 10% solution, and processed by routine morphological techniques. Cross-sections (5 μm thick) of diaphragm muscle were stained with 0.5% (w/v) hematoxylin-eosin, for microscopy examination. Tissue damage (edema, intense myonecrosis characterized by atrophy of the muscle fibers, hyaline aspect, sarcolemmal disruption and lysis of the myofibrils) was expressed as a myotoxicity index (MI), *i.e.*, the percentage of damaged muscle cells number divided by the total number of cells in three non-overlapping, non-adjacent areas of each preparation [37].

5.3.4. Chick biventer cervicis (BC) preparation

Chicks were killed by halothane inhalation, and biventer cervicis muscles were removed according to Ginsborg and Warriner [49] and described by Werner et al. [11]. Briefly, the preparation was mounted under a tension of 1 g per 0.5 cm in a 5 mL organ bath (Panlab® Four Chamber Organ Bath) maintained at 37°, aerated (95% O₂/5% CO₂), and kept in a Krebs solution with the following composition (mM, pH 7.5): NaCl, 118.1; KCl, 4.8; CaCl₂, 2.5; MgSO₄, 1.2; NaHCO₃, 25; and glucose, 11.1. A bipolar platinum ring electrode was inserted around the tendon within which the nerve trunk supplying the muscle runs. Field stimulation was done using a Pulse Generator & Mainframe for up to 4 units (LE12406TC, Panlab®) stimulator (0.1 Hz, 0.2 ms, 5 - 12 V). Muscle contractions delivered from “intrinsic” receptors, which respond to the neurotransmitter liberated from the nerve terminal, and contractures (depolarizing activity) delivered from “extrinsic” receptors, which respond to acetylcholine added exogenously [27,49] were recorded isometrically via a force-displacement transducer (MLT0201, ADInstruments®) coupled to a group of 4 software-controlled, DC bridge transducer amplifiers (FE224, ADInstruments®). The data acquisition was made using a PowerLab 4/35 system including LabChart and LabChart Pro Modules software (PL3504/P, ADInstruments®) connected to a Power Unit (LE124060M, ADInstruments®). The BC preparations were stabilized for at least 20 min before addition of 110 μM acetylcholine (ACh) for 60 seconds (s) or 20 mM potassium chloride (KCl) for 180s. Contractures to exogenous ACh or KCl were recorded in the absence of field stimulation prior to or after the end of the experiment as a test for evaluating pre- or post-synaptic action and, at the same time, the integrity of the sarcolemma. This preparation enables prejunctional effects to be distinguished from postjunctional effects [50]. It is known that Bjssu venom is lesser sensitive in BC preparation than PND [25,26], reason by which we used 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ in this set of experiments. Proportionally to the venom increase, we did also augment the concentration of TfHE (500 $\mu\text{g}/\text{mL}$), the same proportion used in PND preparation. TfHE was solubilized in a total of 15 μL (or 3 $\mu\text{L}/\text{mL}$) ethanol 70% (EtOH, Cinética Soluções Químicas, Londrina, PR) in all protocols. Two varieties of HY Line chicks were assayed: a) brown: ethanol (n=3), TfHE alone (n=9), Krebs control (n=4), venom (n=4), preincubation (n=6) or post venom addition (n=6); b) W36: ethanol (n=3), TfHE alone (n=4), Krebs control (n=4), venom (n=3), preincubation (n=3) or post venom addition (n=3).

5.3.4. 1. Creatine kinase (CK) determination

Since phrenic nerve-hemidiaphragm preparations have a spontaneous release of CK resulting in elevated basal levels, this activity was measured only in BC preparations [51]. For the quantification of CK activity, samples (100 μL) of the BC bathing solution were withdrawn from the organ bath at 0 (control, after exogenous KCl and ACh addition, but before any treatment) and 120 min after each treatment. The withdrawn volume was replaced with an equal volume of Krebs solution. The samples collected were stored for 2 h at 4°C until CK activity (expressed in units/L) was measured at 340 nm (Shimadzu®, model multispec-1501), 37°C, using a commercial kit (CK-NAC; REF K010-1 Bioclin®, Belo Horizonte, MG, Brazil).

5.4. Statistical analysis

Each experimental protocol from pharmacological assays was repeated at least three times and the results are shown as the mean \pm SEM. The number of experiments (n) is indicated in the legend of the figure. All results (pharmacological assays, histological analysis, and CK determination) were used for statistical comparison of the data using Student's *t*-test and the confidence level was set as 5% (alpha=0.05).

Acknowledgments: The authors thank CEP/UFSCAR for ethical assistance; Prosup/Capes and Probic/Uniso for fellowships; Isadora Caruso Fontana Oliveira by designing the Graphical Abstract and The State of São Paulo Research Foundation (FAPESP) for financial support in all permanent equipments (2004/09705-8; 07/53883-6; 08/52643-4; 12/08271-0). A value of 420 CHF funds for covering the costs to publish in open access is available as institutional support to authors from Uniso.

