



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA

**Avaliação do potencial antiofídico e genotóxico da
isohemigossipolona, uma naftoquinona isolada de *Pachira aquatica* (Aubl.)**

Aluno: Sâmela Alves Pereira Batista Vieira

Orientador (a): Dra. Maria Inês Homsí Brandeburgo

UBERLÂNDIA-MG

2010



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA

PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA

**Avaliação do potencial antiofídico e genotóxico da isohemigossipolona,
uma naftoquinona isolada de *Pachira aquatica* (Aubl.)**

Aluno: Sâmela Alves Pereira Batista Vieira

Orientador (a): Dra. Maria Inês Homsí Brandeburgo

**Dissertação apresentada à
Universidade Federal de
Uberlândia como parte dos
requisitos para a obtenção do
Título de Mestre em Bioquímica.**

UBERLÂNDIA-MG

2010



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA

**Avaliação do potencial antiofídico e genotóxico da
isohemigossipolona, uma naftoquinona isolada de *Pachira aquatica* (Aubl.)**

Aluno: Sâmela Alves Pereira Batista Vieira

Comissão Examinadora

Presidente: Dra. Maria Inês Homsí Brandebugo

Examinadores: Dra. Marcia Helena Borges

Dr. Fábio de Oliveira

Data da defesa: 30/07/2010

As sugestões da Comissão Examinadora e as Normas PGGB para o formato da
Dissertação/Tese foram contempladas.

Dra. Maria Inês Homsí Brandebugo

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

- V65a Vieira, Sâmela Alves Pereira Batista, 1982-
Avaliação do potencial antiofídico e genotóxico da isohemigossipolona,
uma naftoquinona isolada de *Pachira aquatica* (Aubl.) [manuscrito] /
Sâmela Alves Pereira Batista Vieira. - 2010.
118 f. : il.
- Orientadora: Maria Inês Homsí Brandeburgo.
- Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa
de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica.
Inclui bibliografia.
1. Cobra venenosa - Veneno - Teses. 2. Plantas medicinais - Teses. I.
Brandeburgo, Maria Inês Homsí. II. Universidade Federal de Uberlândia.
Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica. III. Título.

CDU: 615.99:598.126

Dedicatória

Ao soberano Deus,

Minha fortaleza, o Deus da minha salvação

**Que me deu força, paciência, capacidade para enfrentar
todos os desafios durante todos estes anos.**

Aos meus pais

Paí e Mãe, vocês são um exemplo de determinação, paciência, carinho, sei que se cheguei até aqui é devido aos seus incentivos e valiosos princípios. Amo muito vocês. Palavras são poucas para expressar meu carinho, amor e gratidão.

Ao meu querido esposo Fabrício, pela paciência, compreensão, amor, carinho, ajuda e compreensão. Você realmente torna meus dias mais alegres e me proporciona momentos felizes.

Agradecimentos

- ❖ À professora e orientadora Dra. Maria Inês Homsí Brandeburgo pela oportunidade, orientação, dedicação, paciência e incentivo ao longo de tempo.
- ❖ À professora Dra. Vanderlúcia Fonseca de Paula pela colaboração com o presente trabalho.
- ❖ À professora Dra. Amélia Hamaguchi pelo apoio a esta pesquisa e valiosos conselhos, não apenas na área científica, mas também na área pessoal.
- ❖ À professora Veridiana pelo valioso auxílio em nossos trabalhos e também pela preocupação com a qualidade dos trabalhos do laboratório.
- ❖ Ao professor Mário Antônio Spanó por disponibilizar o laboratório de Mutagênese para os ensaios de genotoxicidade.
- ❖ Á minha co-orientadora, M.sc. Mirian Machado Mendes, exemplo de determinação, preocupação com a pesquisa e auxílio nos experimentos, você é um exemplo de pesquisadora.
- ❖ À minha amiga Mirian, pela alegria, amizade, serenidade, sensibilidade, paciência, nunca poderei te agradecer o suficiente, mas mesmo assim obrigada por tudo durante quatro anos.
- ❖ Ao Alexandre Azenha Alves de Rezende pelo valioso auxílio nos experimentos. Agradecer é muito pouco diante da sua ajuda.

- ❖ A minha amiga Sarah pela amizade, alegria e ajuda nos experimentos. Sua alegria e zica são contagiantes.

- ❖ Aos colegas de laboratório Dayane, Débora, Letícia, Francis, Renata, Mário Sérgio, Lino, David, Lamartine e Guilherme.

- ❖ Aos funcionários do Instituto, Tianinha, Gerson e Dona Nenzinha.

- ❖ À CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior do Ministério da Educação) e à Universidade Federal de Uberlândia pelo apoio financeiro.

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Química de Proteínas e Produtos Naturais e Laboratório de Mutagênese da Universidade Federal de Uberlândia, em colaboração com o Laboratório de Produtos Naturais da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia

Sumário

Apresentação.....	1
Capítulo I- Fundamentação Teórica.....	3
1 Introdução.....	4
1.1 Plantas Medicinais e Compostos Isolados.....	4
1.1.1 Quinonas.....	5
1.1.2 <i>Pachira aquatica</i>	8
1.2 As serpentes.....	9
1.3 Constituição da peçonha.....	12
1.3.1 Metaloproteases.....	12
1.3.2 Serinoproteases	15
1.3.3 Fosfolipases A ₂	17
1.4 Soroterapia.....	19
1.5 Teste de detecção de mutação e recombinação somática(SMART).....	21
2. Referências Bibliográficas.....	24
Capítulo 2- Propriedades antiofídicas de uma naftoquinona isolada de <i>Pachira aquatica</i> (Aubl.)	41
Resumo.....	42
Abstract.....	43
1- Introdução.....	44
2- Materiais e Métodos.....	46
2.1 Obtenção da peçonha de <i>Bothrops pauloensis</i> e toxina isolada de <i>Bothrops moojeni</i> , BthMP.....	46
2.2 Animais.....	46
2.3 Obtenção do extrato bruto de <i>Pachira aquatica</i> e isolamento da naftoquinona.....	46

2.4	Ensaio de neutralização.....	47
2.4.1	Atividade coagulante.....	47
2.4.2	Atividade fosfolipase A ₂	48
2.4.3	Atividade proteolítica sobre o fibrinogênio.....	48
2.4.4	Atividade hemorrágica.....	48
2.4.5	Atividade miotóxica.....	48
2.4.6	Ensaio anticoagulantes.....	49
2.5	Análise estatística.....	49
3-	Resultados.....	49
4-	Discussão e Conclusão.....	51
5-	Referências Bibliográficas.....	55
	Capítulo 3- Avaliação do potencial genotóxico do composto isolado de	
	<i>Pachira aquatica</i> (Aubl.).....	72
	Resumo.....	74
	Abstract.....	75
1-	Introdução.....	76
2-	Materiais e Métodos.....	78
2.1	Agentes químicos.....	78
2.2	Linhagens de moscas, cruzamentos e tratamentos.....	78
2.3	Análise estatística.....	79
3-	Resultados e Discussão.....	80
4-	Referências Bibliográficas.....	82
	Conclusão Geral.....	94
	Anexos.....	95

Lista de Figuras

Capítulo 1

Figura 1- Estrutura química das três principais classes de quinonas: benzoquinona, naftoquinona e antraquinona.....	5
Figura 2- Estrutura química do lapachol.....	7
Figura 3- <i>Pachira aquatica</i>	8
Figura 4- A - Ilustração da parte aérea e da raiz de <i>P. aquatica</i> . B - Estrutura química do composto isolado da planta <i>Pachira aquatica</i>	9
Figura 5- <i>Bothrops pauloensis</i>	10
Figura 6- Diagrama esquemático da divisão de Metaloproteases de peçonhas de serpentes.....	14
Figura 7- Estrutura do fibrinogênio.....	16
Figura 8- Efeitos locais de toxinas de serpentes da família Viperidae.....	19
Figura 9- Aspectos fenotípicos dos descendentes do cruzamento ST e HB.....	23

Capítulo 2

- Figura 1-** Estrutura química da naftoquinona isolada de *Pachira aquatica*.....65
- Figura 2-** Neutralização da atividade fosfolipase A₂ da peçonha de *Bothrops pauloensis* pelo extrato bruto e naftoquinona isolada de *Pachira aquatica*.....67
- Figura 3-** Inibição das proteases de *B. pauloensis* pela naftoquinona ISO.....68
- Figura 4-** Neutralização da atividade hemorrágica da peçonha de *Bothrops pauloensis* e de BthMP pelo extrato bruto de *Pachira aquatica* e naftoquinona isolada.....69
- Figura 5-** Neutralização da miotoxicidade da peçonha de *Bothrops pauloensis* pela naftoquinona ISO.....70
- Figura 6-** Neutralização de ensaios anticoagulantes da peçonha de *Bothrops pauloensis* pela naftoquinona isolada de *Pachira aquatica*.....71

Capítulo 3

- Figura 1-** Estrutura química de ISO.....87
- Figura 2-** Distribuição do tamanho (número de células) de manchas mutantes em asas de descendentes trans-heterozigotos marcados (MH) provenientes do cruzamento padrão (ST).....91
- Figura 3-** Distribuição do tamanho (número de células) de manchas mutantes em asas de descendentes trans-heterozigotos marcados (MH) provenientes do cruzamento de alta bioativação (HB).....92

Lista de Tabelas

Capítulo 2

Tabela 1- Neutralização da atividade coagulante da peçonha bruta de <i>Bothrops pauloensis</i> pela natoquinona.....	66
---	----

Capítulo 3

Tabela 1- Larvas sobreviventes expostas a diferentes concentrações de apenas ISO no Teste para Detecção de Mutação e Recombinação Somática em <i>D. melanogaster</i> e comparação com grupos controles (água ultrapura e DXR).....	88
---	----

Tabela 2- Teste de detecção de manchas (SMART) em heterozigotos marcados (MH) em progênies de cruzamento padrão (ST) após tratamento crônico das larvas de <i>Drosophila</i> com ISO e doxorubicina.....	89
---	----

Tabela 3- Teste de detecção de manchas (SMART) em heterozigotos marcados (MH) em progênies de cruzamento de alta bioativação (HB) após tratamento crônico das larvas de <i>Drosophila</i> com ISO e doxorubicina.....	90
--	----

Lista de Abreviaturas

DMC- dose mínima coagulante

DMH- dose mínima hemorrágica

DXR- doxorubicina

EB- extrato bruto de *Pachira aquática*

EM- espectometria de massa

*flr*³- flare

HB- cruzamento de alta bioativação

ISO- naftoquinona isolada de *Pachira aquatica*

MH- trans-heterozigoto marcado

mwh – múltiple wing hairs

OMS- Organização Mundial da Saúde

PLA₂- Fosfolipase A₂

SBH- Sociedade Brasileira de Herpetologia

SMART- teste para detecção de mutação e recombinação somática

ST- cruzamento padrão

SVMP- metaloproteses de peçonha de serpentes

SVSP- serinoproteses de peçonhas de serpentes

SVTLE- serinoproteases de peçonhas de serpentes com ação semelhante a trombina

RMN- ressonância magnética nuclear

ROS- espécies reativas do oxigênio

Tf- Temperatura de fusão

TP- tempo de protrombina

TTPA- tempo de tromboplastina parcial ativada

Apresentação

As peçonhas de serpentes constituem ricas fontes de proteínas, as quais foram aperfeiçoadas durante o processo evolutivo para imobilizar e matar a presa, além de iniciar o processo de digestão. No Brasil, as serpentes do antigo gênero *Bothrops* são as de maior interesse médico, por serem responsáveis por aproximadamente 90% dos acidentes ofídicos. O envenenamento provocado por estas serpentes é caracterizado por uma fisiopatologia complexa que inclui efeitos locais e alterações sistêmicas.

Os efeitos locais induzidos pelas peçonhas botrópicas constituem um problema relevante por diversas razões: Desencadeiam-se muito rapidamente após a inoculação, o que dificulta a sua neutralização, se o soro antiofídico for administrado várias horas após o acidente. Afetam drasticamente o tecido muscular, os vasos sanguíneos e a pele, induzindo lesões que, com frequência, deixam sequelas. Frequentemente se complicam com infecções e em alguns casos severos, desencadeia-se uma síndrome compartimental, exigindo a cirurgia de retirada do tecido já necrosado. São difíceis de neutralizar pelos soros antiofídicos e por outros recursos terapêuticos complementares conhecidos.

Na tentativa de neutralizar os efeitos provocados pelo envenenamento ofídico, as populações rurais e indígenas de países tropicais como o Brasil, que tem difícil acesso aos tratamentos com soro antiofídico, recorrem às plantas medicinais. Há muito que as indústrias farmacêuticas utilizam metabólitos secundários isolados de plantas, como princípios ativos para síntese de novos medicamentos.

O objetivo desse trabalho foi avaliar as propriedades antiveneno de uma naftoquinona isolada de *Pachira aquática*.

A dissertação foi desenvolvida em três capítulos: **Capítulo 1** apresenta uma revisão da literatura sobre plantas e alguns princípios ativos utilizados na indústria farmacêutica, características químicas e estruturais do composto isolado de *Pachira aquatica*, aspectos epidemiológicos do envenenamento ofídico, caracterização e estrutura das principais toxinas de serpentes do antigo gênero *Bothrops*; **Capítulo 2** – Avaliação das propriedades antiofídicas da naftoquinona isolada de *Pachira aquatica*; **Capítulo 3**- Avaliação da genotoxicidade do composto isolado de *Pachira aquatica* em células somáticas da asa de *Drosophila melanogaster*.

Capítulo 1

Fundamentação Teórica

1 INTRODUÇÃO GERAL

1.1 Plantas Medicinais e Compostos Isolados

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), planta medicinal “é todo e qualquer vegetal que possui, em um ou mais órgãos, substâncias que podem ser utilizadas com fins terapêuticos ou que sejam precursores de fármacos semi-sintéticos”

A utilização das plantas medicinais, as quais contêm substâncias bio-ativas com propriedades terapêuticas, profiláticas ou paliativas, tem sido durante muitos séculos o único recurso terapêutico de muitas comunidades que as utilizam para o controle de diversas doenças e pragas (MACIEL et al., 2002; SIMÕES et al., 2007). No início de 1990 aproximadamente 80% dos países em desenvolvimento dependiam de plantas medicinais (VEIGA et al., 2005; RATES 2001).

A Organização Mundial da Saúde calcula que no século XX, 11% das 252 drogas mais vendidas em todo mundo eram oriundas de plantas. Em 1970, nos Estados Unidos, 25% das drogas eram derivadas de compostos isolados de plantas. Um dos exemplos clássicos de utilização de plantas no desenvolvimento de fármacos data de 1873, quando Friedrich Bayer isolou componentes da casca do salgueiro. A partir da descoberta e isolamento do ácido Salicílico foi possível a síntese da droga conhecida como Aspirina (PIERPOINT, 1994). Atualmente, a comercialização de fitofármacos gera uma receita da ordem de US\$ 9 a 11 bilhões/ano, sendo que mais de 25.000 plantas são usadas como fármacos ou fonte de fármacos (TYLER, 1994; RASKIN et al., 2002).

Um dos maiores desafios da química farmacêutica, bioquímica e farmacologia é o isolamento e elucidação dos componentes ativos presentes em plantas e seus mecanismos de ação (SILVA et al., 2003).

Segundo Simões e colaboradores (2007) “didaticamente os produtos químicos produzidos pelos vegetais podem ser divididos em metabólitos primários e secundários”. O metabolismo primário é responsável pela síntese de proteínas, carboidratos e lipídeos, com funções vitais bem definidas, mas que não são utilizados com grande frequência como constituintes de fármacos. Já a maioria dos compostos bioativos de plantas são produzidos pelo metabolismo secundário. Estas moléculas são encontradas em baixas concentrações,

apresentam estrutura complexa, baixo peso molecular e grande atividade biológica (SIMÕES et al., 2007). A produção destes metabólitos é decorrente de vários fatores aos quais as plantas estão expostas, como: sazonalidade, ritmo circadiano, temperatura, disponibilidade hídrica, radiação ultravioleta, disponibilidade de nutrientes, altitude, poluição atmosférica e indução por estímulos mecânicos ou ataque de patógenos (GOBBO-NETO et al., 2007).

Dentre os metabólitos secundários destacam-se os flavonóides, taninos, terpenos, esteróides e quinonas. Estes compostos são bastante visados pelas indústrias farmacêuticas para a produção de medicamentos (HABERMEHL, 1998; RASKIN et al., 2002).

1.1.1 Quinonas

“Quinonas são compostos orgânicos que podem ser obtidos a partir da degradação de fenóis. Sua principal característica é a presença de dois grupos carbonílicos que forma um sistema conjugado com pelo menos duas duplas ligações C-C” (SIMÕES et al., 2007).

As quinonas podem ser classificadas em diferentes classes, as mais conhecidas são: benzoquinona, naftoquinona e antraquinona. As benzoquinonas possuem um anel benzênico, as naftoquinonas contêm um anel naftalênico e as antraquinonas um anel antracêntrico (figura 1).

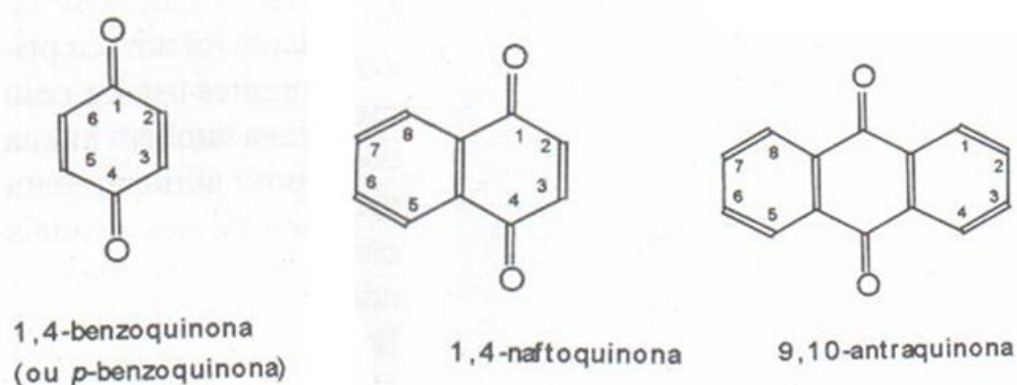


Figura 1- Estrutura química das três classes de quinonas: benzoquinona, antraquinona e naftoquinona. Fonte: SIMÕES et al., 2007.

Atualmente são conhecidas na natureza aproximadamente 1500 quinonas, encontradas em diferentes organismos, como fungos, líquens, artrópodes, bactérias, algas, vírus e principalmente em vegetais superiores (SILVA et al., 2003; SIMÕES et al., 2007).

Nas eubactérias as quinonas participam da constituição da membrana plasmática ajudando no transporte de elétrons da cadeia respiratória, dobramento de proteínas e em algumas bactérias (bactérias púrpuras e cianobactérias) atuam na fotossíntese (BADER et al., 1999; BRETON, 1997). Nos fungos as quinonas tem função específica, gerar espécies reativas de oxigênio no meio extracelular para auxiliar na degradação de lignina (MEDINA, 2008). Já nos vegetais estes compostos participam da fotossíntese e também na proteção contra agentes infecciosos (SHIBATANI et al., 1999).

Sua ampla diversidade é devida às diferentes funções que desempenham, agindo em diversos processos biológicos. Diversos estudos indicam que as quinonas apresentam importantes propriedades terapêuticas, dentre elas podemos destacar: microbicidas, tripanomicidas, viruscidas e antitumorais (SILVA et al., 2003).

As naftoquinonas pertencem à família das quinonas. São compostos dicetônicos derivados do naftaleno, normalmente possuem dois grupos carbonílicos nas posições 1,2 ou 1,4 do anel naftaleno (SIMÕES et al., 2007).

Desde a antiguidade (cerca de 4000 anos) o extrato de *Lawsonia inermis*, no Egito, e o extrato da raiz de *Alkania tinctoria*, usado na antiga Grécia (entre os séculos V e IV a.C) eram usados para tratamento de feridas, úlceras, ferimentos de guerra e picadas de serpentes (SIMÕES et al., 2007; MEDINA, 2008).

As naftoquinonas se destacam pelo seu potencial citotóxico, que é atribuído a capacidade de induzirem o estresse oxidativo através da formação intracelular de espécies reativas do oxigênio (ROS), como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), ânion radical superóxido (O_2^-) e radical hidroxila (HO^\bullet) (Da SILVA et al., 2003; SACAU et al., 2003). Ao induzirem o estresse oxidativo alguns componentes celulares podem ser danificados, podendo resultar em apoptose celular. Devido a estas características, geralmente as naftoquinonas são utilizadas como composto modelo para o desenvolvimento de drogas

anticancerígenas (Da SILVA et al., 2003; KLAUS et al., 2010; SACAU et al., 2003).

Estas moléculas e seus derivados podem ter ação antimicrobiana, pois inibem eficientemente bactérias Gram-negativas tais como *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* (MEDINA et al., 2008) e gram-positivas como *Streptococcus pyogenes*, *Staphylococcus aureus* (MACHADO et al., 2003).

Alguns compostos também apresentaram atividade antiviral, com capacidade de inibir enzimas virais como citomegalovírus, *Herpes simplex*, proteases e integrases do vírus HIV (ERTL et al.1999; STAGLIANO et al. 2006).

Dentre as naftoquinonas naturais destaca-se o lapachol (figura 2), isolado de plantas da família Bignoneaceae. Estudos realizados indicam que o estresse oxidativo provocado por ele ocorre em nível da enzima P450 redutase, promovendo cisão do DNA (KUMAGAI et al., 1997), causando lesão nas células, por isso ele é importante na formulação de drogas antineoplásicas.

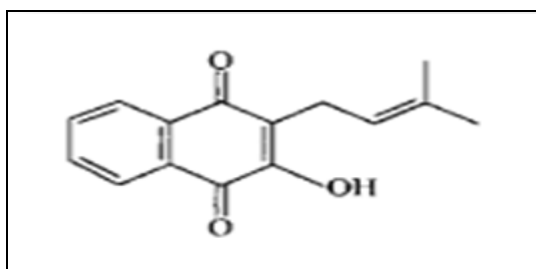


Figura 2- Estrutura química do Lapachol. Fonte: Da SILVA et al., 2002.

O Lapachol apresentou atividade antitumoral (SUBRAMANIAN et al., 1998), antimicrobiana e antifúngica (SHIBATANNI et al., 1999), anticercaricida- prevenção na penetração das cercarias de *Schistosoma mansoni* na pele (AUNSTIN et al., 1974), ação moluscicida – ação contra caramujos *Biomphalaria glabrata* (SANTOS et al., 2000), leishmanicida – atividade contra a formas amastigotas de *Leishmania braziliensis* (TEIXEIRA et al., 2001; KAYSER et al., 2000), tripanomissida- atividade contra o *Trypanosoma cruzi* causador da doença de chagas (SILVA et al. 2006; Da SILVA et al., 2008), antimalárica – ação contra eritrócitos parasitados por *Plasmodium falciparum* (ANDRADE-NETO et al.,2004), antiinflamatória (ALMEIDA, 1990) e antiulcerante (GOEL et al., 1987) além de outras atividades descritas. O lapachol foi um importante composto, pois a partir

dele foram sintetizadas outras substâncias de distintas biodinamicidades (SILVA et al., 2003).

As naftoquinonas isoladas estão presentes principalmente em vegetais das famílias Bignoneacea, Verbeacea e Bombacaceae.

1.1.2 *Pachira aquatica*

A planta *Pachira aquatica* pertence à família Bombacaceae, a qual compreende 31 gêneros e 225 espécies de plantas, que são encontradas em todo território brasileiro, principalmente em áreas tropicais, como na Paraíba. Esta família é constituída de plantas arbóreas, com troncos grossos, folhas grandes, caule com espinhos, flores grandes e vistosas e sementes oleaginosas cobertas por pêlos (OLIVEIRA et al., 2007).

Pachira aquatica é conhecida popularmente como munguba, mamorana, castanhola, castanha do maranhão ou paineira de Cuba. É uma árvore frondosa, com folhas pecioladas e digitadas e apresenta de 5 a 9 folíolos. Suas flores contêm 5 pétalas grandes com coloração castanho avermelhadas, como mostrado na figura 3.



Figura 3- Fotos da planta *Pachira aquatica*.

Fonte: Sâmela Alves P. B. Vieira, 16/10/2009.

Alguns compostos já foram isolados de *Pachira aquatica*. Das cascas da raiz desta planta (Figura 4 A) foram obtidos compostos como, a isohemigossipolona (Figura 4 B) que apresentou alto potencial antifúngico (SHIBATANI et al., 1999).

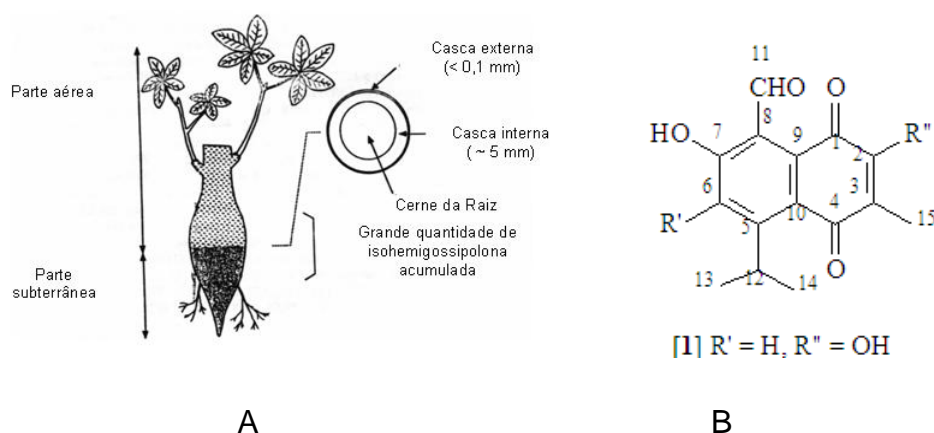


Figura 4- A - Ilustração da parte aérea e da raiz de *P. aquatica* (Fonte: Shibatani *et al.*, 1999). **B** - Estrutura química da isohemigossipolona isolada da planta *Pachira aquatica*.

