

**ESTUDO CLÍNICO E LABORATORIAL DA INTOXICAÇÃO
EXPERIMENTAL PELO VENENO DA SERPENTE *Crotalus durissus
terrificus* EM RATOS *Wistar* TRATADOS COM SORO ANTIOFÍDICO E
*Mikania glomerata***

RAFAEL STUANI FLORIANO

**ESTUDO CLÍNICO E LABORATORIAL DA INTOXICAÇÃO
EXPERIMENTAL PELO VENENO DA SERPENTE *Crotalus durissus
terrificus* EM RATOS *Wistar* TRATADOS COM SORO ANTIOFÍDICO E
*Mikania glomerata***

RAFAEL STUANI FLORIANO

Dissertação apresentada a Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação, Universidade do Oeste Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

Área de Concentração: Fisiopatologia Animal

Orientador(a): Prof.^a Dr.^a Rosa Maria Barilli Nogueira.

591.65
F635e

Floriano, Rafael Stuani.

Estudo clínico e laboratorial da intoxicação experimental pelo veneno da serpente *Crotalus dirissus terrificus* em ratos *Wistar* tratados com soro antiofídico e *Mikania glomerata* / Rafael Stuani Floriano. – Presidente Prudente : [s.n.], 2008.

43 f.

Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade do Oeste Paulista – UNOESTE: Presidente Prudente – SP, 2008.

Bibliografia

1. Veneno crotálico, ação tóxica. 2. Soroterapia. 3. Fitoterápicos. I. Título.

RAFAEL STUANI FLORIANO

Estudo clínico e laboratorial da intoxicação experimental pelo veneno da serpente *Crotalus durissus terrificus* em ratos *Wistar* tratados com soro antiofídico e *Mikania glomerata*

Dissertação apresentada a Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação, Universidade do Oeste Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

Presidente Prudente, 02 de junho de 2008.

BANCA EXAMINADORA

Prof.^a Dr.^a Rosa Maria Barilli Nogueira
Universidade do Oeste Paulista - UNOESTE

Prof.^a Dr.^a Michiko Sakate
Universidade Estadual Paulista – UNESP/Botucatu

Prof.^a Dr.^a Silvia Franco Andrade
Universidade do Oeste Paulista - UNOESTE

DEDICATÓRIA

Dedico este a trabalho ao meu querido Jesus por me conceder a chance de honrá-Lo com a sua realização.

A minha querida família por terem me ensinado que os valores de um homem é o temor ao Senhor e a perseverança na conquista de uma vida melhor para todos.

A minha amada esposa Érica pelo amor, compreensão, carinho e apoio constante.

Ao meu tio Agenor Stuani pelo apoio a minha família, pela confiança depositada e exemplo de vida.

A minha orientadora Dr.^a Rosa pelo exemplo de profissionalismo e dedicação.

AGRADECIMENTOS

A Universidade do Oeste Paulista, Pró-Reitoria de Pós-Graduação e Pesquisa pelo apoio financeiro.

Ao Rogério Giufrida pela análise estatística.

Ao Biotério Central da Unoeste pelo fornecimento dos animais.

Ao Vitor Hugo Mion Petrillo pela realização de alguns exames laboratoriais.

Ao Nelson Barbosa Machado Neto pela identificação da planta.

“Se alguém quiser vir após Mim, renuncie-se a si mesmo, tome sobre si a sua cruz e siga-me.”

Jesus Cristo

RESUMO

Estudo clínico e laboratorial da intoxicação experimental pelo veneno da serpente *Crotalus durissus terrificus* em ratos *Wistar* tratados com soro antiofídico e *Mikania glomerata*

O acidente crotálico apresenta o maior índice de letalidade quando comparado com outros acidentes ofídicos de interesse médico. As frações do veneno crotálico apresentam três atividades com importância clínica conhecida: neurotóxica, hemolítica e miotóxica. Este trabalho teve como objetivo avaliar os aspectos clínicos e laboratoriais da intoxicação experimental com veneno de *Crotalus durissus terrificus* em ratos *Wistar* tratados com soro antiofídico e extrato aquoso de *Mikania glomerata*. Os animais foram divididos em três grupos com dezoito animais cada um. Grupo GC: controle; Grupo GVS: receberam 10mg/kg de veneno via intramuscular e 1mg de soro antiofídico via intraperitoneal para cada 50mg de veneno crotálico; Grupo GVSM: receberam o mesmo protocolo do grupo GVS e o extrato aquoso de *Mikania glomerata* a 10% na dose de 1mL via oral, de hora em hora totalizando cinco administrações. Foram observados edema moderado, sedação moderada, diminuição da locomoção, temperatura, frequência respiratória e frequência cardíaca, porém não houve evidência de alteração de coagulação. Na comparação entre os grupos GVS e GVSM para todos os parâmetros avaliados observamos que foi significativo pela análise estatística o edema maior no membro inoculado nos animais do grupo GVS e o retorno do grau de sedação mais rápido para os animais do grupo GVSM. A frequência respiratória não diferiu entre estes dois grupos, mas foi menor nos animais do grupo GVS mesmo mantendo-se dentro de valores normais para a espécie. A locomoção diminuiu, mas não diferiu entre os dois grupos e a temperatura e frequência cardíaca não diferiram pela análise estatística, mas a diminuição dos seus valores abaixo dos valores normais para a espécie, mais intenso nos animais do grupo GVS, foi clinicamente importante. Concluímos também a necessidade de maiores estudos com a planta *Mikania glomerata* nos acidentes crotálicos em espécies mais sensíveis ao veneno.

Palavras-chave: *Crotalus durissus terrificus*. *Mikania glomerata*. Soro antiofídico. Aspectos clínicos. Aspectos laboratoriais.

ABSTRACT

Clinical and laboratorial study of the experimental intoxication with venom of *Crotalus durissus terrificus* in mice *Wistar* treated with antiophidic serum and aqueous extract of *Mikania glomerata*

The accident crotalic presents the largest lethality index when compared with other ophidic accidents of medical interest. The fractions of the crotalic venom characterize three activities with known clinical importance: neurotoxic, hemolytic and myotoxic activities. The present study aims evaluate the clinical and laboratorial aspects of the experimental intoxication with venom of *Crotalus durissus terrificus* in mice *Wistar* treated with antiophidic serum and aqueous extract of *Mikania glomerata*. The animals were divided in three groups with eighteen animals each one. Group GC: control; Group GVS: received 10mg/kg of venom saw intramuscular and 1mg of antiophidic serum saw intraperitoneal for each 50mg of crotalic venom; Group GVSM: received the same protocol to the group GVS and the aqueous extract of *Mikania glomerata* 10% at the dose of 1mL orally each hour totaling five administrations. They were observed moderate edema, moderate sedation, decrease of the locomotion, temperature, breathing frequency and heart frequency, however there was not evidence of coagulation alteration. In the comparison among the groups GVS and GVSM for all of the appraised parameters observed that it was significant for the statistical analysis the larger edema in the member inoculated in the animals of the group GVS and the return of the faster sedation degree for the animals of the group GVSM. The breathing frequency didn't differ among these two groups, but it was smaller in the animals of the group same GVS staying inside of normal values for the species. The locomotion decreased, but it didn't differ between the two groups and the temperature and heart frequency didn't differ for the statistical analysis, but the decrease of their values below the normal values for the species, more intense in the animals of the group GVS, was clinically important. We also concluded the need of larger studies with the plant *Mikania glomerata* in the accidents crotalic in more sensitive species to the venom.

Key-words: *Crotalus durissus terrificus*. *Mikania glomerata*. Antiophidic serum. Clinical aspects. Laboratorial aspects.

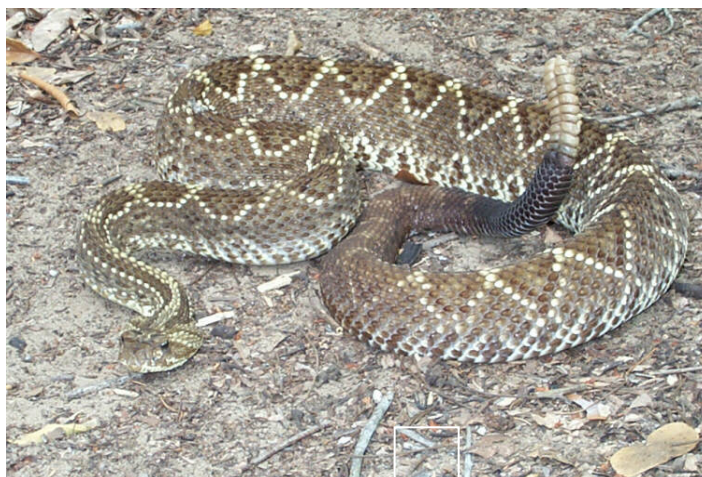
SUMÁRIO

| | |
|--|----|
| 1 INTRODUÇÃO | 10 |
| 2 OBJETIVO..... | 14 |
| 3 REVISÃO DE LITERATURA..... | 15 |
| 3.1 Biologia e Epidemiologia do Gênero <i>Crotalus</i> | 15 |
| 3.2 Veneno crotálico e seus Efeitos..... | 16 |
| 3.3 Tratamento do Acidente Crotálico..... | 22 |
| 4 MATERIAL E MÉTODOS..... | 26 |
| 5 RESULTADOS..... | 29 |
| 6 DISCUSSÃO..... | 32 |
| 7 CONCLUSÃO..... | 35 |
| 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 36 |

1 INTRODUÇÃO

As serpentes do gênero *Crotalus* estão representadas no Brasil por apenas uma espécie, a *Crotalus durissus* e seis subespécie amplamente distribuída no território nacional (Figura 1) (JORGE; RIBEIRO, 1990). Apesar de apresentar características similares em relação a outros gêneros da família Viperidae, como fosseta loreal e presas anteriores ao maxilar (solenóglifas), diferem-se por possuírem, na extremidade da cauda, o guizo formado por anéis durante o número de ecdises que a serpente realiza durante sua vida (BELLUOMINI, 1984).

