

**UNIVERSIDADE DE SOROCABA
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO, PESQUISA, EXTENSÃO E
INOVAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

Débora Antunes Neto Moreno

**NANOPARTÍCULAS DE PRATA (AgNPs) – EFEITOS SOBRE LESÕES DE
NERVO PERIFÉRICO E MÚSCULO DE ROEDORES E AVALIAÇÃO DE
MUTAGENICIDADE (TESTE DE AMES)**

**Sorocaba/SP
2019**

Ficha Catalográfica

Moreno, Débora Antunes Neto

M842n Nanopartículas de prata (AgNPs) : efeitos sobre lesões de nervo periférico e músculo de roedores e avaliação de mutagenicidade (teste de Ames) / \Débora Antunes Neto Moreno. – 2019.

81 f. : il.

Orientadora: Profa. Dra. Yoko Oshima Franco

Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) –
Universidade de Sorocaba, Sorocaba, SP, 2019.

Débora Antunes Neto Moreno

**NANOPARTÍCULAS DE PRATA (AgNPs) – EFEITOS SOBRE LESÕES DE
NERVO PERIFÉRICO E MÚSCULO DE ROEDORES E AVALIAÇÃO DE
MUTAGENICIDADE (TESTE DE AMES)**

Dissertação apresentada à Banca Examinadora do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade de Sorocaba, como exigência parcial para Exame de Defesa do Mestrado em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Prof.^a Doutora Yoko Oshima Franco

**Sorocaba/SP
2019**

Débora Antunes Neto Moreno

**NANOPARTÍCULAS DE PRATA (AgNPs) – EFEITOS SOBRE LESÕES DE
NERVO PERIFÉRICO E MÚSCULO DE ROEDORES E AVALIAÇÃO DE
MUTAGENICIDADE (TESTE DE AMES)**

Dissertação aprovada como requisito parcial para o Exame de Defesa no Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade de Sorocaba.

Aprovado em: **25/02/2019**

BANCA EXAMINADORA:

Professora Doutora Yoko Oshima Franco
Universidade de Sorocaba – UNISO

Professora Doutora Angela Faustino Jozala
Universidade de Sorocaba – UNISO

Professor Doutor Rafael Stuani Floriano
Universidade do Oeste Paulista – UNOESTE

DEDICATÓRIA

Ao meu esposo e minha filha,
Vinicius Silveira Moreno e Íris Antunes Moreno, que sempre estiveram ao meu
lado, me dando todo apoio para a realização de um sonho.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por sempre me dar sabedoria e luz, agradeço também pela família maravilhosa que sempre esteve me apoiando e me dando forças, a começar pelos meus pais Mateus Antunes Neto e Susana Célia Pereira Antunes, a meu irmão Mateus Antunes Neto Júnior, pois em meus momentos de ausência houve compreensão de todas as partes.

Agradeço ao meu esposo e companheiro Vinicius Silveira Moreno, que sem ele eu não chegaria até aqui, que sempre esteve me dando forças e me colocando para cima nos momentos de tristeza, de vontade de desistir e nos de comemorações de resultados positivos. Agradeço à minha filha Íris Antunes Moreno, que com sua delicadeza e sua inocência sempre soube estar ao meu lado e compreender os inúmeros momentos que deixei de dar a devida atenção.

Agradeço aos meus sogros Claudemir Moreno Gasques e Sara Silveira Moreno, à minha cunhada Bruna Silveira Moreno Benavides, ao meu cunhado Felipe Silveira Moreno e à minha tia Shirlei Silveira Trettel por sempre me ajudar em todos os momentos que precisei deixar a Íris eles se dispuseram com todo o prazer.

Agradeço com todo o meu coração à minha professora e orientadora Yoko Oshima Franco, por me acolher de braços abertos para a pesquisa, por sempre me orientar com todo amor e carinho.

Agradeço aos professores colaboradores deste projeto, Edson Hideaki Yoshida, Carolina Alves dos Santos, Denise Grotto, Eliana Aparecida Varanda, Flávia Aparecida Resende, Jorge Amaral Filho, José Carlos Cogo, Mahendra Rai, Marli Gerenutti e Stephen Hyslop.

Agradeço aos meus companheiros de longa jornada de trabalho, Natália Tribuiani, Fabiana Trevisan, Ludmilla Rodrigues Ribeiro Jorge, Murilo Melo Juste Dini, Fabia Judice Marques Viroel, que sempre estavam no laboratório para dar aquele apoio necessário. E em especial, à Jéssica Campanholi, pelo incentivo do começo de tudo.

Agradeço aos alunos de Iniciação Científica Mirela Santos Saladini, Hellen Cristine Boschilha Lastra, Marina Oliveira de Paula, Isadora Caruso Fontana Oliveira e Eduardo Matheus Ricciardi Suzuki que passaram e dedicaram seus

dias para estarmos juntos em todas as etapas do projeto. Ao estagiário do CEUNSP na linha de pesquisa em mutagenicidade (Teste de Ames), Bruno de Brito Alves, pela amizade.

Saúdo pela convivência, ainda que curta, aos alunos de Iniciação Científica que chegaram ao Lapenm, durante esta jornada, Jocimar de Souza, Fernanda Mayumi Ishii, Bruna Stramandinoli Deamatis, Orlando Bozzoni Vettorazzo, Caroline Malavasi Barros, Marcos Antônio de Queiroz Junior e também a estagiária Andreia Gonçalves de Mello Carvalho.

Agradeço a todos os companheiros e técnicos do Lapetox e Apoio 2, Thaísa Borim Pickler, Valéria de Campos Orsi, Henrique Trombini Garcia, Márcia Regina das Mercedes, Rosenéia Aparecida Leite Tagliaferro, Selma Silva Santos e estagiárias Gabriela Franqueira Pinto e Mariane Terumi Doi, que sempre se dispuseram a ajudar.

Agradeço aos docentes do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas por completarem minha formação em pesquisa e à Universidade de Sorocaba pela infraestrutura dos laboratórios e de apoio com motoristas, que possibilitaram a execução integral do projeto.

Agradeço aos professores da banca de qualificação e da defesa pela disposição em analisar criticamente este trabalho, Angela Faustino Jozala, Rafael Stuani Floriano, Sandro Rostelato Ferreira e Valquíria Miwa Hanai Yoshida.

Agradeço à Capes/Prosup pela bolsa concedida e com a qual pude dedicar-me integralmente a esta pesquisa.

"A day without laughter is a day wasted."

(Charlie Chaplin)

RESUMO

Introdução: As Nanopartículas de prata (AgNPs) possuem características antimicrobianas e esta razão tem inúmeras aplicações medicinais, incluindo lesões teciduais. **Objetivos:** Portanto o objetivo do trabalho foi avaliar a eficácia de AgNPs 50 nm em modelos experimentais de lesão e a toxicidade. **Metodologia:** Foram utilizados 2 (dois) modelos **a) ex vivo**, em preparações nervo frênico-diafragma de camundongos, usando como ferramenta farmacológica o veneno de *Bothrops jararacussu* (Bjssu, 60 µg/mL), reconhecidamente neurotóxico e miotóxico, através de técnica miográfica. Os músculos resultantes dos ensaios *ex vivo* foram analisados através de microscopia de luz e comparados com controle de solução nutritiva de Tyrode. **b) in vivo**, em modelo de queimadura de segundo grau induzido por um dispositivo metálico através de contato térmico, em ratos. A recuperação da lesão causada por queimadura foi comparada macroscópica e diariamente por 28 dias frente ao tratamento com AgNPs e comparado com salina (não tratado). Nos 7^o, 14^o, 21^o e 28^o dias, dois animais de cada grupo foram sacrificados e a área da queimadura foi analisada macroscopicamente (análise de imagem – fotografia) e por microscopia de luz. Foi analisado a toxicidade e mutagenicidade: O teste de Ames foi conduzido com e sem ativação metabólica, em misturas de veneno com AgNPs e comparadas com controles de veneno e AgNPs, isoladamente, após ensaios preliminares de toxicidade. **Resultados:** Na JNM apenas 37,2 ± 6,0% das fibras musculares mostraram-se fisiologicamente ativas perante a exposição ao veneno, ao final de 120 minutos, enquanto a neutralização deste efeito do veneno, pelas AgNPs, garantiu o funcionamento de 74,7 ± 4,3% das fibras musculares. Nas queimaduras, as AgNPs não apresentaram diferença significativa na cicatrização da queimadura, nem no peso dos fígados dos animais, entretanto foi observada a presença de hemorragias na cavidade abdominal dos animais E7 e diferenças na coloração e consistência dos mesmos, mostraram diferenças em níveis de GSH, podendo indicar hepatotoxicidade. As AgNPs na ausência de ativação metabólica não apresentaram mutagenicidade a nenhuma cepa. Entretanto, quando ativadas metabolicamente elas mostraram-se mutagênicas nas cepas TA98 e TA100. O veneno de Bjssu, na ausência do sistema de metabolização mostrou-se