Author Contributions: Contributions from authors: N.T.; M.O.T. and M.N.S. performed the experiments; J.A.F. guided the histological analysis; M.G.S. guided the pharmacognostical study; M.G. dos S. prepared the TfHE; J.C.C. certificated the venom; R.S.F. contributed with protocol ideas; K.C-M. contributed in the paper criticism and writing, and Y.O-F. conceived and designed the experiments and wrote the paper.

Conflicts of Interest: "The authors declare no conflict of interest." "The founding sponsors had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript, and in the decision to publish the results".

Abbreviations

The following abbreviations are used in this manuscript:

ACh: acetylcholine

BC: biventer cervicis

B. jararacussu: *Bothrops jararacussu*

Bjssu: *Bothrops jararacussu*

CK: creatine kinase

KCl: potassium chloride

PND: phrenic nerve-diaphragm

TfHE: *Terminalia fagifolia* hidroalcoholic extract

T. fagifolia: *Terminalia fagifolia*

References

- WHO. Rabies and envenomings: a neglected public health issue: report of a Consultative Meeting. Geneva : World Health Organization, 2007. Available online: URL <http://www.who.int/bloodproducts/animal sera/Rabies.pdf> (acessed on 23 February 2016).
- Rocha e Silva, M.; Beraldo, W.T.; Rosenfeld, G. Bradykinin, a hypotensive and smooth muscle stimulating factor released from plasma globulin by snake venoms and by trypsin. *Am. J. Physiol.* **1949**, *156*, 261–273.
- Chalhoub, M.; Prestes, N.C.; Lopes, M.D.; Rocha, N.S.; Thomazini-Santos, I.A.; Mendes-Giannini, M.J. The use of snake venom derived fibrin glue in hysterorrhaphy of ovine caesarean surgery. *J. Venom. Anim. Toxins* **2000**, *6*, 220-237.
- Vyas, V.K.; Brahmbhatt, K.; Bhatt, H.; Parmar, U. Therapeutic potential of snake venom in cancer therapy: current perspectives. *Asian Pacific J. Trop. Biomed.* **2013**, *3*, 156–162.
- Vu, T.T.; Stafford, A.R.; Leslie, B.A.; Kim, P.Y.; Fredenburgh, J.C.; Weitz, J.I. Batroxobin binds fibrin with higher affinity and promotes clot expansion to a greater extent than thrombin. *J. Biol. Chem.* **2013**, *288*, 16862-16871.
- da Silva, S.L.; Rowan, E.G.; Albericio, F.; Stábeli, R.G.; Calderon, L.A.; Soares, A.M. Animal toxins and their advantages in biotechnology and pharmacology. *BioMed Res. Intl.* **2014**, *2014*, Article ID 951561, 2 pages. <http://dx.doi.org/10.1155/2014/951561>
- Rodrigues-Simioni, L.; Borgese, N.; Ceccarelli, B. The effects of *Bothrops jararacussu* venom and its components on frog nerve-muscle preparation. *Neuroscience* **1983**, *10*, 475-489.