FIGURA 1 – a) Serpente *Crotalus durissus terrificus*. b) Distribuição da espécie *Crotalus durissus* no Brasil (Brasil 2001).



Fonte: Brasil (2001)

O veneno da serpente *Crotalus durissus terrificus* é composto por uma mistura extremamente complexa de proteínas biologicamente ativas onde a interação de cada um dos elementos causa lesões geralmente graves (DAL PAI; NETO, 1994). O veneno é constituído de várias frações as quais apresentam como principais toxinas a crotoxina, crotamina, giroxina e convulxina. Cerca de 50% da fração do veneno são um complexo constituído por uma fração básica e uma ácida na proporção 1:1 denominadas crotoxinas A e B, respectivamente, sendo que a fração crotoxina B, com atividade fosfolipase A₂ (PLA₂), é responsável por exercer atividades miotóxica, inflamatória, citotóxica e neurotóxica (VITAL BRAZIL, 1972; OKAMOTO et al., 1983; PUIG et al., 1995; ROODT et al., 1996). A crotamina reduz o potencial de repouso da membrana, sugerindo a ativação do canal de sódio que agindo na membrana de células musculares de mamíferos altera a permeabilidade dos íons Na⁺ e Ca⁺⁺ aumentando o influxo desses íons, causando a despolarização da membrana e forte contração muscular (CHEYMOL et al., 1971; CHANG; TSENG, 1978; VITAL BRAZIL, 1990). A giroxina foi isolada por Barrabin et al. (1978) e é considerada uma neurotoxina não-letal responsável por alterações de equilíbrio e a convulxina é responsável por convulsões, distúrbios circulatórios e respiratórios (VITAL BRAZIL et al., 1966).

As frações do veneno crotálico exercem três atividades com importância clínica conhecida: neurotóxica, com ações central e periférica, causando paralisia flácida das musculaturas esquelética e facial, paralisia do globo ocular e às vezes, paralisia dos músculos respiratórios podendo ocasionar insuficiência respiratória (VITAL BRAZIL, 1972; AMARAL et al., 1991; JORGE; RIBEIRO, 1992); coagulante, relacionada ao consumo de fibrinogênio e incoagulabilidade sanguínea (AMARAL et al., 1988); miotóxica sistêmica, causando lesões de fibras musculares esqueléticas ou rabdomiólise generalizada, podendo ocasionar como complicação secundária insuficiência renal aguda (IRA) (AMARAL et al., 1986; AZEVEDO MARQUES et al., 1985), além da hemolítica “*in vitro*” (ROSENFELD et al., 1960-62; KELEN et al., 1960-62).

O quadro clínico causado pelo veneno crotálico, habitualmente tem manifestações locais discretas, como dor, eritema e edema. Nishioka et al. (2000) relataram o aparecimento de abscesso no local da picada, no entanto, esta complicação é rara. Os efeitos de maiores importâncias clínica e gravidade são aqueles sistêmicos que incluem neurotóxicos, miotóxicos, nefrotóxicos,

hepatotóxicos, além de alterações de coagulação sangüínea, hematológicas e imunológicas (PINHO; PEREIRA, 2001).

Fatores secundários aos efeitos da peçonha no organismo contribuem para aumentar o nível de gravidade do acidente ofídico, entre eles destacam-se idade, peso, condições gerais do organismo do indivíduo, quantidade de veneno inoculada, local da picada e o tempo decorrido do acidente até o tratamento (MURTAUGH; KAPLAN, 1992).

Os efeitos tóxicos do acidente crotálico diferem dos causados por outras serpentes de interesse médico, possibilitando a identificação do gênero com base nas características clínicas do paciente acometido e resultados de exames laboratoriais (PINHO; PEREIRA, 2001).

O único tratamento de eficácia comprovada experimentalmente para neutralizar a ação da peçonha crotálica é a soroterapia heteróloga ou soroterapia antiveneno (SAV). Podem ser usados dois tipos de soros, o soro antiofídico botrópico-crotálico (SABC) ou o soro específico anticrotálico (SAC). A via de administração recomendada é a intravenosa (IV). A soroterapia deve ser realizada em conjunto com o tratamento de suporte que consiste em estabilizar as funções dos órgãos vitais do paciente acometido (BRASIL, 2001).

A Fundação Nacional de Saúde (BRASIL, 2001) caracteriza o acidente crotálico como leve, moderado e grave para humanos baseando-se nas manifestações clínicas e sugerem o tratamento com soro anticrotálico ou antiofídico botrópico-crotálico nas doses de 5, 10 e 20 ampolas respectivamente. Considerando que o tratamento com soro se baseia na capacidade neutralizante sobre o veneno inoculado e que a quantidade inoculada seja a mesma obtida em primeira extração (50mg), outros autores sugerem que seja utilizada, para animais, uma quantidade de soro suficiente para neutralizar 50mg de veneno crotálico (ROSENFELT et al., 1960-62; BICUDO, 1994).

Apesar da soroterapia ser o tratamento preconizado no acidente ofídico, existe um grande interesse em muitos estudos recentes na busca de tratamentos complementares que possam ser usados com o intuito de diminuir a intensidade e gravidade das alterações clínicas observadas, diminuindo a incidência de complicações secundárias ao acidente, e desta forma diminuir o índice de letalidade (FERREIRA et al., 1992; PEREIRA et al., 1994; MELO et al., 1994; BRASIL, 2001; MAIORANO et al., 2005).

Algumas plantas citadas na literatura como a *Curcuma longa*, *Eclipta prostrata*, *Apuleia leiocarpa* dentre outras com propriedade antiofídica são indicadas no tratamento complementar à soroterapia, pois há indício de possuírem diversidade grande de compostos químicos com muitas atividades farmacológicas de interesse médico-científico (FERREIRA et al., 1992; PEREIRA et al., 1994; MELO et al., 1994)

O gênero *Mikania glomerata* utilizada neste estudo é popularmente conhecida como “guaco”, pertence ao reino *Plantae*, classe *Magnoliopsida*, ordem *Asterales* e família *Asteracea*. Esta é uma planta medicinal brasileira muito utilizada para tratar problemas respiratórios e combater a tosse (PANIZZA, 1997), mas também tem atividade antiofídica (MAIORANO et al., 2005).

Embora o mecanismo de ação da *Mikania glomerata* ainda seja desconhecido, a cumarina (1,2-benzopirano), uma das frações do seu extrato, foi escolhida como substância marcadora por ser um dos constituintes majoritários do vegetal e contribuir para o efeito farmacológico incluindo a atividade antiofídica (LEITE et al., 1993).

Alguns trabalhos mostram que a planta inibe a ação de vários venenos de serpentes inibindo a ação letal dos mesmos além de ser uma fonte rica de inibidores potenciais de PLA2, metaloproteases e serinoproteases, enzimas envolvidas com os sinais clínicos observados em humanos e animais (MAIORANO et al., 2005).

2 OBJETIVO

Avaliar os aspectos clínicos e laboratoriais da intoxicação experimental com veneno de *Crotalus durissus terrificus* em ratos *Wistar* tratados com soro antiofídico e extrato aquoso de *Mikania glomerata*.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Biologia e Epidemiologia do Gênero *Crotalus*

As serpentes pertencem à subordem Ophidia, e são encontradas em quase todo o mundo, mas principalmente nas regiões tropicais e subtropicais por não apresentarem mecanismos termorreguladores (JIM; SAKATE, 1994).

As serpentes do gênero *Crotalus* estão representadas no Brasil por apenas uma espécie, a *Crotalus durissus*, e distribuídas em seis subespécies: *C. durissus terrificus* e *C. durissus trigonicus*, encontradas nas zonas altas e secas da região sul; *C. durissus collilineatus*, distribuída nas regiões secas da região centro-oeste, Minas Gerais e norte de São Paulo; *C. durissus cascavella*, encontrada nas áreas da caatinga do nordeste; *C. durissus ruruima*, encontrada na região norte do país; *C. durissus marajoensis*, encontrada na Ilha de Marajó (JORGE; RIBEIRO, 1990; SAKATE, 2002).

As espécies do gênero *Crotalus* apresentam características semelhantes em relação a outras espécies de serpentes peçonhentas da família Viperidae como os gêneros *Bothrops* e *Lachesis*, possuem presas pares localizadas na posição anterior do maxilar superior sendo classificadas como solenóglifas, possuem maxilares curtos e móveis no plano vertical e um par de fossetas loreais (órgão termorregulador) situado entre as narinas e os olhos. A fosseta loreal detecta o calor de animais homeotérmicos e também vibrações do ar, por intermédio da membrana que reveste o septo entre as duas câmaras (STORER et al., 2002; NOBLE; SCHMID, 1937). As serpentes do gênero *Micrurus* são exceções, pois, apesar de serem peçonhentas, não apresentam fosseta loreal e possuem dentes inoculadores pouco desenvolvidos (PINHO; PEREIRA, 2001).

Apesar de tantas características similares, as serpentes do gênero *Crotalus* diferem de qualquer outra espécie de serpente peçonhenta por possuírem, na extremidade da cauda, o guizo ou chocalho formado por gomos ou anéis durante as ecdises (mudas de pele) que a serpente realiza durante sua vida (BELLUOMINI, 1984). O guizo é usado para emitir um sinal de alerta aos predadores quando a serpente se sente ameaçada em seu habitat natural (STORER et al., 2002).

A *Crotalus durissus terrificus* é também conhecida popularmente por cascavel, cascavel-quatro-ventas, boicininga, maracambóia, maracá, entre outras denominações (SAKATE, 2002).