mutagênico à cepa TA100. Quando acrescentou-se o sistema de metabolização mostrou-se mutagênico em todas as cepas. Na mistura, na ausência de ativação metabólica, não foram mutagênicos a nenhuma cepa. Entretanto, quando ativadas metabolicamente elas mostraram-se mutagênicas nas cepas TA97a e TA98. **Conclusão:** Os resultados obtidos mostraram que as AgNPs foram eficazes contra o bloqueio neuromuscular, mas não contra o efeito miotóxico, induzidos pelo veneno de *Bjssu*; não apresentou vantagens no processo de cicatrização da lesão causada por queimadura de segundo grau comparativamente ao soro fisiológico, ao final de 28 dias. Para o teste de Ames, os resultados em conjunto mostram que as AgNPs atenuam *in vitro* o efeito mutagênico do veneno.

Palavras-chave: Nanopartículas de Prata, *Bothrops jararacussu*, Queimadura de Segundo Grau, Teste de Ames.

ABSTRACT

Introduction: Silver nanoparticles (AgNPs) have antimicrobial properties and this reason has numerous medical applications, including tissue lesions.

Objectives: Therefore, the objective of this study was to evaluate the efficacy of 50 nm AgNPs in experimental lesion models and toxicity.

Methods: Two (a) ex vivo models were used in phrenic-diaphragmatic nerve preparations of mice, using as a pharmacological tool the venom of *Bothrops jararacussu* (Bjssu, 60 µg/mL), recognized as neurotoxic and myotoxic using a myographic technique. The muscles resulting from the ex vivo assays were analyzed by light microscopy and compared with Tyrode's nutrient solution control. b) in vivo, in a second-degree burn model induced by a metallic device through thermal contact, in rats. Burn injury recovery was compared macroscopically and daily for 28 days against AgNPs treatment and compared to saline (untreated). On the 7th, 14th, 21st and 28th days, two animals from each group were sacrificed and the burn area was analyzed macroscopically (image - photo analysis) and by light microscopy. Toxicity and mutagenicity were analyzed: The Ames test was conducted with and without metabolic activation in venom mixtures with AgNPs and compared with venom controls and AgNPs, alone, after preliminary toxicity tests.

Results: At the JNM, only $37.2 \pm 6.0\%$ of the muscle fibers were physiologically active against exposure to the venom at the end of 120 minutes, while the neutralization of this poison effect by the AgNPs guaranteed the functioning of $74, 7 \pm 4.3\%$ of muscle fibers. In the burns, the AgNPs showed no significant difference in burn healing or in the animals' livers weight. However, the presence of hemorrhages in the abdominal cavity of E7 animals and differences in color and consistency of the animals showed differences in GSH levels, and may indicate hepatotoxicity. AgNPs in the absence of metabolic activation did not show mutagenicity to any strain. However, when activated metabolically they were mutagenic in strains TA98 and TA100. The Bjssu venom, in the absence of the metabolism system, was mutagenic to the TA100 strain. When added the metabolism system was mutagenic in all strains. In the mixture, in the absence of metabolic activation, they were not mutagenic to any strain. However, when metabolically activated they were mutagenic in strains TA97a and TA98.

Conclusion: The results obtained showed that the AgNPs were effective against the neuromuscular block, but not against the myotoxic effect, induced by the Bothrops jararacussu venom; did not present advantages in the healing process of the lesion caused by second degree burn compared to the saline solution at the end of 28 days. For the Ames test, the results together show that AgNPs attenuates in vitro the mutagenic effect of venom.

Key words: Silver Nanoparticles, Ames Test, *Bothrops jararacussu*, Second-Degree Scald Burn.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	<i>Bothrops jararacussu</i> .	10
Figura 2.	Esquema de Junção Neuromuscular.	13
Figura 3.	Esquema de isolamento da preparação do nervo frênico-diafragma.	25
Figura 4.	Parâmetros macroscópicos da lesão por contato térmico.	28
Figura 5.	Esquema do Teste de Ames. Método de incorporação em placas.	30
Figura 6.	Materiais dentro do fluxo laminar com o Ultra Violeta (UV) ligado, com todos os materiais utilizados para o Teste de Ames.	31
Figura 7.	Preparação nervo frênico-diafragma de camundongos (estímulo indireto) – Curva resposta de volumes de 50, 100, 200 e 500 µL de AgNPs (concentrações dadas no texto).	34
Figura 8.	Preparação nervo frênico-diafragma de camundongos (estímulo indireto) – Ensaio de Neutralização.	35
Figura 9.	Preparação biológica exposta à solução nutritiva de Tyrode. Coloração H/E. (barra: 1 cm=40 µm).	36
Figura 10.	Preparação biológica exposta a AgNPs (0,405 µg/5 µL) coloração H/E. (barra: 1 cm=40 µm).	36
Figura 11.	Preparação biológica exposta a AgNPs (40,5 µg/500 µL) coloração H/E, (barra: 1 cm=40 µm).	37
Figura 12.	Preparação biológica exposta ao veneno de <i>B. jararacussu</i> (60 µg/mL), coloração H/E (barra: 1 cm=40 µm).	37
Figura 13.	Preparação biológica exposta a neutralização, coloração H/E (barra: 1 cm=40 µm).	38

Figura 14.	Procedimento utilizado para a execução de queimadura de segundo grau através de contato dérmico, em animais anestesiados.	41
Figura 15.	Diferenças de pesos tomados no primeiro dia e no dia do sacrifício dos animais dos grupos controle (n=2) e experimental (n=2) correspondentes aos 7°, 14°, 21° e 28° dias.	42
Figura 16.	Processo de Cicatrização.	42
Figura 17.	Comparação da Cicatrização no 7° dia.	43
Figura 18.	Comparação do Processo de Cicatrização no final do tratamento (28° dia).	43
Figura 19.	Peso dos Fígados.	44
Figura 20.	Comparação entre os fígados do grupo controle (à esquerda) com o grupo experimental (à direita), no 7° dia após a queimadura.	44
Figura 21.	Dosagens bioquímicas do Estresse Oxidativo (GSH; GPx; Catalase; e TBARS).	45