8. Vladimir-Knežević, S.; Blažeković, B.; Kindl, M.; Vladić, J.; Lower-Nedza, A.D.; Brantner, A.H. Acetylcholinesterase inhibitory, antioxidant and phytochemical properties of selected medicinal plants of the Lamiaceae Family. *Molecules* **2014**, *19*, 767-782.
9. Basu, S.; Chaudhuri, T.; Chauhan, S.P.; Das Gupta, A.K.; Chaudhury, L.; Vedasiromoni, J.R. The theaflavin fraction is responsible for the facilitatory effect of black tea at the skeletal myoneural junction. *Life Sci.* **2005**, *76*, 3081-3088.
10. Oshima-Franco, Y.; Rosa, L.J.R.; Silva, G.A.A.; Amaral Filho, J.; Silva, M.G.; Lopes, P.S.; Cogo, J.C.; Cintra, A.C.O.; da Cruz-Höfling, M.A. Antibothropic action of *Camellia sinensis* extract against the neuromuscular blockade by *Bothrops jararacussu* snake venom and its mais toxin, *Bothropstoxin-I*. In *Pharmacology*. Edited Gallelli, L. Ed.; Intech : Croatia, Croatia, **2012**; pp. 469-489.
11. Werner, A.C.; Ferraz, M.C.; Yoshida, E.H.; Tribuiani, N.; Gautuz, J.A.A.; Santana, M.N.; Dezzotti, B.A.; de Miranda, V.G.; Foramiglio, A.L.; Rostelato-Ferreira, S.; Tavares, R.V.S.; Hyslop, S.; Oshima-Franco, Y. The facilitatory effect of *Casearia sylvestris* Sw. (guatonga) fractions on the contractile activity of mammalian and avian neuromuscular apparatus. *Curr. Pharm. Biotechnol.* **2015**, *16*, 468-481.
12. Ferraz, M.C.; Parrilha, L.A.C.; Moraes, M.S.D.; Amaral Filho, J.; Cogo, J.C.; dos Santos, M.G.; Franco, L.M.; Groppo, F.C.; Puebla, P.; San Feliciano, A.; Oshima-Franco, Y. The effect of lupane triterpenoids (*Dipteryx alata* Vogel) in the *in vitro* neuromuscular blockade and myotoxicity of two snake venoms. *Curr. Org. Chem.* **2012**, *16*, 2717-2723.
13. Barbosa, A.M.; Villaverde, A.B.; Guimarães Souza, L.; Ribeiro, W.; Cogo, J.C.; Zamunér, S.R. Effect of low-level laser therapy in the inflammatory response induced by *Bothrops jararacussu* venom. *Toxicon* **2008**, *1*, 1236-1244.
14. Tribuiani, N.; da Silva, A.M.; Ferraz, M.C.; Silva, M.G.; Bentes, A.P.; Graziano, T.S.; dos Santos, M.G.; Cogo, J.C.; Varanda, E.A.; Groppo, F.C.; Cogo, K.; Oshima-Franco, Y. *Vellozia flavicans* Mart. ex Schult. hydroalcoholic extract inhibits the neuromuscular blockade induced by *Bothrops jararacussu* venom. *BMC Complement. Altern. Med.* **2014**, *14*, 48. doi: 10.1186/1472-6882-14-48.
15. de Campos, E.P.; Trombini, L.N.; Rodrigues, R.; Portella, D.L.; Werner, A.C.; Ferraz, M.C.; de Oliveira, R.V.; Cogo, J.C.; Oshima-Franco, Y.; Aranha, N.; Gerenucci, M. Healing activity of *Casearia sylvestris* Sw. in second-degree scald burns in rodents. *BMC Res. Notes* **2015**, *8*, 269. doi: 10.1186/s13104-015-1251-4.
16. Ayres, M.C.C.; Chaves, M.H. Constituintes químicos e atividade antioxidante de extratos das folhas de *Terminalia fagifolia* Mart. et Zucc. *Quím. Nova* **2009**, *32*, 1509-1512.
17. Freire, F.M.T.; Lopes, A.S.; Meneses, R.C.S. Plantas Medicinais do Trópico Semi-Árido do Piauí. Aspectos Botânicos. In *Produção Científica do Programa de Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Nordeste na UFPI*. Fundação Universidade Federal do Piauí/CNPq/BID. Teresina-PI, Brasil, 1992.
18. Garcez, F.R.; Garcez, W.S.; Santana, A.L.B.D.; Alves, M.M.; Scaliante, A.M.; Matos, M.D.F.C. Bioactive flavonoids and triterpenes from *Terminalia fagifolia* (Combretaceae). *J. Braz. Chem. Soc.* **2006**, *17*, 1223-1228.
19. Nunes, P.H.; Martins, M. do C.; Oliveira, R. de C.; Chaves, M.H.; Sousa, E.A.; Leite, J.R.; Véras, L.M.; Almeida, F.R. Gastric antiulcerogenic and hypokinetic activities of *Terminalia fagifolia* Mart. & Zucc. (Combretaceae). *Biomed. Res. Intl.* **2014**, *2014*, article ID261745, 12 pages. <http://dx.doi.org/10.1155/2014/261745>
20. de Araujo, A.R.; Quelemes, P.V.; Perfeito, M.L.; de Lima, L.I.; Sá, M.C.; Nunes, P.H.; Joanitti, G.A.; Eaton, P.; Soares, M.J.; de Almeida Leite, J.R. de S. Antibacterial, antibiofilm and cytotoxic activities of *Terminalia fagifolia* Mart. extract and fractions. *Ann. Clin. Microbiol. Antimicrobiol.* **2015**, *14*, 25. doi: 10.1186/s12941-015-0084-2.
21. Coelho, F.B.R.; Dal Belo, C.A.; Lolis, S.F.; Santos, M.G. Levantamento etnofarmacológico realizado na comunidade Mumbuca localizada no Jalapão – TO. *Rev. Eletr. de Farmácia Supl.* **2005**, *2*, 52-55.
22. McMichael, P. The agrofuels project at large. *Crit. Sociol.* **2009**, *35*, 825-839.
23. Matsuda, H.; Hori, M.; Abrams, P.A. Effects of predator-specific defence on biodiversity and community complexity in two-trophic-level communities. *Evolution. Ecol.* **1996**, *10*, 13-28.
24. Kotler, B.P.; Brown, J.S.; Slotow, R.H.; Goodfriend, W.L.; Strauss, M. The influence of snakes on the foraging behavior of gerbils. *Oikos* **1993**, *67*, 309-316.
25. Zamunér, S.R.; da Cruz-Höfling, M.A.; Corrado, A.P.; Hyslop, S.; Rodrigues-Simioni, L. Comparison of the neurotoxic and myotoxic effects of Brazilian *Bothrops* venoms and their neutralization by commercial antivenom. *Toxicon* **2007**, *44*, 259-271.