Desde 1986, o Ministério da Saúde tornou obrigatória a notificação dos acidentes ofídicos humanos, e com base nos índices observados desde então, a análise estatística revela que o acidente crotálico está em segundo lugar quanto ao número de acidentes ocorridos, mas em primeiro com relação ao índice de letalidade (Tabela 1).

TABELA 1 – Casos, óbitos e índice de letalidade dos acidentes com os principais gêneros de serpentes peçonhentas do Brasil em 2005 com atualizações até julho de 2006

| Acidente | Casos | Óbitos | Índice de letalidade |
|-----------------|--------------|---------------|-----------------------------|
| Botrópico | 19.453 | 76 | 0,40% |
| Crotálico | 1.885 | 19 | 1% |
| Laquético | 731 | 2 | 0,30% |
| Elapídico | 149 | 0 | 0% |

Fonte: BRASIL, 2006.

3.2 Veneno Crotálico e seus Efeitos

As peçonhas são compostas quimicamente por uma mistura extremamente complexa de proteínas biologicamente ativas onde a interação de cada um dos elementos causa lesões geralmente graves (DAL PAI; NETO, 1994). O veneno crotálico é constituído de várias frações e estas revelam as seguintes toxinas: crotoxina, crotamina, giroxina e convulxina. Cerca de 50% da fração do veneno são um complexo molar de proporção 1:1 denominado crotoxina. Este complexo é constituído por uma fração básica (crotoxina B) com atividade fosfolipase A₂, responsável por exercer atividade miotóxica, inflamatória, citotóxica e neurotóxica, e por uma fração ácida (crotoxina A) que não apresenta atividade enzimática. O efeito tóxico deste complexo ocorre somente com a interação das

duas frações, podendo a crotoxina B ser tóxica em doses elevadas. (ROODT et al., 1996; PUIG et al., 1995).

A fração crotoxina do veneno crotálico produz efeitos tanto no sistema nervoso central quanto no sistema nervoso periférico, provocando sintomas de paralisia motora e respiratória em todas as espécies animais estudadas. Sugere-se que a paralisia seja decorrente do bloqueio da transmissão nervosa na junção neuromuscular, por inibição da liberação de acetilcolina na pré-sinapse (VITAL BRAZIL, 1972; OKAMOTO et al., 1983). A paralisia é flácida e acomete a musculatura esquelética, músculos respiratórios, face e globo ocular.

A crotamina é uma proteína menor, composta por 42 aminoácidos, menos tóxica que a crotoxina, e sua ação é específica sobre a musculatura reduzindo o potencial de repouso da membrana de mamíferos, ativando o canal de Na^+ ou Ca^{++} aumentando o seu influxo (CHEYMOL et al., 1971). O influxo destes íons causa despolarização da membrana e forte contração muscular (CHANG; TSENG, 1978; BRASIL, 1990). Em estudos recentes, é mostrada a capacidade da crotamina de ativar proteases e fosfolipase A_2 presentes na peçonha além de possuir uma potente ação analgésica considerada superior à ação da morfina (HUDELSON; HUDELSON, 1995; MANCIN et al., 1998).

Em 1966, Vital Brazil et al. isolaram uma fração neurotóxica responsável por convulsões, distúrbios circulatórios e respiratórios denominada convulxina.

A giroxina foi isolada por Barrabin et al. (1978) e é considerada uma neurotoxina não-letal responsável por sintomas neurológicos relacionados à alteração do equilíbrio.

De acordo com a importância clínica dos sinais observados na intoxicação crotálica, podem se classificar as ações do veneno em três principais: neurotóxica (VITAL BRAZIL, 1972; AMARAL et al., 1991; JORGE; RIBEIRO, 1992), coagulante, relacionada ao consumo de fibrinogênio e incoagulabilidade sanguínea (AMARAL et al., 1988), miotóxica sistêmica, causando lesões de fibras musculares esqueléticas e rbdomiólise generalizada (AMARAL et al., 1986; AZEVEDO MARQUES et al., 1985), além da hemolítica "*in vitro*" (ROSENFELD et al., 1960-62; KELEN et al., 1960-62).

Apesar de sua letalidade, ainda não se sabe qual é a quantidade de veneno inoculada em um acidente, pois existem vários fatores como tamanho da

serpente, tempo decorrido entre uma picada e outra, idade, saúde, nutrição da serpente e o local da picada que podem interferir na quantidade de veneno inoculada (ARAÚJO; BELLUOMINI, 1960-62; STORER et al., 2002). Segundo Rosenfeld et al. (1960-62) a quantidade máxima de veneno extraída da espécie *Crotalus durissus terrificus* foi de 50 mg em 75% das serpentes estudadas.

O quadro clínico causado por veneno crotálico, habitualmente apresenta manifestações locais discretas como a dor, eritema e edema moderado a inaparente. Nishioka et al. (2000) relataram o aparecimento de abscesso no local da picada, no entanto, esta complicação é rara. Os efeitos de maior importância clínica e gravidade são os sistêmicos relacionados aos neurotóxicos, miotóxicos, coagulantes e hemolíticos além das alterações hematológicas, nefrotóxicas, imunológicas e hepatotóxicas (PINHO; PEREIRA, 2001).

Os efeitos neurotóxicos se caracterizam por ataxia, fasciculações, paralisia muscular flácida, ptose palpebral, midríase, disfagia, sialorréia, vômito e diarreia (AZEVEDO MARQUES et al., 1987; BARRAVIERA, 1994).

Amaral et al. (1991) relataram três casos de pacientes humanos que apresentaram comprometimento da função respiratória além de sinais neurológicos. Segundo os autores, todos os pacientes apresentaram dispnéia, taquipnéia e movimentos respiratórios superficiais. Dos três casos, dois apresentaram insuficiência respiratória aguda, sendo que no primeiro houve parada respiratória e o segundo evoluiu para coma profundo atribuído à hipóxia cerebral secundária às crises convulsivas que apresentou durante o período de internação, vindo a óbito 10 meses após o acidente ofídico.

Em outro trabalho, foram analisados os prontuários de pacientes picados por *C. durissus* e atendidos no Hospital Vital Brasil, no Instituto Butantan e dentre os efeitos neurotóxicos, os mais freqüentes foram ptose palpebral, diplopia, visão turva, midríase, vômitos, sonolência e insuficiência respiratória grave (JORGE; RIBEIRO, 1992).

Lago et al. (2000), em trabalho experimental com veneno de *Crotalus durissus terrificus* em fêmeas bovinas, descrevem alterações comportamentais como inquietação e desconforto na primeira hora após a inoculação do veneno crotálico. No final da 2ª hora, os animais apresentavam apatia com cabeça baixa, letargia e edemaciação discreta no local da inoculação. Na 10ª hora, houve diminuição da sensibilidade superficial, do tônus muscular com aparecimento de incoordenação

motora, decúbito esternal e diminuição dos reflexos patelar e gastrocnêmico. Na 14ª hora, observaram-se movimentos de "pedalagem" e diminuição da sensibilidade profunda. Na 16ª hora, observou-se paralisia flácida dos membros pélvicos e na 20ª hora, dispnéia, sialorréia e ocorrência das primeiras mortes.

Nogueira et al. (2007) relatam, em cães, o aparecimento de ataxia, sedação leve a moderada, paralisia muscular flácida generalizada, mialgia generalizada, paralisia do globo ocular, ptose mandibular, dificuldade de deglutição e de fonação além de sialorréia, vômito e diarreia.

O efeito miotóxico do veneno crotálico se caracteriza por rabdomiólise, liberação de mioglobina e mialgia generalizada. É observado aumento de enzimas marcadoras de lesão muscular como creatinoquinase (CK), lactato desidrogenase (LDH) e aspartato aminotransferase (AST). A mioglobinemia e mioglobinúria constituem as manifestações clínicas mais evidentes de rabdomiólise (AZEVEDO-MARQUES et al., 1985; JORGE; RIBEIRO, 1992).

Ribeiro et al. (1998) analisaram as notificações pertencentes à Secretaria da Saúde do Estado de São Paulo, de 13 pacientes que faleceram por envenenamento crotálico no período de 1988 a 1993 e observaram em 84,6% destes, a presença de mioglobinúria e necrose muscular.

Em um relato de caso sobre acidente crotálico em uma cadela gestante, avaliaram as alterações clínicas conseqüentes, em que foi possível determinar edema discreto no local da picada sem sinais de mialgia local. O teste para determinação da presença de mioglobina na urina foi positivo e os valores das enzimas CK e AST mostraram elevações significativas quatro horas após o acidente. O animal foi tratado com soroterapia e terapia de suporte apresentando melhora total do quadro clínico após três dias da terapia e foi acompanhado durante todo o período gestacional. Não foi verificada nenhuma alteração nos neonatos que foram acompanhados até os 60 dias de idade (COLLICCHIO et al., 2002).

Bucarechi et al. (2002) relataram 31 casos de crianças vítimas de acidente crotálico, e observaram elevação nos valores de CK, LDH e mioglobinúria em 14 delas.

Nogueira e Sakate, (2006) observaram mioglobinúria em cães intoxicados experimentalmente com veneno crotálico nos tempos 6, 24 e 48 horas após inoculação do veneno. Em 2007, outro trabalho de Nogueira *et al.* também relatam mioglobinúria em cães.

A insuficiência renal aguda (IRA) é a principal complicação do paciente que sobrevive às ações iniciais do veneno crotálico, pois ações indiretas do veneno sobre as células renais podem acontecer em decorrência da mioglobinúria secundária a rabdomiólise e provocar obstrução tubular por cilindros de mioglobina e conseqüentemente necrose tubular aguda (MAGALHÃES et al., 1986; SOERENSEN, 1990).

Amaral et al. (1991) relataram dois casos de pacientes humanos atendidos no Centro de Tratamento Intensivo do Hospital das Clínicas do UFMG, onde diagnóstico de acidente crotálico baseou-se na ausência de alterações no local da picada e nos sinais decorrentes das ações neurotóxicas, miotóxicas e nefrotóxicas do veneno crotálico. Ambos desenvolveram insuficiência renal aguda e necessitaram de diálise peritoneal.