1.2 As serpentes

As serpentes pertencem ao Reino Animal, Filo Chordata, Classe Reptilia, Ordem Squamata e Subordem Serpentes. Dentro da Subordem Serpentes existem três Superfamílias: Typhlopoidea, Henophidia e Xenophidia. Dentro da Superfamília Typhlopoidea estão três famílias, em que as cobras cegas estão incluídas. A Superfamília Henophidia abriga onze famílias, dentre elas a família Boidea (jibóia) e na Superfamília Xenophidia estão seis famílias, entre elas as famílias Viperidae, Elapidae e Colubridae são as que despertam maior interesse médico devido aos acidentes provocados por estas serpentes (SBH. 2010; CARDOSO *et al.*, 2009).

O termo serpente vem do latim *serpen* + *antis*, que significa “rastejante, quem rasteja”. No Brasil estes animais são conhecidos popularmente por cobras. Suas principais características que as distinguem dos outros reptéis são: corpo alongado e flexível, ausência de membros anteriores e posteriores (não possuem patas), modificações que lhes permitem alimentar-se de grandes animais, não apresentam cintura escapular, nem pálpebras móveis ou ouvido externo e tímpano (BARRAVIERA, 1999, CARDOSO *et al.*, 2009).

No mundo existem atualmente cerca de 2.900 espécies de serpentes. O Brasil apresenta 371 espécies de serpentes distribuídas em 80 gêneros e 10 famílias. As 371 espécies estão distribuídas em quatro principais famílias:

Elapidae (27 espécies), Viperidae (28 espécies), Colubridae (34 espécies) e Boidae (12 espécies), sendo que as duas primeiras famílias são peçonhentas.

Dentre as serpentes peçonhentas brasileiras destaca-se na família Elapidae o gênero *Micrurus*, conhecidas como corais. Dentro da família Viperidae os principais gêneros são: *Crotalus* (recentemente reclassificadas como *Caudisona*) serpentes conhecidas popularmente como cascavéis, que apresentam como característica morfológica um apêndice apical denominado chocalho ou guizo na cauda; *Lachesis* distribuídas na região Norte e áreas litorâneas da região Nordeste e Sudeste do Brasil, apresentam as últimas fileiras de placas subcaudais modificadas, quilhadas e eriçadas, além de um espinho terminal, popularmente conhecido como esporão; *Bothrops* (recentemente subdivididas em *Bothropoides*, *Bothrops* e *Rhinocerophis*), conhecidas como jararacas, uma vez que não apresentam guizo ou esporão, pois as placas subcaudais são duplas e normais (CARDOSO et al., 2009).



Figura 5- Serpente *Bothrops pauloensis*. Fonte: SAWAYA et al., 2008.

A espécie, atualmente classificada como *Bothropoides pauloensis*, foi descrita por Amaral em 1925. Esta espécie conhecida popularmente como jararaca do rabo branco pertencia inicialmente à espécie *Bothrops newiedi*, sendo considerada como uma subespécie: *Bothrops newiedi pauloensis*. Após uma revisão sistemática, SILVA (2000) elevou as doze subespécies da espécie *Bothrops newiedi* a sete espécies distintas. Em 2005 a Sociedade Brasileira de Herpetologia – SBH aceitou essa nova classificação, com isso a subespécie

Bothrops newiedi pauloensis foi denominada de espécie *Bothrops pauloensis*. Em 2009, Fenwick e colaboradores, observaram diferenças morfológicas e moleculares entre as serpentes do gênero *Bothrops* e propuseram a divisão deste gênero em outros cinco gêneros; a espécie *Bothrops pauloensis* foi inserida no gênero *Bothropoides*. Neste trabalho usaremos a designação *Bothrops pauloensis* para nos referirmos a esta espécie (figura 5).

De acordo com o Ministério da Saúde, são notificados aproximadamente 20.000 casos de acidentes ofídicos por ano no Brasil, com letalidade em torno de 0,43% (BRASIL 2001).

Atualmente, o gênero *Crotalus* é responsável por 7,7% dos acidentes ofídicos, o gênero *Lachesis* por 1,4%, o gênero *Micrurus* por 0,4% e o antigo gênero *Bothrops* por 90% (CARDOSO et al., 2009). Entre as principais espécies botrópicas responsáveis pelo envenenamento ofídico podemos citar: *Bothrops alternatus* com distribuição restrita na região sul do Brasil, *Bothrops atrox* encontrada na região norte do país, *Bothrops erythromelas* distribuída na região nordeste, *Bothrops jararaca* encontrada nas regiões Sul e Sudeste, *Bothrops jararacussu* em florestas tropicais do Sudeste e no Cerrado da região Central, *Bothrops moojeni* presente na região do cerrado do Brasil Central, desde o Paraná até o Maranhão e *Bothrops neuwiedi* distribuída em todo Brasil com exceção da Bacia Amazônica (BRASIL, 2001; CARDOSO et al., 2009).

Apesar do alto índice de acidente ofídico pelo gênero *Bothrops*, a taxa de mortalidade é baixa. As principais características do envenenamento são os efeitos provocados imediatamente após a picada, como hemorragia e distúrbios na cascata de coagulação (ROSENFELD, 1971; GUITÉRREZ et al., 1995; GUTIÉRREZ et al., 2003) podendo levar à amputação do membro atingido. De acordo com dados da Funasa (BRASIL, 2001) os homens são os mais atingidos pelos acidentes ofídicos (aproximadamente 70%), por desempenharem com maior frequência atividade na zona rural. A maioria destes acidentes, cerca de 70%, atinge os membros inferiores e apenas 13,4% atingem os membros superiores.

No Triângulo Mineiro as espécies responsáveis pela maioria dos acidentes ofídicos são *Bothrops moojeni* e *Bothrops pauloensis*. Dados do Departamento de Clínica Médica do Hospital das Clínicas da cidade de Uberlândia revelaram que

entre 1993 e 1995 ocorreram 90 acidentes ofídicos, dentre eles 75,5% foram causados por serpentes dos gêneros *Bothrops*, 24,4% dos acidentes foram com serpentes do gênero *Crotalus* e apenas 0,1% dos acidentes ocorreram com serpentes do gênero *Micrurus* (Da SILVA et al., 2003). Tais dados demonstram que no Brasil o perfil epidemiológico dos acidentes ofídicos se manteve inalterado nos últimos 100 anos (CARDOSO et al., 2009).

1.3 Constituição da peçonha

As peçonhas de serpentes são constituídas principalmente por proteínas, dentre elas há uma grande variedade de enzimas e toxinas que apresentam diferentes estruturas e funções. (DALMORA et al., 1992; PORTO et al., 2007). Dentre as enzimas presentes em peçonhas de serpentes destacam-se as metaloproteases, serinoproteases e fosfolipases A₂ (FOX e SERRANO, 2005; MATSUI et al., 2000; PORTO et al., 2007).

1.3.1 Metaloproteases

As metaloproteases de peçonha de serpentes (SVMPs) apresentam grande diversidade estrutural e funcional. No envenenamento botrópico elas são responsáveis pelo quadro hemorrágico das vítimas, por isso são conhecidas como hemorraginas ou toxinas hemorrágicas (CARDOSO et al., 2009), embora nem todas sejam hemorrágicas.

As SVMPs precisam do íon zinco como cofator para desempenhar atividade enzimática (FOX e Serrano, 2005). Sua massa molecular varia de 20 a 100 kDa (BJARNASON e FOX, 1994; KAMIGUTI et al., 1996; HATI et al., 1999). Estas enzimas são sintetizadas e armazenadas na glândula de veneno da serpente na forma de zimogênios e, quando secretadas, sofrem um processamento proteolítico que converte o zimogênio na forma ativa (madura) da enzima.

Por serem proteínas com múltiplos domínios funcionais foram inicialmente classificadas por Bjarnason e Fox (1994) em quatro grupos: PI, PII, PIII e PIV. A classe PI inclui proteínas com baixa massa molecular (de 20 a 30 kDa) que apresentam somente o domínio catalítico, com fraca ou nenhuma atividade

hemorrágica. A classe PII é constituída por proteínas com massa molecular entre 30 e 60 kDa, as quais acrescentam ao domínio metaloprotease um domínio semelhante a desintegrina (RGD) na região carboxi-terminal. Na classe PIII encontramos proteínas com massa molecular entre 60 e 80 kDa, elas apresentam domínio metaloprotease, seguido do domínio desintegrina-like (semelhante à desintegrina, onde a sequência RGD é substituída pela sequência ECD) e outro rico em cisteína na região carboxi-terminal, conferindo a estas proteínas alta atividade hemorrágica (HATI et al., 1999). Já a classe P-IV é composta por proteínas com massa molecular entre 80 e 100 kDa, e apresentam duas subunidades: uma subunidade semelhante à classe PIII e outra contendo somente o domínio semelhante à lectina, conectadas por ligações dissulfeto.

Com base nas proteínas já isoladas e dados de sequenciamento de cDNA de toxinas de serpentes, Fox e Serrano (2005) fizeram uma reclassificação das SVMPs. De acordo com esta nova classificação somente as classes PII e PIII foram subdivididas. Na subclasse PIIa a forma madura não libera o domínio desintegrina; em P-IIb a forma madura é um dímero que compreende a metaloprotease ligada ao domínio desintegrina. São conhecidos heterodímeros de desintegrinas nas peçonhas, mas não se pode afirmar se eles seriam provenientes de uma subclasse PIIa com uma nova classe DI que não contém o domínio metaloprotease. Na subclasse P-IIIa são conhecidas proteínas contendo somente um domínio desintegrina-like unido ao domínio rico em cisteína. Segundo os autores, dentre as toxinas conhecidas desta subclasse ainda não se conseguiu isolar da peçonha, uma PIIIa contendo somente o domínio metaloprotease. É sugerido que este domínio seja muito instável e sujeito a proteólise. Esta instabilidade é atribuída à única característica comum existente entre estas proteínas, a presença de um resíduo Cys na posição 195 da região c-terminal do domínio metaloprotease. Na subclasse P-IIIb encontram-se as metaloproteases diméricas (figura 6).

Em 2008, Fox e Serrano propuseram uma nova reclassificação destas enzimas, na qual as metaloproteases da classe PIV passam a fazer parte da classe PIIId.

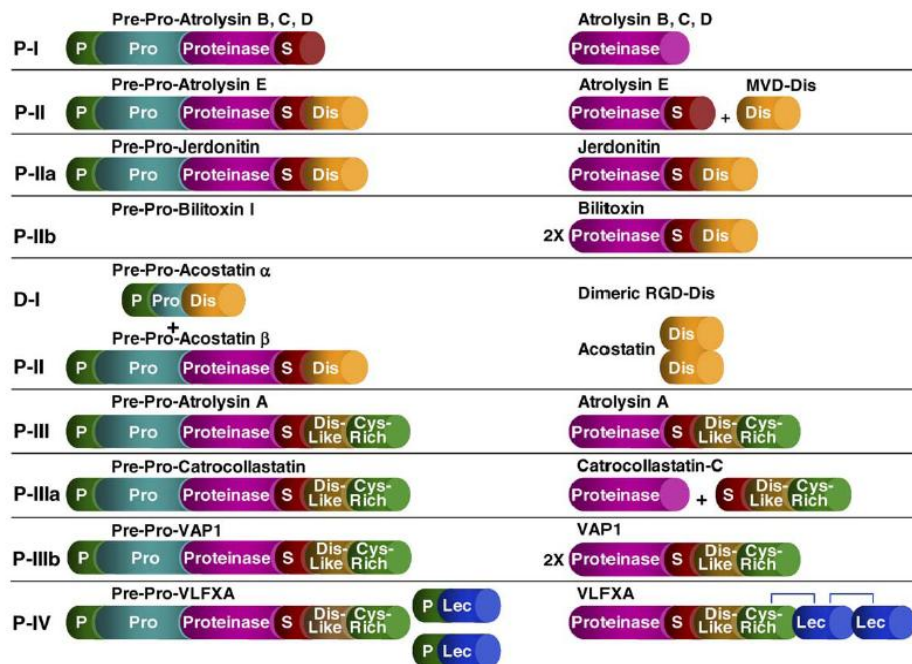


Figura 6 - Diagrama esquemático da divisão de metaloproteases de peçonhas de serpentes proposto por FOX e SERRANO em 2005. Fonte: FOX e SERRANO (2005).

P= peptídeo sinal; **pro=** pro-proteína; **S=** espaçamento; **Dis=** desintegrina; **Dis-like=** semelhante a desintegrina; **Cys-rich=** rico em cisteína; **Lec=** semelhante a lectina.

As metaloproteases da classe PIII são as principais responsáveis pelo rápido quadro hemorrágico no tecido e no músculo afetado após poucos minutos do acidente ofídico, pois degradam as proteínas da matriz extracelular (OHSAKA et al., 1973; OHSAKA, 1976, BARAMOVA et al., 1989; BARAMOVA et al., 1991; RUCAVADO et al., 1995; GUTIÉRREZ et al., 2009). Esta hemorragia pode ser provocada por dois mecanismos, “per rhexis” e o “diapedesis”. No mecanismo “per rhexis” as SVMPs atuam na digestão das moléculas da membrana do endotélio tais como colágeno tipo IV, laminina, nidogênio, fibronectina, proteoglicanos, heparan sulfato e outras que ajudam a manter a integridade dos vasos e capilares, resultando em extravasamento sanguíneo e edema (HATI et al., 1999). Já no mecanismo “diapedesis” as SVMPs atuam sobre as junções entre as células vizinhas (HATI et al., 1999; GUTIÉRREZ et al., 2000).

A hemorragia ocasionada pelas SVMPs pode provocar outras lesões aos tecidos atingidos, onde se destacam os danos causados às células musculares. Estes danos são provocados por isquemia, consequência do extravasamento sanguíneo, o que leva a uma diminuição da concentração de oxigênio nas fibras musculares provocando necrose (GUTIÉRREZ et al., 1995; GUTIÉRREZ et al., 2005; GUTIÉRREZ et al., 2009). Esta necrose impede que a fibra muscular seja regenerada, e com isso há uma reconstituição do local necrosado por tecido fibroso, indicando que as metaloproteases tem uma ação indireta que prejudica a regeneração tecidual.

1.3.2 Serinoproteases

As Serinoproteases de Peçonhas de Serpentes (SVSP) são enzimas responsáveis principalmente pelos distúrbios hemostáticos em vítimas de acidentes ofídicos, atuando sobre a cascata de coagulação e sobre o sistema fibrino(geno)lítico (MARKLAND, 1998; SERRANO et al., 2005; MATSUI et al., 2000). A coagulopatia é uma das mais sérias complicações de acidentes ofídicos e é resultado da interação entre as enzimas “thrombin-like” e enzimas procoagulantes. Estas enzimas podem representar até 20% do conteúdo protéico total das peçonhas de serpentes da família Viperidae. Apresentam em média 235 resíduos de aminoácidos dos quais 12 são de cisteína e podem formar pontes dissulfeto. Estas enzimas também são sintetizadas na forma de zimogênio e no processamento proteolítico perdem alguns aminoácidos resultando na enzima ativa.

Entre as SVSPs destacam-se as enzimas “thrombin-like” (SVTLE) ou semelhantes à trombina. As SVTLE são assim denominadas porque semelhantemente à trombina são capazes de clivar fibrinopeptídeos das cadeias do fibrinogênio, transformando-o em fibrina, no entanto, não são capazes de ativar o fator XIII da cascata de coagulação, para formar o polímero de fibrina ou coágulo “duro” (SERRANO et al., 2005). A trombina desempenha um importante papel na coagulação, clivando ligações peptídicas do fibrinogênio e liberando fibrinopeptídeos A e B, promovendo a agregação plaquetária e ativando o fator XIII da cascata de coagulação sanguínea (WOLBERG, 2007). As SVTLE

geralmente clivam preferencialmente a cadeia B β do fibrinogênio (SWENSON e MARKLAND 2005).

O fibrinogênio é uma molécula globular composta de três cadeias A α , B β e γ unidas por pontes dissulfeto, como mostrado na figura 7. A conversão do fibrinogênio em coágulo de fibrinina pela trombina pode ser descrita em três passos: proteólise do fibrinogênio (hidrólise das cadeias A α e B β resultando em liberação dos fragmentos denominados fibrinopeptídeos A e B); polimerização dos monômeros liberados pela trombina formando um coágulo ‘frouxo’ de fibrina (pois ainda não existe ligação cruzada entre os monômeros); e a ativação do fator XIII (que promove a ligação cruzada entre as cadeias laterais dos resíduos de lisina e glutamina) formando um coágulo de fibrina insolúvel (MARKLAND 1998).

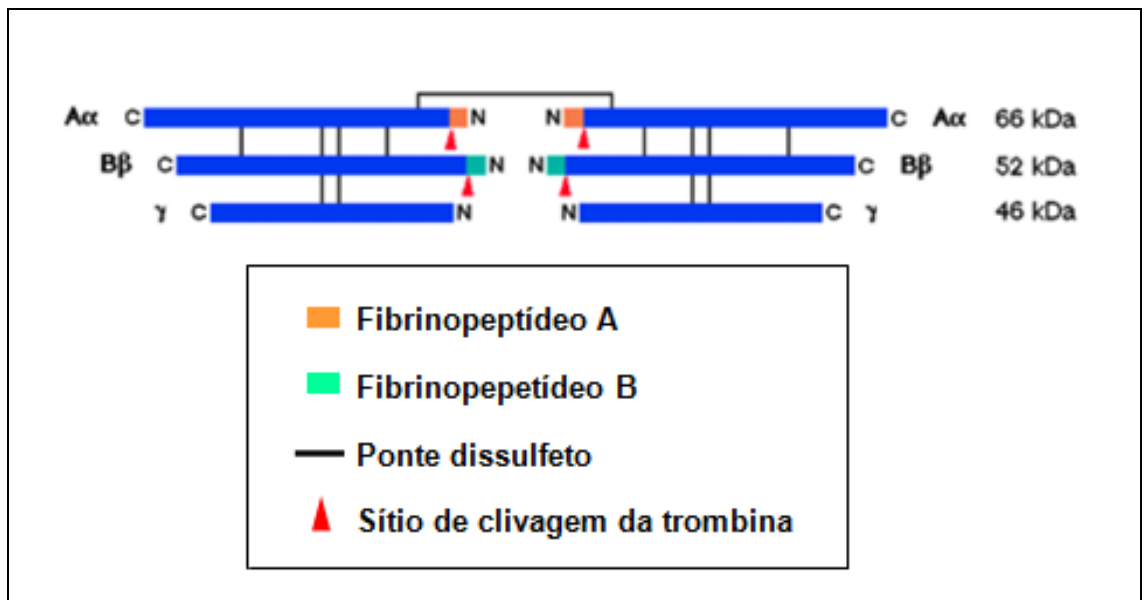


Figura 7 – Estrutura do fibrinogênio. Os símbolos α , β e γ representam as cadeias de fibrinogênio.

Fonte: <http://tollefsen.wustl.edu/projects/coagulation/coagulation.html>. Acesso em 12/11/2004.

Como as SVTLE não promovem a ativação do fator XIII da cascata de coagulação, o coágulo resultante não forma pontes cruzadas e com isto apresenta uma aparência frouxa, mais fácil de ser degradada e que nas vítimas de acidentes ofídicos, frequentemente resulta na depleção do estoque de

fibrinogênio plasmático tornando o sangue incoagulável (MARSH e Williams 2005; SERRANO et al., 2005). Devido ao fato de as SVTLE formarem um coágulo que é rapidamente degradado, estas enzimas encontraram grande aplicação terapêutica, principalmente no tratamento de desordens trombóticas (LEITE et al., 2000). Segundo Marsh e Williams (2005) como as SVTLEs em geral não ativam o fator XIII, o coágulo produzido *in vitro* é friável e facilmente fragmentado. A falha na formação da ligação cruzada *in vivo*, causa prontamente a destruição pelo sistema fibrinolítico e remoção efetiva do fibrinogênio do plasma.

Algumas SVSPs isoladas são usadas no tratamento e diagnóstico de desordens do sistema hemostático. Entre elas podemos citar a Batroxobina (Reptilase[®]) isolada da peçonha de *Bothrops moojeni* (STOCKER e BARLOW, 1976). O tempo de Reptilase[®] é uma alternativa à determinação do tempo de trombina(TT) como um ensaio rápido de fibrinogênio em amostras contendo heparina e é particularmente útil no ensaio de antitrombina III, onde o plasma pode ser preparado livre de fibrinogênio sem a adição de trombina que poderia reagir com a antitrombina III e interferir no resultado. A presença de produtos de degradação de fibrina, hipofibrinogemia e defeitos na polimerização de fibrina(desfibrinogemia) causarão um prolongamento no tempo de Reptilase[®] (Marsh e Williams, 2005).

1.3.3 Fosfolipases A₂

As fosfolipases A₂ (PLA₂) estão presentes em peçonhas de diferentes animais, como insetos e serpentes e também são constituintes de tecidos de mamíferos. Esta classe de enzimas é definida pela habilidade de catalisar a hidrólise da ligação éster dos glicerofosfolipídeos na posição sn-2 do glicerol liberando ácidos graxos livres e lisofosfolipídeos (DIAZ et al, 2003; KINI et al., 2003; JAN et al., 2007).

Para que estas enzimas apresentem atividade catalítica há a necessidade de que o aspartato na posição 49 esteja envolvido na ligação com o íon cálcio e a atividade enzimática da PLA₂ é dependente da presença dos domínios de ligação a este íon (GUTIÉRREZ, et al.,2003; KINI et al., 2003). O cálcio funciona como cofator da hidrólise, tanto orienta o substrato fosfolipídico, quanto estabiliza o

intermediário catalítico tetraédrico - formado por resíduos de Asp 99, His 48 e uma molécula de água (SCOOT et al., 1990). O mecanismo de catálise ocorre em três etapas: [1] desprotonação da molécula de água pela díade catalítica Asp99/His48; [2] ataque nucleofílico da água na ligação éster Sn-2; e [3] colapso do intermediário da reação, liberando os produtos da catálise: lisofosfolipídeos e ácidos graxos (KUDO, 2002).

A classificação das PLA₂ varia entre os autores. No presente trabalho optou-se pela classificação de Scaloske e Dennis (2006), onde as PLA₂ são divididas em 15 grupos e as PLA₂ de serpentes estão dentro do grupo IA (*Elapidae/Hydrophidae*) e do grupo IIA (*Viperidae*). O grupo II é subdividido em dois subgrupos: aquele que é Asp-49, com ácido aspártico na posição 49 e apresentam alta atividade catalítica e as Lys-49, com lisina na posição 49 e baixa atividade hidrolítica (STÁBELLI et al., 2005). As PLA₂ da peçonha de serpentes são enzimas com baixa massa molecular (13 kDa - 15 kDa) e muito abundantes.

Estas enzimas são responsáveis por vários efeitos como miotoxicidade (SOARES et al., 1998; ANDRIÃO-ESCARSO et al., 2000; SOARES et al., 2000; RODRIGUES et al., 2004; RODRIGUES et al., 2007), edema (ÂNGULO et al., 1997; SOARES et al., 1998; ANDRIÃO-ESCARSO et al., 2000; SOARES et al., 2000; RODRIGUES 2007; CALGAROTTO et al., 2008), inibição da agregação plaquetária (RODRIGUES et al., 2007) e letalidade (ÂNGULO et al., 1997; HOMSI-BRANDEBURGO et al., 1988, ANDRIÃO-ESCARSO et al., 2000).

As PLA₂ que induzem a miotoxicidade são chamadas de miotoxinas e podem ser tanto PLA₂ Lis49 e Asp49 (LOMONTE et al., 2003). Essas proteínas agem especificamente sobre as células musculares, por isso não atingem outros tecidos como nervos e vasos sanguíneos, que permanecem intactos (GUTIÉRREZ et al., 2003). O mecanismo de ação das miotoxinas sobre o tecido muscular provoca uma série de alterações fisiológicas como: formação de "lesões delta" que são pequenas alterações na membrana plasmática, essas lesões aumentam de tamanho provocando hipercontrações dos miofilamentos e alterações mitocondriais, tais como aumento de volume, ruptura de membranas e formação de densidades floculentas, resultando na aglomeração das proteínas da membrana interna da mitocôndria; os núcleos adquirem aspecto picnótico e as

membranas intracelulares se alteram com formação de múltiplas vesículas no interior do espaço celular. (LOMONTE et al., 2003; CARDOSO et al., 2009).

A figura 8 representa as hipóteses sobre os efeitos locais provocados pela peçonha das serpentes da família Viperidae segundo Gutiérrez e Lomonte (2009).