26. Bueno, L.G.F.; Leite, G.B.; Cruz-Höfling, M.A.; Rodrigues-Simioni, L.; Oshima-Franco, Y. Effects of manganese (Mn^{2+}) on neurotoxic and myotoxic activities induced by *Crotalus durissus terrificus* and *Bothrops jararacussu* venoms in chick biventer cervicis preparations. *J. Venom. Anim. Toxins incl. Trop. Dis.* **2007**, *13*, 479–499.
27. Chang, C.C.; Tang, S.S. Differentiation between intrinsic and extrinsic acetylcholine receptors of the chick biventer cervicis muscle. *Naunyn. Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* **1974**, *282*, 379–388.
28. Ginsborg, B.L. Spontaneous activity in muscle fibres of the chick. *J. Physiol. (Lond.)* **1960**, *150*, 707–717.
29. Ginsborg, B.L. Some properties of avian skeletal muscle fibres with multiple neuromuscular junctions. *J. Physiol. (Lond.)* **1960**, *154*, 581–598.
30. Kim, E.J.; Purswell, J.L.; Evans, J.D.; Branton, S.L. Production characteristics of Hy-Line W36 laying hens hatched from white and tinted eggs. *Poult. Sci.* **2014**, *93*, 2123–2128.
31. Punnett, R.C.; Bailey, P.G. Genetic studies in poultry. II. Inheritance of egg colour and broodiness. *J. Genet.* **1920**, *10*, 277–292.
32. Wei, R.; Bitgood, J.J.; Dentine, M.R. Inheritance of tinted eggshell colors in white-shell stocks. *Poult. Sci.* **1992**, *71*, 406–418.
33. Collaço, R. de C.; Cogo, J.C.; Rodrigues-Simioni, L.; Rocha, T.; Oshima-Franco, Y.; Randazzo-Moura, P. Protection by *Mikania laevigata* (guaco) extract against the toxicity of *Philodryas olfersii* snake venom. *Toxicon* **2012**, *60*, 614–622.
34. Ferraz, M.C.; Oliveira, J.L.; Oliveira Junior, J.R. de, Cogo, J.C.; dos Santos, M.G.; Franco, L.M.; Puebla, P.; Ferraz, H.O.; Ferraz, H.G.; da Rocha, M.M.; Hyslop, S.; San Feliciano, A. The triterpenoid betulin protects against the neuromuscular effects of *Bothrops jararacussu* snake venom *in vivo*. *Evidence-Based Complement. Alt. Med.* **2015**, *2015*, Article ID 939523, 10 pages, 2015. doi:10.1155/2015/939523
35. Soares-Silva, J.O.; de Oliveira, J.L.; Cogo, J.C.; Tavares, R.V.S.; Oshima-Francom, Y. Pharmacological evaluation of hexane fraction of *Casearia gossypiosperma* Briquet: antivenom potentiality. *J. Life Sci.* **2014**, *8*, 306–315.
36. Oshima-Franco, Y.; Alves, C.M.; André Filho, N.; Gerenutti, M.; Cintra, A.C.O.; Leite, G.B.; Rodrigues-Simioni, L.; Silva, M.G.. Neutralization of the neuromuscular activity of *Bothropstoxin-I*, a myotoxin from *Bothrops jararacussu* snake venom, by a hydroalcoholic extract of *Casearia sylvestris* Sw. (guaçatonga). *J. Venom. Anim. Toxins Incl. Trop. Dis.* **2005**, *11*, 465–478.
37. Ferraz, M.C.; Yoshida, E.H.; Tavares, R.V.S.; Cogo, J.C.; Cintra, A.C.O.; Dal Belo, C.A.; Franco, L.M.; dos Santos, M.G.; Resende, F.A.; Varanda, E.A.; Hyslop, S.; Puebla, P.; San Feliciano, A.; Oshima-Franco, Y. An isoflavone from *Dipteryx alata* Vogel is active against the *in vitro* neuromuscular paralysis of *Bothrops jararacussu* snake venom and *Bothropstoxin I*, and prevents venom-induced myonecrosis. *Molecules* **2014**, *19*, 5790–5805.
38. Veronese, E.L.; Esmeraldino, L.E.; Trombone, A.P.; Santana, A.E.; Bechara, G.H.; Kettelhut, I.; Cintra, A.C.; Giglio, J.R.; Sampaio, S.V. 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* **2005**, *12*, 123–130.
39. Francis, G.; Kerem, Z.; Makkar, H.P.S.; Becker, K. The biological action of saponins in animal systems: a review. *Br. J. Nutr.* **2002**, *88*, 587–605.
40. Ma, L.Y.; Xiao, P.G. Effects of *Panax notoginseng* saponins on platelet aggregation in rats with middle cerebral artery occlusion or *in vitro* and on lipid fluidity of platelet membrane. *Phytother. Res.* **1998**, *12*, 138–140.
41. Kai, L.; Wang, Z.F.; Xiao, J.S. L-type calcium channel blockade mechanisms of panaxadiol saponins against anoxic damage of cerebral cortical neurons isolated from rats. *Acta Pharmacol. Sin.* **1998**, *19*, 455–458.
42. Nievas, F.G.A.; Barrantes, F.J.; Antollini, S.S. Conformation-sensitive steroid and fatty acid sites in the transmembrane domain of the nicotinic acetylcholine receptor. *Biochem.* **2007**, *46*, 3503–3512.
43. Portuguese Pharmacopoeia Committee. Portuguese Pharmacopoeia. Infarmed Editors, Lisboa, Portugal, **2002**.
44. Costa, A. *Experimental Pharmacognosy*. 3rd ed.; Fundação Caloustre Gulbenkian, Lisboa, Portugal, **1981**, *3*, p. 303–309.
45. Brazilian Pharmacopeia. 5th ed.; Brasília:Anvisa, **2010**, *1*, p. 546.