Em análise de prontuários de pacientes picados por serpentes da espécie *C. durissus terrificus* e atendidos no Hospital Vital Brasil do instituto Butantan, Jorge e Ribeiro, (1992) relataram que nove pacientes foram submetidos à diálise devido à instalação de insuficiência renal aguda.

Bucarechi et al. (2002) também relatam que três crianças de um total de seis, atendidas após seis horas do acidente crotálico, evoluíram para insuficiência renal aguda sendo que duas delas necessitaram de hemodiálise.

Monteiro et al. (2001) e Martins et al. (2002) relatam que a crotoxina é o componente principal do veneno responsável pela nefrotoxicidade.

Além disso, sabe-se que complicações secundárias como desidratação, hipotensão arterial, choque e acidose metabólica associados à rabdomiólise podem contribuir para a instalação da lesão renal (MAGALHÃES et al., 1986).

A alteração na coagulação ocorre pelo consumo do fibrinogênio e conseqüente aumento no tempo de coagulação e incoagulabilidade sanguínea. Geralmente não há redução do número de plaquetas, mas ocorre indução de agregação plaquetária *in vitro*. As manifestações hemorrágicas, quando presentes, são discretas (AMARAL et al., 1980; JORGE; RIBEIRO, 1988).

Jorge e Ribeiro, (1992) analisaram prontuários de 216 pacientes humanos que foram submetidos a exames laboratoriais e dentre as manifestações detectadas, a alteração da coagulação sanguínea ocorreu em 104 pacientes, tendo sido observada também, incoagulabilidade em 82 deles.

Ribeiro et al. (1998) analisaram os prontuários de 43 pacientes humanos que evoluíram para óbito devido ao envenenamento crotálico e observaram que 34 destes apresentaram alterações no tempo de coagulação.

Fonseca et al. (2002) estudaram 6 pacientes que apresentaram sinais clínicos de picada por *Crotalus durissus terrificus* e detectaram hemorragia no local da picada em 4 pacientes usando imagens de ressonância magnética.

Collicchio et al. (2002) relatam incogulabilidade em cadela picada pela serpente *Crotalus durissus terrificus* até 24 horas após intoxicação.

Nogueira e Sakate, (2006) intoxicaram experimentalmente cães com veneno crotálico e observaram incoagulabilidade sanguínea em 100% dos animais seis horas após intoxicação e retorno à normalidade do tempo de coagulação, para a espécie, oito horas após a soroterapia antiofídica.

Nogueira et al. (2007) relataram diminuição do fibrinogênio, incoagulabilidade sanguínea, aumento no tempo de protrombina e tromboplastina parcial ativada em cães intoxicados experimentalmente com veneno crotálico.

As alterações hematológicas encontradas no acidente crotálico estão relacionadas aos eritrócitos e leucócitos (SLOTTA; BORCHET, 1954; COSTA et al., 1989).

Barraviera, (1993) relata, em pacientes humanos, aumento no número de leucócitos e neutrófilos concordando com os achados de outros autores como Azevedo-Marques et al. (1990), Rosenfeld, (1991), Jorge e Ribeiro, (1992).

Em 1995, Barraviera *et al.* demonstraram aumento de citocinas como IL-1 (interleucina 1), IL-6 e IL-8 em acidente crotálico caracterizando a reação inflamatória.

Nogueira e Sakate, (2006) e Nogueira et al. (2007) relatam leucocitose com neutrofilia seis horas após intoxicação crotálica em cães.

A hepatotoxicidade foi proposta pela primeira vez por Barraviera et al. (1989) em pacientes humanos e em 1995 o mesmo autor e seus colaboradores relatam, em 32 pacientes, aumento dos níveis séricos de alanina aminotransferase a aspartato aminotransferase na maioria dos doentes.

Em 1997, Perez et al. relatam, em ratas inoculadas com veneno crotálico, comprometimento do tecido hepático com congestão e dilatação de grandes vasos sanguíneos.

Nos achados anatomopatológicos, são relatados, em diferentes espécies animais degeneração e necrose musculares no local da inoculação do veneno e em áreas distantes deste local (DEMPSTER et al., 1980; AZEVEDO MARQUES et al. 1985), áreas focais e multifocais bem demarcadas de coloração esbranquiçada decorrentes de degeneração e necrose no local da picada, infiltrado inflamatório, hialinização de fibras, edema, hemorragia, atividade mio regenerativa discreta e linfadenopatia reativa próxima ao local de inoculação do veneno após uma semana (NOGUEIRA et al. 2007), lesões hemorrágicas no sistema nervoso central, nos pulmões e glomerulonefrite (BELLUOMINI et al. 1983), além de alterações degenerativas hepáticas (AMORIM et al. 1951; BARRAVIERA et al. 1995)

3.3 Tratamento do Acidente Crotálico

Vários fatores secundários aos efeitos da peçonha no organismo contribuem para aumentar o nível de gravidade do acidente ofídico, entre eles destacam-se idade, peso e condições gerais do organismo do indivíduo. A quantidade de veneno inoculada, o local da picada e o tempo decorrido até o tratamento também podem levar ao agravamento do quadro clínico da vítima (MURTAUGH; KAPLAN, 1992).

Os efeitos tóxicos no acidente crotálico diferem dos efeitos causados por outras serpentes de interesse médico, possibilitando a identificação do gênero com base nas características clínicas do paciente acometido (PINHO; PEREIRA, 2001).

A Fundação Nacional de Saúde (BRASIL, 2001) caracteriza o acidente crotálico como leve, moderado e grave para humanos baseando-se nas manifestações clínicas e sugere o tratamento com soro anticrotálico ou antibotrópico-crotálico nas doses de 5, 10 e 20 ampolas respectivamente.

Outros autores sugerem que seja utilizada, para animais, a quantidade de soro suficiente para neutralizar 50mg de veneno crotálico, considerando que o tratamento com soro se baseia na capacidade neutralizante sobre o veneno inoculado e que a quantidade inoculada seja a mesma obtida em primeira extração (ROSENFELT et al., 1960-62; BICUDO, 1994).

A confirmação laboratorial do acidente pode ser feita por meio de antígenos do veneno crotálico que pode ser detectado no sangue por meio da técnica de ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay) ou por achados nos exames laboratoriais como valores elevados de creatinaquinase (CK), desidrogenase láctica (LDH) e alanino aminotransferase (ALT), tempo de coagulação freqüentemente prolongado, presença de mioglobina, com ausência de hematúria, elevação dos níveis de uréia, creatinina, ácido úrico, fósforo, potássio e diminuição da calcemia na fase oligúrica da IRA. (PINHO; PEREIRA, 2001).

O único tratamento de eficácia comprovada experimentalmente para neutralizar a ação da peçonha crotálica é a soroterapia heteróloga ou soroterapia antiveneno (SAV). Usam-se dois tipos de soros em vítimas de acidente crotálico: o soro antiofídico botrópico-crotálico (SABC) ou o soro específico anticrotálico (SAC). A dose utilizada deve ser a mesma para adultos e crianças ou para pequenos e grandes animais, visto que o objetivo do tratamento é neutralizar a maior quantidade de veneno circulante, independentemente do peso do paciente. A OMS recomenda que os soros sejam apresentados na forma liofilizada, mais estável e de fácil armazenamento. Entretanto, no Brasil, os soros são produzidos e apresentados também na forma líquida. As ampolas devem ser conservadas em geladeira à temperatura de 4 a 8 graus centígrados positivos, evitando-se o congelamento, por no máximo três anos (BRASIL, 2001). Os principais laboratórios que produzem esses imunoderivados são o Instituto Butantan – São Paulo, Fundação Ezequiel Dias – Minas Gerais e Instituto Vital Brazil – Rio de Janeiro.

A via de administração recomendada é a intravenosa (IV). As vias subcutânea e intramuscular podem ser consideradas quando houver restrições do uso da via intravenosa (SAKATE, 2002).

A soroterapia dever ser realizada em conjunto com o tratamento de suporte que consiste em estabilizar as funções vitais do paciente acometido. A hidratação adequada é de fundamental importância na prevenção da insuficiência renal aguda. O pH urinário deve ser mantido acima de 6,5, pois a urina ácida potencializa a precipitação intratubular de mioglobina. Assim, a alcalinização da urina deve ser feita pela administração parenteral de bicarbonato de sódio (BRASIL, 2001; NOGUEIRA et al., 2007).

Os efeitos neurotóxicos, causados pelo veneno crotálico, caracterizam o quadro de anorexia, dificuldade de mastigação, paralisia dos músculos faciais e

depressão grave, necessitando a realização da alimentação parenteral ou enteral com alimento líquido ou pastoso até que o animal se recupere e volte a se alimentar normalmente. Durante o período de sedação do animal, deve-se oferecer constantemente água em pequenas quantidades para evitar o ressecamento da mucosa bucal. A aplicação de colírio ou solução fisiológica na córnea ajuda a evitar o ressecamento e aparecimento de úlceras (SAKATE, 2002).

Não são recomendados o uso de torniquete ou garrote, cortar ou perfurar o local da picada, colocar materiais contaminantes (folhas, pó de café, argila) e oferecer bebida alcoólica ou outras substâncias, pois esses procedimentos podem agravar o quadro clínico do paciente (AMARAL et al., 1998; BRASIL, 2001). Como, no local da picada, as manifestações são mínimas, com sinais leves, recomenda-se adequada assepsia e analgésicos se necessários. O uso de antibiótico está condicionado à evidência de infecção, lembrando que os germes patogênicos podem provir da boca da serpente, da pele do acidentado ou do uso de contaminantes sobre o ferimento (PINHO; PEREIRA, 2001; BRASIL, 2001).