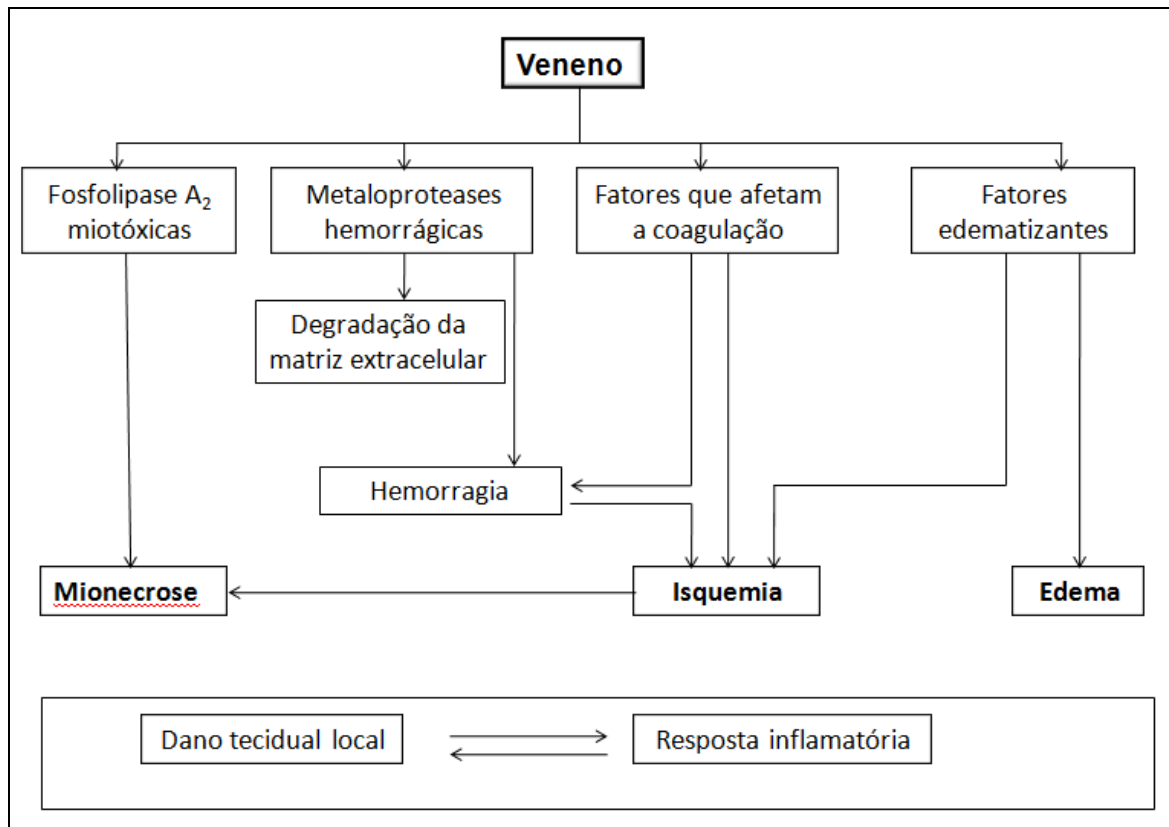


Figura 8- Esquema hipotético dos danos locais provocados pelas principais toxinas de serpentes da família Viperidae. Fonte: GUTIÉRREZ e LOMONTE, 2009.

1.4 Soroterapia

Desde o período colonial que o ofidismo no Brasil é responsável por um número significativo de óbitos. O tratamento das pessoas que se acidentavam era feito basicamente com ervas, rituais e manipulações utilizadas pela população (CARDOSO et al., 2009). O soro antiofídico foi produzido pela primeira vez no Brasil em 1901 por Vital Brazil no então Instituto Soroterápico, atual Instituto Butantan. Este pesquisador observou que os sintomas clínicos de vítimas picadas por serpentes dos gêneros *Bothrops* e *Crotalus* eram diferentes. A partir da

observação de que o soro neutralizava especificamente o veneno contra o qual foi preparado, Vital Brasil estabeleceu os princípios da soroterapia. O tratamento deveria ser iniciado o mais breve possível, para que a peçonha não afetasse um maior número de tecidos ou órgãos; a administração do soro deveria ser feita em dose única; o soro deveria ser aplicado por uma via adequada de administração e o antiveneno teria especificidade para o veneno (ROSENFELD, 1967).

Atualmente, o soro antiofídico é produzido por algumas instituições públicas brasileiras, dentre elas o Instituto Butantan, em São Paulo, Instituto Vital Brazil, no Rio de Janeiro, Centro de Produção e Pesquisa em Imunobiológicos (CPPI), em Curitiba e a Fundação Ezequiel Dias (Funed) em Belo Horizonte. Segundo as instituições públicas o soro é oferecido aos hospitais gratuitamente (FUNED, 2008). Ele é produzido a partir da inoculação de peçonha em animais de grande porte, como cavalos, induzindo uma resposta imunológica das toxinas presentes na peçonha. Dessa forma, o animal produz anticorpos e esses anticorpos são utilizados para inibir os efeitos lesivos da peçonha em vítimas de envenenamento (CHIPPAUX, 1998; CARDOSO et al., 2009). Este antiveneno é constituído por várias imunoglobulinas. Sua ação baseia-se na formação de um complexo entre o antígeno com anticorpos específicos (CHIPPAUX, 1998).

O soro antiofídico pode ser monovalente ou polivalente, dependendo da quantidade de diferentes gêneros de animais utilizados na sua produção. O soro monovalente é produzido com apenas um gênero de serpentes, como exemplo o soro antibotrópico, que é constituído de anticorpos específicos para o tratamento de vítimas de acidentes botrópicos. Já o soro polivalente é constituído por mais de um gênero, exemplo é o soro antibotrópico-crotálico que é constituído de uma mistura de peçonhas dos antigos gêneros *Bothrops* e *Crotalus* e usado em tratamentos de vítimas de acidentes ofídicos com serpentes desses dois gêneros (FUNED, 2008).

O soro monovalente tem maior eficácia na inibição dos efeitos lesivos da peçonha para a qual ele foi produzido. Já os polivalentes são menos eficazes porque pode ocorrer a formação de anticorpos para a peçonha de apenas um determinado gênero (CARDOSO et al., 2009).

O soro deve ser aplicado sempre por via endovenosa, garantindo maior rapidez e eficiência na neutralização das peçonhas circulantes (PINHO, 2001). A

dose do soro baseia-se na identificação da serpente, no tempo decorrido entre o acidente e o atendimento médico, na evolução do quadro clínico e na concentração do soro (CHIPPAUX, 1998).

Em caso de retardo na aplicação do soro os efeitos sistêmicos são inibidos, mas os efeitos locais não. Segundo Rosenfeld (1967) os efeitos locais provocados pela peçonha não são totalmente inibidos, devido à baixa concentração de soro nos tecidos lesados. Battelino (2003) afirma que em camundongos o soro aplicado simultaneamente ou até 15 minutos após o envenenamento pode reverter efeitos sistêmicos como coagulação, intensas lesões hemorrágicas e reações inflamatórias, mas após esse tempo não há uma reversão eficiente do quadro lesivo sistêmico. Assim, a eficiência do soro está intimamente associada ao tempo decorrido para iniciar o tratamento e a quantidade de peçonha injetada na vítima.

A soroterapia embora não seja capaz de inibir os efeitos locais provocados pela peçonha botrópica, é um tratamento gratuito, adotado em todo Brasil pelas unidades de saúde. Estas unidades estão concentradas em grande número na região Sudeste e nas grandes cidades das regiões Norte e Nordeste, sendo precárias no interior, onde a maioria da população não tem acesso ao soro antiofídico. Por isso, em várias comunidades do Brasil, o uso de plantas medicinais é uma alternativa ao tratamento com o soro antiofídico.

1.5 Teste para Detecção de Mutação e Recombinação Somática – SMART

Danos celulares e moleculares podem ser provocados por agentes químicos, biológicos e físicos. Os agentes genotóxicos são aqueles capazes de causarem lesões no material genético, no DNA, (duplicação e transcrição gênica) podendo causar mutações e aberrações cromossômicas que conseqüentemente geram tumores, principalmente em seres humanos (COSTA E MENK, 2000).

Vários ensaios biológicos são empregados com o intuito de verificar a genotoxicidade de substâncias, como: extratos vegetais, frações e compostos químicos isolados (NOLDIN et al., 2003). Um dos testes mais utilizado é Somatic

Mutation And Recombination Test- SMART (Teste de Mutação e Recombinação Somática) que utiliza como biomonitor a *Drosophila melanogaster* (conhecida popularmente como mosca da fruta).

A *Drosophila melanogaster* é utilizada como biomonitor devido à algumas características: período curto de geração (aproximadamente 10 dias a 25°C), caracteres morfológicos bem definidos, sistema enzimático semelhante aos dos mamíferos que permite o metabolismo de agentes xenobióticos e grande número de linhagens mutantes, muito bem caracterizadas geneticamente (GRAF et al., 1996). Além das características favoráveis do animal, este teste tem custo baixo, produz resultados confiáveis, inequívocos e reprodutíveis.

O SMART de asa em *D. melanogaster* fundamenta-se na premissa de que durante o desenvolvimento embrionário, grupos de células (discos imaginais das asas) proliferam mitoticamente até o ponto em que se diferenciam, durante a metamorfose, em estruturas que originam as asas das moscas adultas. Este bioensaio faz uso de dois genes marcadores para a forma dos pêlos das asas: pêlos múltiplos (*mwh*, 3-0.3) e pêlos cujo formato lembram uma “chama de vela”, do inglês “flare” (*flr³*, 3-38.8), baseando-se na indução de alterações genéticas que originam a perda de heterozigose em células larvais, as quais são heterozigotas para estes dois genes recessivos (GRAF et al., 1984).

Este teste é realizado por meio de cruzamentos experimentais utilizando três linhagens portadoras dos marcadores recessivos das células das asas: *multiple wing hairs* (*mwh*, 3-0,3) e *flare* (*flr³*, 3-38,8): [1] linhagem “*multiple wing hairs*” (*mwh*) com constituição genética *y; mwh jv*; [2] linhagem “*flare-3*” (*flr³*), com constituição genética *flr³ / In(3LR)TM3, ri p^o sep I(3)89Aa bx^{34e} e Bd^S*; [3] linhagem “*ORR; flare-3*” (*ORR; flare-3*), com constituição genética *ORR; flr³ / In(3LR)TM3, ri p^o sep I(3)89Aa bx^{34e} e Bd^S* (GRAF e VAN SCHAİK, 1992), sendo esta última, portadora de genes com expressão elevada de enzimas do complexo citocromo P450, localizados nos cromossomos 1 e 2, provenientes da linhagem *Oregon R*, resistente ao DDT.

Com estas linhagens são realizados dois diferentes cruzamentos: 1) cruzamento padrão (ST – *standard cross*) entre machos “*mwh*” e fêmeas virgens “*flr³*”; 2) cruzamento de alta bioativação (HB - *high bioactivation cross*) entre machos “*mwh*” e fêmeas virgens “*ORR; flr³*”. Assim sendo, o cruzamento padrão é

útil na detecção de agentes genotóxicos diretos, enquanto o cruzamento de alta bioativação é útil na detecção de agentes genotóxicos indiretos, ou promutágenos, que necessitam de ativação metabólica para induzir efeitos genotóxicos.

Ambos os cruzamentos produzem dois tipos de progênie: 1) Trans-heterozigoto marcado ($mwh + / + flr^3$) (MH), que é distinguido pela borda lisa da asa (Figura 9 A); 2) Heterozigoto balanceado ($mwh + / TM3, Bd^S$) (BH), com borda de asa serrilhada (Figura 9 B).

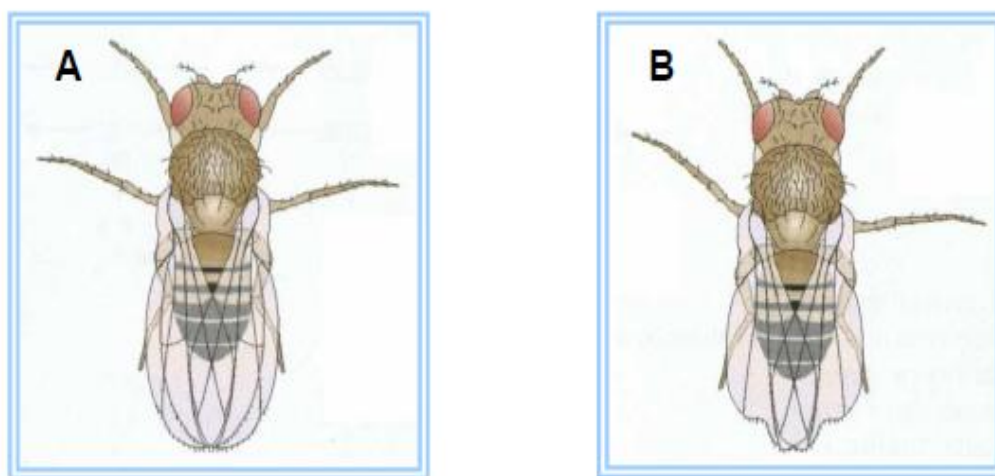


Figura 9- Aspectos fenotípicos dos descendentes do cruzamento ST e HB. A) trans heterozigoto marcado ($mwh + / + flr^3$)- asa de borda lisa; B) heterozigoto balanceado ($mwh + / TM3, Bd^S$)(BH)-asa de borda serrilhada.

O teste detecta a presença de substâncias mutagênicas pela quantidade de manchas de pêlos mutantes que o animal apresenta na asa. Nos adultos emergentes MH as manchas mutantes aparecem como manchas simples, apresentando o fenótipo “*mwh*” ou “*flare*”, ou como manchas gêmeas mostrando áreas adjacentes “*mwh*” e “*flare*”. As manchas simples são produzidas por mutação, aberração cromossômica (deleção), recombinação, ou não-disjunção mitótica, enquanto que as manchas gêmeas ocorrem exclusivamente por recombinação. Nos indivíduos BH as manchas mutantes aparecem apenas como manchas simples do tipo “*mwh*”, produzidas por mutação, aberração cromossômica (deleção) ou não-disjunção. A indução da perda de heterozigose destes marcadores, nas células dos discos imaginais da larva, por tratamento

com um composto genotóxico, leva à formação de clones de células mutantes, os quais se expressam, após a metamorfose, em uma mancha mutante na asa (SPANÓ e GRAF, 1998).

2 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, E. R.; SILVA, A. A. F.; SANTOS, E. R.; CORREIA, C. A. L.

Antiinflammatory action of lapachol. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 29, p. 239- 241, 1990.

ANDRADE-NETO, V. F.; GOULART, M. O. F.; Da SILVA, J. F. F.; Da SILVA, M. J.; PINTO, M. C. F. R.; PINTO, A. V.; ZALIS, M. G.; CARVALHO, L. H.; KRETTLI, A. U. Antimalarial activity of phenazines from lapachol, β -lapachone and its derivates against *Plasmodium falciparum* in vitro and *Plasmodium berghei* in vivo. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**. v.14, p. 1145-1149, 2004.

ANDRIÃO-ESCARSO, S. H.; SOARES, A. M.; FONTES, M. R. M.; FULY, A. L.; CORRÊA, F. M. A.; ROSA, J. C.; GREENE, L. J.; GIGLIO, J. R. Structural and functional characterization of an acidic platelet aggregation and hypotensive phospholipase A_2 from *Bothrops jararacussu* snake venom. **Biochemical Pharmacology**. v. 64, p. 723-732, 2002.

ANGULO, Y.; ESTRADA, R.; GUTIÉRREZ, J. M. Clinical and laboratory alterations in horses during immunization with snake venoms for the production of polyvalent (Crotalinae) antivenom. **Toxicon**. v. 35, p. 81-90, 1997.

AUSTIN, F. G. *Schistosoma mansoni* chemoprophylaxis with dietary lapachol. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**. v. 23 (3), p. 412-419, 1974.

BADER, M.; MUSE, W.; BALLOU, D. P.; GASSNER, C.; BARDWELL, J. C. A. Oxidative Protein Folding Is Driven by the Electron Transport System. **Cell** v. 98, p. 217-227, 1999.

BJARNASON, J. B.; FOX, J. W. Hemorrhagic metalloproteinases from snake venoms. **Pharmacology and Therapeutics**. v. 62, p. 325-372, 1994.

BARRAVIERA, B. **Venenos, Aspectos Clínicos e Terapêuticos dos Acidentes por Animais Peçonhentos**. Editora de Publicações Biomédicas Ltda, 1999, 1º Ed; 411 p.

BARAMOVA, E. N.; SHANNON, J. D.; BJARNASON, J. B.; FOX, J. W. Degradation of extracellular matrix proteins by hemorrhagic metalloproteinases. **Archives of Biochemistry and Biophysics**. v. 275, p. 63- 71, 1989.

BARAMOVA, E. N.; SHANNON, J. D.; FOX, J. W.; BJARNASON, J. B. Proteolytic digestion of non-collagenous basement membrane proteins by the hemorrhagic metalloproteinase Ht- e from *Crotalus atrox* venom. **Biomedica Biochimica Acta** v. 50, p. 763-768, 1991.

BATTELINO, C.; PIAZZA, R.; DA SILVA, A. M. M.; CURY, Y.; FARSKY, S. H. P. Assessment of efficacy of bothropic antivenom therapy of microcirculatory effects induced by *Bothrops jararaca* snake venom. **Toxicon**. v. 41, p. 583-593, 2003.

BHATTARAM, V. A.; GRAEFE, U.; KOHLERT, C.; VEIT, M.; DERENDORF, H. Pharmacokinetics and bioavailability of herbal medicinal products. **International of Phytotherapy and Phytopharmacology**. v. 9, p. 1-33, 2002.

BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE. MINISTÉRIO NACIONAL DE SAÚDE. Manual de Diagnóstico e Tratamento de Acidentes por Animais Peçonhentos, **FUNASA**; 3ª edição, 112p, 2001.

BRETON, G. W.; KURTZ, M. J.; KURTZ, S. L. Acetylation of unsymmetrical diols in the presence of Al₂O₃. **Tetrahedron Letters**. v. 38, p. 3825-3828, 1997.

CARDOSO, J. L. C.; FRANÇA, F. O. S.; WEN, F. H.; MALAQUE, C. M. S.; HADDAD, V. Jr. **Animais peçonhentos no Brasil- Biologia, Clínica e Terapêutica dos Acidentes**. 2^a edição São Paulo: Savier, 2009, 540p.

CHIPPAUX, J.; LANG, J.; EDDINE, S. AMADI.; FAGOT, P.; RAGE, V.; PEYRIEUX, J. -C.; LE MENER, V. Clinical safety of a polyvalent F(ab')₂ equine antivenom in 223 African snake envenomations: a field trial in Cameroon. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**. v. 92, p. 657-662, 1998.

COSTA, R. M. A. & MENK, C. F. M. Biomonitoramento de mutagênese ambiental. **Biotecnologia, Ciência & Desenvolvimento**. v. 3, p. 24-26, 2000.

DALMORA, S. L.; VACCARI, S. F.; PEREIRA, J. E. S. 1992. Dosagem biológica do antiveneno botrópico. **Memórias do Instituto Butantã**. v. 54, p. 21-30, 1992.
Da SILVA, M. N.; FERREIRA, V. F.; DE SOUZA, M. C. B. V. Um panorama atual da Química e da Farmacologia de naftoquinonas, com ênfase na β-lapachona e derivados. **Química Nova**. v. 26, p. 407-416, 2003.

Da SILVA JR., E. N.; MENNA-BARRETO, R. F. S.; PINTO, M. C. F. R.; SILVA, R. S. F.; TEIXEIRA, D. V.; DE SOUZA, M. C. B. V.; DE SIMONE, C. A.; DE CASTRO, S. L.; FERREIRA, V. F.; PINTO, A. V. Naphthoquinoidal [1,2,3]-triazole, a new structural moiety active against *Trypanosoma cruzi*. **European Journal of Medicinal Chemistry**. v. 43, p. 1774- 1780, 2008.

DIAZ, B. L.; ARM, J. P. Phospholipase A2. **Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids**. v. 69, p. 87- 97, 2003.

ERTL, R. P.; BANDIERA, S. M.; BUHLER, D. R.; STEGEMAN, J. J.; WINSTON, G. W. Immunochemical Analysis of Liver Microsomal Cytochromes P450 of the American Alligator, *Alligator mississippiensis*. **Toxicology and Applied Pharmacology**.v. 157 (3), p. 157- 165, 1999.

FENWICK, A. M.; GUTBERLET, R. L. JR.; EVANS, J. A.; PARKINSON, C. L. Morphological and molecular evidence for phylogeny and classification of South American pitvipers, genera *Bothrops*, *Bothriopsis*, and *Bothrocophias* (Serpentes: Viperidae). **Zoological Journal of Linnean Society**. v. 156, p. 617-640, 2009.

FOX, J. W.; SERRANO, S. M. T. Structural considerations of the snake venom metalloproteinases, key members of the M12 reprotolysin family of metalloproteinases. **Toxicon**. v. 45, p. 969-985, 2005.

FOX, J. W, SERRANO, S. M. T. Insights into and speculations about snake venom metalloproteinase (SVMP) synthesis, folding and disulfide bond formation and their contribution to venom complexity. **The FEBS Journal**. v. 275, p. 3016-3030, 2008.

GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**. v. 30, p. 374-381, 2007.

GOEL, R. K.; PATHAK, N. K.; BISWAS, M.; PANDEY, V. B.; SANYAL, A. K. Effect of lapachol, a naphthaquinone isolated from *Tectona grandis*, on experimental

peptic ulcer and gastric secretion. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**. v. 39(2), p. 138-40, 1987.

GRAF, U.; WÜNGLER, F. E.; KATZ, A. J.; FREI, H.; JUON, H.; HALL, C. B.; KALE, P. G. Somatic Mutation and Recombination Test in *Drosophila melanogaster*. **Environmental Mutagenese**. v. 6, p. 153-188, 1984.

GRAF, U.; SPANÓ, M. A.; GUZMÁN-RINCÓN, J.; ABRAHAM, S. K.; ANDRADE, H. H. R. The wing somatic mutation and recombination test (SMART) in *Drosophila melanogaster*: an efficient tool for the detection of genotoxic activity of pure compounds or complex mixtures as well as for studies of genotoxicity. **Afr. Newslet. Occup. Health Safet.** v. 6, p. 9-13, 1996.

GRAF, U. & VAN SCHAİK, N. Improved bioactivation cross for the wingsomatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. **Mutation Research**. v. 271, p. 59-67, 1992.

GUTIÉRREZ, J. M.; LOMONTE, B. Phospholipase A₂, myotoxins from *Bothrops* snake venoms. **Toxicon**. v. 33, p. 1405-1424, 1995.

GUTIÉRREZ, J. M.; RUCUVADO, A. Snake venom metalloproteinases: Their role in the pathogenesis of local tissue damage. **Biochemie**. v. 82, p. 841-850, 2000.

GUTIÉRREZ, J. M.; OWNBY, C. L. Skeletal muscle degeneration induced by venom phospholipases A₂: insights into the mechanisms of local and systemic myotoxicity. **Toxicon**. v. 42, p. 915-931, 2003.

GUTIÉRREZ, J. M.; RUCUVADO, A.; ESCALENTE, T.; DÍAZ, C. Hemorrhage induced by snake venom metalloproteinases: biochemical and biophysical mechanisms involved in microvessel damage. **Toxicon**. v. 45, p. 997-1011, 2005.

GUTIÉRREZ, J. M & LOMONTE, B. Efectos locales en el envenenamiento ofídico en América Latina. En: **Animais Peçonhentos no Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos acidentes** (CARDOSO, J. L. C.; FRANÇA, F. O. S.; WEN, F. H.; MALAQUE, C. M. S.; HADDAD, V. Jr.) p.352-365 2^a edição Savier Editora, São Paulo, Brasil. 2009, 540p.

GUTIÉRREZ, J. M.; RUCAVADO, A.; CAVES, F.; DÍAZ, C.; ESCALANTE, T. Experimental pathology of local damage induced by *Bothrops asper* snake venom. **Toxicon**. v. 54, p. 958-975, 2009.

HABERMEHL, G. G. Secondary and tertiary metabolites as plant toxins. **Toxicon**. v. 36, p. 1707-1719, 1998.

HATI, R.; MITRA, P.; SAKER, S.; BHATTACHARYYA, K. K. Snake venom hemorrhagins. **Critical Reviews in Toxicology**. v.29, p. 1-19, 1999.

HOMSI-BRANDEBURGO, M. I.; QUEIROZ, L. S.; SANTO-NETO, H.; RODRIGUES-SIMIONI, L.; GIGLIO, J. R. Fractionation of *Bothrops jararacussu* snake venom: Partial chemical characterization and biological activity of bothropstoxin. **Toxicon**. v. 26, p. 615 – 627, 1988.

JAN, V. M.; GUILLEMIN, I.; ROBBE-VINCENT, A.; CHOUMET, V. Phospholipase A2 diversity and polymorphism in European viper venoms: Paradoxical molecular evolution in Viperinae. **Toxicon**. v. 50, p. 1140-1161, 2007.

KAMIGUTI, A. S. Platelets as targets of snake venom metalloproteinases.

Toxicon. v. 45, p. 1041-1049, 2005.

KAYSER, O.; KIDERLEN, A. F.; LAATSCH, H.; CROFT, S. L. In vitro leishmanicidal activity of monomeric and dimeric naphthoquinones. **Acta Tropica.**

v.77, p. 307- 314, 2000.

KINI, R.M.; ZHANG, C. Y.; TAN, B. K. H. Pharmacological activity of the interdomain segment between metalloproteinase and disintegrin domains.

Toxicon. v. 35, p. 529-535, 1997.

KINI, R. M. Excitement ahead: structure, function and mechanism of snake venom phospholipase A₂ enzymes. **Toxicon.** v. 42, p. 827-840, 2003.