46. Bulbring, E. Observations on the isolated phrenic nerve diaphragm preparation of the rat. *Br. J. Pharmacol. Chemother.* **1946**, *1*, 38-61.
47. Farrapo, N.M.; Silva, G.A.A.; Costa, K.N.; Silva, M.G.; Cogo, J.C.; Dal-Belo, C.A.; Santos, M.G.; Groppo, F.C.; Oshima-Franco, Y. Inhibition of *Bothrops jararacussu* venom activities by *Plathymenia Reticulata* Benth extracts. *J. Venom Res.* **2011**, *2*, 52-58.
48. Camargo, T.M.; Nazato, V.S.; Silva, M.G.; Cogo, J.C.; Groppo, F.C.; Oshima-Franco, Y. *Bothrops jararacussu* venom-induced neuromuscular blockade inhibited by *Casearia gossypiosperma* Briquet hydroalcoholic extract. *J. Venom. Anim. Toxins incl. Trop. Dis.* **2010**, *16*, 432-441.
49. Ginsborg, B.L.; Warriner, J. The isolated chick biventer cervicis nerve-muscle preparation. *Br. J. Pharmacol. Chemother.* **1960**, *15*, 410-411.
50. Vatampour, H. Effects of black scorpion *Androctonus crasicuda* venom on striated muscle preparation *in vitro*. *Iran. J. Pharm. Res.* **2003**, *2*, 17-22.
51. Randazzo-Moura, P.; Leite, G.B.; Silva, G.H.; Paffaro Junior, V.A.; Cintra, A.C.O.; da Cruz-Höfling, M.A.; Rodrigues-Simioni, L.; Oshima-Franco, Y. A study of the myotoxicity of *Bothropstoxin-I* using manganese in mouse phrenic nerve-diaphragm and extensor digitorum longus preparations. *Braz. J. Morphol. Sci.* **2006**, *23*, 237-246.

© 2016 by the authors; licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons by Attribution (CC-BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

6. CONCLUSÃO

O EHTf, nas concentrações estudadas, protegeu contra a ação neurotóxica *in vitro* do veneno *B. jararacussu*, em modelos de pré incubação e pós veneno, em ambas as preparações estudadas (mamífero e ave).

O EHTf, nas concentrações estudadas, protegeu contra a ação miotóxica do veneno de *B. jararacussu*, confirmado pelo parâmetro bioquímico de atividade de creatioquinase (em preparações BC, em ambas as linhagens) e pelo parâmetro histológico (em preparações NFD).

Em preparações de ave, evidências apontam que o EHTf pode agir pós sinapticamente, sobre os receptores nicotínicos extrínsecos e também sobre o sarcolema, preservando totalmente os receptores nicotínicos intrínsecos. A facilitação (estímulos indiretos) também pode estar associada a uma ação no receptor do retículo sarcoplasmático.

A análise da resposta contraturante frente à adição exógena de KCl indicou que houve proteção do sarcolema em preparações de ambas as linhagens quando expostas ao EHTf, nas concentrações estudadas.

As saponinas presentes no EHTf podem ter importante papel na proteção exibida contra os efeitos tóxicos do veneno de *B. jararacussu*.

REFERÊNCIAS

AMARAL, C. F. S. et al. Insuficiência renal aguda secundária a acidentes ofídicos botrópico e crotálico. Análise de 63 casos. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 28, n. 4, p. 220-7, 1986.

ARAÚJO, F. et al. Epidemiologia dos acidentes por animais peçonhentos. **Animais peçonhentos no Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos acidentes**, p. 6-12, 2003.

AYRES, M.C.C.; CHAVES, M.H. Constituintes químicos e atividade antioxidant de extratos das folhas de *Terminalia fagifolia* Mart. et Zucc. **Química Nova**, v. 32, n. 6, p. 1509-1512, 2009.

AZEVEDO-MARQUES, M. M.; CUPO, P.; HERING, S. E. Acidentes por animais peçonhentos: serpentes peçonhentas. **Medicina (Ribeirão Preto. Online)**, v. 36, n. 2/4, p. 480-489, 2003.