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Características genotípicas e fenotípicas das cepas padrão sugeridas para o ensaio de Teste de Ames.	15
Tabela 2.	Tecidos extraídos nos 7 ^o , 14 ^o , 21 ^o e 28 ^o dias de ratos submetidos à queimadura de segundo grau e tratados com salina (controle) e AgNPs 50 nm (experimentais), corados com HE (coram o citoplasma, filamentos citoplasmáticos, fibras extracelulares e estruturas em rosa ou vermelho), Tricromo de Massom (diferencia o colágeno das paredes vasculares em azul, contra o tecido em róseo) e Orceína (cora fibras elásticas em vermelho).	46
Tabela 3.	Teste de Toxicidade de AgNPs 0,081 mg/mL e do veneno de Bjssu 50 mg/mL com a cepa TA98.	54
Tabela 4.	Teste de Toxicidade de AgNPs 0,081 mg/mL e do veneno de Bjssu 50 mg/mL com a cepa TA100.	54
Tabela 5.	Teste de Ames do veneno de Bjssu a 50 mg/mL, das AgNPs 0,081 mg/mL e da mistura do veneno de Bjssu 50 mg/mL + AgNPs 0,081 mg/mL sem ativação metabólica com a cepa TA97a.	55
Tabela 6.	Teste de Ames do veneno de Bjssu a 50 mg/mL, das AgNPs 0,081 mg/mL e da mistura do veneno de Bjssu 50 mg/mL + AgNPs 0,081 mg/mL sem ativação metabólica com a cepa TA98.	56
Tabela 7.	Teste de Ames do veneno de Bjssu a 50 mg/mL, das AgNPs 0,081 mg/mL e da mistura do veneno de Bjssu 50 mg/mL + AgNPs 0,081 mg/mL sem ativação metabólica com a cepa TA100.	56
Tabela 8.	Teste de Ames do veneno de Bjssu a 50 mg/mL, das AgNPs 0,081 mg/mL e da mistura do veneno de Bjssu 50 mg/mL + AgNPs 0,081 mg/mL sem ativação metabólica com a cepa TA102.	57
Tabela 9.	Teste de Ames do veneno de Bjssu a 50 mg/mL, das AgNPs 0,081 mg/mL e da mistura do veneno de Bjssu 50 mg/mL + AgNPs 0,081 mg/mL com ativação metabólica com a cepa TA97a.	57

Tabela 10.	Teste de Ames do veneno de Bjsu a 50 mg/mL, das AgNPs 0,081 mg/mL e da mistura do veneno de Bjsu 50 mg/mL + AgNPs 0,081 mg/mL com ativação metabólica com a cepa TA98.	58
Tabela 11.	Teste de Ames do veneno de Bjsu a 50 mg/mL, das AgNPs 0,081 mg/mL e da mistura do veneno de Bjsu 50 mg/mL + AgNPs 0,081 mg/mL com ativação metabólica com a cepa TA100.	58
Tabela 12.	Teste de Ames do veneno de Bjsu a 50 mg/mL, das AgNPs 0,081 mg/mL e da mistura do veneno de Bjsu 50 mg/mL + AgNPs 0,081 mg/mL com ativação metabólica com a cepa TA102.	59
Tabela 13.	Resultados do teste de Ames expressos em negativo (não mutagênico) e positivo (mutagênico).	60

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACh	Acetilcolina
Ag ⁺	Prata Catiônica
AgNO ₃	Nitrato de Prata
AgNPs	Nanopartículas de Prata
Bjssu	<i>Bothrops jararacussu</i>
Ca ²⁺	Cálcio
CEN	Centro de Estudos da Natureza
CEUA	Comissão de Ética em Uso de Animais
DLS	<i>Dinamic Light Scattering</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido Desoxirribonucleíco
GSH	Glutathiona Reduzida
GSH-Px	Glutathiona-Peroxidase
GSSG	Glutathiona Oxidada
H/E	Hematoxilina/Eosina
HCl	Ácido Clorídrico
IM	Índice Mutagênico
JNM	Junção Neuromuscular
KCl	Cloreto de Potássio
MgCl ₂	Cloreto de Magnésio

NaCl	Cloreto de Sódio
NaH ₂ PO ₄	Fosfato Diidrogenado de Sódio
NaHCO ₃	Bicarbonato de Sódio
NFD	Nervo Frênico Diafragma
NPD	4-Nitrofenilenodiamina
NPs	Nanopartículas
OMS	Organização Mundial de Saúde
PLA ₂	Fosfolipase A ₂
PVA	Polivinil Álcool
PVP	Polivinil pirrolidona
SERS	Do inglês, <i>Surface Enhanced Raman Scattering</i>
SLS	<i>Static Light Scattering</i>
SNARE	<i>Soluble NSF (N-Ethylmaleimide-Sensitive Factor) Attachment Protein Receptor</i>
SOD	Superóxido-Desmutase
TBARS	<i>Thiobarbituric acid reactive substances</i>
UV	Ultravioleta

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	01
2 REVISÃO DA LITERATURA	05
2.1 Nanopartículas de Prata (AgNPs)	05
2.2 Veneno de <i>Bothrops jararacussu</i> (Bjssu)	08
2.3 Junção Neuromuscular	12
2.4 Teste de Mutagenicidade - Teste de Ames	14
2.5 Queimaduras	16
2.6 Estresse Oxidativo	18
2.6.1 Sistema de Defesa Antioxidante	18
3 OBJETIVOS	21
3.1 Geral	21
3.2 Específicos	21
4 METODOLOGIA EXPERIMENTAL	22
4.1 Material	22
4.1.1 Reagentes	22
4.1.2 Materiais	22
4.1.3 Cepas	22
4.1.4 Animais	22
4.1.5 Veneno de <i>Bothrops jararacussu</i> (Bjssu)	23
4.1.6 Nanopartículas de Prata (AgNPs)	23

4.1.6.1 Obtenção da Nanopartícula de Prata (AgNPs)	23
4.2 Procedimentos Experimentais	24
4.2.1 Preparação Nervo Frênico-Diafragma de Camundongos	24
4.2.2 Análise Histológica	25
4.2.2.1 Coloração de Hematoxilina/Eosina	26
4.2.2.2 Coloração de Tricromo de Masson (Com Azul de Anilina)	26
4.2.2.3 Coloração de Orceína	27
4.2.3 Indução de Lesões <i>in vivo</i> e Tratamento com AgNPs (50nm)	27
4.2.4 Teste de Ames (<i>Salmonella</i> Microsoma) Teste de Toxicidade	28
4.2.5 Realização do Teste	29
4.2.6 Forma de Análise dos Resultados	31
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	33
5.1 Efeito das AgNPs 50 nm sobre o Bloqueio Neuromuscular do Veneno de <i>Bothrops jararacussu</i>	33
5.2 Análise Histológica do Músculo Nervo Frênico-Diafragma (NFD) de Camundongos	36
5.3 Efeitos da AgNPs 50 nm em Queimaduras de Segundo Grau por Contato Térmico, em Ratos	41
5.4 Avaliação de Mutagenicidade pelo Teste de Ames do Veneno de <i>Bothrops jararacussu</i> (Bjssu) 50 mg/mL e da AgNPs 50 nm na Concentração de 0,081 mg/mL e da Mistura Bjssu + AgNPs	53
5.4.1 Teste de Ames das AgNPs 50 nm, do Veneno de <i>Bothrops jararacussu</i> (Bjssu) e Mistura de Bjssu + AgNPs	55
6 CONCLUSÃO	66

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS E SUGESTÕES PARA TRABALHO FUTURO	68
REFERÊNCIAS	69

1 INTRODUÇÃO

O rápido desenvolvimento de resistência dos patógenos aos antimicrobianos tradicionais e a dificuldade de inserção de novos fármacos/compostos na terapêutica tem aumentado a procura por terapias alternativas e seguras. A prata (Ag^+) tem sido usada como um agente antimicrobiano, em virtude de elevada ação contra esses organismos e pequena toxicidade ao homem (SILVER; PHUNG; SILVER, 2006).

Um inconveniente ao uso da prata na forma iônica é sua rápida inativação por complexação e precipitação (ATIYEH et al., 2007), o que torna o uso de nanopartículas (NPs) uma valiosa alternativa. As NPs são partículas em dimensões que variam de 1 a 100 nm (BUZEA; PACHECO; ROBBIE, 2007).

As nanopartículas de prata (AgNPs) tem potencial ação contra bactérias resistentes a múltiplos antimicrobianos, pois são menos susceptíveis a desenvolver resistência à prata iônica, em comparação aos antibióticos tradicionais, pelo fato de atuar em uma ampla gama de funções do microrganismo (MORONES et al., 2005).