As propriedades antiofídicas de alguns fitoterápicos são citadas na literatura como tratamento complementar à soroterapia, indicando uma diversidade grande de compostos químicos com diversas atividades farmacológicas de interesse médico-científico. Batina et al. (2000) relatam a capacidade do extrato de *Tabernaemontana catharinensis*, popularmente conhecida como “leiteiro de vaca”, de inibir a ação letal do veneno da serpente *Crotalus durissus terrificus*. Experimentalmente os pesquisadores inocularam doses letais de veneno crotálico em ratos *Wistar* e, após 30 minutos, estes foram tratados com o extrato da planta. Em outro momento, veneno e o extrato foram administrados juntos. A *Tabernaemontana catharinensis* mostrou-se eficaz na inibição da letalidade do veneno crotálico, principalmente no segundo momento estudado.

A *Mikania glomerata*, popularmente conhecida como “guaco”, é uma planta medicinal brasileira empregada em tratamentos contra tosse e problemas respiratórios. Encontram-se comercializados, principalmente nas formas farmacêuticas de extrato fluido, tintura e xarope (DI STASI, 1994; PANIZZA, 1997).

O estudo químico da *Mikania glomerata* mostra as seguintes substâncias isoladas: cumarina (1,2-benzopirano), ácido caurenóico, ácido cinamolglandiflóroco, estigmasterol, friedelina, e lupeol (OLIVEIRA et al., 1984; VILEGAS et al., 1997; VENEZIANI et al., 1999). A cumarina (1,2-benzopirano) é o

constituente majoritário do vegetal e principal princípio ativo que contribui para o efeito farmacológico (LEITE et al., 1993).

Maiorano et al. (2005) estudaram *in vitro* a capacidade do extrato aquoso de *Mikania glomerata* em inibir as atividades farmacológicas e enzimáticas do veneno crotálico e botrópico *in vitro*. Segundo os autores, a atividade PLA₂ induzida pelo veneno da serpente *Crotalus durissus terrificus* foi totalmente inibida pelo extrato aquoso de *Mikania glomerata*, enquanto, pelo veneno da serpente *Bothrops jararacussu*, a inibição não foi observada. A respeito do edema, o extrato aquoso e desidratado inibiu aproximadamente 40% dos efeitos induzidos pelo veneno crotálico. Os resultados mostraram também, que a atividade hemorrágica do veneno da *Bothrops alternatus* foi 50-80% inibida pelo extrato aquoso e desidratado respectivamente. Ainda segundo os autores, os extratos de *Mikania glomerata* são poderosos agentes inibidores da atividade coagulante causada pela degradação considerável de fibrinogênio e de outros fatores da coagulação.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Local: o experimento foi realizado no Biotério Central da Universidade do Oeste Paulista – UNOESTE. O projeto foi protocolado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Unoeste com o número 036/06.

Animais: foram utilizados ratos *Wistar* de padrão sanitário convencional controlado, fêmeas, com peso variando de 250 a 350g provenientes do Biotério Central da Universidade do Oeste Paulista – UNOESTE, Presidente Prudente-SP.

Os animais foram mantidos isolados em gaiolas metabólicas individuais no Biotério Central da Universidade do Oeste Paulista – UNOESTE por um período não inferior a uma semana antes do experimento. Água e ração foram fornecidas à vontade.

Grupos experimentais: foram constituídos três grupos experimentais com 18 animais em cada grupo:

- Grupo GC: animais submetidos aos mesmos procedimentos experimentais dos grupos GVS e GVSM, administrando-se placebo via intraperitoneal para representar o tratamento soroterápico, intramuscular para a inoculação de veneno e oral para a administração do extrato aquoso de *Mikania glomerata*.
- Grupo GVS: animais intoxicados experimentalmente com veneno da serpente *Crotalus durissus terrificus* via intramuscular e tratados com soro antiofídico botrópico-crotálico via intraperitoneal.
- Grupo GVSM: animais intoxicados experimentalmente com veneno da serpente *Crotalus durissus terrificus* via intramuscular e tratados com soro antiofídico botrópico-crotálico via intraperitoneal e com extrato aquoso de *Mikania glomerata* via oral.

Momentos experimentais: a avaliação clínica e tempo de coagulação foram realizados em três diferentes momentos:

- M1: 30 minutos após inoculação do veneno (n=6).

- M2: 6 horas após inoculação do veneno (n=6).
- M3: 24 horas após inoculação do veneno (n=6).

Veneno: foi fornecido pelo Centro de Estudos de Venenos e Animais Peçonhentos – CEVAP, Universidade Estadual Paulista (UNESP) – Campus Botucatu-SP.

O veneno estava na concentração de 2mg/mL e a dose utilizada, encontrada após realização de experimento piloto, foi de 10mg/kg. A inoculação foi realizada via intramuscular no terço médio da face lateral do membro posterior esquerdo do rato.

Soroterapia: foi realizada com soro antiofídico botrópico-crotálico da Vencofarma[®] comercializado em ampolas de 10mL. O soro foi administrado pela via intraperitoneal seis horas após a administração do veneno crotálico. A dose foi calculada de acordo com a quantidade de veneno administrada e de acordo com Bicudo (1994) onde refere que 1mg do soro antiofídico botrópico-crotálico da Vencofarma[®] neutraliza 50mg de veneno crotálico.

Extrato aquoso de *Mikania glomerata* foi preparado no laboratório de farmacologia da Faculdade Adamantinaense Integrada – FAI, Adamantina-SP. Foram colhidas as folhas do guaco (*Mikania glomerata*.) a qual foi cultivada em área preparada e sob observação constante. A preparação do extrato foi de acordo com a Farmacopéia Brasileira (SILVA, 1929). A solução aquosa foi utilizada na concentração de 10% e administrado via oral na dose de 1mL, de hora em hora, totalizando cinco administrações após a inoculação do veneno crotálico.

Avaliação clínica: realizada em todos os momentos, consistiu na avaliação da frequência cardíaca (bpm), frequência respiratória (mpm), temperatura (°C), presença de edema por meio da mensuração dos membros posteriores direito e esquerdo com paquímetro (cm), observação da locomoção considerando os escores: 1-presente, 2-ausente, grau de sedação, escores: 1-leve (levanta-se quando estimulado), 2-moderada (reage a estímulos mas permanece em decúbito), 3-grave (não reage a estímulos).

Avaliação laboratorial: determinação da presença ou ausência de alteração de coagulação, pelo método do tubo capilar (JAIN, 1993), após contenção do animal em caixa de madeira e posterior incisão da extremidade da cauda e colheita de sangue.

Análise estatística: para as variáveis paramétricas, edema do membro direito, edema do membro esquerdo, temperatura, freqüências cardíaca e respiratória, foi realizada a Análise de Variância com contrastes com o método Tukey. Para as variáveis não paramétricas como grau de sedação e locomoção, foi realizada a análise Kruskal-Wallis com contrastes com o método Dun (CURI, 1997).

5 RESULTADOS

Após a inoculação do veneno crotálico, os animais apresentaram sinais de desconforto, inquietação, retração do membro acometido caracterizando dor no membro inoculado e evitavam a locomoção. Também foi observado quadro de anorexia e oligúria durante os momentos de experimentação.

Os animais dos grupos GVS e GVSM apresentaram edema moderado quando comparados com o grupo controle nos dois membros posteriores sendo que o membro posterior esquerdo, inoculado com veneno, apresentou edema mais acentuado em relação ao membro posterior direito. Nos animais do grupo GVS, no membro esquerdo foi observado edema acentuado estatisticamente significativo ($p < 0,05$) nos momentos M1, M2 e M3 quando comparado ao grupo controle. Para os animais do grupo GVSM houve edema nos momentos M1 e M3, porém mais acentuado no momento M1. Comparando os grupos GVS e GVSM, observou-se que o edema foi maior nos animais do grupo GVS no momento M2. Na avaliação do membro direito, foi observado edema moderado nos animais dos grupos GVS no momento M2 e no grupo GVSM, no momento M1 e M3 quando comparados ao grupo GC (Tabela 1).

Na avaliação da temperatura corpórea, houve diminuição significativa ($p < 0,05$) para os animais do grupo GVS no momento M2 em relação ao momento M1 e diminuição no momento M2 para os animais dos grupos GVS e GVSM quando comparado ao grupo controle. Apesar de não serem estatisticamente significativos, os valores mantiveram-se abaixo do valor de referência para a espécie no momento M3 para os animais dos dois grupos (Tabela 1).

Quanto à frequência respiratória, observou-se que os animais apresentaram dispnéia após inoculação do veneno, de intensidade leve. No grupo GVS, os animais apresentaram pequena diminuição da frequência no momento M2 em relação ao momento M1 e estatisticamente significativo ($p < 0,05$) quando comparado ao momento M3, mas os valores permaneceram dentro dos de referência para a espécie. Os animais do grupo GVSM não apresentaram diminuição da frequência respiratória em nenhum momento não havendo diferença na comparação entre os momentos dentro do mesmo grupo nem na comparação com o grupo controle (Tabela 1).

Na avaliação da frequência cardíaca e comparação entre os grupos observou-se uma diminuição não significativa para os animais do grupo GVS e GVSM no momento M3 quando comparado ao grupo controle. Apesar de não ser estatisticamente significativo, o grupo GVS apresentou maior diminuição da frequência cardíaca em todos os momentos quando comparado com o grupo GVSM. Comparando os momentos dentro do mesmo grupo, observou-se que no grupo GVS houve diminuição estatística significativa ($p < 0,05$) no momento M3 quando comparado ao momento M1 e para os animais do grupo GVSM diminuição significativa ($p < 0,05$) no momento M3 quando comparado ao momento M1 (Tabela 1).