BELLINI, N. Veneno valioso. **SESC SP** 2004. Disponível em <http://www.sescsp.org.br/online/artigo/2860_VENENO+VALIOSO#/tagcloud=list>. Acessado em 27/11/2015

BORGES, M. H. et al. Effects of aqueous extract of *Casearia sylvestris* (Flacourtiaceae) on actions of snake and bee venoms and on activity of phospholipases A 2. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology**, v. 127, n. 1, p. 21-30, 2000.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Guia de vigilância epidemiológica / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. – 6. ed. – Brasília : Ministério da Saúde, 2005.

BRASIL. Ministério da Saúde. Manual de diagnóstico e tratamento de acidentes por animais peçonhentos. Fundação Nacional de Saúde, 2001.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Guia de Vigilância em Saúde / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. – Brasília : Ministério da Saúde, 2014. 812 p. Disponível em <http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/guia_vigilancia_saude_unificado.pdf> Acessado em:18/11/15.

BRASIL, Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN)/ Vigilância Sanitária/Ministério da Saúde, 2011. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/tabela_casos_por_mes_2010.pdf>. Acessado em: 27/11/2015.

BRUNDA, G.; SASHIDHAR, R. B. Epidemiological profile of snake- bite cases from Andhra Pradesh using immunoanalytical approach. **The Indian Journal of Medical Research**, v. 125, n. 5, p. 661-8, 2007.

BÜLBRING, E. Observations on the isolated phrenic nerve diaphragm preparation of the rat. **British Journal of Pharmacology and Chemotherapy**, v. 1, p. 38-61, 1946.

CAMARGO, T. M. et al. *Bothrops jararacussu* venom- induced neuromuscular blockade inhibited by Casearia gossypiosperma Briquet hydroalcoholic extract. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v. 16, n. 3, p. 432-441, 2010.

CANIGUERAL, S.; DELLACASSA, E.; BANDONI, A. L. Plantas Medicinales y Fitoterapia: ¿ indicadores de dependencia o factores de desarrollo? **Acta Farmacéutica Bonaerense**, v. 22, n. 3, p. 265-279, 2003.

CARDOSO, J.; WEN, F. **Introdução ao ofidismo**. Araújo, F. A. A.; Santalúcia, M.; Cabral, R. F., editores, v. 4, 2003.

CARDOSO, J. L. C. et al. Venomous animals in Brazil: biology, clinic and therapeutics of envenomations Animais peçonhentos no Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos acidentes. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 45, n. 6, p. 338-338, 2003.

CHIPPAUX JP. Snake-bites: appraisal of the global situation. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 76, n. 5, p. 515-24, 1998.

CHILPA, R. R.; ESTRADA, M. J. Quimica de las plantas alexiteras. **Interciencia (Caracas)**, v. 20, p. 257-264, 1995.

CINTRA-FRANCISCHINELLI, M. et al. Antibothropic action of *Casearia sylvestris* Sw.(Flacourtiaceae) extracts. **Phytotherapy Research**, v. 22, n. 6, p. 784-790, 2008.

COLLAÇO, R. C. C. et al. Protection by *Mikania laevigata* (guaco) extract against the toxicity of *Philodryas offersii* snake venom. **Toxicon**, v. 60, n. 4, p. 614-622, 2012. ISSN 0041-0101.

CUPO, P. et al. Reações de hipersensibilidade imediatas após uso intravenoso de soros antivenenos: valor prognóstico dos testes de sensibilidade intradérmicos Immediate hypersensitivity reactions following intravenous use of antivenom sera: predictive value of hypersensitivity skin test. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 33, n. 2, p. 115-122, 1991.

DE ARAUJO, A. R. et al. Antibacterial, antibiofilm and cytotoxic activities of *Terminalia fagifolia* Mart. extract and fractions. **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials**, p.14 - 25, 2015,. doi: 10.1186/s12941-015-0084-2.

DE SOUZA, C. D.; FELFILI, J. M. Uso de plantas medicinais na região de Alto Paraíso de Goiás, GO, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, v. 20, n. 1, p. 135-142, 2006.

DI STASI, L. C. **Plantas medicinais: arte e ciência: um guia de estudo interdisciplinar.** Ed. da Universidade Estadual Paulista, 1996.

FARMACOPEIA BRASILEIRA, Brasil / Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília: Anvisa v. 1, ed 5, p. 201, 2010.

FARMACOPÉIA PORTUGUESA. Editora Infarmed, Lisboa, Portugal, 2002

FARRAPO, N. M. et al. Inhibition of *Bothrops jararacussu* venom activities by *Plathymenia Reticulata* Benth extracts. **Journal of Venom Research**, v. 2, p. 52-58, 2011.

FERRAZ, M. C. et al. An isoflavone from *Dipteryx alata* Vogel is active against the in vitro neuromuscular paralysis of *Bothrops jararacussu* snake venom and *Bothropstoxin I*, and prevents venom-induced myonecrosis. **Molecules**, v.19, p. 5790-5805, 2014.