Muitas rotas de síntese tem sido propostas para produzir as AgNPs, sendo as mais comuns aquelas baseadas na redução química dos íons Ag^+ em solução aquosa. Citrato, d-glucose, ácido ascórbico, aldeídos, aminas e polissacarídeos são usados como agentes redutores. Entretanto, muitas das interações das AgNPs com o corpo humano ainda são pouco compreendidas. Consequentemente, as características mais desejáveis para as AgNPs ainda não estão bem estabelecidas. O desenvolvimento das NPs com características morfológicas e físico-químicas bem controladas para a aplicação no corpo humano ainda é uma área ativa de pesquisa interdisciplinar (SANTOS et al., 2014).

É desejável que toda nanopartícula obtida tenha alguma aplicabilidade em áreas da medicina (humana ou veterinária), da odontologia e da biologia (a todas as formas de vida), entre outras, mas que também seja conhecido o seu

potencial tóxico. Neste contexto, algumas perguntas nortearam a elaboração deste estudo, a seguir explicitadas.

1. Como atuam as AgNPs frente aos efeitos tóxicos (neurotoxicidade e miotoxicidade) do veneno da serpente *Bothrops jararacussu* (Bjssu)?

Esta pergunta decorre do conhecimento de que o veneno de *B. jararacussu* induz um bloqueio neuromuscular *in vitro* irreversível descrito por Rodrigues-Simioni; Borgese; Ceccarelli (1983) e mionecrose tanto *in vitro* como *in vivo* no local da picada, além de diversos distúrbios comuns ao gênero como edemas, hemorragias, coagulações sanguíneas, entre outros. Além disso, o veneno botrópico é altamente inflamatório (infecção secundária), o que pode ser atenuado pelo caráter antimicrobiano das nanopartículas.

Para responder à pergunta utilizaram-se duas técnicas: a miográfica, para avaliar o quanto as nanopartículas de prata impediriam o bloqueio neuromuscular induzido pelo veneno ofídico e a histológica, para avaliar o grau de proteção das AgNPs a nível celular.

2. Como atuam as AgNPs frente à lesão dérmica provocada por queimadura de segundo grau?

Em uma breve contextualização, as lesões são decorrentes do desequilíbrio da homeostase, que podem ser reversíveis (o tecido consegue reparar o dano ou manter a funcionalidade mínima) ou irreversíveis (levam à morte do tecido) e podem ter diferentes origens: privação de O₂ (oxigênio), ocasionada por agentes químicos (sais, ácidos, bases, óxidos, solventes orgânicos); agentes físicos (radiação ionizante, temperatura, luz); agentes infecciosos (bactérias, vírus, fungos, protozoários); reações imunológicas; anormalidade genética; e desequilíbrios nutricionais. O início da lesão se dá por uma agressão à integridade da membrana, responsável por preservar compartimentos aquosos dos meios intra e extracelulares (ROBBINS, 2013).

Outro tipo de lesão é aquele decorrente de queimaduras, uma das mais traumáticas injúrias (ADHYA et al., 2014). A extensão da lesão queimada contribui no aumento na letalidade, mas a infecção bacteriana é ainda a causa

principal (choque séptico ou severa bacteremia), chegando a 75% dos casos fatais, mais que por choque osmótico ou hipovolêmico (HUSAIN; KARIM; TAJURI, 1989; SHANNON et al., 1997; BANG et al., 1998; GUDAVICIENE; RIMDEIKA, 2004). Dentre as causas das infecções podem ser apontadas as intervenções invasivas (SALEH; NOSHAD, 2014), com relevância aos cuidados hospitalares administrados aos pacientes queimados. Infecções bacterianas também acontecem secundariamente no acidente ofídico, quando a serpente inocula a bactéria no momento da picada (JORGE; RIBEIRO, 1997).

Para responder sobre o efeito das AgNPs nas lesões ocasionadas por queimaduras de segundo grau adotou-se um modelo experimental, em que as AgNPs foram aplicadas topicamente sobre a lesão, durante 28 dias (XU, 2009). Posteriormente, amostras de sangue foram coletadas para determinação dos indicadores de estresse oxidativo; os tecidos da área lesionada foram avaliados através de microscopia de luz; e os fígados dos animais avaliados macroscopicamente.

3. Qual o potencial tóxico das AgNPs, do veneno de *B. jararacussu* e da mistura (AgNPs + Bjssu), pelo parâmetro da mutagenicidade (Teste de Ames)?

Para contextualizar a terceira pergunta, faz-se necessário ressaltar que o veneno ofídico tem sido utilizado como ferramenta farmacológica na busca de novos medicamentos. Nessa linha, alguns pesquisadores tem realizado a avaliação de toxicidade em testes *in vitro* como citotoxicidade, apoptose celular e genotoxicidade com foco principalmente no tratamento do câncer, identificando potenciais carcinógenos ou antimutagênicos (SOARES, 2012). Marcussi et al. (2013) demonstraram o potencial genotóxico de venenos botrópicos e algumas toxinas isoladas, dentre os quais o veneno de *B. jararacussu*, através do teste do micronúcleo com bloqueio da citocinese e do ensaio cometa.

Por outro lado, a toxicidade das próprias NPs tem sido avaliadas por vários métodos. Li et al. (2012) optaram pelo teste de Ames e teste do micronúcleo para avaliar a segurança de AgNPs concluindo que na dimensão de 5 nm as nanopartículas não foram mutagênicas conforme resultado do teste *Salmonella*,

o que não foi confirmado pelo teste do micronúcleo em linfoblastos humanos TK6.

Para responder à terceira pergunta selecionou-se um teste de avaliação de toxicidade, o teste de Ames (com e sem ativação metabólica) que permite calcular o índice de mutagenicidade em cepas de *Salmonella typhimurium* TA97a, TA98, TA100 e TA102. Os ensaios de avaliação de toxicidade podem, também, ter foco simplesmente na avaliação de segurança de determinada substância de acordo com a sua utilização, como no caso de nanomateriais.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Nanopartículas de Prata (AgNPs)

A nanotecnologia envolve a produção, manipulação e o uso de materiais abaixo de 1 μm até o nível atômico (MOHANPURIA; RANA; YADAV, 2008), tendo como objetivo entender, criar e usar materiais com novas propriedades e funções. O rearranjo do material em nanoescala usando interações moleculares fracas, tais como, as forças de Van der Waals, ligações de hidrogênio ou dipolos eletrostáticos requer pouco consumo de energia e permite a reversibilidade do sistema ou outros rearranjos (ROCO, 2003).

As NPs são estruturas que apresentam propriedades físicas, químicas ou biológicas, que podem ser atribuídos à sua dimensão. Desta forma, partículas menores que 1 μm podem ser consideradas nanoestruturas desde que apresentem propriedades completamente novas ou melhoradas baseadas em suas características específicas, como tamanho, distribuição, fase, morfologia (flocos, esferas, formas, dendríticas, etc) (PÉREZ; BAX; ESCOLANO, 2005), cristalinidade, entre outros, quando comparadas com partículas de dimensões maiores provenientes da mesma fonte.

As NPs metálicas têm grande aplicação em vários domínios, como na tecnologia de sensores, aparelhos ópticos, catálise, marcadores biológicos e sistemas de transporte de drogas (DANIEL; ASTRUC, 2004).

A prata é utilizada na forma coloidal há mais de 100 anos e está registrada desde 1954 nos Estados Unidos como um material biocida. No entanto, apenas recentemente, avanços em nanotecnologia abriram novas áreas de aplicação para esse nanomaterial (NOWACK; KRUG; HEIGHT, 2011). Embora frequentemente descritas como sendo “de prata” as AgNPs são compostas por uma grande porcentagem de óxido de prata, devido à sua alta relação superfície/volume, o que proporciona a essas partículas um amplo substrato para a reação com o O_2 , culminando com a formação de óxidos (MODY et al., 2010; NOWACK; KRUG; HEIGHT, 2011).