TABELA 1 – Valores das médias e desvio padrão das variáveis, edema membro esquerdo, edema membro direito, temperatura, frequência respiratória (FR), frequência cardíaca (FC) segundo grupos e momentos dos animais dos grupos controle (GC), grupo veneno + soro (GVS) e grupo veneno + soro + *Mikania glomerata* (GVSM)

| Variáveis | Grupos | Momentos | | |
|-------------------------------|--------|-----------------|-----------------|-----------------|
| | | M1 | M2 | M3 |
| Edema de membro esquerdo* | GC | 0,77 ± 0,10 Aa | 0,88 ± 0,16 Aa | 0,77 ± 0,08 Aa |
| | GVS | 1,32 ± 0,12 Ba | 1,53 ± 0,20 Ba | 1,15 ± 0,29 Bab |
| | GVSM | 1,33 ± 0,16 Ba | 1,08 ± 0,13 Ab | 1,28 ± 0,10 Bab |
| Edema de membro direito | GC | 0,67 ± 0,08 Aa | 0,77 ± 0,08 Aa | 0,68 ± 0,08 Aa |
| | GVS | 0,77 ± 0,15 Aa | 1,00 ± 0,13 Ba | 0,85 ± 0,21 Aba |
| | GVSM | 0,95 ± 0,06 Ba | 0,78 ± 0,04 Ab | 0,90 ± 0,10 Ba |
| Temperatura (°C) | GC | 37,1 ± 0,2 Aa | 37,2 ± 0,3 Aa | 36,6 ± 0,8 Aa |
| | GVS | 37,3 ± 0,7 Aa | 34,6 ± 1,6 Bb | 35,8 ± 0,9 Aab |
| | GVSM | 36,1 ± 1,7 Aa | 35,2 ± 1,1 Ba | 35,8 ± 0,9 Aa |
| Frequência respiratória (mpm) | GC | 104,3 ± 17,4 Aa | 101,7 ± 17,6 Aa | 116,3 ± 24,6 Aa |
| | GVS | 112,7 ± 25 Aa | 90,3 ± 16,4 Aab | 121,0 ± 8,9 Aa |
| | GVSM | 96 ± 17,2 Aa | 119,7 ± 25,1 Aa | 119,2 ± 18,1 Aa |
| Frequência cardíaca (bpm) | GC | 218 ± 11,2 Aa | 218 ± 13,1 Aa | 200 ± 14,3 Aa |
| | GVS | 212 ± 18,7 Aa | 202 ± 43,1 Aab | 126 ± 77,2 Ab |
| | GVSM | 213 ± 17,8 Aa | 210 ± 15,1 Aab | 179 ± 30,8 Ab |

Legenda: Letras maiúsculas: comparam grupos em cada momento. Letras minúsculas: comparam momentos em cada grupo. Médias seguidas de letras iguais não diferem significativamente ($p > 0,05$). Valores normais: Temperatura (°C) 35,9-37,5; Frequência respiratória (mpm) 70-120; Frequência cardíaca (bpm) 215-450 (Valores de referência do Biotério Central da Universidade do Oeste Paulista - UNOESTE). M1: 30 minutos após inoculação do veneno; M2: 6 horas após inoculação do veneno; M3: 24 horas após inoculação do veneno. * Membro que recebeu veneno.

Na avaliação do grau de sedação, os animais do grupo GVS apresentaram grau de sedação moderada nos momentos M2 e M3 e os animais do grupo GVSM no momento M2, sendo estatisticamente significativo ($p < 0,05$) no

momento M2 dos dois grupos quando comparado com o grupo controle e não houve diferença estatística significativa na comparação entre os dois grupos nos mesmos momentos. Na comparação dos momentos dentro do mesmo grupo observou-se que o grau de sedação foi mais intensa seis horas após administração do veneno crotálico para os dois grupos (Tabela 2).

Em relação à locomoção, clinicamente, os animais apresentaram diminuição da mesma imediatamente após inoculação do veneno. No momento M2, nos grupos GVS e GVSM houve diminuição da locomoção significativa ($p < 0,05$) em relação ao grupo controle e progrediu para ataxia e decúbito lateral. Quando comparados os grupos GVS e GVSM, não foi observada diferença estatística significativa em nenhum dos momentos avaliados, mas clinicamente os animais do grupo GVSM recuperaram-se melhor no M3 em relação ao mesmo momento do grupo GVS (Tabela 2).

TABELA 2 – Valores das medianas e valores máximos e mínimos das variáveis, grau de sedação e locomoção segundo grupos e momentos dos animais dos grupos controle (GC), grupo veneno + soro (GVS) e grupo veneno + soro + *Mikania glomerata* (GVSM)

| Variáveis | Grupos | Momentos | | |
|------------------|--------|------------------|-------------------|------------------|
| | | M1 | M2 | M3 |
| Grau de sedação* | GC | 1,0 (1,0;1,0) Aa | 1,0 (1,0;1,0) Aa | 1,0 (1,0;1,0) Aa |
| | GVS | 1,0 (1,0;1,0) Aa | 2,0 (1,0;2,0) Bab | 1,5 (1,0;2,0) Aa |
| | GVSM | 1,0 (1,0;1,0) Aa | 2,0 (2,0;2,0) Bb | 1,0 (1,0;1,0) Aa |
| Locomoção* | GC | 1,0 (1,0;1,0) Aa | 1,0 (1,0;1,0) Aa | 1,0 (1,0;1,0) Aa |
| | GVS | 1,0 (1,0;1,0) Aa | 2,0 (1,0;2,0) Bb | 1,0 (1,0;2,0) Aa |
| | GVSM | 1,0 (1,0;1,0) Aa | 2,0 (1,0;2,0) Bb | 1,0 (1,0;1,0) Aa |

LEGENDA: Letras maiúsculas: comparam grupos em cada momento. Letras minúsculas: comparam momentos em cada grupo. Médias seguidas de letras iguais não diferem significativamente ($p > 0,05$). *Grau sedação: 1-leve (levanta-se quando estimulado), 2-moderada (reage a estímulos, mas permanece em decúbito), 3-grave (não reage a estímulos). *Locomoção: 1-presente, 2-ausente. M1: 30 minutos após inoculação do veneno; M2: 6 horas após inoculação do veneno; M3: 24 horas após inoculação do veneno.

O tempo de coagulação se alterou apenas em dois animais sendo um animal do grupo GVS momento M1 e um animal do grupo GVSM momento M3, desta forma não houve diferença significativa entre momentos para cada grupo nem entre grupos para cada momento.

6 DISCUSSÃO

O edema moderado observado em maior intensidade nos animais do grupo GVS no M2 em relação ao mesmo momento grupo GVSM, aparece em decorrência da ação direta do veneno sobre a musculatura, principalmente relacionada à ação da crotoxina e fosfolipase A₂ e ação de uma série de substâncias liberadas na fase aguda inflamatória como interleucinas, bradicinina e histamina (KINI; EVANS, 1989; BARRAVIERA, 1994). A ação miotóxica pode provocar mialgias local e generalizada o que pode acarretar em mioglobinúria e urina cor de “coca-cola” (AZEVEDO MARQUES et al., 1985). Os resultados observados neste estudo concordam com uma série de autores que também citam o aparecimento de edema que pode variar de intensidade leve a moderado. Hudelson e Hudelson, (1995) citam a ação miotóxica local com presença de necrose de coagulação e necrose miolítica em camundongos. Collicchio et al. (2002) e Nogueira et al. (2007) também citam o aparecimento de edema discreto do membro acometido de cães. Nos animais do grupo GVSM o edema observado foi menos intenso no M2, o que mostra a ação da *Mikania glomerata* concordando com os resultados de Maiorano et al. (2005) que relatam, em estudo “*in vivo*”, que o extrato de *Mikania glomerata* pode inibir cerca de 40% da intensidade do edema em camundongos *Swiss*.

Os transtornos de locomoção, ataxia e sedação aparecem em decorrência da ação neurotóxica do veneno principalmente das frações crotoxina e crotamina que atuam tanto em sistema nervoso central como periférico (ARAÚJO; BELLUOMINI, 1960-62; AZEVEDO MARQUES et al., 1985; BARRAVIERA, 1994; VIEIRA et al., 2006). Os resultados deste estudo concordam com os achados de Belluomini et al., (1982), que relatam, em bovinos, dificuldade de locomoção e de ficar em estação após 2 a 6 horas da inoculação do veneno crotálico. Lago et al. (2000) que realizaram envenenamento experimental crotálico também em bovinos relatam dificuldades de locomoção, incoordenação motora e decúbito esternal após 10 horas da inoculação do veneno. Collicchio et al. (2002) relatam o caso de uma cadela gestante intoxicada pela picada da serpente *Crotalus durissus terrificus* que apresentou dificuldades de se manter em estação duas horas após o acidente. Nogueira e Sakate, (2006) e Nogueira et al. (2007) também relatam ataxia e sedação leve nos animais após quatro horas e seis horas respectivamente da

administração do veneno crotálico. Segundo Maiorano et al. (2005), em estudos realizados com o extrato desidratado da raiz de *Mikania glomerata*, foi observada a capacidade da planta em inibir 100% da atividade fosfolipase A₂ do veneno crotálico. Nossos resultados diferem dos resultados de Maiorano et al. (2005) e não mostram diferenças significativas entre os grupos GVS e GVSM, provavelmente pela diferença da parte da planta utilizada para preparo do extrato e tratamento dos animais.

A diminuição da temperatura observada pode estar relacionada ao quadro de choque que pode se instalar devido à liberação de agentes vasoativos na anafilaxia. A síndrome determina distúrbio circulatório caracterizado por hipotensão arterial ou artério-venosa comprometendo a perfusão tecidual (RAISER, 2002). Lago et al. (2000) relatam diminuição da temperatura 20 horas após a inoculação do veneno em bovinos. Nogueira e Sakate, (2006) relatam diminuição significativa da temperatura 6 a 24 horas após intoxicação experimental pelo veneno crotálico em cães tratados com soro antiofídico botrópico-crotálico. Em outro trabalho envolvendo cães tratados com soro antiofídico, fluidoterapia e alcalinização da urina, os autores relatam que a avaliação da temperatura não mostrou nenhuma diferença significativa entre momentos para cada grupo nem entre grupos para cada momento (NOGUEIRA et al., 2007).