FREIRE, F. M. T.; LOPES, A. S.; MENESES, R. C. S. Plantas Medicinais do Trópico Semi-Árido do Piauí. Aspectos Botânicos. In **Produção Científica do Programa de Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Nordeste na UFPI**. Fundação Universidade Federal do Piauí/CNPq/BID. Teresina-PI, Brasil, 1992.

GARCEZ, F. R. et al. Bioactive flavonoids and triterpenes from *Terminalia fagifolia* (Combretaceae). **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 17, n. 7, p. 1223-1228, 2006.

GINSBORG, B. L.; WARRINGER, J. The isolated chick biventer cervicis nerve- muscle preparation. **British Journal of Pharmacology and Chemotherapy**, v. 15, p. 410, 1960.

HODGSON, W. C.; WICKRAMARATNA, J. C. In vitro neuromuscular activity of snake venoms. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology, Oxford, UK**, v. 29, n. 9, p. 807-814, 2002. ISSN 0305-1870.

JORGE, M. T.; RIBEIRO, L. A. Acidentes por serpentes peçonhentas do Brasil. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 36, n. 2, p. 66-77, 1990. ISSN 0102-843X.

LOMONTE, B.; LEÓN, G.; HANSON, L. A. Similar effectiveness of fab and f(ab') 2 antivenoms in the neutralization of hemorrhagic activity of *Vipera berus* snake venom in mice. **Toxicon**, v. 34, n. 10, p. 1197-1202, 1996. ISSN 0041-0101.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. Nova Odessa: Editora Plantarum 352p.-col. illus. Por Geog, v. 4, 1992.

MAIORANO, V. A. et al. Antiophidian properties of the aqueous extract of *Mikania glomerata*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 102, n. 3, p. 364-370, 2005.

MASOKO, P.; PICARD, J.; ELOFF, J. N. The antifungal activity of twenty-four southern African Combretum species (Combretaceae). **South African Journal of Botany**, v. 73, n. 2, p. 173-183, 4, 2007. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0254629907000099>> Acessado em 20/01/16.

MELGAREJO, A. R.; CARDOSO, J.; FRANÇA, F. Serpentes peçonhentas do Brasil. Cardoso, L. C. et al. **Animais Peçonhentos no Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos acidentes**. São Paulo : Savier, p. 33-61, 2003.

MORS, W. B. et al. Plant natural products active against snake bite — the molecular approach. **Phytochemistry**, v. 55, n. 6, p. 627-642, 2000. ISSN 0031-9422.

NELSON, B. K. Snake envenomation incidence, clinical presentation and management. **Medical Toxicology and Adverse Drug Experience**, v. 4, n. 1, p. 17-31, 1989. ISSN 0113-5244.

NUNES, P. H. et al. Gastric antiulcerogenic and hypokinetic activities of *Terminalia fagifolia* Mart. & Zucc. (Combretaceae). **BioMed Research International**, p. 12, 2014, article ID261745, 2014. disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1155/2014/261745>> Acessado em 25/02/2016

PINHO, F. M.; PEREIRA, I. D. Ofidismo. **Revista da Associação Médica Brasileira** (1992), v. 47, n. 1, p. 24-29, 2001. ISSN 01044230.

RANDAZZO-MOURA, P. et al. A study of the myotoxicity of *Bothropstoxin-I* using manganese in mouse phrenic nerve-diaphragm and extensor digitorum longus preparations. **Brazilian Journal of Morphological Sciences**, v.23, n. 2, p. 237-246, 2006.

ROJAS, C. A.; ALMEIDA SANTOS, S. M.; GONÇALVES, M. R. Epidemiologia dos acidentes ofídicos na região noroeste do estado de São Paulo, Brasil. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v. 8, n. 3, 2007. ISSN 1519-9940.

RUPPELT, B. M. et al. Pharmacological screening of plants recommended by folk medicine as anti-snake venom: I. Analgesic and anti-inflammatory activities. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 86, p. 203-205, 1991.

SILVA, J. O. S. Atividade farmacológica de frações de diferentes polaridades de *Casearia gossypiosperma* Briquet contra o bloqueio neuromuscular induzido pelos venenos ofídicos (cascavel e jararacuruçu). Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade de Sorocaba, São Paulo: Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade de Sorocaba, São Paulo: p 69, 2012.

SINITOX - Sistema Nacional de Informações Toxico-farmacológicas. Casos Registrados de Intoxicação Humana por Agente Tóxico e Sexo. Brasil, 2012. disponível em: <http://sinitox.icict.fiocruz.br/sites/sinitox.icict.fiocruz.br/files//Tabela%208_2012.pdf> . Acessado em 25/03/16.

SOARES, A. M. et al. Mn 2⁺ ions reduce the enzymatic and pharmacological activities of *Bothropstoxin-I*, a myotoxic Lys49 phospholipase A 2 homologue from *Bothrops jararacussu* snake venom. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 34, n. 6, p. 668-677, 2002. ISSN 1357-2725.