As AgNPs são sintetizadas pela redução de um sal de prata mediante um agente redutor como o boroidreto de sódio na presença de um estabilizador coloidal. Os estabilizadores coloidais mais comumente utilizados são o álcool polivinílico, o poli (vinilpirrolidona), a albumina de soro bovino (BSA), o citrato e a celulose. Métodos mais recentes incluem também o uso de i-d-glicose, como açúcar redutor, e amido como o estabilizador. Essas AgNPs ainda podem ser sintetizadas em diferentes formas e com intervalos de tamanho variados (por exemplo: 10–200 nm); sendo essas características importantes para as propriedades que elas apresentam (ELECHIGUERRA et al., 2005; STEPANOV; POPOK; HOLE, 2002).

As AgNPs são usadas em muitas áreas da ciência e da vida cotidiana. Elas são adicionadas a produtos químicos, alimentos, cosméticos, roupas e também a uma gama de utensílios domésticos. As NPs são predominantemente utilizadas com ações antimicrobianas (YOON et al., 2007), terapêuticas (KREUTER; GELPERINA, 2008) e também como marcadores fluorescentes (SU et al., 2008). Na medicina, as AgNPs são exploradas na liberação da droga (MENG et al., 2010), imagem molecular (KOHL et al., 2011), diagnósticos e tratamento de doenças cardiovasculares (GODIN et al., 2010). Incluem-se, ainda, o uso como cimento ósseo, instrumentos cirúrgicos, máscaras cirúrgicas, etc.

Ao lado da prata iônica, que em dose específica, é adequada ao tratamento de feridas (ATIYEH et al., 2007; LANSDOWN, 2006; QIN, 2005), as AgNPs também apresentam excelentes propriedades antibacterianas (CHOI et al., 2010; MORONES et al., 2005).

Segundo a Agência de Proteção Ambiental (EPA – *Environmental Protection Agency*), 53% dos produtos biocidas a base de prata registrados provavelmente contém AgNPs, por exemplo, desenvolveram biomateriais por impregnação de silicone revestido com NPs de óxido de prata, curativos, catéteres venosos e urinários, fios de sutura, adesivos ortodônticos, máscaras cirúrgicas e tubos endotraqueais, evitando assim infecções após procedimentos cirúrgicos (CHEN; SCHLUESENER, 2008). Esses novos biomateriais foram desenvolvidos com o objetivo de reduzir a infecção bacteriana. Recentemente, foi proposta a

incorporação de AgNPs ao cimento ortopédico – um biomaterial empregado em cirurgias, principalmente na fixação de próteses – com o objetivo de reduzir os riscos de infecções em regiões onde o cimento é utilizado, geralmente joelhos e quadris (LIMA, 2011).

Os resultados obtidos relativos à eficiência bactericida dessas NPs foram díspares, mas a metodologia permitiu pela primeira vez a impregnação de polímeros contendo prata, o que significou um grande passo para o início da confecção de biomateriais com propriedades antimicrobianas (FURNO et al., 2004).

Além das aplicações biológicas, as AgNPs também podem ser incorporadas nos dispositivos de nanoeletrônica, como nanoconectores e nanoeletrodos, devido à alta condutividade elétrica e térmica que as nanopartículas proporcionam. Tais NPs podem ainda ser usadas nos processos de catálise industrial e como substrato para o espalhamento Raman amplificado em superfície (SERS, do inglês, *Surface Enhanced Raman Scattering*) (ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY, 2010).

O aumento das aplicações de NPs também aumenta a exposição aos organismos vivos. A citotoxicidade e genotoxicidade de AgNPs depende de muitos fatores, por exemplo concentração, dispersão, tamanho e funcionalização da superfície (DURÁN et al., 2010; LIMA et al., 2013).

Por exemplo, relatórios indicaram que o tamanho das AgNPs é um fator importante para citotoxicidade e genotoxicidade, provavelmente agindo por mecanismos de apoptose e necrose (CARLSON, 2008; PARK et al., 2011). Exposição do corpo humano a AgNPs pode ocorrer através de diferentes rotas, por exemplo, inalação, ingestão, injeção ou contato físico com cortes ou feridas; a cautela é necessária porque alguns dados *in vitro* sugerem que mesmo em baixas concentrações essas AgNPs podem ser tóxicas em alguns casos (ASHARANI et al., 2009; KIM et al., 2009). Asharani et al. (2009) mostram por microscopia eletrônica de transmissão (MET) que AgNPs podem penetrar em compartimentos celulares, como endossomos, lisossomos e mitocôndrias.

2.2 Veneno de *Bothrops jararacussu* (Bjssu)

Os acidentes ofídicos representam um problema de saúde pública relevante, especialmente nos países subtropicais e tropicais, afetando principalmente a população rural. Cerca de 5 milhões desses acidentes ocorrem a cada ano em todo o mundo, causando aproximadamente 100.000 mortes (CHIPPAUX, 1998; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2015). As sequelas são devido a fatores inflamatórios, hemorrágicos, coagulantes, neurotóxicos e efeitos miotóxicos ocasionados pelos componentes do veneno. Estes sinais são frequentemente agravados pela dificuldade de acesso aos serviços de saúde nas regiões menos desenvolvidas (KASTURIRATNE et al., 2008; HANSSON et al., 2013).

Em 2007, os acidentes ofídicos foram incluídos como doenças negligenciadas pela Organização Mundial de Saúde (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2007), por constituir um problema de saúde importante em países como a África, Ásia, Oceania e América Latina (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2011). Oliveira et al. (2010) observaram aproximadamente 27.000 acidentes ofídicos em 2008, a partir de bases de dados oficiais brasileiras.

Bothrops e serpentes *Bothropoides* foram responsáveis por cerca de 70% desses casos. Os principais sintomas são danos no tecido local (hemorragia, necrose e edema) e alterações no sangue, coagulação induzida por uma mistura complexa de enzimas e proteínas dos venenos de serpentes (FERNANDES et al., 2011). A terapia sérica é o tratamento mais eficaz contra a letalidade induzida por serpentes peçonhentas botrópicas, mas tem pequena ação contra a ação miotóxica local (CARDOSO, 2003). Entretanto, a busca por novas alternativas é sempre interessante, principalmente em países pobres e que são ricos em biodiversidade.

O veneno botrópico é rico em fosfolipase A₂ (PLA₂), uma classe de enzimas com atividade catalítica nas membranas celulares de tecidos específicos. Essa observação sugeriria que a PLA₂ desempenha um papel crucial na toxicidade do veneno (GUTIERREZ; LOMONTE, 1995). Além disso, a PLA₂ induz vários outros efeitos, tais como neurotoxicidade (SOARES; FONTES; GIGLIO, 2004; LIZANO; DOMONT; PERALES, 2003) pré ou pós-sináptica,

cardiotoxicidade (MALLAT; LAMBEAU; TEDGUI, 2010; CHALBOT et al., 2011), miotoxicidade (MARCUSSE et al., 2011; DAMICO et al., 2008), inibição ou indução da agregação plaquetária (DA SILVA et al., 2012; SILVEIRA et al., 2013), edema (ROMERO et al., 2010; VILLAR et al., 2008) e hipotensão (FAROOQUI et al., 1999; DA SILVA et al., 2011). Portanto, há interesse médico e científico na ação da enzima PLA₂ em vários processos fisiopatológicos. Neste sentido, várias linhas de pesquisa são dedicadas a buscas de drogas ou ferramentas para inibir ou neutralizar a ação da PLA₂.