KINI, R. M. Structure-function relationships and mechanism of anticoagulant phospholipase A₂ enzymes from snake venoms. **Toxicon.** v. 45, p. 1147- 1161, 2005.

KLAUS, V.; HARTMANN, T.; GAMBINI, J.; GRAF, P.; STAHL, W.; HARTWIG, A.; KLOTZ, L. 1,4-Naphthoquinones as inducers of oxidative damage and stress signaling in HaCaT human keratinocytes. **Archives of Biochemistry and Biophysics.** v. 496, p. 93-100, 2010.

KUDO, I.; MURAKAMI, M. Phospholipase A₂ enzymes. **Prostaglandins & Other Lipid Mediators.** v. 68-69,3-58, 2002.

KUMAGAI, Y.;TSURUTANI, Y.;SHINYASHIKI, M.;HOMMA-TAKEDA, S.;NAKAI, Y.;YOSHIKAWA, T.; SHIMOJO, N. Bioactivation of lapachol responsible for DNA scission by NADPH-cytochrome P450 reductase. **Environmental Toxicology and Pharmacology**. v. 3, p. 245- 250, 1997.

LEITE, C. V. S.; NARESE, L. E.; ARANTES, H. L.; NI, M. J. S.; MERCADANTE, M. C.; BARRAVIEIRA, B.; KOBAYASI, S. Na evaluation by rat colon anastomosis of the efficacy of fibrin glue derived from snake venom. **Journal Venom Animal and Toxins**. v. 6, p. 130-141, 2000.

LOMONTE, B.; ANGULO, Y.; CALDERÓN, L. An overview of lysine-49 phospholipase A2 myotoxins from crotalid snake venoms and their structural determinants of myotoxic action. **Toxicon**. v. 42, p. 885- 901, 2003.

OHSAKA, A.; JUST, M.;HABERMANN, E. Action of snake venom hemorrhagic principles on isolated glomerular basement membrane. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Biomembranes*. v. 323, p. 415-428, 1973.

OHSAKA, A. Hemorrhagic principles from snake venom as useful tools for analyzing the physiological mechanisms involved in hemorrhage. **Toxicon**. v. 14, p. 414- 414, 1976.

MACHADO, T. B.; PINTO, A. V.; PINTO, M. C. F. R.; LEAL, I. C. R.; SILVA, M. G.; AMARAL, A. C. F.; KUSTER, R. M.; NETTO-DOS-SANTOS , K. R. *In vitro* activity of Brazilian medicinal plants, naturally occurring naftoquinones and their analogues, against methicilin-resistant *Staphylococcus aureus*. **International Journal of Antimicrobial Agents**. v. 21, p. 279-284, 2003.

MACIEL, M. A. M.; PINTO, A. C.; VEIGA, V. F. J. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Química Nova**. v. 25 (3), p. 429-438, 2002.

MARKLAND, F. S. Snake venoms and the hemostatic system. **Toxicon**. v. 36, p. 1749-1800, 1998.

MARSH, N.; WILLIAMS, V. Practical applications of snake venom toxins in haemostasis. **Toxicon**. v. 45, p. 1171-1181, 2005.

MEDINA, L. F. C.; VIAU, C. M.; MOURA, D. J.; SAFFI, J.; BRANDELLI, A.; HENRIQUES, J. A. P. Genotoxicity of aminohydroxynaphthoquinones in bacteria, yeast, and Chinese hamster lung fibroblast cells. **Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**. v. 650, p. 140-149, 2008.

NOLDIN, V. F.; MONACHE, F. D.; YUNES, R. A. Composição química e atividades biológicas das folhas de *Cynara scolymus* L. (alcachofra) cultivada no Brasil. **Química Nova**. v. 26, p. 331-334, 2003.

OLIVEIRA, L. Z.; CESARINO, F.; MORO, F. V.; PANTOJA, T. F.; SILVA, B. M. S. Morfologia do fruto, da semente, germinação e plântula de *Pachira aquatica* Aubl. (Bombacaceae). **Revista Brasileira de Biociências**. v. 5, p. 840-842, 2007.

PIERPOINT, W.S. Salicylic Acid and its Derivatives in Plants: Medicines, Metabolites and Messenger Molecules. **Advances in Botanical Research**-Academic Press. v. 20, 163- 235, 1994.

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

PORTO, B. N.; TELLI, C. A.; DUTRA, T. P.; ALVES, L. S.; BOZZA, M. T.; FIN, C. A.; THIESEN, F. V.; RENNER, M. F. Biochemical and biological characterization of the venoms of *Bothriopsis bilineata* and *Bothriopsis taeniata* (Serpentes: Viperidae). **Toxicon**. v. 50, p. 270-277, 2007.

RASKIN, I.; RIBNICKY, D. M.; KOMARNYTSKY, S.; ILIC, K.; POULEV, A.; BORISJUK, N.; BRINKER, A.; MORENO, D. A.; RIPOLL, C.; YAKOBY, N.; O'NEAL, J. M.; CORNWELL, T.; PASTOR, I.; FRIDLENDER, B. Plants and human health in the twenty-first century. **TRENDS in Biotechnology**. v. 20, p. 522-531, 2002.

RATES, S. M. K. Plants as source of drugs. **Toxicon**. v. 39, p. 603-613, 2001.

RODRIGUES, V. M.; SOARES, A. M.; GUERRA-SÁ, R.; RODRIGUES, V.; FONTES, M. R. M.; GIGLIO, J. R. Structural and functional characterization of Neuwiedase a nonhemorrhagic fibrin(ogen)olytic metalloprotease from *Bothrops neuwiedi* snake venom. **Archives of Biochemistry and Biophysics**. v.381, p. 213-224, 2000.

RODRIGUES, V. M.; MARCUSSI, S.; CAMBRAIA, R. S.; ARAÚJO, A. L.; MALTA-NETO, N. R.; HAMAGUCHI, A.; FERRO, E. A. V.; HOMSI-BRANDEBURGO, M. I.; GIGLIO, J. R.; SOARES, A. M. Bactericidal and neurotoxic activities of two myotoxic phospholipase A₂ from *Bothrops neuwiedi pauloensis* snake venom. **Toxicon**. v. 44, p. 305-314, 2004.

RODRIGUES, R. S.; IZIDORO, L. F. M.; TEIXEIRA, S. S.; SILVEIRA, L. B.; HAMAGUCHI, A.; HOMSI-BRANDEBURGO, M. I.; SELISTRE-DE-ARAÚJO, H. S.; GIGLIO, J. R.; FULY, A. L.; SOARES, A. M.; RODRIGUES, V.M. Isolation and functional characterization of a new myotoxic acidic phospholipase A2 from *Bothrops pauloensis* snake venom. **Toxicon**. v. 50, p. 153 – 165, 2007.

ROSENFELD, G. Acidentes por animais peçonhentos. 2ª Ed. In: Mattos AG, editor. **Emergências em pediatria**. São Paulo: Ed. Savier, 1967: 383-393.

ROSENFELD, G. Symptomatology, pathology and treatment of snake bites in South America. In: Bucherl W, Buckley EE, Deulofeu V, editors. **Venomous animals and their venoms**. New York: Academic Press, 1971: 345-841.

RUCAVADO, A.; LOMONTE, B.; OVADIA, M.; GUTIÉRREZ, J. M. Local tissue damage induced by BaPI, a metalloproteinase isolated from *Bothrops asper* (Terciopelo) snake venom. **Experimental and Molecular Pathology**. v. 63, p. 186-199, 1995.

SACAU, E. P.; ESTÉVEZ-BARUN, A.; RAVELO, A. G.; FERRO, E. A.; TOKUDA, H.; MUKAINAKA, T.; NISHINO, H. Inibitory effects of lapachol derivatives on Epstein-Barr vírus activation. **Bioorganic & Medical Chemistry**. v. 11, p. 483-488, 2003.

SANTOS, A. F.; FERRAZ, P. A. L.; PINTO, A. V.; PINTO, M. C. F. R.; GOULART, M. O. F.; SANT'ANA, A. E. G. Molluscicidal activity of 2-hydroxy-3-alkyl-1,4-naphthoquinones and derivatives. **International Journal for Parasitology**. v. 30, p. 1199- 1202, 2000.

SAWAYA, R. J.; MARQUES, O. A. V.; MARTINS, M. **Composição e história natural das serpentes de Cerrado de Itirapina**, São Paulo, sudeste do Brasil.

SBH. 2010. *Brazilian amphibians – List of species*. Acessível em <http://www.sbherpetologia.org.br>. **Sociedade Brasileira de Herpetologia**. Acessado em 20/05/2010.

SCHALOSKE, R. H.; DENNIS, E. A. The phospholipase A₂ superfamily and its group numbering system. **Biochimica et Biophysica Acta**. v. 1761, p. 1246-1259, 2006.

SCOOT, D. L.; WHITE, S. P.; OTWINOWSKI, Z.; YUAN, W.; GELB, M. H.; SINGLER, P. B. Interfacial catalysis: The mechanism of phospholipase A₂. **Science**, v. 250, p. 1541-1546, 1990.

SERRANO, S. M. T.; MAROUN, R. C. Snake venom serine proteinases; sequence homology vs. substrate specificity, a paradox to be solved. **Toxicon**. v. 45, p. 1115-1132, 2005.

SHIBATANI, M.; HASHIDOKO, Y.; TAHARA, S. "A Major Fungitoxin from *Pachira aquatica* and its accumulation in outer bark". **Journal of Chemical Ecology**, **25**(2): 347-353, 1999.

SHIBATANI, M.; HASHIDOKO, Y.; TAHARA, S. Accumulation of isohemigossypolone and its related compounds in the inner bark and heartwood of diseased *Pachira aquatica*. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**. v. 63(10): 1777-1780, 1999.

SILVA, M. N.; FERREIRA, V. F.; SOUZA, M. C. B. V. Um panorama atual da química e da farmacologia de naftoquinonas, com ênfase na β -lapachona e derivados. **Química Nova**. v. 26, p. 407-416, 2003.

SILVA, R. S.F.; COSTA, E. M.; TRINDADE, U. L.T.; TEIXEIRA, D. V.; PINTO, M. C. F.R.; SANTOS, G. L.; MALTA, V. R.S.; DE SIMONE, C. A.; PINTO, A. V.; DE CASTRO, S. L. Synthesis of naphthofuranquinones with activity against *Trypanosoma cruzi*. **European Journal of Medicinal Chemistry**. v. 41, p. 526-530, 2006.

SILVA, V. X. Revisão sistemática do complexo *Bothrops neuwiedi* (Serpente, Viperidae, Crotalinae). Tese (Doutorado)- Universidade de São Paulo, 2000.

SILVA, C. R.; MONTEIRO, M. R.; ROCHA, H. M.; RIBEIRO, A. F.; CALDEIRA-DE-ARAÚJO, A.; LEITÃO, A. C.; BEZERRA, R. J. A. C.; PÁDULA, M. Assessment of antimutagenic and genotoxic potential of Senna (*Cassia angustifolia* Vahl.) aqueous extract using *in vitro* assays. **Toxicology in vitro**. v. 22, p. 212-218, 2008.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVIC, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Editora UFSC, Florianópolis. SC. 2007, 821 p.

SOARES, A. M.; RODRIGUES, V. M.; HOMSI-BRANDEBURGO, M. I.; TOYAMA, M. H.; LOMBARDI, F. R.; ARNI, R. K.; GIGLIO, J. R. A rapid procedure for the isolation of the Lys-49 myotoxin II from *Bothrops moojeni* (caissaca) venom: biochemical characterization, crystallization, myotoxic and edematogenic activity. **Toxicon**. v. 36, p. 503- 514, 1998.

SOARES, A. M.; GUERRA-SÁ, R.; BORJA-OLIVEIRA, C. R.; RODRIGUES, V. M.; RODRIGUES-SIMIONI, L.; RODRIGUES, V.; FONTES, M. R. M.; LOMONTE, B.; GUTIÉRREZ, J. M.; GIGLIO, J. R. Structural and Functional Characterization of BnSP-7, a Lys49 Myotoxic Phospholipase A₂ Homologue from *Bothrops neuwiedi pauloensis* Venom. **Archives of Biochemistry and Biophysics**. v. 378, p. 201-209, 2000.

SOARES, A. M.; SESTITO, W. P.; MARCUSSI, S.; STÁBELI, R. G.; ANDRIÃO-ESCARSO, S. H.; CUNHA, O. A. B.; VIEIRA, C. A.; GIGLIO, J. R. Alkylation of myotoxic phospholipases A₂ in *Bothrops moojenii* venom: a promising approach to an enhanced antivenom production. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**. v. 36, p. 258-270, 2004.

SPANÓ, M. A. ; GRAF, U. Smart: A Method For The Detection Of Mutagenic And Recombinagenic Activity In Somatic Cells Of *Drosophila*. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*. v. 14, p. 111-114, 1998.

SUBRAMANIAN, R.; NAKAJIMA, M.; KAWAKATSU, T. Processing of vegetable oils using polymeric composite membranes. **Journal of Food Engineering**. v. 38, p. 41-56, 1998.

STÁBELI, R. G.; AMUI, S. F.; SANT'ANA, C. D.; PIRES, M. G.; NOMIZO, A.; MONTEIRO, M. C.; ROMÃO, P. R. T.; GUERRA-SÁ, R.; VIEIRA, C. A.; GIGLIO, J. R.; FONTES, M. R. M.; SOARES, A. M. 2005. *Bothrops moojeni* myotoxin-II, a Lys49- phospholipase A₂ homologue: Na example of function versatility of snake venom proteins. **Comparative Biochemistry and Physiology**.

STAGLIANO, K. W.; EMADI, A.; LU, Z.; MALINAKOVA, H C.; TWENTER, B.; YU, M.; HOLLAND, L. E.; ROM, A. M.; HARWOOD, J. S.; AMIN, R.; JOHNSON, A. A.; POMMIER, Y. Regiocontrolled synthesis and HIV inhibitory activity of unsymmetrical binaphthoquinone and trimeric naphthoquinone derivatives of conocurvone. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**. v. 14, p. 5651- 5665, 2006.

STOCKER, K.; BARLOW, G.H. The coagulant enzyme from *Bothrops atrox* venom (batroxobin). **Methods in Enzymology**. Academic Press. v. 45, p.214- 223, 1976.

SWENSON, S.; MARKALND, F. S. Snake venom fibrin(ogen)olytic enzymes. **Toxicon**. v. 45, p. 1021-1039, 2005.

TEIXEIRA, M. J.; DE ALMEIDA, Y. M.; VIANA, J. R.; HOLANDA, J. G.; RODRIGUES, T. P.; PRATA, J. R. C.; COELHO, I. V. B.; RAO, V. S.; POMPEU, M. M. L. *In vitro* and *in vivo* leishmanicidal activity of 2-hydroxy-3-(3-methyl-2-butenyl)-1,4-naphthoquinone (lapachol). **Phytotherapy Research**. v. 15, p. 44-48, 2001.

TESCHKE, R.; GENTHENER, A.; WOLFF, A. Kava hepatotoxicity: Comparison of aqueous, ethanolic, acetic kava extracts and kava-herbs mixtures. **Journal of Ethnopharmacology**. v.123, p. 378-384, 2009.

TYLER, B. C.; RIBOLOW, H. Glycerol phosphorylcholine (GPC) and serine ethanolamine phosphodiester (SEP): evolutionary mirrored metabolites and their potential metabolic roles. **Comparative Biochemistry and Physiology**. v.108, p. 11- 20, 1994

VEIGA, V. F. J.; PINTO, A. C. Plantas medicinais: cura segura? **Química Nova**. v. 28(3), p. 519-528, 2005.

WOLBERG, A. S. Thrombin generation and fibrin clot structure. **Blood Reviews**. v. 21, p. 131- 142, 2007.

Capítulo 2

Atividades antiofídicas da isohemigossipolona, uma naftoquinona isolada de *Pachira aquatica* (Aubl.)

Capítulo escrito de acordo com as normas técnicas de publicação exigidas pela revista *Phytotherapy Research* .

Resumo

Plantas medicinais são ricas fontes em compostos bioativos que despertam o interesse da indústria farmacêutica. Alguns extratos e compostos isolados de plantas apresentam atividade comprovada contra peçonhas de serpentes. As naftoquinonas são utilizadas no tratamento de diversas patologias. O presente trabalho teve como objetivo avaliar a capacidade da isohemigossipolona (ISO) isolada da casca externa da raiz de *Pachira aquatica*, em neutralizar os danos causados pela peçonha de *Bothrops pauloensis* e de uma metaloprotease (BthMP) isolada de *Bothrops moojeni*. As atividades fosfolipásica A₂, coagulante, fibrinogenolítica, hemorrágica, miotóxica e anticoagulante (avaliada por tempo de protrombina (TP), tromboplastina parcial ativada (TTPA) e quantificação de fibrinogênio plasmático) induzidas pela peçonha de *Bothrops pauloensis* foram significativamente inibidas quando a naftoquinona ISO foi previamente incubada com a peçonha. A neutralização também foi observada quando ISO foi aplicada pela mesma via, 15 minutos após a administração da peçonha ou toxina. Em conclusão, nossos resultados mostram que a natoquinona isolada de *Pachira aquatica* inibiu os danos locais e sistêmicos causados por enzimas proteolíticas e fosfolipásicas das peçonhas de serpentes.

Palavras-chave: naftoquinona, *Bothrops pauloensis*, *Bothropoides pauloensis*, isohemigossipolona

Abstract

Medicinal plants are rich sources of bioactive compounds that attract the interest of the pharmaceutical industry. Some extracts and compounds isolated from plants have proven activity against snake venoms. The naphthoquinones are used to treat various diseases. This study aimed to evaluate whether the naphthoquinone isolated from the outer bark of *Pachira aquatica* (ISO), is able to counteract the damage caused by the venom of *Bothrops (Bohtropoides) pauloensis* and a metalloprotease (BthMP) isolated from *Bothrops moojeni*. Phospholipase A2 activity, coagulant, fibrinogenolytic, hemorrhagic, myotoxic and anticoagulant (measured by prothrombin time (PT), activated partial thromboplastin time (APTT) and quantification of plasma fibrinogen) induced by the venom of *Bothrops (Bothropoides) pauloensis* were significantly inhibited when the naphthoquinone ISO was preincubated with the venom. The inhibition was observed when ISO was applied by the same route, 15 minutes after administration of venom or toxin. In conclusion, our results show that the isolated naphthoquinone *Pachira aquatica* inhibited local and systemic damage caused by proteolytic enzymes from snake venoms.

Keywords: naphthoquinone, *Bothrops pauloensis*, *Bothropoides pauloensis*, isohemigossipolone

1 INTRODUÇÃO

No Brasil, as serpentes que causam maior índice de acidentes (aproximadamente 90%) pertencem à família Viperidae e antigo gênero *Bothrops*. Recentemente, Fenwick et al. (2009) reclassificaram as espécies incluídas no gênero *Bothrops* em três novos gêneros: *Bothropoides*, *Bothrops* e *Rhinocerophis* e a espécie *Bothrops pauloensis* passou para *Bothropoides pauloensis*. As peçonhas destas serpentes geralmente não são letais, mas são responsáveis pelo efeito lesivo no local da picada, que frequentemente resulta em sequelas e perda do membro afetado (Brasil, 2001; Cardoso et al., 2009). Elas são ricas em enzimas, principalmente fosfolipases A₂ (PLA₂), serinoproteases (SVSP) e metaloproteases (SVMP) (Fox e Serrano, 2005; Matsui et al., 2000; Porto et al., 2007).

As PLA₂ são responsáveis pela miotoxicidade (Soares et al., 1998; Rodrigues et al., 2007), edema (Ângulo et al., 1997; Calgarotto et al., 2008), letalidade (Homsí-Brandeburgo et al., 1988, Andrião-Escarso et al., 2002) e inibição da agregação plaquetária (Soares et al., 1998; Rodrigues et al., 2007). As serinoproteases são responsáveis pelos distúrbios hemostáticos em vítimas de acidentes ofídicos, atuando sobre a cascata de coagulação e sobre o sistema fibrin(ogen)olítico (Markland, 1998; Serrano et al., 2005; Matsui et al., 2000). As metaloproteases podem provocar quadro hemorrágico, mionecrose, edema e distúrbios no sistema hemostático das vítimas (Cardoso et al., 2009; Gutiérrez e Lomonte 2009; Gomes et al., 2009). Da peçonha de *Bothrops moojeni* foi isolada uma metaloprotease da classe PI (BthMP) que é fibrin(ogen)olítica, edematogênica, miotóxica, fracamente hemorrágica e causa desfibrinogenação do sangue (Gomes et al., 2009).

A soroterapia ainda é o único tratamento para vítimas de acidentes ofídicos aceito pelo Ministério da Saúde. Embora o soro seja eficiente na reversão dos principais efeitos letais causados pela peçonha, geralmente ele é incapaz de reverter os danos locais, resultando em sequelas permanentes (Cardoso et al., 2009). Isto porque, o dano local se instala logo após a picada, por isso o soro antiofídico deve ser administrado no menor espaço de tempo possível logo após o acidente (Brasil, 2001; Rosenfeld, 1967; Cardoso et al., 2009).

As plantas medicinais tem sido durante muitos séculos o único recurso terapêutico de muitas comunidades que as utilizam para o controle de diversas doenças e pragas (Maciel et al., 2002; Simões et al., 2007). Elas apresentam uma grande diversidade de compostos bioativos com propriedades terapêuticas, os quais são produzidos pelo metabolismo secundário. Estes metabólitos são produzidos em baixas concentrações, apresentam estrutura complexa, de baixo peso molecular e grande atividade biológica (Simões et al., 2007).

A produção de metabólitos secundários é decorrente de vários fatores aos quais as plantas estão expostas (Gobbo-Neto et al., 2007). Dentre os metabólitos secundários com ações farmacológicas destacam-se os flavonóides, taninos, terpenos, esteróides e quinonas.

Na família das quinonas encontramos as naftoquinonas, que geralmente apresentam compostos dicetônicos (ou carbonílicos) nas posições 1,2 ou 1,4 do anel naftaleno. Dentre as naftoquinonas, o lapachol e seus derivados (α e β -lapachona) são os metabólitos mais estudados, apresentando diversos efeitos terapêuticos, tais como: atividade antitumoral (Subramanian et al., 1998), antimicrobiana e antifúngica (Shibatani et al., 1999), dentre outras (Aunstin et al., 1974; Santos et al., 2000; Teixeira et al., 2001; Kayser et al., 2000; Goulart et al., 1997; Almeida, 1990; Goel et al., 1987). Algumas naftoquinonas, que ocorrem em vegetais, são vitaminas do complexo K (Silva et al., 2003).

As plantas da família Bombacaceae, que são ricas fontes em naftoquinonas, estão divididas em 28 gêneros com 200 espécies e encontram-se amplamente distribuídas nas regiões tropicais. O gênero *Pachira* tem duas espécies: *Pachira aquatica* e *Pachira macrocarpa*. A *Pachira aquatica* (Aubl.) conhecida no Brasil como “castanha do maranhão” é encontrada principalmente na região Amazônica e no Estado do Maranhão.

Nosso objetivo foi avaliar as propriedades de uma naftoquinona (ISO) isolada de *Pachira aquatica* em neutralizar os efeitos lesivos provocados pela peçonha da serpente *B. pauloensis* e de uma metaloprotease (BthMP) isolada da peçonha de *Bothrops moojeni* (Gomes et al., 2009).

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Obtenção da peçonha bruta de *Bothrops pauloensis* e toxina (BthMP)

A peçonha da serpente *Bothrops pauloensis* (Pb) foi coletada de serpentes capturadas na região de Ribeirão Preto-SP e cedida pelo biólogo Luiz Henrique Anzaloni Pedrosa. A metaloprotease (BthMP) isolada da peçonha da serpente *Bothrops moojeni* foi obtida como descrito por Gomes et al. (2009). A peçonha e a toxina foram liofilizadas, pesadas, dissolvidas em salina, (pH 7,2) e centrifugadas a 3000 x g por 10 minutos. O sobrenadante foi coletado e imediatamente usado. A quantificação de proteínas foi feita pelo método de Bradford (1976).

2.2 Animais

Os camundongos machos Swiss (18-22g) foram doados pelo Instituto Vallé, Uberlândia-MG e mantidos no Centro de Bioterismo e Experimentação Animal (CBEA), sob condições padrões (temperatura de 22 ± 1°C, umidade relativa do ar em torno de 60±5%, ciclo de 12 horas dia/noite) com água e alimentação “ad libitum”. A utilização dos animais foi feita com a aprovação do Comitê de Ética da Universidade Federal de Uberlândia, sob o número de protocolo 021/10.

2.3 Obtenção do Extrato Bruto de *Pachira aquática* e Isolamento da isohemigossipolona (ISO)

Para a preparação do extrato bruto de *Pachira aquatica* (EB), cerca de 40 espécimes jovens (10cm de altura) foram coletadas na CEPLAC (rodovia Ilhéus-Itabuna- BA), transplantadas e cultivadas em área experimental da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia(UESB). Ao atingir aproximadamente um metro de

altura, estas plantas foram coletadas, e suas raízes separadas em casca externa, interna e cerne. A casca externa foi triturada em clorofórmio.

O extrato Clorofórmico da Casca externa da Raiz de *Pachira aquatica* foi submetido a fracionamentos e a isohemigossipolona foi isolada segundo o protocolo descrito por Shibatanni et al(1999).

O extrato bruto (EB) de *Pachira aquatica* e a isohemigossipolona (figura 2) foram pesados e dissolvidos em solução A (84% de água, 14% etanol, 1% tween 80 e 1% de clorofórmio) para a realização dos experimentos.