Dispnéia, diminuição das freqüências respiratória e cardíaca observadas principalmente nos animais do grupo GVS no momento M2, relacionam-se às ações miotóxica e neurotóxica do veneno crotálico e concordam com os achados de Amaral et al. (1991) que relatam insuficiência respiratória em três pacientes humanos que apresentaram dispnéia e taquipnéia, sendo que dois pacientes evoluíram para insuficiência respiratória aguda, necessitando de intubação. Jorge e Ribeiro, (1992) relatam quadro de insuficiência respiratória aguda que necessitou intubação e ou traqueostomia em três pacientes, sendo duas delas crianças. Em estudo realizado por Soeresen et al. (1995) com veneno crotálico em bovinos, os animais apresentaram diminuição na freqüência cardíaca. Outro trabalho com cães também relata a diminuição da freqüência cardíaca quatro horas após inoculação experimental de veneno crotálico em todos os grupos estudados, apesar dos valores estarem dentro da normalidade para a espécie (Nogueira e Sakate, 2006). Nogueira et al. (2007), em intoxicação experimental, relatam a diminuição das freqüências respiratória cardíaca em cães 6 horas após inoculação

do veneno, mantendo-se baixa até 24 horas e 48 horas respectivamente nos animais intoxicados com veneno e também nos animais intoxicados e tratados com soroterapia, fluidoterapia e alcalinização da urina. Os animais do grupo GVSM mantiveram a frequência respiratória dentro da normalidade e tiveram uma menor diminuição da frequência cardíaca comprovando a ação da *Mikania glomerata* sobre as ações miotóxica e neurotóxica do veneno crotálico concordando com os achados de Maiorano et al. (2005) que mostram a eficiência do extrato aquoso de *Mikania glomerata* para inibir a ação da PLA₂ do veneno crotálico.

7 CONCLUSÃO

Os animais do grupo GVSM apresentaram sinais clínicos mais estáveis em relação ao grupo GVS, seis horas após inoculação do veneno, em temperatura, frequência respiratória e cardíaca, grau de sedação e edema nos membros posteriores direito e esquerdo, o que não foi observado nos demais momentos, sendo necessários mais estudos com outras espécies mais sensíveis ao veneno da serpente *Crotalus durissus terrificus*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMARAL, C. F. S. et al. Tourniquet ineffectiveness to reduce the severity of envenoming after *Crotalus durissus* sp snake bite in Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil. **Toxicon**, v. 1998, n. 36, p. 805-808.

AMARAL, C. F. S.; MAGALHÃES, R. A.; REZENDE, N. A. Comprometimento respiratório secundário e acidente ofídico crotálico. **Rev. Inst. Méd. Trop.**, v. 33, p. 251-255, 1991

AMARAL, C. F. S.; REZENDE, N. A.; PEDROSA, T. M. G. Afibrinogenemia secundária e acidente ofídicos crotálico (*Crotalus durissus terrificus*). **Rev. Inst. Méd. Trop.**, v. 30, p. 288-292, 1988.

AMARAL, C. F. S.; REZENDE, N. A.; SILVA, A. O. Insuficiência renal aguda secundária a acidentes ofídicos botrópico e crotálico: Análise de 63 casos. **Rev. Inst. Méd. Trop.**, v. 28, p. 220-227, 1986.

AMARAL, C. F. S.; SILVA, O. A.; LOPEZ, M. Afibrinogenemia following snake bite (*Crotalus durissus terrificus*). **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 29, p. 1453-1455, 1980.

AMORIM, M. F.; MELLO, R. F.; SALIBA, F. Envenenamento botrópico e crotálico. **Mem. Inst. Butantan**, v. 23, p. 63-108, 1951.

ARAÚJO, P.; BELLUOMINI, H. E. Toxicidade de venenos ofídicos. I. Sensibilidade específica de animais domésticos e de laboratório. **Mem. Inst. Butantan**, v. 30, p. 143-156, 1960-62.

AZEVEDO MARQUES, M. M. et al. Rattlesnake bites. Clinical features and complementary tests. **Mem. Inst. Butantan**, v. 52, p. 27-30, 1990.

AZEVEDO MARQUES, M. M.; HERING, S. E.; CUPO, P. Evidence that *Crotalus durissus terrificus* (South American rattlesnake) envenomation in humans causes myolysis rather than hemolysis. **Toxicon.**, v. 11, p. 1163-1168, 1987.

AZEVEDO-MARQUES, M. M.; CUPO, P.; COIMBRA, T. M. Myonecrosis, myoglobinuria and acute renal failure induced by South American rattlesnake (*Crotalus durissus terrificus*) envenomation in Brazil. **Toxicon.**, v. 23, p. 631-636, 1985.

BARRABIN, H. et al. Isolation and characterization of gyroxin from *Crotalus durissus terrificus* venom. In: ROSENBERG, P. **Toxins animals plant and microbial**. New York: Pergamon Press, 1978.

BARRAVIERA, B. Acidentes por serpentes dos gêneros "*Crotalus*" e "*Micrurus*". In: BARRAVIERA, B. (Coord.). **Venenos Animais: uma visão integrada**. Rio de Janeiro: Publicações Científicas, 1994.

_____. **Alterações hepáticas no envenenamento ofídico**. 154 f. Tese (Livre-Docência) - Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 1993.

_____, et al. A retrospective study of 40 victims of *Crotalus* snake bites. Analysis of the hepatic necrosis observed in one patient. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 22, p. 5-12, 1989.

_____. et al. Liver dysfunction in patients bitten by *Crotalus durissus terrificus* (Laurent, 1768) Snakes in Botucatu (State of São Paulo, Brazil). **Rev. Inst. Med. Trop.**, v. 37, p. 63-69, 1995.

BATINA, M. DE F. et al. Inhibition of the lethal and myotoxic activities of *Crotalus durissus terrificus* venom by *Tabernaemontana catharinensis*: identification of one of the active components. **Rev. Planta Médica**, v. 66, p. 424-428, 2000.

BELLUOMINI, H. E. Conhecimentos sobre as serpentes brasileiras e medidas de prevenção de acidentes. **Rev. Bras. Saúde Ocup.**, v. 12, p. 82-96, 1984.

BELLUOMINI, H. E. et al. Serum Therapy of cattle experimentally poisoned with rattlesnake venom, **Inst. Butantan.**, p. 93-95, 1983.

BELLUOMINI, H. E. et al. Symptomatology der experimentellen Crotalustoxin-Vergiftung bei Rindern, die einer spezifischen Serumtherapie unterworfen wurden. **Dtsch. Tierärztl. Wschr.**, v. 89, p. 444-448, 1982.

BICUDO, P. L. Acidentes ofídicos em Medicina Veterinária. In: BARRAVIERA, B. (Coord.). **Venenos animais: uma visão integrada**. Rio de Janeiro: Publicações Científicas, 1994.

BRASIL. Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde. **Manual de diagnóstico e tratamento de acidentes por animais peçonhentos**. 2. ed. Brasília, 2001.

_____. Secretaria Nacional de Ações Básicas de Saúde. **Acidentes ofídicos**. Brasília. (Contribuição ao Estudo da Morbidade, 47/48), 1990.

_____. **Sistema de Informação de Agravos de Notificações**. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/saude/visualizar_texto.cfm?idtxt=21429>, 2006. (Acessado: Fevereiro 16, 2007,

BUCARETCHI, F.; HERRERA, S. R. F.; HYSLOP, S. Snakebites by *Crotalus durissus ssp* in Campinas. **Rev. Inst. Med. Trop.**, v. 44, n. 133-138, 2002.

CHANG, C. C.; TSENG, K. H. Effects of crotamina, a toxin of South American rattlesnake venom on the sodium channel of murine skeletal muscle. **Br. J. Pharmacol.**, v. 63, p. 551-559, 1978.

CHEYMOL, J. et al. comparison of the neuromuscular action of crotamine and the venom of *Crotalus durissus terrificus* var. *crotaminicus*. 1. Neuromuscular preparations in situ. **Toxicon.**, v. 9, p. 279-286, 1971.

COLLICCHIO, R. C. et al. Relato de caso: Alterações clínicas e laboratoriais conseqüentes à picada de cascavel (*Crotalus durissus terrificus*) em uma cadela gestante. **Clínica Veterinária**, v. 40, p. 45-48, 2002.

COSTA, P. L.; GARCIA DE LIMA, E.; LAURE, C. J. Rattlesnake venom: Action upon erythrocytes and leucocytes of rats. *Acta Physiol. Pharmacol. Latinoam.*, v. 39, p. 359-373, 1989.

CURI, P. R. **Metodologia e Análise da Pesquisa em Ciências Biológicas**. Botucatu: Ed. Tipomic, 1997. 263p.

DAL PAI, V.; NETO, H. S. Ação dos venenos sobre os tecidos animais. In: BARRAVIERA, B. **Venenos animais**. Uma visão integrada. São Paulo: Publicações Científicas, 1994.

DEMPSTER, D. W.; GOPALAKRISHNAKONE, P.; HAWGOOD, B. J. Intramitochondrial calcium deposits associated with muscle necrosis induced by crotoxin. **J. Physiol.**, London, V. 300, p. 21, 1980.

DI STASI, L. C. Plantas medicinais da medicina popular no município de Botucatu-SP. In: SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL, 13. Fortaleza. **Livro de Resumos...** . Fortaleza: CNPq. Res, 1994. 320.

FERREIRA L. A. F. et al. Antivenom and biological effects of ar-turmerone isolated from *Curcuma longa* (Zingiberaceae). **Toxicon.**, 1992. 30: 1211-18.