Nos acidentes causados por serpentes do gênero *Bothrops* sp., as lesões locais podem ser atribuídas às atividades de proteases, fosfolipases e fatores hemorrágicos destes venenos, seguidas por liberação de agentes vasoativos causando hemorragias em diversos órgãos e tecidos (GUARNIERI, 1992; CARDOSO, 1999). Outras patologias causadas por esse tipo de veneno são: lesão local tecidual, mionecrose, edema, alterações cardiovasculares, choque hipovolêmico, alterações de coagulação (desfibrinação, etc) e alterações renais. Esses complexos fenômenos patológicos são devido aos efeitos aditivos ou sinérgicos da atividade enzimática e tóxica presentes nesse veneno (OWNBY, 1990; STOCKER, 1990; BJARNASON; FOX, 1994; GUTIERREZ, 1995).

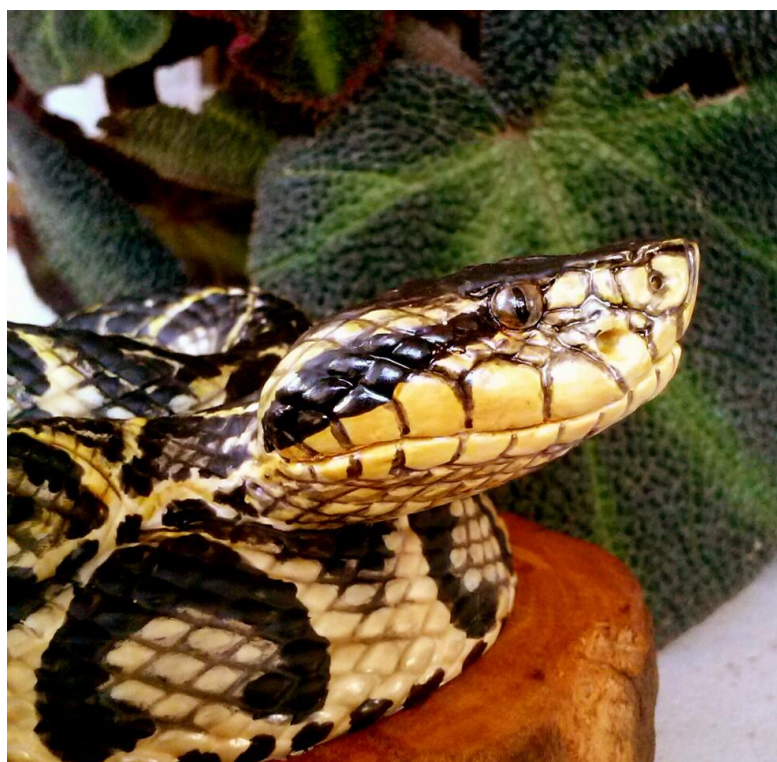
Dentre os efeitos locais dos envenenamentos ofídicos a mionecrose é particularmente relevante, uma vez que pode resultar em perda tecidual permanente, incapacitação ou amputação da região afetada (GUTIÉRREZ; LOMONTE, 1995; LOMONTE et al., 2003). Tal efeito é promovido diretamente pelas miotoxinas dos venenos ofídicos, as quais podem ser classificadas em três principais grupos de proteínas estruturalmente diferentes (HARRIS; CULLEN, 1990).

Esses grupos são constituídos por miotoxinas pequenas, de baixa massa molecular; cardiotoxinas e fosfolipases A₂ miotóxicas (GUTIÉRREZ; OWNBY, 2003; LOMONTE et al., 2003). As proteínas miotóxicas dos componentes dos venenos ofídicos podem promover lesão na musculatura esquelética por mecanismos indiretos (GUTIÉRREZ; CERDAS, 1984; LOMONTE et al., 2003). Deste modo, metaloproteases promovem a lesão muscular a partir de seu

potencial isquêmico (GUTIÉRREZ et al., 1995), bem como por ação sinérgica entre estas proteases e fosfolipases A₂ (BUSTILLO et al., 2002).

Dentre as serpentes pertencentes ao gênero *Bothrops*, a *B. jararacussu* (Figura 1) destaca-se pela baixa imunogenicidade de seu veneno (DOS SANTOS et al., 1992). O efeito local deste veneno não é eficientemente neutralizado pelo antiveneno específico, como também por antivenenos produzidos contra outros venenos botrópicos (DIAS DA SILVA et al., 1989). O veneno desta serpente é miotóxico, causa necrose de fibras musculares estriadas e retarda sua regeneração (QUEIROZ et al., 1984), além de ser hemorrágico. Os principais constituintes desse veneno (bothropstoxina-I, uma Lys49; e bothropstoxina-II, uma Asp49) são ricos exemplos em causar danos celulares (SOARES; FONTES; GIGLIO, 2004).

Figura 1. *Bothrops jararacussu*



Fonte: <http://wallacefinearts.blogspot.com/2016/04/jararacucu-bothrops-jararacussu-edicao.html>

O veneno de *B. jararacussu* (popularmente conhecido como jararacuçu) foi estudado desde o início dos anos 1900 (BRAZIL; PESTANA, 1909). Gonçalves (1956) relatou que o veneno de *B. jararacussu* continha um peptídeo semelhante à crotamina semelhante ao veneno da cascavel sul-americana *Crotalus durissus*

terrificus, enquanto Vital Brazil (1966) mostrou que o veneno de *B. jararacussu* tinha uma ação crotoxina-like capaz de inibir a contração causada pela acetilcolina nas preparações do nervo frênico diafragma de ratos. Os sinais e sintomas clínicos decorrentes do envenenamento por esta espécie em parte se assemelham aos vistos em acidentes por *C. d. terrificus* (BRAZIL, 1911; MILANI JR et al., 1997).

A soroterapia, fundamentada nos estudos de Albert Calmette (CALMETTE, 1894) e Vital Brazil (BRAZIL, 1903), ainda permanece como o único tratamento específico para envenenamentos ofídicos (WEN, 2003; GUTIÉRREZ et al., 2006).

Os soros antiofídicos consistem de concentrados de imunoglobulinas (IgG) obtidas, principalmente, por sensibilização de equinos ou ovinos (GUTIÉRREZ et al., 2006). Tais soros podem ser formulados por moléculas inteiras de IgG ou por seus fragmentos, seja F(ab')₂ ou Fab, provenientes da digestão destas moléculas por pepsina e papaína (GUTIÉRREZ et al., 2003; LALLOO; THEAKSTON, 2003; THEAKSTON et al., 2003).

De qualquer modo, apesar de investigações clínicas demonstrarem que a soroterapia geralmente é eficaz na neutralização das toxinas responsáveis pelos sintomas sistêmicos (GUTIÉRREZ et al., 2006), este tratamento apresenta eficácia problemática em relação aos sintomas locais dos envenenamentos (WARRELL, 1992). Tal problema não ocorre pela ausência de anticorpos inibidores das toxinas que promovem os sintomas locais no soro antiofídico, mas provavelmente é decorrente do rápido desenvolvimento da patologia local, dificultando o acesso das imunoglobulinas do soro antes da ocorrência dos danos teciduais irreversíveis (GUTIÉRREZ et al., 1998). Assim, as limitações da soroterapia elevam a importância da compreensão do modo de ação dos componentes dos venenos, sobretudo os que promovem as reações locais do envenenamento.