2.4 Ensaios de Neutralização

Para os ensaios das atividades: coagulante, fosfolipase A₂, fibrinogenolítica e anticoagulante (avaliada por tempo de protrombina (TP), tromboplastina parcial ativada (TTPA) e quantificação de fibrinogênio plasmático), a peçonha foi incubada com ISO ou EB em duas razões (1:1 e 1:5; peçonha/ ISO ou EB; m/m) por 30 minutos a 37°C. Os experimentos foram realizados em triplicata.

Os ensaios das atividades hemorrágica e miotóxica utilizaram também duas razões (1:1 e 1:5) e duas condições experimentais: **condição de incubação** (Pb e ISO ou EB incubados por 30 min a 37°C) e **condição de tratamento** (aplicação de Pb ou BthMP e após 15 minutos aplicação de ISO ou EB no mesmo local).

2.4.1 Atividade Coagulante

Esta atividade foi realizada utilizando-se como substrato o plasma bovino citratado conforme descrito por ASSAKURA et al. (1992). Para cada ensaio 2DMC- Dose Mínima Coagulante (12,4µg) da peçonha de *B. pauloensis* foram incubadas ou não com ISO. A seguir, 100 µL da mistura foram aplicados em 200µL de plasma mantido em banho-maria a 37°C. A atividade coagulante foi realizada no coagulômetro Quick Timer (DRAKE LTDA), medindo-se o tempo de coagulação ao primeiro sinal de formação da rede de fibrina, após a adição das amostras.

2.4.2 Atividade Fosfolipase A₂(PLA₂)

A atividade fosfolipase A₂ foi realizada como descrito por Borges et al. 2000, em gel de agarose usando gema de ovo e eritrócitos como substrato. A peçonha (10µg) incubada ou não com amostra foi aplicada sobre o gel mantido a 37°C. Os halos formados no gel foram observados e medidos após 24 horas.

2.4.3 Atividade Proteolítica sobre o Fibrinogênio

A atividade fibrinogenolítica foi avaliada como descrito por Rodrigues et al., 2000. Amostras de 50µl de fibrinogênio bovino (1mg/1ml de PBS), foram incubadas com 10 µg de Pb a 37°C por 2 horas. A reação foi interrompida com 25 µL de tampão Tris-HCl 0,5M, pH 6,5 contendo 2% (m/v) de SDS, 10% (v/v) de β-mercaptoetanol e 0,05%(m/v) de azul de bromofenol . As amostras foram analisadas em SDS PAGE a 14% (m/v).

2.4.4 Atividade Hemorrágica

Camundongos machos (18-22g) receberam por via intradérmica duas doses mínima hemorrágica (DMH) de Pb (16,3µg) em de 50 µl de PBS (Rodrigues et al., 2001). Camundongos controle receberam somente PBS, ISO ou solução A. Após três horas, os animais foram anestesiados e sacrificados. A pele do dorso foi retirada para medida do halo formado.

2.4.5 Atividade Miotóxica

Camundongos machos (18-22g, n=5) receberam injeções no músculo gastrocnêmio direito de 50µl de PBS contendo 25 µg de Pb combinada ou não com ISO. Camundongos controle receberam somente PBS, ISO ou solução A. Três horas depois os camundongos foram sacrificados e sangrados por punção cardíaca, coletando-se o sangue na presença de citrato de sódio a 0,105 M. A atividade da enzima creatina quinase do plasma foi determinada usando o Kit da marca Biotecnia e expressa em unidades por litro (cada unidade corresponde à

produção de 1 μ mol de NADH por minuto a 30°C).

2.4.6 Ensaio Anticoagulantes

Algumas alterações no sistema hemostático foram avaliadas determinando o Tempo de Protrombina (TP), Tempo de Tromboplastina Parcial Ativada (TTPA) e os níveis de fibrinogênio no plasma de camundongos. Os animais (n=5) receberam injeções de 50 μ l contendo 25 μ g de Pb incubada ou não com ISO no músculo gastrocnêmio da pata direita. Camundongos controle receberam somente PBS, ISO ou solução A. Após 6 horas os animais foram sacrificados, o sangue coletado por punção cardíaca e centrifugado. O tempo de coagulação do plasma foi analisado em um coagulômetro Quick Timer (DRAKE LTDA) usando para TP o Kit-BIOS Diagnóstica, Brasil, para TTPA o Kit LaborLAB, Brasil e para determinação dos níveis de fibrinogênio o Kit Biotécnica, conforme instruções dos fabricantes, respectivamente.

2.5 Análise Estatística

Os resultados foram apresentados como a média do desvio padrão. A normalidade dos dados foi determinada segundo o Teste de Lilliefors e a significância estatística ($p < 0,05$) foi avaliada utilizando o Teste de KRUSKAL-WALLIS calculado com o programa R Language (R DEVELOPMENT CORETEAM, 2006).

3 RESULTADOS

No início deste trabalho fizemos uma análise preliminar, para avaliar o potencial terapêutico contra picada de serpentes de alguns compostos vegetais isolados, provenientes do Laboratório de Produtos Naturais, Departamento de Química e Exatas da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia (UESB), que é coordenado pela Professora Dra. Vanderlúcia Fonseca de Paula. Os resultados desta análise (dados não apresentados) apontaram para uma naftoquinona

designada isohemigossipolona cujos dados obtidos por Temperatura de Fusão (Tf), Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de ^1H e de ^{13}C e Espectrometria de Massas (EM) foram compatíveis com aqueles obtidos por Shibatanni et al. (1999) para a isohemigossipolona- ISO (figura 1).

A tabela 1 mostra que a atividade coagulante induzida pela peçonha bruta de *Bothrops pauloensis* foi significativamente inibida na proporção 1:1 (m/m; Pb/ISO) e na proporção de 1:5 (m/m; Pb/ISO) neutralizou totalmente esta atividade. Esta tabela mostra também que os controles utilizados não influenciam no tempo de coagulação do plasma bovino.

A figura 2 mostra a inibição estatisticamente significativa ($p < 0,05$) da atividade fosfolipase A_2 da peçonha de *B. pauloensis* tanto por ISO quanto pelo extrato bruto de *Pachira aquatica* quando incubados na razão 1:5 (m/m; Pb/ISO ou EB).

A neutralização da atividade fibrinogenolítica de Pb por ISO é mostrada na figura 3. Enquanto a peçonha de *B. pauloensis* degradou totalmente as cadeias $A\alpha$ e $B\beta$ do fibrinogênio (coluna 3), ISO não apresentou atividade proteolítica sobre o fibrinogênio (coluna 7). A naftoquinona isolada de *Pachira aquatica* quando incubada com a peçonha, protegeu parcialmente a proteólise da cadeia $B\beta$ do fibrinogênio na razão de 1:5 (coluna 5) e totalmente na razão de 1:10 (Pb/ISO; m/m) (coluna 6). Foi observado também que quando incubado com Pb ou fibrinogênio, ISO não a causa precipitação inespecífica de proteínas, pois quando centrifugado a amostra não observou a formação de precipitado .

A inibição da atividade hemorrágica de Pb (figuras 4A e 4B) e BthMP (4C) foi estatisticamente significativa ($p < 0,05$) em todas as condições testadas com ISO ou EB, exceto no tratamento de BthMP com ISO na razão 1:1 (m/m; BthMP/ISO). Ressalta-se que, na condição de tratamento, ISO foi capaz de neutralizar Pb e BthMP em mais de 70 e 40%, respectivamente.

A miotoxicidade da peçonha de *B. pauloensis* foi confirmada com o aumento dos níveis de creatina quinase (CK) no plasma de camundongos (figura 5). Todos os resultados deste ensaio mostram que a naftoquinona ISO inibiu significativamente a atividade de Pb, tanto no tratamento quanto na incubação.

Todos os ensaios anticoagulantes (TP, TTPA e quantificação dos níveis de fibrinogênio) foram realizados com Pb e ISO, somente na condição de incubação (figura 6). Nossos resultados mostram que ISO inibiu significativamente o tempo de protrombina, tromboplastina parcial ativada e quantificação dos níveis de fibrinogênio causados por Pb.

4 DISCUSSÃO

As naftoquinonas encontram-se grandemente distribuídas na natureza e apresentam importantes papéis fisiológicos em plantas e animais. Muitos derivados de naftoquinonas são investigados como modelos para inibição das atividades miotóxica e edematogênica, induzidas pela peçonha e miotoxina BthTXI de *Bothrops jararacussu* (Da Silva et al., 2002; De Santis et al., 2009), ou no desenvolvimento de drogas antitumorais, que atuam sobre células alvo produzindo metabólitos reativos e interferindo com enzimas celulares cruciais para a proliferação da célula (Sacau et al., 2003; Da Silva et al., 2002).

A isohemigossipolona é uma naftoquinona isolada da raiz de *Pachira aquatica* por Shibatani et al. (1999a; 1999b). De acordo com os autores a isohemigossipolona tem propriedades fungicidas e, acumula-se constitutivamente na casca externa da raiz de *Pachira aquatica* para proteção dos tecidos de armazenamento da planta.

Neste trabalho avaliamos as propriedades antiofídicas da isohemigossipolona, uma naftoquinona isolada da raiz de *Pachira aquática* por dois protocolos experimentais: por incubação (como na maioria dos trabalhos) e também por tratamento (aplicação de ISO após 15 minutos da administração da peçonha no mesmo local). A isohemigossipolona inibiu eficientemente as atividades coagulante, PLA₂, proteolítica sobre o fibrinogênio, hemorrágica, miotóxica e anticoagulantes provocadas pela peçonha de *Bothrops pauloensis*.

Estudos de inibição da atividade antiofídica por extratos vegetais são bastante difundidos na literatura, mas ainda muito incipientes para compostos isolados. A eficiência dos extratos vegetais pode ser atribuída a múltiplos fatores,

tais como a presença de inibidores, inativadores químicos, princípios imunomoduladores ou agentes quelantes de íons metálicos (Rucavado et al., 2008; Simões et al., 2007; Soares et al., 2004).

Peçonhas de serpentes da família Viperidae são ricas em fosfolipases A₂ e enzimas proteolíticas: metaloproteases (SVMPs) e serinoproteases (SVSPs) onde se incluem as SVTLE (enzimas semelhantes a trombina- “*trombin-like*”). Recentemente, Rodrigues (2010) fez uma análise do perfil de expressão gênica da glândula da peçonha de *B. pauloensis* e encontrou que a grande maioria das toxinas eram as SVMPs (38%) e PLA₂ (27%). As SVSPs constituem apenas 5,1% desta peçonha. Nossos resultados indicam claramente que ISO inibe metaloproteases e fosfolipases A₂ presentes em maior concentração na peçonha de *Bothrops pauloensis*.

Alguns trabalhos sugerem que extratos aquosos de *Musa paradisíaca*, *Schizolobium prahyba*, *Casearia mariquitenses*, *Casearia sylvestris* ou compostos isolados (VALE et al., 2008; Da Silva et al., 2008) podem neutralizar a atividade de constituintes da peçonha por diferentes mecanismos; os quais podem ser: atividade proteolítica, precipitação inespecífica de proteínas, ação quelante de íons metálicos ou peptídeos sintéticos que mimetizam o domínio ligante do substrato à enzima (Borges et al., 2005; Izidoro et al., 2003; Rucavado et al., 2008).

Alguns autores sugerem que a neutralização da ação da peçonha pode ocorrer por uma atividade proteolítica intrínseca dos extratos vegetais ou de compostos isolados (Mendes et al., 2008, Vale et al. 2008). Nossos resultados indicam que ISO não apresenta atividade proteolítica, pois não foi capaz de degradar o fibrinogênio ou as proteínas da peçonha.

Borges et al. (2005), Mendes et al. (2008) e Vale et al. (2008) sugerem que taninos e flavonóides podem se complexar com proteínas de forma inespecífica, precipitando-as. A isohemigossipolona quando misturada com proteínas não forma precipitados, pois quando as amostras são centrifugadas não observamos a presença de precipitados.

A ação quelante de íons metálicos é descrita por vários autores como mecanismo de ação para inibir fosfolipases A₂ e metaloproteases que são

dependentes de Ca^{++} e Zn^{++} , respectivamente. Extratos aquosos de *Casearia sylvestris* (Borges et al., 2001), *Casearia mariquitenses* (Izidoro et al., 2003) e *Mikania glomerata* (Maiorano et al., 2005) inibem enzimas da peçonha de serpentes que são dependentes de íons metálicos, sugerindo que componentes dos extratos retiram esses íons das enzimas, inativando-as. Rucavado et al. (2000) sugerem que batimastat inibiu os danos provocados por peçonhas ofídicas por ação quelante. Rucavado et al. (2008) afirmam que clodronato e doxociclina inibem SVMs porque mimetizam domínios ligantes de íon Zn^{++} , impedindo a atividade de metaloproteases. Não podemos descartar esse mecanismo de ação para ISO, pois o composto inibiu os efeitos lesivos provocados por enzimas dependentes de íons metálicos, como PLA_2 e SVMs.

Sabe-se que após o acidente ofídico a difusão das toxinas presentes na peçonha ocorre rapidamente e, as seqüelas no local da picada causadas pelo envenenamento botrópico normalmente não são revertidas pelo soro antiofídico (BATELLINO et al., 2003). A reprodução das atuais circunstâncias dos acidentes ofídicos, onde o composto isolado é aplicado após 15 minutos do envenenamento, mostrou que a hemorragia e a miotoxicidade causadas pela peçonha de *B. pauloensis* foram inibidas significativamente, similar ao que foi comprovado com o batimastat e doxociclina para a atividade hemorrágica (RUCAVADO et al., 2000; 2008) e extrato aquoso de *Schizolobium parahyba* para as atividades hemorrágica e miotóxica (MENDES et al., 2008).

Um aspecto importante na busca de novos fármacos que inibem os efeitos lesivos causados pela ação proteolítica das peçonhas de serpentes foi discutido por RUCAVADO et al. (2008). Os autores destacam que compostos com ação não específica são necessários em doses mM ou M, enquanto aqueles com ação específica atuam em concentrações μM ou nM. Em nosso trabalho, observamos que 10mM de ISO inibe cerca de 70% da ação hemorrágica da peçonha e 40% da ação hemorrágica da metaloprotease BthMP. Como essa é uma concentração intermediária entre os valores apontados acima, é possível que, mesmo que apresente uma ação quelante, a presença de grupamentos hidroxilas ligados ao anel aromático das naftoquinonas pode interferir ou complexar-se com algum domínio importante para a atividade biológica da proteína.

É importante destacar que a solução A (84% de água, 14% de etanol, 1% de tween 80 e 1% de clorofórmio) utilizada para dissolver a isohemigossipolona não inibiu a atividade lesiva da peçonha. Estes resultados foram observados quando Pb foi dissolvida nesta solução (resultados não mostrados).

Portanto, para uma melhor avaliação do real potencial terapêutico da naftoquinona isolada, são necessários estudos do complexo naftoquinona-proteína por modelagem molecular ou cristalografia de raio X.

5.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, E. R.; SILVA, A. A. F.; SANTOS, E. R.; CORREIA, C. A. L. 1990. Antiinflammatory action of lapachol. *Journal of Ethnopharmacology* 29, 239- 241.

ANDRIÃO-ESCARSO, S. H.; SOARES, A. M.; FONTES, M. R. M.; FULY, A. L.; CORRÊA, F. M. A.; ROSA, J. C.; GREENE, L. J.; GIGLIO, J. R. 2002. Structural and functional characterization of an acidic platelet aggregation and hypotensive phospholipase A_2 from *Bothrops jararacussu* snake venom. *Biochemical Pharmacology* 64, 723-732.

ANGULO, Y.; ESTRADA, R.; GUTIÉRREZ, J. M. Clinical and laboratory alterations in horses during immunization with snake venoms for the production of polyvalent (Crotalinae) antivenom. **Toxicon**. v. 35, p. 81-90, 1997.

AUSTIN, F. G. 1974. *Schistosoma mansoni* chemoprophylaxis with dietary lapachol. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 23 (3), 412-419.

ASSAKURA, M. T.; FURTADO, M. F.; MANDELBAUM, F. R. 1992. Biochemical and biological differentiation of the venoms of the Lancehead Vipers (*Bothrops atrox*, *Bothrops asper*, *Bothrops marajoensis* and *Bothrops moojeni*). *Comparative Biochemistry and Physiology* 102, 727-732.

BATTELINO, C.; PIAZZA, R.; DA SILVA, A. M. M.; CURY, Y.; FARSKY, S. H. P. 2003. Assessment of efficacy of bothropic antivenom therapy of microcirculatory effects induced by *Bothrops jararaca* snake venom. *Toxicon* 41, 583-593.

BIONDO, R.; PRERIRA, A. M. S.; MARCUSSI, S.; PEREIRA, P. S.; FRANÇA, S. C.; SOARES, A. M. 2003. Inhibition of enzymatic and pharmacological activities of some snake venoms and toxins by *Mandevilla velutina* (Apocynaceae) aqueous extract. *Biochimie* 85, 1017-1025.

BORGES, M. H.; SOARES, A. M.; RODRIGUES, V. M.; OLIVEIRA, F.; FRANSCHESCHI, A. M.; RUCUVADO, A.; GIGLIO, J. R.; HOMSI-BARNDEBURGO, M. I. 2001. Neutralization of proteases from *Bothrops* snake venoms by the aqueous extract *Casearia sylvestris* (Flacourtiaceae). *Toxicon* 39, 1863-1869.

BORGES, M. H.; ALVES, D. L. F.; RASLAN, D. S.; PILÓ-VELOSO, D.; RODRIGUES, V. M.; HOMSI-BARNDEBURGO, M. I.; DE LIMA, M. E. 2005. Neutralizing properties of *Musa paradisíaca* L (Musaceae) juice on phospholipase A₂, myotoxic, hemorrhagic and lethal activities of crotalidae venoms. *Journal of Ethnopharmacology* 98, 21-29.

BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE. MINISTÉRIO NACIONAL DE SAÚDE. Manual de Diagnóstico e Tratamento de Acidentes por Animais Peçonhentos, **FUNASA**; 3ª edição, 112p, 2001.

BRADFORD, M. M. 1976. A rapid sensitive method for the quantitation of micogram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72, 248-254.

CALGAROTTO, A. K.; DAMICO, D. C. S.; PONCE-SOTO, L. A.; BALDASSO, P. A.; DA SILVA, S. L.; SOUZA, G. H. M. F.; EBERLIN, M. N.; MARANGONI, S. 2008. Biological and biochemical characterization of new basic phospholipase A₂ BmTX-I isolated from *Bothrops moojeni*. *Toxicon* 51, 1509-1519.

CARDOSO, J. L. C.; FRANÇA, F. O. S.; WEN, F. H.; MALAQUE, C. M. S.; HADDAD, V. Jr. **Animais peçonhentos no Brasil- Biologia, Clínica e Terapêutica dos Acidentes**. 2ª edição São Paulo: Savier, 2009, 540p.

CAVALCANTE, W. L. G.; CAMPOS, T. O.; PAI-SILVA, M. D.; PEREIRA, P. S.; OLIVEIRA, C. Z.; SOARES, A. M.; GALLACI, M. 2007. Neutralization of snake venom phospholipase A₂ toxins by aqueous extract of *Casearia sylvestris*

(Flacourtiaceae) in mouse neuromuscular preparation. *Journal of Ethnopharmacology* 112, 490-497.

Da SILVA, A. J. M.; BUARQUE, C. D.; BRITO, F. V.; AURELIAN, L. MACEDO, L. F.; MALKAS, L. H.; HICKEY, R. J.; LOPES, D. V. S.; NOËL, F.; MURAKAMI, Y. L. B.; SILVA, N. M. V.; MELO, P. A.; CARUSO, R. R. B.; CASTRO, N. G.; COSTA, P. R. R. 2002. Synthesis and preliminary pharmacological evaluation of new (\pm) 1,4-naphthoquinones structurally related to lapachol. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 10, 2731-2738.

Da SILVA, M. N.; FERREIRA, V. F.; DE SOUZA, M. C. B. V. 2003. Um panorama atual da Química e da Farmacologia de naftoquinonas, com ênfase na β -lapachona e derivados. *Química Nova* 26, 407-416.

Da SILVA, S. L.; CALGAROTTO, A. K.; CHAAR, J. S.; MARANGONI, S. 2008. Isolation and characterization of ellagic acid derivatives isolated from *Casearia sylvestris* SW aqueous extract with anti-PLA₂ activity. *Toxicon* 52, 655-666.

Da SILVA, S. L.; CHAAR, J. S.; YANO, T. 2009. Chemotherapeutic potential of two gallic acid derivative compounds from leaves of *Casearia sylvestris* Sw (Flacourtiaceae). *European Journal of Pharmacology* 608, 76-83.

De SANTIS, L. H.; FAGUNDES, F. H.; SOARES, V. C.; PAULA, V. I.; MARANGONI, S.; TOYAMA, M. H. 2009. Modificação na atividade farmacológica da proteína BthTX-I induzida pelo lapachol. *Revista Multidisciplinar da Saúde* 1, 51- 62.

FENWICK, A. M.; GUTBERLET, R. L. JR.; EVANS, J. A.; PARKINSON, C. L. 2009. Morphological and molecular evidence for phylogeny and classification of South American pitvipers, genera *Bothrops*, *Bothriopsis*, and *Bothrocophias* (Serpentes: Viperidae). *Zoological Journal of Linnean Society* 156, 617-640.

FOX J. W.; SERRANO, S. M. T. 2005. Structural considerations of the snake venom metalloproteinases, key members of the M12 reprolysin family of metalloproteinases. *Toxicon* 45, 969-985.

GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. 2007. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. *Química Nova* 30, 374-381.

GOEL, R. K.; PATHAK, N. K.; BISWAS, M.; PANDY, V. B.; SANYAL, A. K. 1987. Effect of lapachol, a naphthaquinone isolated from *Tectona grandis*, on experimental peptic ulcer and gastric secretion. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 39, 138-140.

GOMES, M. S. R.; MENDES, M. M.; DE OLIVEIRA, F.; DE ANDRADE, R. M.; BERNARDES, C. P.; HAMAGUCHI, A.; DE ALCÂNTARA, T. M.; SOARES, A. M.; RODRIGUES, V. M.; HOMSI-BRANDEBURGO, M. I. 2009. BthMP: a new weakly hemorrhagic metalloproteinase from *Bothrops moojeni* snake venom. *Toxicon* 53, 24- 32.

GOULART, M. O. F.; SANT'ANA, A. E. G. 2000. Molluscicidal activity of 2-hydroxy-3-alkyl-1,4-naphthoquinones and derivatives. *International Journal for Parasitology* 30, 1199- 1202.

GUTIÉRREZ, J. M.; LOMONTE, B. 1995. Phospholipase A₂, myotoxins from *Bothrops* snake venoms. *Toxicon* 33, 1405-1424.

GUTIÉRREZ, J. M & LOMONTE, B. Efectos locales en el envenenamiento ofídico en América Latina. 2009. En: **Animais Peçonhentos no Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos acidentes** (CARDOSO, J. L. C.; FRANÇA, F. O. S.; WEN, F. H.; MALAQUE, C. M. S.; HADDAD, V. Jr.) p.352-365 2ª edição Savier Editora, São Paulo, Brasil. 540p.

GUTIÉRREZ, J. M.; RUCUVADO, A. 2000. Snake venom metalloproteinases: Their role in the pathogenesis of local tissue damage. *Biochemie* 82, 841-850.

GUTIÉRREZ, J. M.; OWNBY, C. L. 2003. Skeletal muscle degeneration induced by venom phospholipases A₂: insights into the mechanisms of local and systemic myotoxicity. *Toxicon* 42, 915-931.

GUTIÉRREZ, J. M.; RUCUVADO, A.; ESCALENTE, T.; DÍAZ, C. 2005. Hemorrhage induced by snake venom metalloproteinases: biochemical and biophysical mechanisms involved in microvessel damage. *Toxicon* 45, 997-1011.

HOMSI-BRANDEBURGO, M. I.; QUEIROZ, L. S.; SANTO-NETO, H.; RODRIGUES-SIMIONI, L.; GIGLIO, J. R. 1988. Fractionation of Bothrops jararacussu snake venom: Partial chemical characterization and biological activity of bothropstoxin. *Toxicon* 26, 615 – 627.

IZIDORO, L. F. M.; RODRIGUES, V. M.; RODRIGUES, R. S.; FERRO, E. V.; HAMAGUCHI, A.; GIGLIO, J. R.; HOMSI-BRANDEBURGO, M. I. 2003. Neutralization of some hematological and hemostatic alterations induced by neuwiedase, a metalloproteinase isolated from Bothrops neuwiedi pauloensis snake venom, by the aqueous extract from Casearia mariquitensis (Flacourtiaceae). *Biochimie* 85, 669-675.

KAYSER, O.; KIDERLEN, A. F.; LAATSCH, H.; CROFT, S. L. 2000. In vitro leishmanicidal activity of monomeric and dimeric naphthoquinones. *Acta Tropica* 77, 307- 314.

KLAUS, V.; HARTMANN, T.; GAMBINI, J.; GRAF, P.; STAHL, W.; HARTWIG, A.; KLOTZ, L. 2010. 1,4-Naphtoquinones as inducers of oxidative damage and strss signaling in HaCaT human keratinocytes. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 496, 93-100.

LOMONTE, B.; ANGULO, Y.; RUFINI, S.; CHO, W.; GIGLIO, J. R.; OHNO, M.; DANIELE, J. J.; GEOGHEGAN, P.; GUTIÉRREZ, J. M. 1999. Comparative study of the cytolytic activity of myotoxic phospholipase A₂ on mouse endothelial (tEnd) and skeletal muscle (C2C12) cells *in vitro*. *Toxicon* 37, 145-158.