FONSECA, M. G. et al. Local edema and hemorrhage caused by *Crotalus durissus terrificus* envenoming evaluated by magnetic resonance imaging. **J. Venom. Anim. Toxins**, v. 8, 2002.

FREITAS, F. G. et al. Toxicidade aguda e propriedades antiofídicas do extrato aquoso de *Casearia grandiflora* (Flacourtiaceae): atividades fosfolipásica A₂, miotóxica e letal de peçonhas de *Bothrops moojeni* e *Bothrops neuwiedi*. **Biosci J.**, v. 21, p. 95-103, 2005..

HUDELSON, S.; HUDELSON, P. Pathophysiology of snake envenomization and evaluation of treatments-Part II. **Comp. Cont. Educ.**, v. 17, p. 1035-40, 1995.

JAIN, N. C. **Essentials of Veterinary Hematology**. 1.ed. Philadelphia: Lea & Febiger, 1993. 417 p.

JIM, J.; SAKATE, M. Biologia das serpentes. In: BARRAVIERA, B. (Coord.). **Venenos Animais: uma visão integrada**. Rio de Janeiro: Publicações Científicas, 1994.

JORGE, M. T.; RIBEIRO, L. A. Acidentes por serpentes peçonhentas do Brasil. **Rev. Ass. Méd. Bras.**, v. 36, p. 66-77, 1990.

_____. Epidemiologia e quadro clínico do acidente por cascavel sul-americana (*C. durissus*). **Rev. Inst. Méd. Trop.** São Paulo, v. 34, p. 347-354, 1992.

_____. Incoagulabilidade sanguínea no acidente crotálico. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 21, p. 121, 1988.

KELEN, E. M. A.; ROSENFELD, G.; NUDEL, F. Hemolytic activity of animal venoms. II. Variation in relation to erythrocyte species. **Mem. Inst. Butantan**, v. 30, p. 133-42, 1960-62.

KINI, R. M.; EVANS, H. J. A model to explain the pharmacological effects of snake venom phospholipases A2. **Toxicon**, v. 27, p. 613-35, 1989.

LAGO, L. A.; FERREIRA, P. M. ;FACURY FILHO, E. J. Quadro clínico do envenenamento crotálico experimental em bovinos (*Crotalus durissus terrificus* – crotamina positivo). **Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.**, v. 37, p. 312-15, 2000.

LEITE, M. G. R. et al. Estudo farmacológico comparativo de *Mikania glomerata* Sprengel (guaco), *Justicia pectoralis* Jacq (anador) e *Torresea cearensis* (cumaru). **Rev. Bras. Farm.**, v. 74, p. 12-15,1993.

MAGALHÃES, R. A.; RIBEIRO, M. M. F.; REZENDE, N. A. Rabdomiólise secundária a acidente crotálico (*Crotalus durissus terrificus*). **Rev. Inst. Med. Trop.**, v. 28, p. 228-233,1986.

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

MANCIN, A. C.; SOARES, A. M.; ANDRIÃO-ESCARSO, S. H. The analgesic activity of crotamine a neurotoxin from *Crotalus durissus terrificus* (South American rattlesnake) venom: a biochemical and pharmacological study. **Toxicon**, v. 36, p. 1927-1937, 1998.

MARTINS, A. M. et al. Determination of *Crotalus durissus cascavella* venom components that induced renal toxicity in isolated rat kidneys. **Toxicon**, v. 40, n. 1165-1171, 2002.

MELO, P. A. et al. Inhibition of the myotoxic and hemorrhagic activities of crotalid venoms by *Eclipta prostrata* (Asteraceae) extracts and constituents. **Toxicon**, v. 32, p. 595-603,1994.

MONTEIRO, H. S.; SILVA, I. M.; FONTELES, M. C. Actions of *Crotalus durissus terrificus* venom and crotoxin of the isolated rat kidney. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 34, p. 1347-1352, 2001.

MURTAUGH, R. T.; KAPLAN, P. M. **Veterinary emergency and critical care medicine**. Missouri: Mosby year book., 1992. 685.

NISHIOKA, S. A. et al. South American rattlesnake bite and soft-tissue infection: report of a case. **Rev Soc Bras Med Trop. incl. Trop. Dis.**, v. 33, p. 401-402, 2000.

NOBLE, G. K.; SCHMIDT, A. The structure function on the facial and labial pits of snakes. **Proc. Am. Philos. Soc.**, v. 77, p. 263-288, 1937.

NOGUEIRA, R. M. B.; SAKATE, M. Clinical and hematological alterations in dogs during experimental envenomation with *Crotalus durissus terrificus* venom and treated with antiophidic serum. **J. Venom. Anim. Toxins incl. Trop. Dis.**, v. 12, p. 285-296, 2006.

_____. Experimental envenomation with *Crotalus durissus terrificus* venom in dogs treated with antiophidic serum-Part II: laboratory aspects, electrocardiogram and histopathology. **J. venom. Anim. Toxins**, v. 13, p. 800-10, 2007.

_____. xperimental envenomation with *Crotalus durissus terrificus* venom in dogs treated with antiophidic serum – part I: clinical evaluation, hematology and myelogram. **J. Venom. Anim. Toxins incl. Trop. Dis.**, v. 13, p. 800-810, 2007.

OKAMOTO, M.; PRADO-FRANCESCHI, J. P.; RIBEIRO, L. A. Induction of tolerance to crotoxin in mice. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 265, p. 41-46, 1983.

OLIVEIRA, F. et al. Isolamento e identificação de componentes químicos de *Mikania glomerata* Sprengel e de *Mikania laevigata* Schutz Bip. ex Baker. **Rev. Farm. Bioquim. Univ.**, v. 20, p. 169-183, 1984.

PANIZZA, S. **Plantas que curam**: cheiro de mato. São Paulo: IBRASA, 1997.

PEREIRA, N. A. et al. Pharmacological screening of plants recommended by folk medicine as anti-snake venom. IV. Proction against jararaca venom by isolated constituents. **Planta Med.**, Stuttgart, v. 60, p. 99- 100, 1994.

PEREZ, O. A. et al. Intoxicación por veneno de *crotalus durissus terrificus* (cascavel) en ratas. **Acta toxicol. Argent.**, v. 5, p. 71-74, 1997.

PINHO, F. M. O.; PEREIRA, I. D. Ofidismo. **Rev. Ass. Med. Brasil.**, v. 47, p. 24-29, 2001.

PUIG, J.; VILAFRANCA, M.; FONT, A. Acute intrinsic renal failure and blood coagulation disorders after a snakebite in a dog. **J. Small Anim. Pract.**, v. 36, p. 333-336, 1995.

RAISER, A. G.; ANDRADE, S. F. **Manual de Terapêutica Veterinária**. São Paulo: Roca, 2002.

RIBEIRO, L. A. et al. Óbitos por serpentes peçonhentas no Estado de São Paulo: avaliação de 43 casos, 1988/93. **Rev. Ass. Med. Brasil.**, v. 44, p. 312-318,1998.

ROODT, A. R.; DOLAB, J. A.;SEGRE, L. Fisiopatologia y diagnóstico del ataque por serpientes venenosas. Una breve actualización. **Rev. Med. Vet.**, v. 77, p. 64-71, 1996.

ROSENFELD, G. Acidentes por animais peçonhentos. In: VERONESI, R. **Doenças infecciosas e parasitárias**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1991

ROSENFELD, G.; KELEN, E. M. A.; NUDEL, F. Hemolytic activity of animal venoms. I. Classification in different types and activities. **Mem. Inst. Butantan**, v. 30, p. 103-116,1960-62.

SAKATE, M. Terapêutica das intoxicações. In: ANDRADE, S. F. **Manual de Terapêutica Veterinária**. São Paulo: Roca, 2002.

SILVA, R. A. **Pharmacopeia dos Estados Unidos do Brasil**. São Paulo: Nacional, 1929.

SLOTTA, K.; BORCHET, P. Sobre o fator hemolítico dos venenos ofídicos. **Mem. Inst. Butantan**, São Paulo, v. 26, p. 297-309,1954.

SOERENSEN, B. **Animais peçonhentos**. São Paulo: Atheneu, 1990. 138 p.

SOERENSEN, B.; NETO, L. Z.; OLIVEIRA, A. M. Aspecto clínico e laboratorial do envenenamento botrópico e crotálico em bovinos. **Unimar Ciências**, São Paulo, v. 4, p. 28-335, 1995.

STORER, T. I. et al. Zoologia geral. 8-6.ed. São Paulo: Companhia Editora Nacional, 2002.

VENEZIANI, R. C. S.; CAMILO, D.; OLIVEIRA, R. Constituents of *Mikania glomerata* Sprengel. **Biochem. Syst. Ecol.**, Oxford, v. 27, p. 99-102, 1999.

VIEIRA, C. A. et al. Ação de vários agentes sobre o efeito paralisante dos membros posteriores induzido pela crotamina em camundongos. **Biosc J.**, v. 22, p. 125-32, 2006.

VILEGAS, J. H. Y.; MARCHI, E.; LANÇAS, F. M. Extration of low-polarity compounds (with amphasis on coumarin and Kaurenoic acid) from *Mikania glomerata* ('guaco') leaves. **Phytochem. Anal.**, Chischester, p. 266-270, 1997.

VITAL BRAZIL, O. Neurotoxins from the South American Rattlesnake. **Venon. J. Formos. Med. Assoc.**, v. 71,p. 394-400, 1972.

_____. Pharmacology of crotamine. **Mem. Inst. Butantan**, v. 52, p. 23-24, 1990.

_____ et al. Pharmacology of crystalline crotoxin. III Cardio-vascular and respiratory effects of crotoxin and *Crotalus durissus terrificus* venom. **Mem. Inst. Butantan**, v. 33, p. 993-1000, 1966.