2.3 Junção Neuromuscular

A junção neuromuscular (placa motora) é a região de inserção das terminações nervosas nas fibras musculares. As membranas da célula nervosa

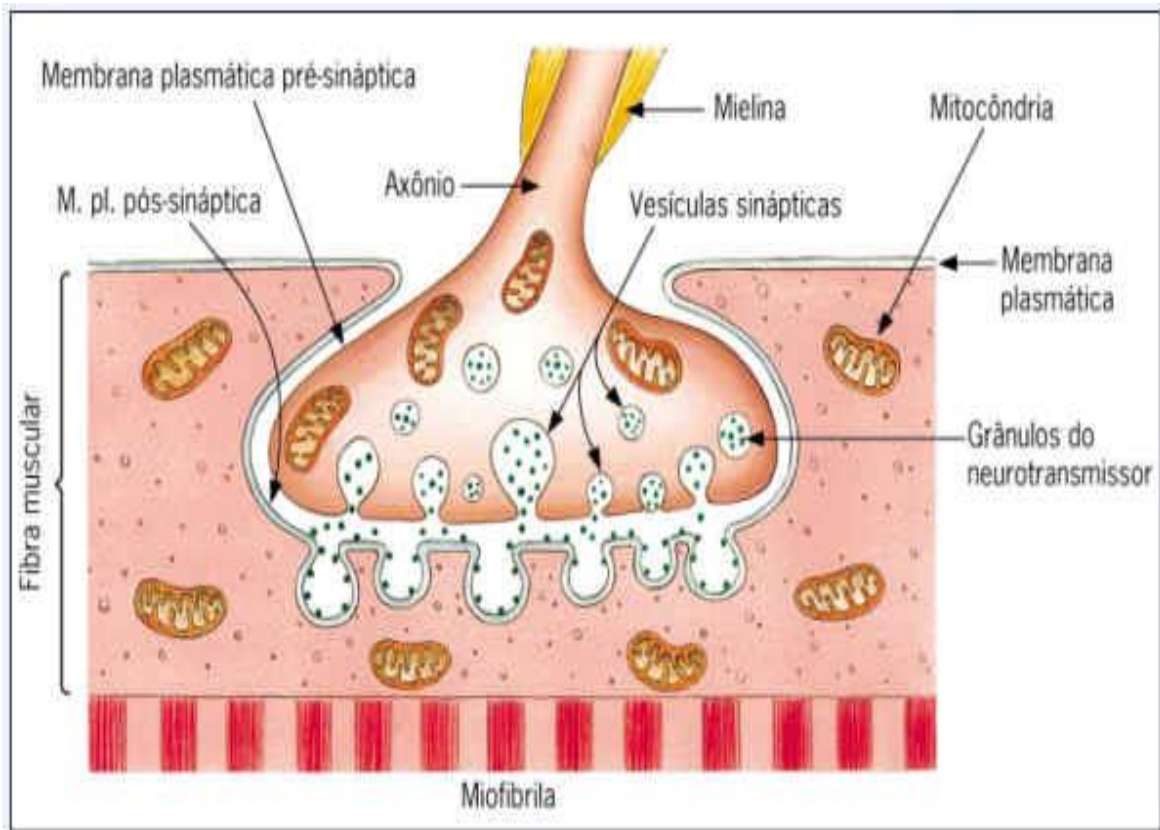
“pré-sináptica” e da célula muscular “pós-sináptica” são separadas por uma fenda com cerca de 20 a 30 nm (fenda sináptica), local de liberação de neurotransmissores.

Próximo à placa motora, o axônio perde a bainha de mielina e se divide em vários ramos delgados (aproximadamente 2 μm de espessura), tendo em cada uma de suas extremidades múltiplas expansões denominadas de “botões sinápticos”, pelos quais os neurotransmissores são liberados para a fenda sináptica. Cada botão fica sobreposto às fendas subneurais (depressões profundas na superfície da fibra muscular), local de alta densidade de receptores colinérgicos (Figura 2).

Cada botão sináptico contém a maquinaria necessária para liberar o neurotransmissor, que inclui: vesículas sinápticas (armazenam acetilcolina – ACh), complexo de acoplamento (complexo protéico de exocitose das vesículas), zona ativa (sítio de liberação do neurotransmissor) e canais de Ca^{2+} voltagem-dependente (permitem a entrada de Ca^{2+} na terminação a cada potencial de ação). O Ca^{2+} desencadeia a fusão das vesículas sinápticas com a zona ativa, liberando seu conteúdo para a fenda sináptica (GUYTON, 2002; KANDEL et al., 1997).

Quando um potencial de ação se propaga pelo terminal, canais de Ca^{2+} voltagem-dependente se abrem permitindo o influxo em massa deste íon para o interior da terminação nervosa. Por sua vez, admite-se que os íons Ca^{2+} exerçam influência sobre as vesículas de ACh, atraindo-as para a membrana pré-sináptica adjacente aos sítios de liberação. A seguir as vesículas se fundem com a membrana e liberam ACh, na fenda sináptica, pelo processo de exocitose (GUYTON, 2002; CHAPMAN, 2008).

Figura 2: Esquema de Junção Neuromuscular



Fonte: <http://nerdquantico.blogspot.com/2016/11/espaco-ciencia-1.html>

O processo de fusão das vesículas de ACh à membrana celular pré-sináptica é desencadeado pela ação das proteínas do complexo *Soluble NSF (N-Ethylmaleimide-Sensitive Factor) Attachment Protein Receptor* (SNARE). As vesículas sinápticas são transportadas pelos filamentos de citoesqueleto até se ligarem às zonas ativas da membrana pré-sináptica próximas a canais de Ca^{2+} , processo denominado de *tethering* ou *targeting* (GUYTON, 2002; CHAPMAN, 2008).

A vesícula então se ancora (*docking*) com o complexo molecular SNARE imediatamente adjacente a um canal de Ca^{2+} , sendo o processo de engatilhamento da maquinaria de fusão (*priming*) ATPase-dependente. Assim, a vesícula sináptica pode proceder a fase de fusão com a membrana plasmática (*fusion*) e liberar seu conteúdo (ACh) para a fenda sináptica quando a concentração de Ca^{2+} alcança um nível crítico. A vesícula vazia é então recaptada e reciclada no terminal nervoso (GUYTON, 2002; CHAPMAN, 2008).

2.4 Teste de Mutagenicidade - Teste de Ames

Mutações são alterações permanentes na sequência de nucleotídeos do DNA (ácido desoxirribonucleíco) e, ao acumular mutações, um gene de divisão celular pode ser afetado, podendo originar um câncer (NELSON; COX, 2011). Por esta razão, é de interesse avaliar o potencial mutagênico de determinada substância, seja ela pura ou em mistura (VARGAS et al., 1990; VARANDA et al., 1997).

As principais hipóteses sobre os mecanismos de ação de substâncias que provocam câncer estão baseadas na indução de mutações em células somáticas. Segundo dados da Organização Mundial da Saúde (OMS), o câncer é uma das principais causas de morte no mundo e foi responsável por aproximadamente 13% de todas as mortes em 2008 sendo que cerca de 70% ocorreram em países de baixa e média renda (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2013).

Neste estudo, empregou-se o teste de Ames utilizando-se cepas TA97a, TA98, TA100 e TA102 de *Salmonella typhimurium*, as quais apresentam mutações nos genes *operon* da histidina, tornando-as histidina- dependentes. Cada cepa possui uma mutação distinta, de modo que todas elas sejam auxotróficas para histidina. Estas mutações agem como alvo para novas mutações, que podem restaurar a função de um gene, revertendo a situação de dependência de histidina, em um meio mínimo. Na presença de um mutágeno, o número de colônias revertentes aumenta. Assim, as células que sofrem novas mutações são denominadas revertentes (MARON; AMES, 1983).

Além da mutação de histidina, as cepas contêm outras mutações que aumentam a capacidade em detectar mutágenos. A mutação *rfa* causa perda parcial na membrana de lipopolissacarídeo, aumentando a permeabilidade para moléculas grandes que não penetrariam normalmente na membrana. Esta mutação pode ser confirmada pelo teste de sensibilidade ao cristal violeta. A mutação *uvrB* é uma deleção em um gene que codifica o sistema de reparo por excisão de DNA, aumentando a sensibilidade na detecção de mutágenos. Esta deleção estendeu-se até o gene de síntese de biotina, consequentemente, as bactérias necessitam de biotina para sobreviver. TA102 não contém esta mutação. Pode-se confirmar esta mutação pela sensibilidade à luz ultravioleta (UV) (MARON; AMES, 1983).