MACHADO, T. B.; PINTO, A. V.; PINTO, M. C. F. R.; LEAL, I. C. R.; SILVA, M. G.; AMARAL, A. C. F.; KUSTER, R. M.; NETTO-DOS-SANTOS, K. R. 2003. In vitro activity of Brazilian medicinal plants, naturally occurring naphthoquinones and their analogues, against methicilin-resistant *Staphylococcus aureus*. *International Journal of Antimicrobial Agents* 21, 279-284.

MACIEL, M. A. M.; PINTO, A. C.; VEIGA, V. F. J. 2002. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. *Química Nova* 25 (3), 429-438.

MAIORANO, V. A.; MARCUSSI, S.; DAHER, M. A. F.; OLIVEIRA, C. Z.; COUTO, L. B.; GOMES, O. A.; FRANÇA, S. C.; SOARES, A. M.; PEREIRA, P. S. 2005. Antiphidic properties of the aqueous extract of *Mikania glomerata*. *Journal of Ethnopharmacology* 102, 364-370.

MARKLAND, F. S. 1998. Snake venoms and the hemostatic system. *Toxicon* 36, 1749-1800.

MATSUI, T.; YOSHIHIRO, F.; TITANI, K. 2000. Snake venom proteases affecting hemostasis and thrombosis. *Biochimica et Biophysica Acta* 1477, 146-156.

MENDES, M. M.; OLIVEIRA, C. F.; LOPES, D. S.; VALE, L. H. F.; ALCÂNTARA, T. M.; IZIDORO, L. F. M.; HAMAGUCHI, A.; HOMSI-BRANDEBURGO, M. I.; SOARES, A. M.; RODRIGUES, V. M. 2008. Anti-snake venom properties of *Schizolobium parahyba* (Caesalpinoideae) aqueous leaves extract. *Phytotherapy Research* 22, 859-866.

OLIVEIRA, A. B.; RASLAN, D. S.; MIRAGLIA, M. C. M.; MESQUITA, A. A. L. 1990. Estrutura química e atividade biológica de naftoquinonas de Bignoneáceas brasileiras. *Química Nova* 13, 302-307.

OLIVEIRA, C. Z.; MAIORANO, V. A.; MARCUSSI, S.; SANT'ANA, C. A.; JANUÁRIO, A. H.; LOURENÇO, M. V.; SAMPAIO, S. V.; FRANÇA, S. C.; PEREIRA, P. S.; SOARES, A. M. 2005. Anticoagulant and antifibrinolytic properties of the aqueous extract from *Bauhinia forficata* against snake venoms. *Journal of Ethnopharmacology* 98, 213-216.

PAULA, V. F.; ROCHA, M. E.; BARBOSA, L. C. A.; HOWARTH, O. 2006. Aquatidial, a new bis-norsesquiterpenoid from *Pachira aquática* Aubl. *Journal of the Brazilian Chemical Society* 17, 1443-1446.

PORTO, B. N.; TELLI, C. A.; DUTRA, T. P.; ALVES, L. S.; BOZZA, M. T.; FIN, C. A.; THIESEN, F. V.; RENNER, M. F. 2007. Biochemical and biological characterization of the venoms of *Bothriopsis bilineata* and *Bothriopsis taeniata* (Serpentes: Viperidae). *Toxicon* 50, 270-277.

RODRIGUES, V. M.; SOARES, A. M.; ANDRÃO-ESCARSO, S. H.; FRANSCHESCHI, A. M.; RUCAVADO, A.; GUTIERREZ, J. M.; GIGLIO, J. R. 2001. Pathological alterations induced by newwiedase, a metalloproteinase isolated from *Bothrops newwiedi* snake venom. *Biochimie* 83, 471-479.

RODRIGUES, V. M.; MARCUSSI, S.; CAMBRAIA, R. S.; ARAÚJO, A. L.; MALTANETO, N. R.; HAMAGUCHI, A.; FERRO, E. A. V.; HOMSI-BRANDEBURGO, M. I.; GIGLIO, J. R.; SOARES, A. M. 2004. Bactericidal and neurotoxic activities of two myotoxic phospholipase A_2 from *Bothrops newwiedi pauloensis* snake venom. *Toxicon* 44, 305-314.

RODRIGUES, R. S.; IZIDORO, L. F. M.; TEIXEIRA, S. S.; SILVEIRA, L. B.; HAMAGUCHI, A.; HOMSI-BRANDEBURGO, M. I.; SELISTRE-DE-ARAÚJO, H. S.; GIGLIO, J. R.; FULY, A. L.; SOARES, A. M.; RODRIGUES, V.M. 2007.

Isolation and functional characterization of a new myotoxic acidic phospholipase A2 from *Bothrops pauloensis* snake venom. *Toxicon* 50, 153 – 165.

RODRIGUES, RENATA DOS SANTOS. Análise do perfil de expressão gênica da glândula de peçonha de *Bothrops pauloensis* (*Bothropoides pauloensis*). Tese (Doutorado), Universidade Federal de Uberlândia, 2010.

ROSENFELD, G. Acidentes por animais peçonhentos , 2ª Ed. In: Mattos AG, editor. **Emergências em pediatria**. São Paulo: Ed. Savier, 1967: 383-393.

RUCAVADO, A.; ESCALANTE, T.; FRANCESCHI, A.; CHAVES, F.; LÉON, G.; CURY, Y.; OVADIA, M.; GUTIÉRREZ, J. M. 2000. Inhibition of local hemorrhage and dermonecrosis induced by *Bothrops asper* snake venom: effectiveness of early *in situ* administration of the peptidomimetic metalloproteinase inhibitor batimastat and the chelating agent CaNa₂EDTA. *The American Society of Tropical Medicine and Hygiene* 63, 313-319.

RUCAVADO, A.; HENRÍQUEZ, M.; GARCÍA, J.; GUTIÉRREZ, J. M. 2008. Assessment of metalloproteinase inhibitors clodronate and doxycycline in the neutralization of hemorrhage and coagulopathy induced by *Bothrops asper* snake venom. *Toxicon* 52, 754-759.

SANTOS, A. F.; FERRAZ, P. A. L.; PINTO, A. V.; PINTO, M. C. F. R.; GOULART, M. O. F.; SANT'ANA, A. E. G. 2000. Molluscicidal activity of 2-hydroxy-3-alkyl-1,4-naphthoquinones and derivatives. *International Journal for Parasitology* 30, 1199-1202.

SACAU, E. P.; ESTÉVEZ-BARUN, A.; RAVELO, A. G.; FERRO, E. A.; TOKUDA, H.; MUKAINAKA, T.; NISHINO, H. 2003. Inibitory effects of lapachol derivatives on Epstein-Barr vírus activation. *Bioorganic & Medical Chemistry* 11, 483-488.

SERRANO, S. M. T.; MAROUN, R. C. 2005. Snake venom serine proteinases; sequence homology vs. substrate specificity, a paradox to be solved. *Toxicon* 45, 1115-1132.

SHIBATANI, M.; HASHIDOKO, Y.; TAHARA, S. 1999. A Major Fungitoxin from *Pachira aquatica* and its accumulation in outer bark. *Journal of Chemical Ecology*, 25(2), 347-353.

SHIBATANI, M.; HASHIDOKO, Y.; TAHARA, S. 1999. Accumulation of isohemigossypolone and its related compounds in the inner bark and heartwood of diseased *Pachira aquatica*. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* 63(10), 1777-1780.

SILVA, M. N.; FERREIRA, V. F.; SOUZA, M. C. B. V. 2003. Um panorama atual da química e da farmacologia de naftoquinonas, com ênfase na β -lapachona e derivados. *Química Nova*, 26, 407-416.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVIC, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Editora UFSC, Florianópolis. SC. 2007, 821 p.

SOARES, A. M.; RODRIGUES, V. M.; HOMSI-BRANDEBURGO, M. I.; TOYAMA, M. H.; LOMBARDI, F. R.; ARNI, R. K.; GIGLIO, J. R. 1998. A rapid procedure for the isolation of the Lys-49 myotoxin II from *Bothrops moojeni* (caissaca) venom: biochemical characterization, crystallization, myotoxic and edematogenic activity. *Toxicon* 36, 503- 514.

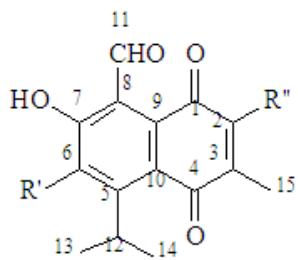
SOARES, A. M.; SESTITO, W. P.; MARCUSSI, S.; STÁBELI, R. G.; ANDRIÃO-ESCARSO, S. H.; CUNHA, O. A. B.; VIEIRA, C. A.; GIGLIO, J. R. 2004.

Alkylation of myotoxic phospholipases A₂ in *Bothrops moojenii* venom: a promising approach to an enhanced antivenom production. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 36, 258-270.

SUBRAMANIAN, R.; NAKAJIMA, M.; KAWAKATSU, T. 1998. Processing of vegetable oils using polymeric composite membranes. *Journal of Food Engineering* 38, 41-56.

TEIXEIRA, M. J.; DE ALMEIDA, Y. M.; VIANA, J. R.; HOLANDA, J. G.; RODRIGUES, T. P.; PRATA, J. R. C.; COELHO, I. V. B.; RAO, V. S.; POMPEU, M. M. L. 2001. *In vitro* and *in vivo* leishmanicidal activity of 2-hydroxy-3- (3-methyl-2-butenyl)-1,4-naphthoquinone (lapachol). *Phytotherapy Research* 15, 44-48.

VALE, L. H. F.; MENDES, M. M.; HAMAGUCHI, A.; SOARES, A. M.; RODRIGUES, V. M.; HOMSI-BRANDEBURGO. 2008. Neutralization of pharmacological and toxic activities of *Bothrops* snake venoms by *Schizolobium parahyba* (Fabaceae) aqueous extract and its fractions. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology* 103, 104-107.



[1] R' = H, R'' = OH

Figura 1- Estrutura química do composto isolado de *Pachira aquatica* iso-hemigossipolona

Tabela 1: Neutralização da atividade coagulante^a da peçonha bruta de *Bothrops (Bothropoides) pauloensis* (Pb) pela naftoquinona isolada de *Pachira aquatica* (ISO).

Pb	Incubação 1:1	Incubação 1:5	ISO	Solução A ^b	PBS
55± 0,64	120± 0,02*	>240 ±0,0*	>240±0,0	>240±0,0	>240±0,0

^a atividade coagulante do plasma determinada até 240 segundos.

^b Solução A- solução solvente do composto isolado de *Pachira aquatica* (84% de água, 14% etanol, 1% tween 80 e 1% de clorofórmio)

*As médias são significativamente ($p < 0,05$) diferentes das médias controles.

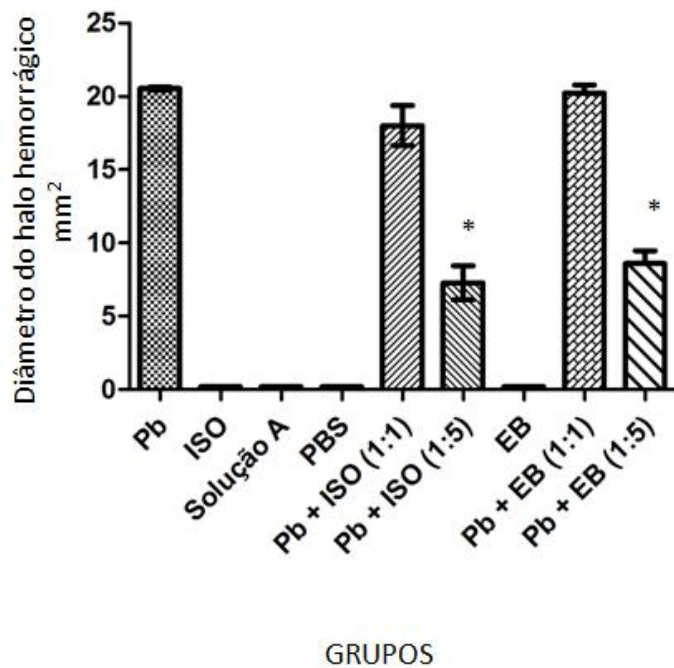


Figura 2- Neutralização da atividade fosfolipásica A_2 da peçonha de *Bothrops pauloensis* (10 μ g Pb) pelo extrato bruto (EB) e isohemigossipolona (ISO) isolada de *Pachira aquática*. Cada experimento é representado pela média \pm S.D (n=3).
*As médias são significativamente ($p < 0,05$) diferentes das médias controles.

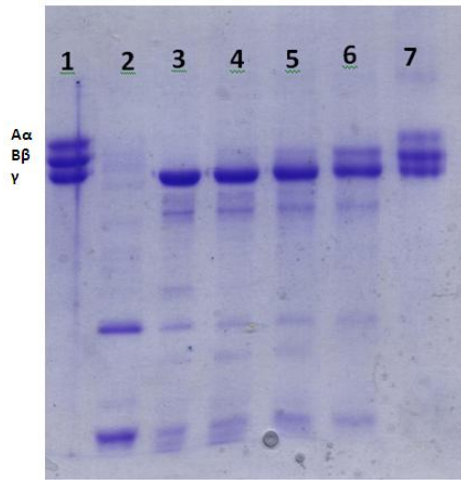


Figura 3- Inibição das proteases da peçonha de *Bothrops pauloensis* (Pb) pela isohepimosipolona(ISO) isolada de *Pachira aquatica*.

- 1- Fibrinogênio (Fib)(15 μ g),
- 2- Pb (10 μ g),
- 3- Pb + Fib,
- 4- Pb + ISO 1:1(m/m; Pb/ ISO) +Fib,
- 5- Pb + ISO 1:5 (m/m; Pb/ ISO) +Fib,
- 6- Pb + ISO 1:10 (m/m; Pb/ ISO) +Fib,
- 7- ISO (composto isolado de *Pachira aquatica*) (100 μ g) + Fib.

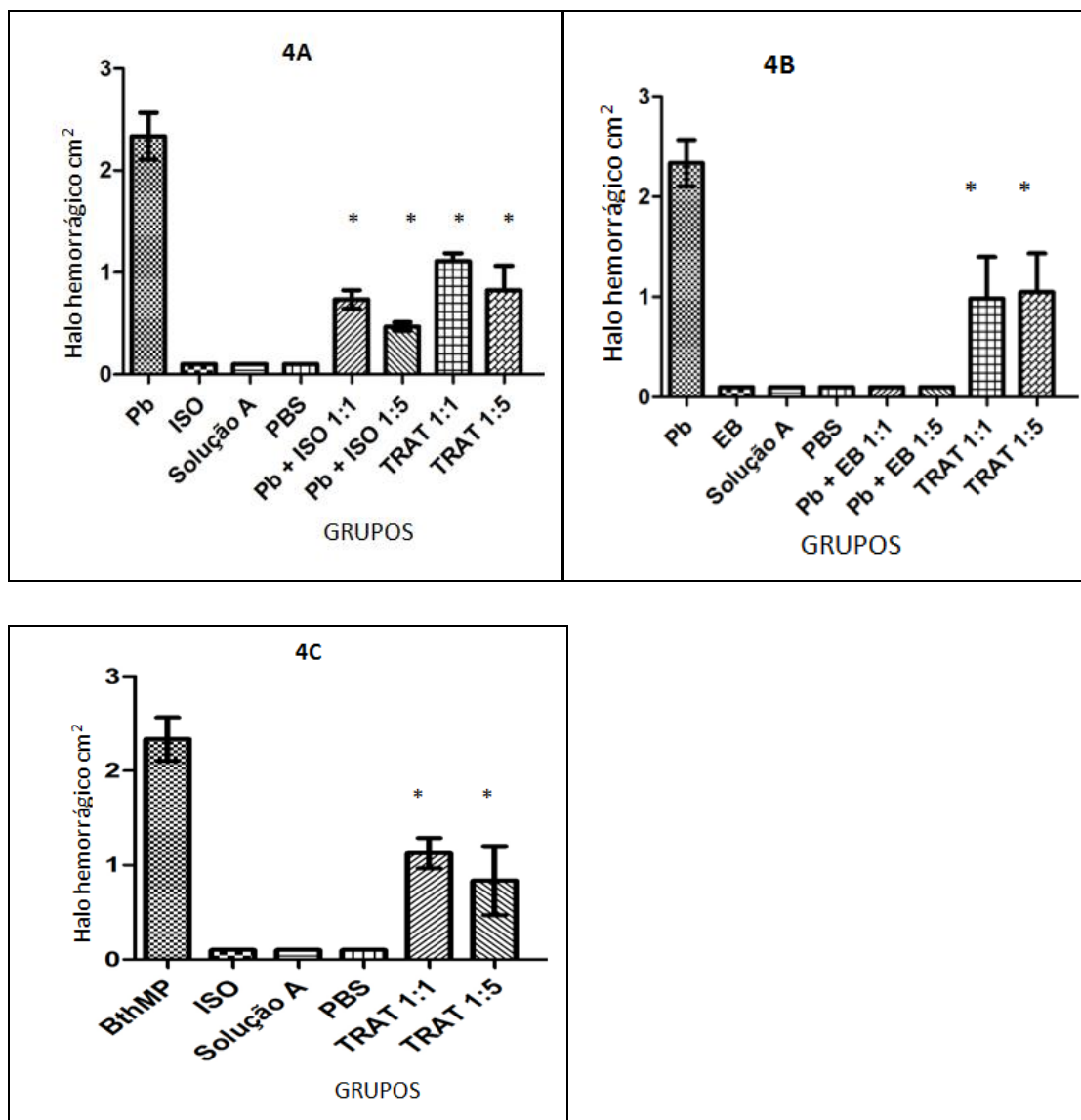


Figura 4- Neutralização da atividade hemorrágica da peçonha de *Bothrops pauloensis* (Pb) e BthMP(metaloprotease de *Bothrops moojeni*) pelo extrato bruto (EB) e isohemigossipolona isolada de *Pachira aquatica* (ISO). A- Neutralização de Pb por ISO. B- Neutralização de Pb por EB; C- Neutralização de BthMP por ISO. Cada experimento é representado pela média \pm S.D (n=5). *As médias são significativamente ($p < 0,05$) diferentes das médias controles.

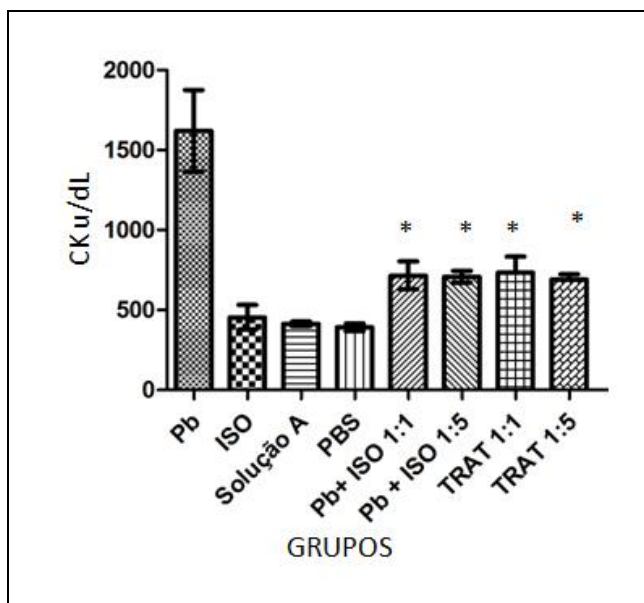


Figura 5- Neutralização da mitotoxicidade da peçonha de *Bothrops pauloensis* (Pb) pela isohemigossipolona (ISO) isolada de *Pachira aquatica*. Cada experimento é representado pela média \pm S.D (n=5). *As médias são significativamente ($p < 0,05$) diferentes das médias controles.

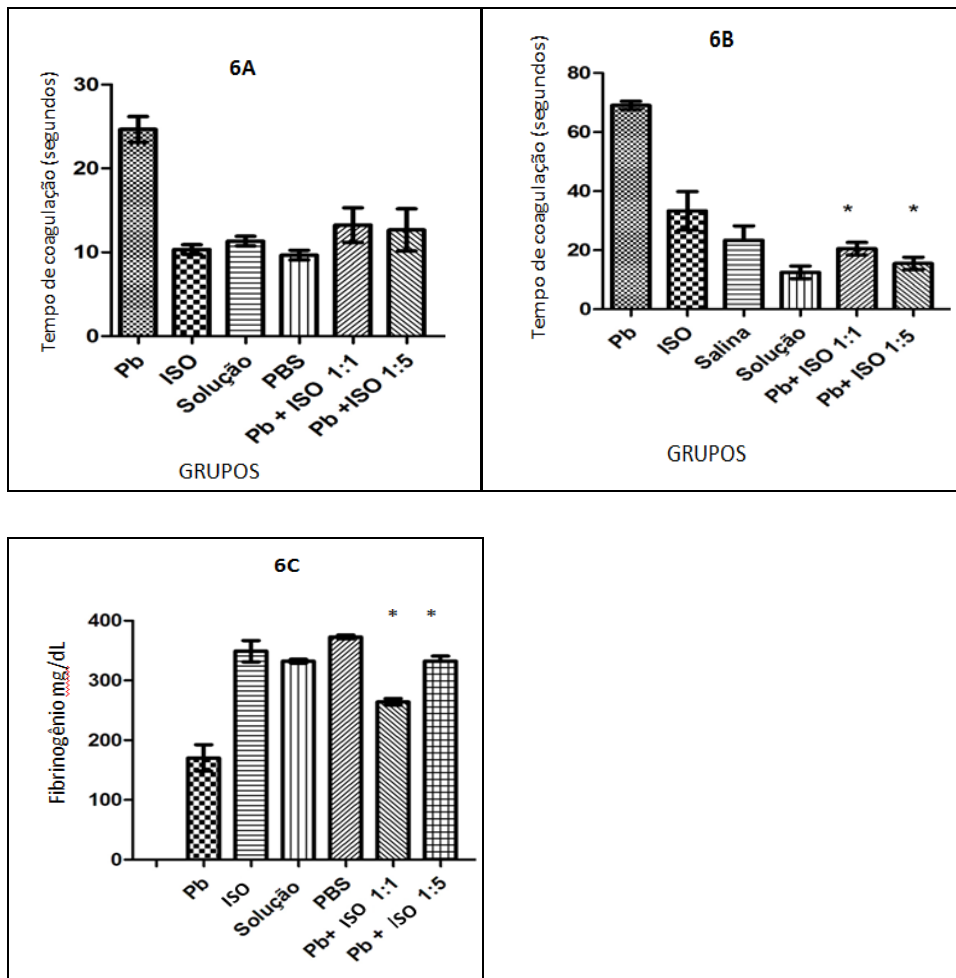


Figura 6- Neutralização de ensaios anticoagulantes da peçonha de *Bothrops (Bothropoides) pauloensis* (Pb) pelo composto isolado de *Pachira aquatica* (ISO). Foi medido o tempo de coagulação (segundos) do plasma de camundongos, coletado 6 horas após inoculação das amostras. A- Tempo de Protrombina (TP); B- Tempo de Tromboplastina Parcial Ativada (TTPA), C- Quantificação dos Níveis de Fibrinogênio Plasmático. Cada experimento é representado pela média \pm S.D (n=5). *As médias são significativamente ($p < 0,05$) diferentes das médias controles.

Capítulo 3

**Avaliação do potencial genotóxico de uma
naftoquinona isolada de *Pachira aquatica* (Aubl.)**

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Mutagênese do Instituto de Genética e Bioquímica da Universidade Federal de Uberlândia, sob a supervisão do prof. Dr. Mário Antônio Spanó, com a colaboração da prof. Dra. Vanderlúcia Fonseca de Paula.

Resumo

A utilização de plantas como medicamentos são comuns em nossa sociedade. Alguns compostos presentes nestas plantas são bastante visados pela indústria farmacêutica, dentre eles podemos destacar as quinonas. As quinonas são conhecidas pelo seu alto potencial farmacológico principalmente como modelos para drogas antitumorais. Estas moléculas são conhecidas por promoverem o estresse oxidativo gerando espécies reativas do oxigênio, podendo causar genotoxicidade nos organismos que as utilizam. O cloridrato de doxorubicina (DXR) é um dos fármacos utilizados no tratamento de algumas neoplasias. Esta substância apresenta alta toxicidade devido aos diferentes mecanismos de ação, podendo causar danos irreparáveis em células saudáveis e tumorais. O objetivo deste trabalho foi avaliar a genotoxicidade em células da asa de *Drosophila melanogaster* pela isohemigossipolona isolada de *Pachira aquatica* (ISO). Para avaliar o potencial genotóxico induzido por ISO utilizou-se o Teste para Detecção de Mutação e Recombinação Somática (SMART). A naftoquinona ISO foi testada em diferentes concentrações (0,25; 0,5 e 1, 0 mg/mL), não apresentando genotoxicidade quando comparada com os controles positivo (DXR) e negativo (água ultrapura). Nossos resultados mostram que a naftoquinona ISO isolada de *Pachira aquatica* não apresentou potencial genotóxico.