TRIBUIANI, N. et al. *Vellozia flavigans* Mart. ex Schult. hydroalcoholic extract inhibits the neuromuscular blockade induced by *Bothrops jararacussu* venom. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 14, n. 1, p. 48-57, 2014.

VEIGA-JUNIOR, V. F.; PINTO, A. C.; MACIEL, M. A. M. Plantas medicinais: cura segura. **Química Nova**, v. 28, n. 3, p. 519-528, 2005.

VIEIRA, R. A. Validação científica de plantas medicinais como fator catalisador no desenvolvimento da indústria farmacêutica nacional. **Meio Ambiente Saude**. v. 2, p. 57-64 p. 2001.

WHO - World Health Organization. List of neglected tropical diseases. 2009. Disponível em: <http://www.who.int/neglected_diseases/diseases/en/> acessado em 25/03/2016.

ANEXO A – CEUA – UNISO

UNIVERSIDADE DE SOROCABA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS
CEUA-UNISO

PARECER

Protocolo nº 027/2014

Interessado (a): Yoko Oshima Franco e Beatriz Moreira

Orientador (a): Yoko Oshima Franco

Título do Projeto: Farmacodinâmica e Toxicidade da Betulina (*Dipteryx alata*)

Título do Experimento: o mesmo

Apresentado à Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA para análise, segundo a Lei No. 11.794, de 8 de outubro de 2008, que regulamenta o inciso VII do parágrafo 1º do artigo 225 da Constituição Federal, foi considerado:

APROVADO.

APROVADO com RECOMENDAÇÃO, devendo o proponente encaminhar as modificações sugeridas em anexo para complementação do protocolo;

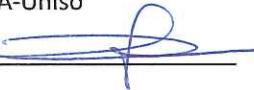
COM PENDÊNCIA, devendo o proponente readequar os itens do protocolo;

REPROVADO

Manifestação do Parecerista:

Nome: Renata de Lima

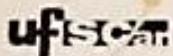
Coordenador da CEUA-Uniso

Assinatura: 

Data: 13/08/2014

* Encaminhar cópia deste parecer para o e-mail ceua@uniso.br e original assinado para a Seção Técnica Acadêmica

ANEXO B – CEUA - UFSCar



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA
Comissão de Ética no Uso de Animais
Via Washington Luis, km. 235 - Caixa Postal 676
Fones: (016) 3351.8025 / 3351.9679
Fax: (016) 3351.8025
CEP 13560-970 - São Carlos - SP - Brasil
ceta@ufscar.br - www.pq.ufscar.br

Parecer da Comissão de Ética no Uso de Animais

nº 070/2012

Protocolo nº. 066/2012

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de São Carlos - CEUA/UFSCar APROVOU o projeto de pesquisa intitulado **Avaliação do potencial farmacológico de plantas medicinais do cerrado**, submetido pela pesquisadora Karina Cogo.

São Carlos, 28 de maio de 2013.

Azair Liane Matos do Canto de Souza

Profa. Dra. Azair Liane Matos do Canto de Souza

Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais

ANEXO C – COMPROVANTE DE SUBMISSÃO

Dear Dr. Oshima-Franco,

Thank you very much for uploading the following manuscript to the MDPI submission and editorial system at susy.mdpi.com. One of our editors will be in touch with you soon.

Journal name: Toxins

Manuscript ID: toxins-122107

Type of manuscript: Article

Title: Ability of Terminalia fagifolia Mart. (Combretaceae) against the toxic effects of *Bothrops jararacussu* venom

Authors: Natália Tribuiani, Marylu Tavares, Monique Santana, Jorge Amaral Filho, Magali Silva, Marcio Dos Santos, José Cogo, Rafael Floriano, Karina Cogo-Müller, Yoko Oshima-Franco *

Received: 24 February 2016

E-mails: natatribuiani@hotmail.com, marylu.tavares@gmail.com, monike_santanna@hotmail.com, jeajoe@globo.com, magali.silva@prof.uniso.br, galdino@uft.edu.br, jccogo@gmail.com, florianos_rs@yahoo.com, karina.muller@fcf.unicamp.br, yoko.franco@prof.uniso.br

Submitted to section: Animal Venoms,

<http://www.mdpi.com/journal/toxins/sections/animal-venoms>

http://susy.mdpi.com/user/manuscripts/review_info/84df55586e32180fb4ac1174865fb77e

You can follow progress of your manuscript at the following link (login required):

http://susy.mdpi.com/user/manuscripts/review_info/84df55586e32180fb4ac1174865fb77e

Kind regards,

MDPI AG

Toxins Editorial Office

Postfach, CH-4005 Basel, Switzerland

Office: Klybeckstrasse 64, CH-4057 Basel

Tel. +41 61 683 77 34 (office)

Fax +41 61 302 89 18 (office)

E-mail: toxins@mdpi.com

<http://www.mdpi.com/journal/toxins/>

*** This is an automatically generated email ***