Palavras- chave: naftoquinona, SMART, *Pachira aquática*, isohemigossipolona

Abstract

The use of plants as medicines are common in our society. Some compounds present in plants are very concerned by farmacêutica industry, among them we can highlight the quinones. Quinones are known for their high pharmacological potential primarily as models for antitumor drugs. These molecules are known to promote oxidative stress by generating reactive oxygen species, may cause genotoxicity in organisms that use it. The doxorubicin hydrochloride (DXR) is a drug used in treatment of some cancers. This substance is highly toxic due to different mechanisms of action, may cause irreparable damage to healthy cells and tumors. The aim of this study was to evaluate whether a isohemigossipolone isolated from *Pachira aquatica* (ISO) shows genotoxicity in the wing cells of *Drosophila melanogaster*. To evaluate the genotoxic potential induced by ISO was used to test the Detecção of Somatic Mutation and recombination (SMART). The ISO was tested at different concentrations (0.25, 0.5 and 1, 0 mg / ml) with no genotoxicity when compared with positive controls (DXR) and negative (ultrapure water). Our results show that ISO naphthoquinone isolated from *Pachira aquatica* showed no genotoxic potential.

Keywords: naphthoquinone, SMART, *Pachira aquatica*.

1 INTRODUÇÃO

A utilização das plantas medicinais, as quais contêm substâncias bio-ativas com propriedades terapêuticas, profiláticas ou paliativas, tem sido durante muitos séculos o único recurso terapêutico de muitas comunidades que as utilizam para o controle de diversas doenças e pragas (MACIEL et al., 2002; SIMÕES et al., 2007).

A busca por compostos com atividade biológica tem despertado grande interesse da indústria farmacêutica nas últimas décadas. A maioria destes compostos bioativos é proveniente do metabolismo secundário das plantas, como flavonóides, taninos, terpenos, esteróides e quinonas (HABERMEHL, 1998; RASKIN et al., 2002). Apesar de grandemente disponíveis na natureza, um dos grandes desafios para a química farmacêutica, bioquímica e farmacologia é a caracterização dos compostos bioativos presentes em plantas e seu mecanismos de ação (MACIEL et al., 2002).

Plantas das famílias Bignoneaceae e Bombacaceae são ricas em compostos com ação biológica. Entre estes compostos estão as quinonas. Elas são conhecidas pelo seu potencial antitumoral, antitripanomicida, antimicrobiana, antibactericida e antiinflamatória (MALTA et al., 2003; MACHADO et al., 2004; ANDRADE-NETO et al., 2004; KLAUS et al., 2010). As classes mais conhecidas de quinonas são as naftoquinonas, antraquinonas e benzoquinonas. As naftoquinonas contêm um anel naftalênico com dois grupos carbonílicos. Elas se destacam pelo seu significativo potencial citotóxico atribuído ao fato dessas moléculas induzirem o estresse oxidativo aumentando a formação intracelular de espécies reativas do oxigênio (ROS), como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), ânion radical superóxido (O_2^-) e radical hidroxila (HO^\bullet) (SILVA et al., 2003; SACAU et al., 2003). Com o aumento na geração de ROS alguns componentes celulares são danificados, podendo levar a apoptose celular. Devido a estas características, geralmente, naftoquinonas são utilizadas como modelo para o desenvolvimento de drogas anticancerígenas (SILVA et al., 2003; KLAUS et al., 2010; SACAU et al., 2003).

Atualmente o lapachol e seus derivados, principalmente, α e β lapachona são as naftoquinonas mais estudadas. Estudos indicam que o estresse oxidativo provocado por ele ocorre em nível da enzima P450 redutase, promovendo a interação com as topoisomerases I e II e, levando a apoptose celular (KUMAGAI et al., 1997; SILVA et al., 2003).

A planta *Pachira aquatica* pertence à família Bombacaceae, conhecida popularmente como castanha do maranhão ou castanhola. Alguns compostos desta planta foram isolados e apresentaram ação antifúngica (SHIBATANI et al., 1999).

Um dos fármacos utilizados no tratamento de algumas neoplasias é o cloridrato de doxorubicina (DXR). A DXR é um antibiótico antracíclico isolado de *Streptomyces peucetius*, variedade *caesius* (ASHIKAWA et al., 2004), o qual possui alta toxicidade devido aos diferentes mecanismos de ação que podem interferir em reações e enzimas essenciais ao funcionamento do DNA, e levam a danos irreparáveis em células sadias e tumorais (GEWIRTZ, 1999; RAMJI et al., 2003; MINOTTI et al., 2004). Vários cientistas tem desenvolvido diversas pesquisas com compostos bioativos no intuito de diminuir os danos colaterais da via de ação causados pela administração da DXR (ANTUNES et al., 2007; COSTA e NEPONUCENO, 2006; FRAGIORGE et al., 2007; VALADARES et al., 2007; REZENDE et al., 2008).

O Teste para Detecção de Mutação e Recombinação Somática (SMART) em *Drosophila melanogaster* é eficiente para detectar atividade genotóxica e antigenotóxica de compostos (GRAF et al., 1996). Nestes testes são utilizados os animais provenientes de cruzamento padrão (*Standard cross* - ST) e cruzamento de alta capacidade de bioativação metabólica (*High bioactivation cross* - HB), que apresenta altos níveis constitutivos da enzima citocromo P-450 redutase, o que permite detectar promutágenos e procarcinógenos. Este teste detecta um amplo espectro de alterações genéticas, incluindo mutação de ponto, deleção, recombinação mitótica e não-disjunção (GRAF et al., 1989; Graf & van Schaik, 1992), sendo mais sensível para a detecção de eventos recombinacionais (SPANÓ et al., 2001).

O objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial genotóxico da isohemigossipoona, uma naftoquinona isolada da planta *Pachira aquatica*(Aubl.)

utilizando o teste para detecção de mutação e recombinação somática (Somatic Mutation And Recombination Test - SMART) em células de asas de *Drosophila melanogaster*.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Agentes Químicos

A naftoquinona ISO foi isolada do extrato bruto da casca externa da raiz de *Pachira aquatica* (Aubl.) segundo o protocolo descrito no capítulo 2 desta dissertação. O cloridrato de doxorubicina (DXR) (Doxolem; Eurofarma Laboratórios Ltda., São Paulo- SP, Brasil; CAS n°. 23214-92-8) foi obtido do Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia, MG, Brasil. A água ultrapura (18,2MΩ) foi obtida do sistema MiliQ (Milipore, Vimodrone, Milan, Itália). O composto ISO foi dissolvido em solução de dissolução (84% de água Mili-Q, 14% de etanol, 1% de tween 80 e 1% de cloroformio) e adicionado ao meio de cultura. O meio de cultura alternativo (purê de batata instantâneo) foi comprado da Yoki Alimentos S. A., São Bernardo do Campo (SP), Brasil.

2.2 Linhagens de *Drosophila melanogaster*, cruzamentos e tratamentos

O teste para detecção de mutação e recombinação somática (somatic mutation and recombination test – SMART) em células de asas de *Drosophila melanogaster*, também denominado de teste da mancha da asa, foi realizado utilizando três linhagens mutantes: 1] linhagem “*multiple wing hairs*” (*mwh*) com constituição genética *y; mwh jv*; 2] linhagem “*flare-3*” (*flr³*), com constituição genética *flr³ / In(3LR)TM3, ri p^p se^p I(3)89Aa bx^{34e} e Bd^S*; 3] linhagem “*ORR; flare-3*” (*ORR; flare-3*), com constituição genética *ORR; flr³ / In(3LR)TM3, ri p^p sep I(3)89Aa bx^{34e} e Bd^S*. Esta última linhagem possui os cromossomos 1 e 2 provenientes da linhagem Oregon R (R), resistente ao DDT, contendo genes responsáveis por alto nível de enzimas de metabolização do tipo citocromo P(CYP)6 A2 (Graf e van Schaik, 1992).

Com estas linhagens foram realizados dois diferentes cruzamentos: 1) cruzamento padrão (ST – *standard cross*) entre machos “*mwh*” e fêmeas virgens “*flr³*” (Graf *et al.*, 1984; 1989); 2) cruzamento de alta capacidade de bioativação metabólica (HB – *high bioactivation cross*) entre machos “*mwh*” e fêmeas virgens “*ORR; flr³*” (Graf & van Schaik, 1992). Ovos dos dois cruzamentos foram coletados por 8 horas em frascos contendo uma base de ágar-ágar (4%) coberta com uma camada de fermento biológico suplementado com açúcar. A isohemigossipolona (ISO), a DXR ou água foram adicionados ao meio de cultura para a realização dos testes. Larvas de terceiro estágio de desenvolvimento (72 ± 4 h) foram lavadas com água corrente e coletadas com o auxílio de uma peneira de malha fina. Grupos de larvas foram transferidos para frascos de vidros contendo 1,5 g de meio alternativo (purê de batata instantâneo Yoki[®]) (Yoki Alimentos S. A. – São Bernardo do Campo, SP, Brasil) hidratado com soluções contendo diferentes concentrações de ISO (0,25; 0,5 ou 1,0 mg/mL). Como controle positivo foi utilizado o cloridrato de doxorrubicina (DXR) na concentração de 0,125 mg/mL. Como controle negativo foi utilizado o solvente (1% de Tween-80 + 1% de clorofórmio, 14% de etanol e 84% de água ultra pura).

Adultos emergentes portadores do genótipo: *mwh + / + flr³* (trans-heterozigoto marcado – MH) foram coletados e fixados em etanol a 70%. As asas foram destacadas e montadas entre lâmina e lamínula com solução de Faure (30 g de goma arábica, 20 mL de glicerol, 50 g de hidrato cloral e 50 mL de água) e analisadas quanto à ocorrência de diferentes tipos de manchas mutantes, em microscópio óptico de luz, com magnificação de 400x.

2.3 Análise Estatística

As frequências de cada tipo de mancha (pequenas simples, grandes simples ou gêmeas) e as frequências totais de manchas por mosca, de cada tratamento, foram comparadas aos pares (controle negativo *versus* ISO; controle negativo *versus* controle positivo), de acordo com Kastenbaum e Bowman (1970), com nível de significância: $\alpha=\beta=0,05$, de acordo com FREI e WÜRGLER, 1988.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

No presente estudo larvas de terceiro estágio dos cruzamentos ST (*standard cross* ou cruzamento padrão) e HB (*high bioactivation cross* ou cruzamento de alta bioativação), foram tratadas cronicamente (48 horas). Cada tratamento foi feito em duplicata. Antes da avaliação de genotoxicidade, ISO foi submetido a um teste de intervalo de doses. As taxas de sobrevivência de moscas utilizadas nos experimentos são apresentadas na Tabela 1. Não há diminuições significativas nas taxas de sobrevivência das larvas submetidas a apenas ISSO nos cruzamentos ST ou HB (em relação ao grupo controle negativo) demonstrando que a isohemigossipolona não apresenta toxicidade para as larvas. Os resultados (Tabela 1) demonstram que a ISO não foi tóxica nas concentrações testadas quando comparada com a ação da DXR em células somáticas de *D. melanogaster*.

A avaliação genotóxica de ISO foi realizada por meio de cruzamentos ST (*standard cross* ou cruzamento padrão) e HB (*high bioactivation cross* ou cruzamento de alta bioativação). Os resultados obtidos com indivíduos MH (heterozigotos marcados) nos cruzamentos ST (tabela 2), mostram que a isohemigossipolona nas condições testadas (0,25; 0,5 e 1,0 mg/mL) não apresentou genotoxicidade. O número total de manchas mutantes induzidas por ISO não foi estatisticamente significativo ($p > 0,05$) quando comparado ao controle negativo (água MiliQ ou água ultrapura). Nestes cruzamentos, a DXR levou a um aumento na frequência total de manchas mutantes, demonstrando a genotoxicidade associada à DXR.

A tabela 3 mostra a frequência de manchas mutantes (simples pequenas, simples grandes e o total de manchas) observadas nos animais tratados (48 horas) com a ISO em diferentes concentrações (0,25; 0,5 e 1,0mg/mL) no cruzamento HB. Nestas condições, ISO não apresentou potencial genotóxico quando comparado com o controle negativo (água estéril).

As figuras 1 e 2 mostram o total de manchas induzidas por recombinação e mutação *mwh*, observadas em indivíduos MH dos cruzamentos ST e HB tratados com ISO em diferentes concentrações (0,25; 0,5 e 1,0mg/mL)

A isohemigossipolona uma naftoquinona isolada, nas concentrações utilizadas, não é um agente genotóxico, quando analisado por meio de detecção de mutação e recombinação somática em *Drosophila melanogaster* em dois cruzamentos ST e HB. Em indivíduos HB tratados com DXR (0,125mg/mL) o número de manchas teve um aumento significativo ($p < 0,05$) quando comparado com o controle negativo.

Alguns estudos mostram que algumas naftoquinonas podem ser genotóxicas devido ao fato de aumentarem a geração de ROS por meio da formação intracelular de espécies reativas do oxigênio, como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), ânion radical superóxido (O_2^-) e radical hidroxila (HO°) (SILVA et al., 2003; SACAU et al., 2003). Elas se destacam pelo seu significativo potencial citotóxico atribuído à modificação no DNA (KLAUS et al., 2010). A isohemigossipolona uma naftoquinona isolada de *Pachira aquatica* demonstrou que nas concentrações testadas não há potencialização da genotoxicidade, mas seu mecanismo de ação ainda é desconhecido. No presente estudo a doxorrubicina, DXR, foi utilizada devido a sua ação inibidora da topoisomerase II, gerando radicais livres e danos ao DNA (NAVARRO et al. 2006; SPENCER et al. 2008).

Resultados obtidos com o cruzamento HB permitem concluir que a alta expressão das enzimas citocromo P450 redutase, expressa na linhagem "ORR; flr³" não interfere no potencial genotóxico de ISO nas concentrações testadas.

Nossos experimentos mostraram que nas concentrações testadas a naftoquinona isolada de *Pachira aquatica* não apresentou atividade genotóxica em ambos os cruzamentos, ST (*standard cross* ou cruzamento padrão) e HB (*high bioactivation cross* ou cruzamento de alta bioativação).

4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDRADE-NETO, V. F.; GOULART, M. O. F.; Da SILVA, J. F. F.; Da SILVA, M. J.; PINTO, M. C. F. R.; PINTO, A. V.; ZALIS, M. G.; CARVALHO, L. H.; KRETTLI, A. U. Antimalarial activity of phenazines from lapachol, β -lapachone and its derivatives against *Plasmodium falciparum* in vitro and *Plasmodium berghei* in vivo. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**. v. 14, p. 1145-1149, 2004.

ANTUNES, L. M. G.; BUENO, R. B. L.; DIAS, F. L.; FACINO, R. M. Acetylsalicylic acid exhibits anticlastogenic effects on culture human artery: new evidences for cardioprotection. **Mutation Research**. v. 626, p. 155-161, 2007.

ASHIKAWA, K.; SHISODIA, S.; FOKT, I.; PRIEBE, W. AGGARWALL, B. B. Evidence that activation of nuclear factor KB is essential for the cytotoxic effects of doxorubicin and its analogues. **Biochemistry Pharmacology**. v. 67, p. 353-364, 2004.

COSTA, W, F.; NEPONUCENO, J. C. Protective effects of a mixture of antioxidant vitamins and minerals on the genotoxicity of doxorubicin in somatic cells of *Drosophila melanogaster*. **Environmental and Molecular Mutagenesis**. v. 47, p. 18-24, 2006.

FRAGIORGE, E. J.; REZEND.;E, A. A. A.; GRAF, U.; SPANÓ, M. A. Comparative genotoxicity evaluation of imidazolinone herbicides in somatic cells of *Drosophila melanogaster*. **Food and Chemical Toxicology**. v. 46, p. 393-401, 2008.

FREI, H.; WÜNGLER, F. E. Statistical methods to decide whether mutagenicity test data from *Drosophila* assays indicate a positive, negative, or inconclusive result. **Mutation Research**. v. 203, p. 277- 308, 1988.

GEWIRTZ, D. A. A critical evaluation of the mechanisms of action proposed for the anthracycline antibiotics doxorubicin and daunorubicin. **Biochemical Pharmacology**. v.57, p 27-741, 1999.

GRAF, U.; WÜNGLER, F. E.; KATZ, A. J.; FREI, H.; JUON, H.; HALL, C. B.; KALE, P. G. Somatic Mutation and Recombination Test in *Drosophila melanogaster*. **Environmental Mutagenesis**. v. 6, p. 153-188, 1984.

GRAF, U.; FREI, H.; KÄGI, A.; KATZ, A.; WÜNGLER, F. E. Thirty compounds tested in the *Drosophila* wing spot test. **Mutation Research**. v. 222, p. 359-373, 1989.

GRAF, U.; VAN SCHAIK, N. Improved bioactivation cross for the wingsomatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. **Mutation Research**. v. 271, p. 59-67, 1992.

GRANCE, S. R. M.; TEIXEIRA, M. A.; LEITE, R. S.; GUIMARÃES, E. B.; SIQUEIRA, J. M.; FILIU, W. F. O.; VASCONCELOS, S. B. S.; VIEIRA, M. C. *Baccharis trimera*: Effect on hematological and biochemical parameters and hepatorenal evaluation in pregnant rats. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 117, p. 28-33, 2008.

HABERMEHL, G. G.; Secondary and tertiary metabolites as plant toxins. **Toxicol.** v. 36, p. 1707-1719, 1998.

KASTENBAUM, M. A.; BOWMAN, K. O. Tables for determining the statistical significance of mutation frequencies. **Mutation Research**. v. 9, p. 527-549, 1970.

KLAUS, V.; HARTMANN, T.; GAMBINI, J.; GRAF, P.; STAHL, W.; HARTWIG, A.; KLOTZ, L. 1,4-Naphthoquinones as inducers of oxidative damage and stress signaling in HaCaT human keratinocytes. **Archives of Biochemistry and Biophysics**. v. 496, p- 93-100, 2010.

KUMAGAI, Y.;TSURUTANI, Y.;SHINYASHIKI, M.;HOMMA-TAKEDA, S.;NAKAI, Y.;YOSHIKAWA, T.; SHIMOJO, N. Bioactivation of lapachol responsible for DNA scission by NADPH-cytochrome P450 reductase. **Environmental Toxicology and Pharmacology**. v. 3, p. 245- 250, 1997.

MACHADO, T. B.; PINTO, A. V.; PINTO, M. C. F. R.; LEAL, I. C. R.; SILVA, M. G.; AMARAL, A. C. F.; KUSTER, R. M.; NETTO-DOS-SANTOS , K. R. In vitro activity of Brazilian medicinal plants, naturally occurring naftoquinones and their analogues, against methicilin-resistant *Staphylococcus aureus*. **International Journal of Antimicrobial Agents**. v. 21, p. 279-284, 2003.

MACIEL, M. A. M.; PINTO, A. C.; VEIGA, V. F. J. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Química Nova**. v. 25 (3), p. 429-438, 2002.

MALTA, V. R. S.; PINTO, A. V.; MOLFETTA, F. A.; HONÓRIO, K. M.;De SIMONE, C. A.; PEREIRA, M. A.; SANTOS, R. H. A.; Da SILVA, A. B. F. The influence of eletronic and steric effects in the structure- activity relationship (SAR) study of quinine compounds with biological activity against *Trypanossoma cruzi*. **Journal of Molecular Structure (Theochem)**. v. 634, p. 271-280, 2003.

MEDINA, L. F. C.; VIAU, C. M.; MOURA, D. J.; SAFFI, J.; BRANDELLI, A.; HENRIQUES, J. A. P. Genotoxicity of aminohydroxynaphthoquinones in bactéria, yeast, and Chinese hamster lung fibroblast cells. **Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**. v. 650, p. 140-149, 2008.

MINOTTI, G.; MENNA, P.; SALVATORELLI, E.; CAIRO, G.; GIANNI, L. Anthracyclines: Molecular advances and pharmacologic developments in antitumor activity and cardiotoxicity. **Pharmacology Reviwes**. v. 56, p. 185-229.

NAVARRO, R.; BUSNADIEGO, I.; RUIZ-LARREA, M. B.; RUIZ-SANZ, J. I. Superoxide anions are involved in doxorubicin-induced ERK activation in

hepatocyte cultures. **Annals of the New York Academy of Sciences**. v.1090, p. 419-428, 2006.

RAMJI, S.; LEE, C.; INABA, T.; PATTERSON, A. V.; RIDICK, D. S. Human NADPH-cytochrome p450 reductase over does not enhance the aerobic cytotoxicity of doxorubicin in human breast cancer cell lines. **Cancer Research**. v. 63, p. 6914-6919, 2003.

RASKIN, I.; RIBNICKY, D. M.; KOMARNYTSKY, S.; ILIC, K.; POULEV, A.; BORISJUK, N.; BRINKER, A.; MORENO, D. A.; RIPOLL, C.; YAKOBY, N.; O'NEAL, J. M.; CORNWELL, T.; PASTOR, I.; FRIDLENDER, B. Plants and human health in the twenty-first century. **TRENDS in Biotechnology**. v.20, p. 522-531, 2002.

REZENDE, A. A. A.; GRAF, U.; GUTERRES, Z. R.; KERR, W. E.; SPANÓ, M. A. Protective effects of proanthocyanidins of grape (*Vitis vinifera* L.) seeds on DNA damage induced by Doxorubin in somatic cells of *Drosophila melanogaster*. **Food and Chemical Toxicology**. v. 47, p. 1466-1472, 2009.

SACAU, E. P.; ESTÉVEZ-BARUN, A.; RAVELO, A. G.; FERRO, E. A.; TOKUDA, H.; MUKAINAKA, T.; NISHINO, H. Inhibitory effects of lapachol derivatives on Epstein-Barr virus activation. **Bioorganic & Medical Chemistry**. v. 11, p. 483-488, 2003.

SILVA, M. N.; FERREIRA, V. F.; SOUZA, M. C. B. V. Um panorama atual da química e da farmacologia de naftoquinonas, com ênfase na β -lapachona e derivados. **Química Nova**. v. 26, p. 407-416, 2003.

SILVA, C. R.; MONTEIRO, M. R.; ROCHA, H. M.; RIBEIRO, A. F.; CALDEIRA-DE-ARAÚJO, A.; LEITÃO, A. C.; BEZERRA, R. J. A. C.; PÁDULA, M. Assessment of antimutagenic and genotoxic potential of Senna (*Cassia angustifolia* Vahl.) aqueous extract using *in vitro* assays. **Toxicology in vitro**. v. 22, p. 212-218, 2008.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVIC, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Editora UFSC, Florianópolis. SC. 2007, 821 p.

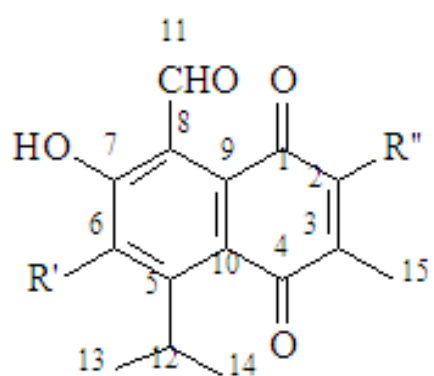
SHIBATANI, M.; HASHIDOKO, Y.; TAHARA, S. "A Major Fungitoxin from *Pachira aquatica* and its accumulation in outer bark". **Journal of Chemical Ecology**, **25**(2): 347-353, 1999.

SHIBATANI, M.; HASHIDOKO, Y.; TAHARA, S. Accumulation of isohemigossypolone and its related compounds in the inner bark and heartwood of diseased *Pachira aquatica*. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**. 63(10): 1777-1780, 1999.

SPANÓ, M. A.; FREI, H.; WÜRGLER, F. E.; GRAF, U. Recombinogenic activity of four compounds in the standard and high bioactivation crosses of *Drosophila melanogaster* in wing spot test. **Mutagenesis**. v. 16, p. 385-394, 2001.

SPENCER, D. M. S.; BILARDI, R. A.; KOCH, G. C.; NAFIE, J. W.; KIMURA, K. I.; CUTTS, S. M.; PHILLIPS, D. R.; DNA repair in response to anthracycline-DNA adducts: A role for both homologous recombination and nucleotide excision repair. **Mutation Research**. v. 638, p. 110-121, 2008.

VALADARES, B. L. B.; GRAF, U.; SPANÓ, M. A. Inhibitory effects of water extract of própolis on doxorubicin-induced somatic mutation and recombination in *Drosophila melanogaster*. **Food and Chemical Toxicology**. v. 46, p.1103-1110, 2008.



[1] R' = H, R'' = OH

Figura 1- Estrutura química da naftoquinona isolada de *Pachira aquatica* isohemigossipolona (ISO).

Tabela 1 Larvas sobreviventes expostas a diferentes concentrações de somente isohemigossipolona (ISO) no Teste para Detecção de Mutação e Recombinação Somática em *D. melanogaster* e comparação com grupos controles (água ultrapura e DXR).

Compostos		Standard cross (ST)		High bioactivation cross (HB)	
DXR (mg/mL)	ISO (mg/mL)	Survival (%)	<i>p</i> -value	Survival (%)	<i>p</i> -value
0	0	85	>0.05	85	>0.05
0	1.0	80	>0.05	60	>0.05
0	0.5	90	>0.05	80	>0.05
0	0.25	90	>0.05	90	>0.05
0.125	0	70	>0.05	70	>0.05

Comparações estatísticas de taxas de sobrevivência foram feitas pelo teste de qui-quadrado para amostras independentes

Tabela 2 Teste de detecção de manchas (SMART) em heterozigotos marcados (MH) em progênies de cruzamento padrão (ST) após tratamento crônico das larvas de *Drosophila* com isohemigossipolona (ISO) e doxorubicina (DXR).

Genótipos e tratamentos		Número de asas (N)	Manchas por asa (número de manchas) diagnóstico estatístico ^a				Manchas com clones <i>mwh</i> ^c (n)	Frequência de clones formação/10 ⁵ cells por divisão de célula ^d (n/NC) ^{e,f}
			Manchas pequenas simples (1-2 células) ^b m=2	Manchas largas simples (>2 células) ^b m=5	Manchas gêmeas m=5	Total de manchas m=2		
DXR (mg/mL)	ISO (mg/mL)							
<i>mwh/flr³</i>								
0	0	40	0.25 (10)	0.08 (03)	0.03 (01)	0.35 (14)	14	7,1
0	0.25	40	0.13 (05)-	0.08 (03)i	0.00 (00)i	0.20 (08)-	8	4
0	0.50	40	0.18 (07)-	05 (02)i	0.00 (00)i	0.23 (09)-	9	4,6
0	1.0	40	0.23 (9)i	0.00 (00)-	0.10 (04)i	0.33 (13)-	13	6,6
0.125	0	40	0.98 (39)+	2.15 (86)+	3.68 (147)+	6.8 (272)+	267	13,6

^a Diagnóstico estatístico de acordo com Frei e Würzler [1988]: +, positivo; -, negativo; i, inconclusivo; P<0.05.

^b Incluindo linhagem *flr³* manchas simples.

^c Considerando clones *mwh* de manchas simples e gêmeas *mwh* single.

^d Calculado de acordo com Frei et al. [1992].

^e Número entre colchetes são as frequências de indução corrigido para a incidência espontânea estimada de controles negativos

^f C=48,800 (número aproximado de células examinada por asa).

Tabela 3 Teste de detecção de manchas (SMART) em heterozigotos marcados (MH) em progênies de cruzamento de alta bioativação (HB) após tratamento crônico das larvas *Drosophila* com isohemigossipolona (ISO) e doxorubicina (DXR).

Genotipos e tratamentos		Número de asas (N)	Manchas por asa (número de manchas) diagnóstico estatístico ^a				Manchas com clone <i>mwh</i> ^c (n)	Frequência de clones formação/10 ⁵ células por divisão ^d (n/NC) ^{e,f}
			Manchas pequenas simples (1-2 células) ^b m=2	Manchas largas simples (>2 células) ^b m=5	Manchas gêmeas m=5	Total de manchas m=2		
DXR (mg/mL)	ISO (mg/mL)							
<i>mwh/flr³</i>								
0	0	40	0.30 (12)	0.05 (02)	0.05 (02)	0.45 (18)	18	9,2
0	0.25	40	0.20 (08)-	0.10 (04)i	0.00 (00)i	0.30 (12)-	12	6,1
0	0.50	40	0.38 (15)i	0.03 (01)i	0.00 (00)i	0.40 (16)-	16	8,1
0	1.0	40	0.35 (14)i	0.13 (05)i	0.00 (00)i	0.43 (17)-	17	8,7
0.125	0	40	3.15 (126)+	3.65 (146)+	3.80 (152)+	10.60 (424)+	404	20,6

^a Diagnóstico estatístico de acordo com Frei e Würzler [1988]: +, positivo; -, negativo; i, inconclusivo; P<0.05.

^b Incluindo linhagem *flr³* manchas simples.

^c Considerando clones *mwh* de manchas simples e gêmeas *mwh* single.

^d Calculado de acordo com Frei et al. [1992].

^e Número entre colchetes são as frequências de indução corrigido para a incidência espontânea estimada de controles negativos

^f C=48,800 (número aproximado de células examinada por asa).

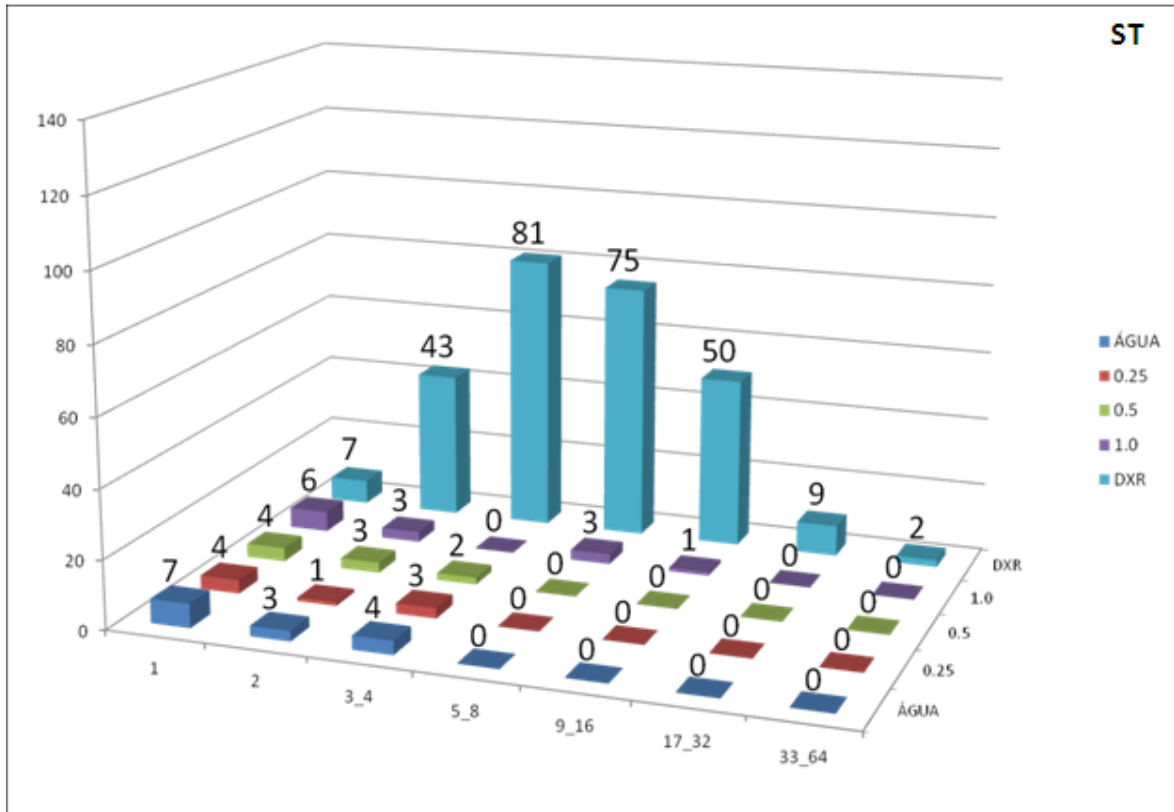


Figura 2- Distribuição do tamanho (número de células) de manchas mutantes em asas de descendentes trans-heterozigotos marcados (MH) provenientes do cruzamento padrão (ST) tratados com água MilliQ (controle negativo), isohemigossipolona-ISO (0,25; 0,5 ou 1,0 mg/mL) e água e DXR 0,125 mg/mL (controle positivo).

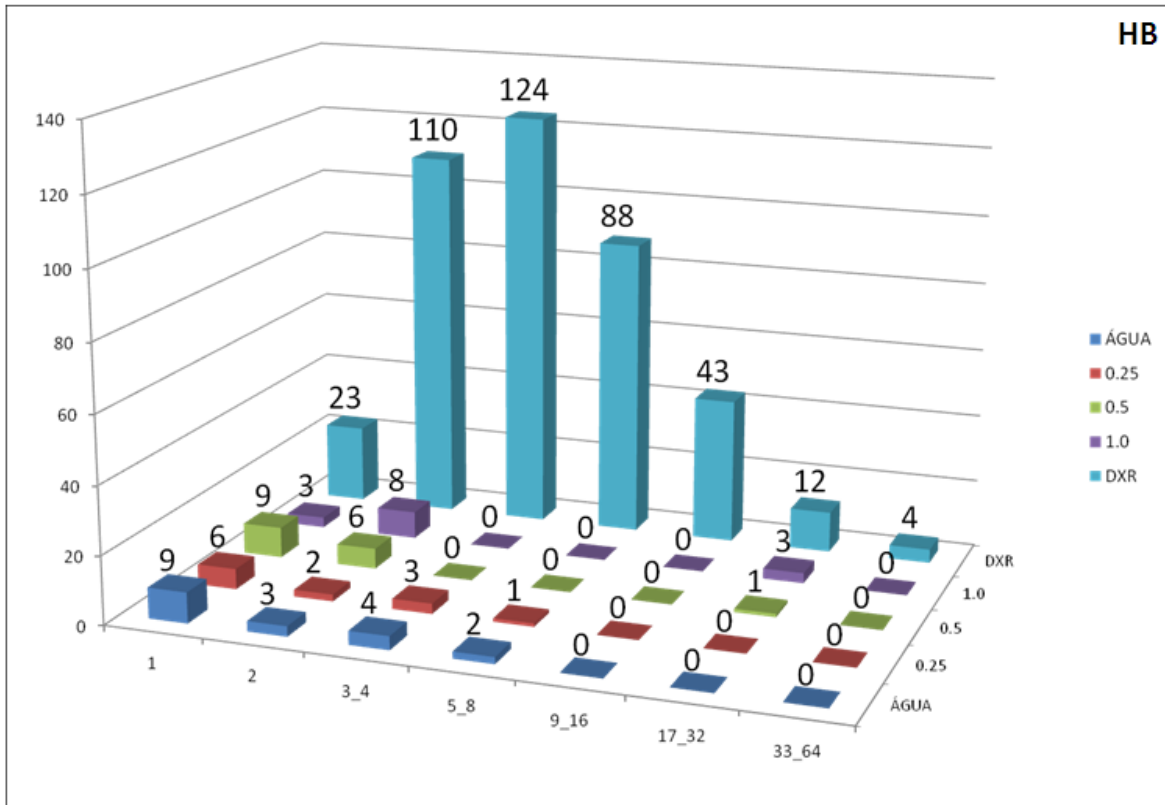


Figura 3- Distribuição do tamanho (número de células) de manchas mutantes em asas de descendentes trans-heterozigotos marcados (MH) provenientes do cruzamento de alta ativação (HB) tratados com água MilliQ (controle negativo), isohemigossipolona-ISO (0,25; 0,5 ou 1,0 mg/mL) e água e DXR 0,125 mg/mL (controle positivo).

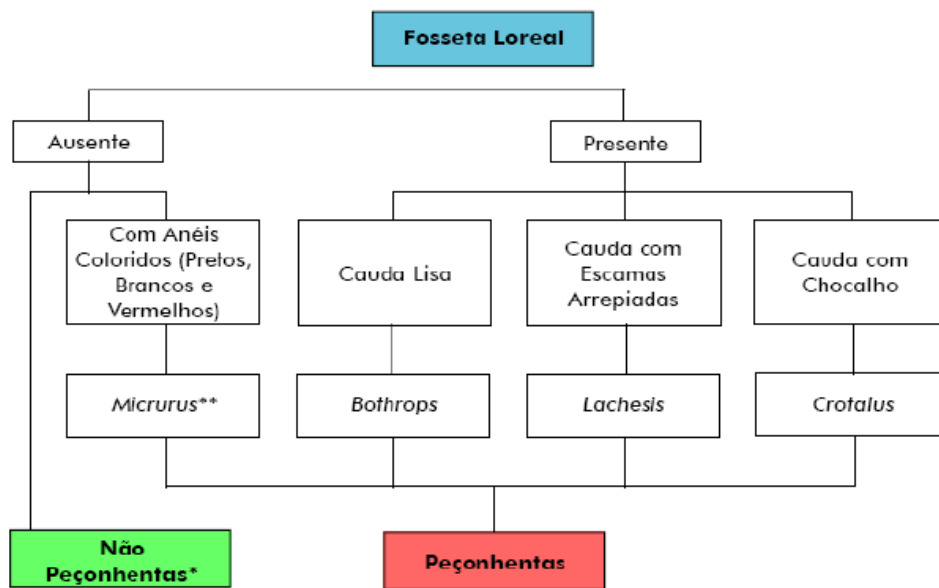
CONCLUSÃO GERAL

- O composto isohemigossipolona inibiu eficientemente as atividades coagulante, fosfolipásica A₂, proteolítica sobre o fibrinogênio, miotóxica, hemorrágica e anticoagulantes (tempo de protrombina- TP; tempo de tromboplastina parcial ativada-TTPA e quantificação dos níveis de fibrinogênio) causadas pela peçonha de *Bothrops pauloensis*.
- O Teste para Detecção de Mutação e Recombinação Somática (SMART) em asa de *Drosophila melanogaster* mostrou que nas condições testadas a isohemigossipolona não apresentou genotoxicidade.
- É importante ressaltar que as concentrações de isohemigossipolona utilizadas no teste de genotoxicidade são superiores às dos ensaios de neutralização mostrados no capítulo anterior. Portanto, podemos inferir que a isohemigossipolona não é genotóxica nas doses utilizadas nos experimentos de neutralização da peçonha de *Bothrops pauloensis*, aumentando nossa confiabilidade para uma possível utilização terapêutica.

ANEXOS



Flor da planta *Pachira aquática*.



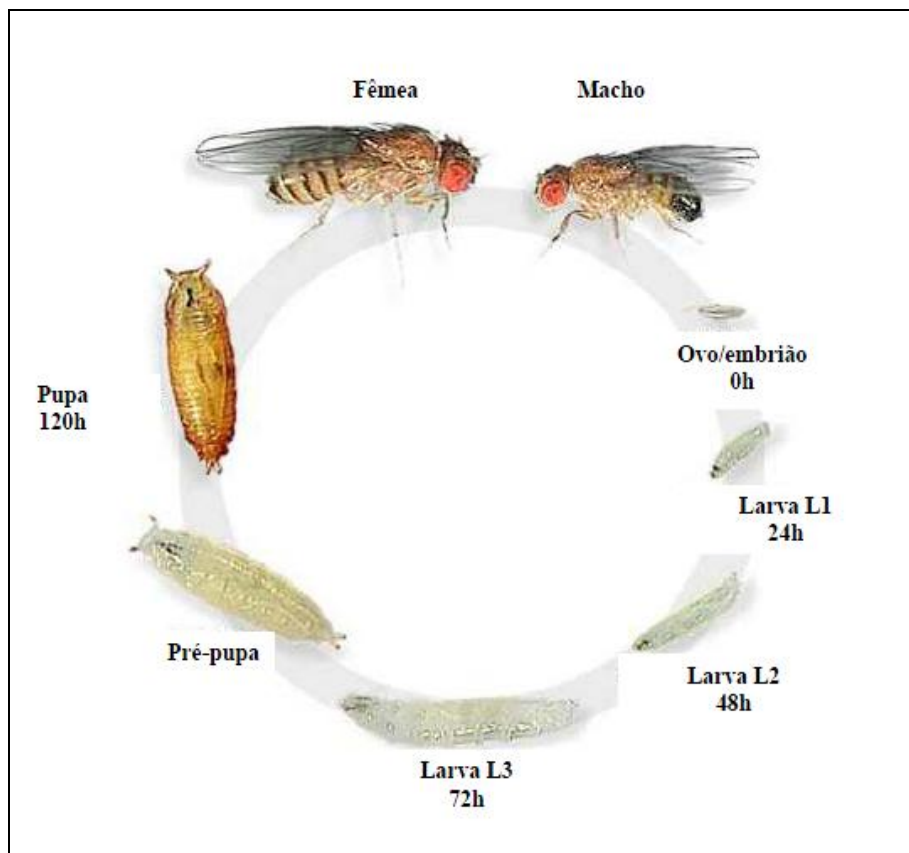
* As falsas corais podem apresentar o mesmo padrão de coloração das corais verdadeiras, sendo distinguíveis pela ausência de dente inoculador.
 ** Na Amazônia, ocorrem corais verdadeiras desprovidas de anéis vermelhos.

Diferença de serpentes peçonhentas e não peçonhentas.

Fonte: FUNASA, 2001- Ministério da Saúde. Manual de Diagnóstico e Tratamento

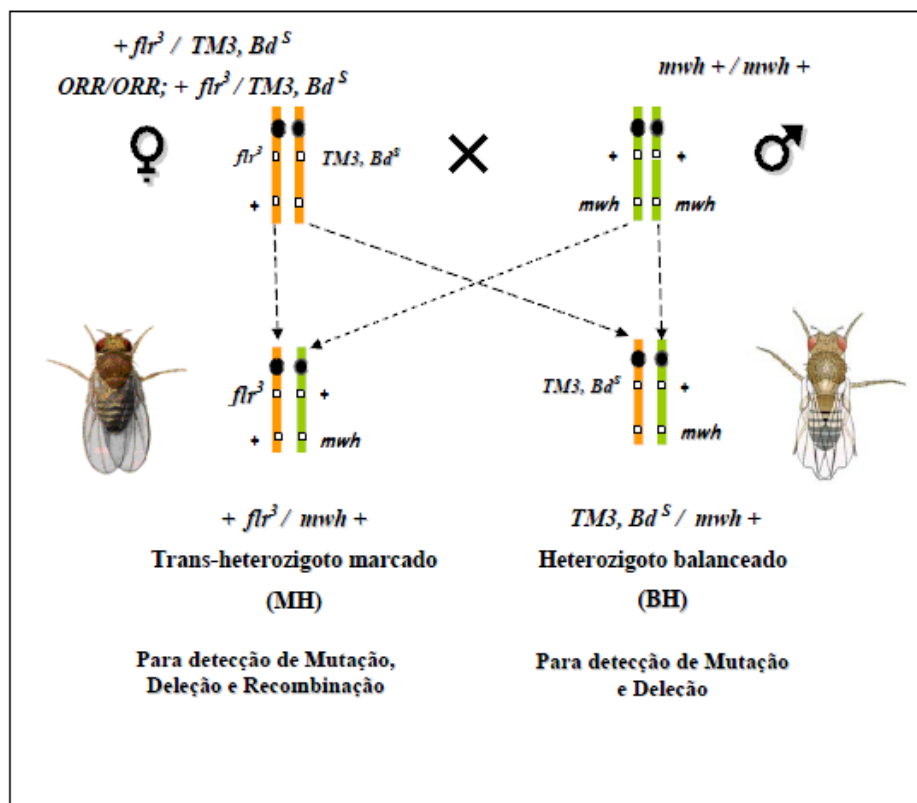


Serpente Peçonhenta

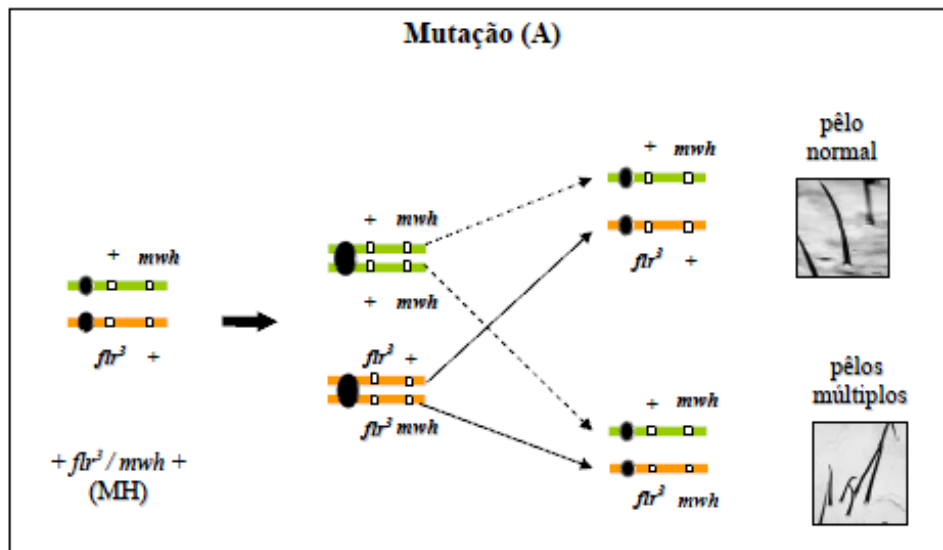


Ciclo de vida de *Drosophila melanogaster*.

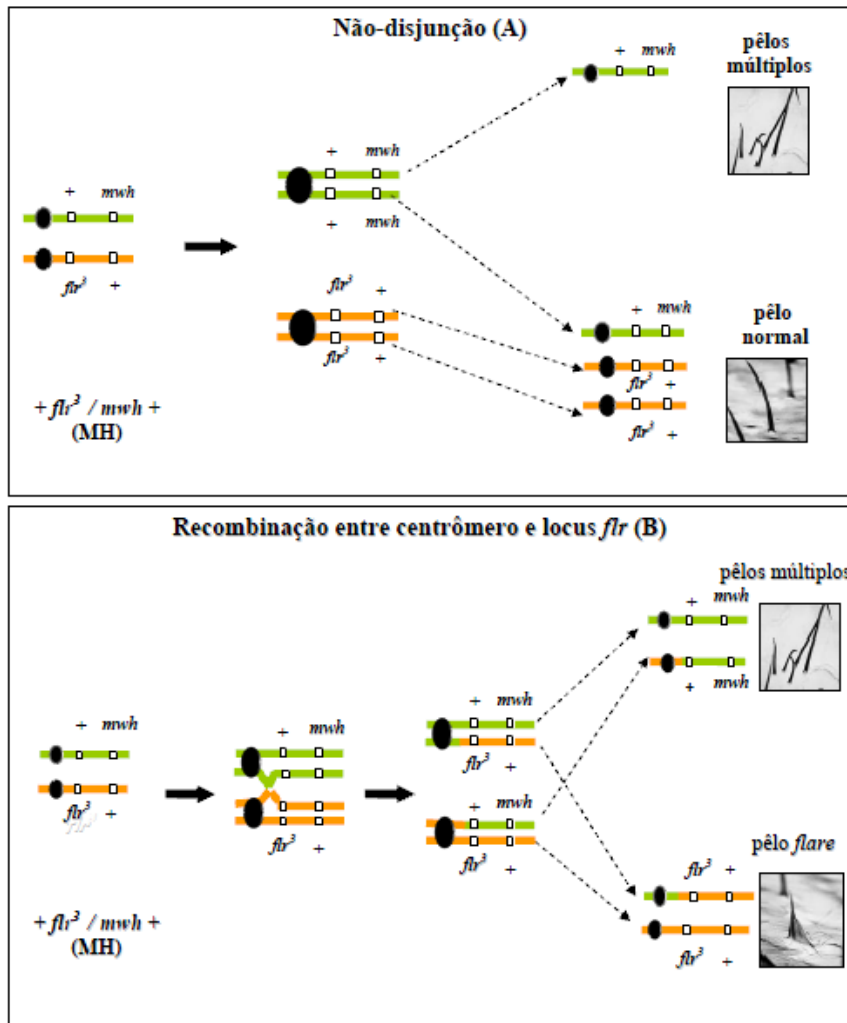
Adaptado de <http://flymove.unimuenster.de/homepage.html> acessado em 24/11/2004.



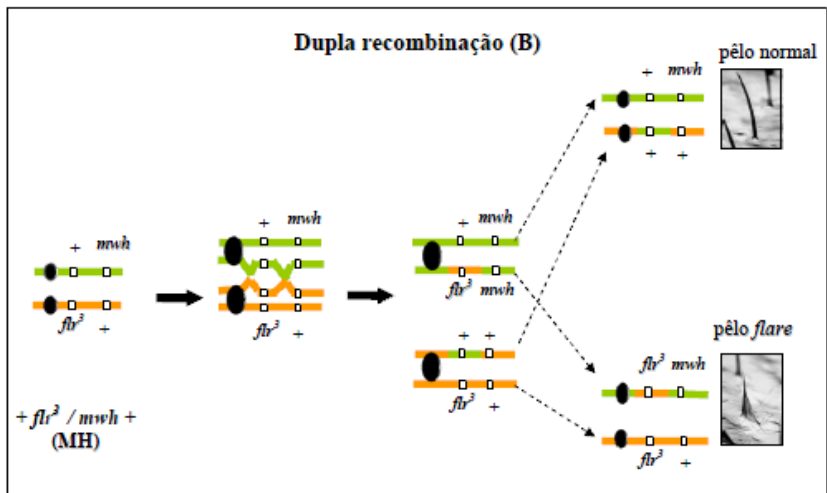
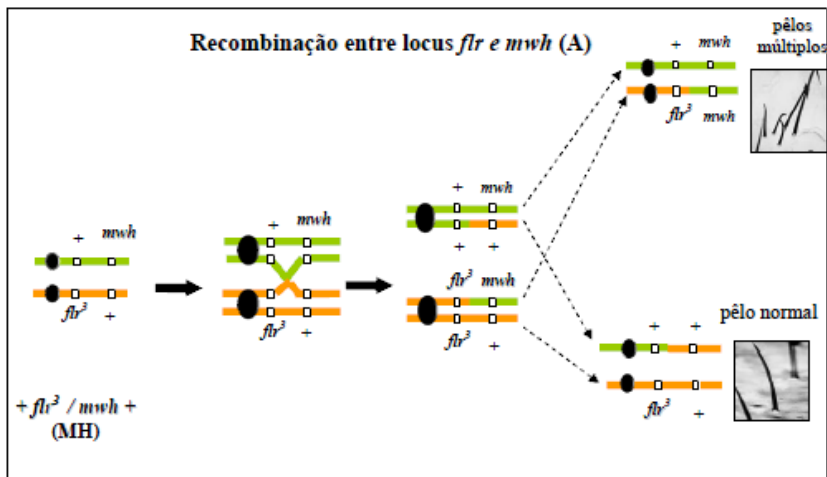
Esquema representativo do cruzamento padrão (ST).



Esquemas representativos dos mecanismos responsáveis pelo aparecimento de manchas mutantes *mwh* por meio de mutação (A) e deleção (B).



Esquemas representativos dos mecanismos responsáveis pelo aparecimento de manchas mutantes *mwh* por meio de não disjunção (A) e recombinação entre centrômero e locus *flr* (B).



Esquemas representativos dos mecanismos responsáveis pelo aparecimento de manchas mutantes *mwh* por meio de recombinação entre locus *flr* e *mwh* (A) e dupla recombinação (B).