Todas as cepas possuem o plasmídeo Fator R, ou *pKM101*, que aumenta a mutagênese química e espontânea por otimizar o sistema de reparo *error prone*. Este plasmídeo contém gene de resistência à ampicilina. Pode-se confirmar pela resistência à ampicilina (MORTELMANS; ZEIGER, 2000). A cepa TA102 possui o plasmídeo *pAQ1*, que carrega mutação no gene *hisG428* e gene resistência à tetraciclina. Este plasmídeo aumenta o número de sítios alvos e pode ser confirmado pela resistência à tetraciclina. As linhagens TA98 e TA97a detectam mutações do tipo *frameshift*, TA100 detecta substituições de pares de bases e TA102 detecta eficientemente vários mutágenos, como formaldeído, hidroperóxidos, bleomicina e mitomicina C, que são dificilmente detectados nas outras cepas (MARON; AMES, 1983).

As características genóticas de cada cepa são ilustradas na Tabela 1.

Tabela 1: Características genóticas e fenotípicas das cepas padrão sugeridas para o ensaio de Teste de Ames.

Cepa	Mutação em His	Plasmídeos	Outras Mutações	Tipo de Mutação Detectável	
TA97a	<i>hisD6610</i> <i>hisO1242</i>	pKM101	<i>rfa</i> Δ (<i>uvrB</i> <i>ch1 bio</i>)	Frameshift	Adição de um par G:C
TA98	<i>hisD3052</i>	pKM101	<i>rfa</i> Δ (<i>uvrB</i> <i>ch1 bio</i>)	Frameshift	Deleção de um par G:C
TA100	<i>hisG46</i>	pKM101	<i>rfa</i> Δ (<i>uvrB</i> <i>ch1 bio</i>)	Substituição	G:C para A:T
TA102	pAQ1 (<i>hisG428</i>)	pKM101; pAQ1	<i>rfa</i>	Substituição	A:T para G:C
TA1535	<i>hisG46</i>	---	<i>rfa</i> Δ (<i>uvrB</i> <i>ch1 bio</i>)	Substituição	G:C para A:T
TA1537	<i>hisC3076</i>	---	<i>rfa</i> Δ (<i>uvrB</i> <i>ch1 bio</i>)	Frameshift	Adição de um par G:C
TA1538	<i>hisG46</i>	---	<i>rfa</i> Δ (<i>uvrB</i> <i>ch1 bio</i>)	Frameshift	Deleção de um par G:C

Fonte: Adaptado CETESB (1993).

Este ensaio é aceito para identificar substâncias puras, em mistura e em amostras ambientais que podem produzir danos genéticos que levam a mutações gênicas. Além disso, tem sido muito empregado em estudos para elucidação de mecanismos de mutagênese e antimutagênese e na avaliação de efeitos sinérgicos de misturas de compostos (UMBUZEIRO; VARGAS, 2003).

O teste de Ames baseia-se na indução de mutações reversas com o emprego de linhagens de *Salmonella typhimurium* derivadas da parental LT2, auxotróficas (incapacidade de um organismo de sintetizar um composto orgânico necessário ao seu próprio crescimento) para o aminoácido histidina (*his*-), apresentando diferentes mutações no *operon* deste aminoácido, sendo construídas para detectar mutações do tipo deslocamento do quadro de leitura (*frameshift*) ou substituição de pares de base no DNA. Essas linhagens são incapazes de crescer em meio de cultura mínimo, sem histidina, a menos que ocorram novas mutações no local dessas mutações pré-existentes, ou nas proximidades dos genes que restaurem a função do gene e permita as células a sua capacidade de síntese. Essas células recém mutadas podem crescer na ausência de histidina e formar colônias. Por isso o teste é referido como ensaio de reversão. O número de revertentes é facilmente medido pela contagem de colônias que crescem em meio mínimo, após a exposição de uma população de células à substância a ser testada (UMBUZEIRO; VARGAS, 2003; MORTELMANS; ZEIGER, 2000).

2.5 Queimaduras

A queimadura é uma lesão dos tecidos orgânicos em decorrência de um trauma de origem térmica, exposição a chamas, frio extremo, substâncias químicas, radiações, atritos e fricção, líquidos e superfícies quentes (SANTOS et al., 2009) que varia desde uma pequena bolha até formas graves, capazes de desencadear respostas sistêmicas proporcionais à extensão e à profundidade (GUIRRO; GUIRRO, 2004). São lesões que podem levar à desfiguração, à incapacidade e até à morte (SILVEIRA; GOMES; SERRA, 2004).

Na queimadura ocorre a destruição da barreira epitelial e da microbiota resistente da pele, rompendo seu efeito protetor (BARBOSA et al., 2007). Segundo dados da Organização Mundial da Saúde (OMS, 2006), anualmente existem 300.000 mortes no mundo decorrentes de queimaduras. Estima-se que no Brasil ocorram em torno 1.000.000 de acidentes com queimaduras por ano (OMS, 2006).

As queimaduras são classificadas de acordo com a profundidade da lesão provocada (SERRA et al., 2004). A lesão de primeiro grau atinge a camada mais externa da pele, a epiderme, apresenta edema, dor e hiperemia local. As lesões

de segundo grau atingem tanto a epiderme como a parte da derme, sendo característica típica a presença de bolhas ou flictemas. Podem ser classificadas em: superficial (quando atingem toda a epiderme e parte da derme, conservando folículos pilosos e glândulas sudoríparas) ou profunda (quando envolvem a destruição de quase toda a derme, apresentando coloração mais pálida e menos dolorosa). A lesão de terceiro grau acomete todas as camadas da pele, podendo chegar ao tecido ósseo.

Em queimados ocorrem degradação de proteínas e proliferação de microrganismos patógenos que, aliados a uma importante deficiência imunológica, podem gerar um foco infeccioso e, posteriormente, sepse. As anormalidades metabólicas em queimados são consequência da combinação da liberação de mediadores inflamatórios e a “resposta ao estresse”. As principais anormalidades são: aumento dos hormônios catabólicos (cortisol, catecolaminas); diminuição dos hormônios anabólicos (GH e testosterona); aumento da taxa de metabolismo basal (TMB); aumento da temperatura corporal; aumento da demanda de glicose e neoglicogênese hepática; uso da proteína muscular como fonte de energia (MOSIER et al., 2011).

A compreensão dos mecanismos envolvidos na produção excessiva de radicais livres em indivíduos que sofreram queimaduras é de extrema importância para terapêutica adequada. Qualquer substância que demonstre estimular as defesas antioxidantes ou diminuir a produção de radicais livres constitui-se como importante objeto de estudo nas queimaduras (MOSIER et al., 2011).

A cicatrização de queimadura inclui processos de inflamação, epitelização, neovascularização e contração da ferida, tornando-o um processo complicado, que inclui a liberação de antioxidantes, citocinas e biomarcadores de danos nos fígados e nos rins (de CAMPOS et al., 2015).

2.6 Estresse Oxidativo

A produção contínua de radicais livres durante os processos metabólicos culminou no desenvolvimento de mecanismos de defesa antioxidante, que tem o objetivo de limitar os níveis intracelulares de tais espécies reativas e controlar

a ocorrência de danos decorrentes (SHAMI; MOREIRA, 2004; BIANCHI; ANTUNES, 1999).

A instalação do processo de estresse oxidativo decorre da existência de um desequilíbrio entre compostos oxidantes e antioxidantes, em favor da geração excessiva de radicais livres ou em detrimento da velocidade de remoção desses. Tal processo leva à oxidação de biomoléculas com conseqüente perda de suas funções biológicas e/ou desequilíbrio homeostático, cuja manifestação é o dano oxidativo potencial contra células e tecidos (HALLIWELL; WHITEMAN, 2004). A cronicidade do processo em questão tem relevantes implicações sobre o processo etiológico de numerosas enfermidades crônicas não transmissíveis, entre elas a aterosclerose, diabetes, obesidade, transtornos neurodegenerativos e câncer (GREEN; BRAND; MURPHY, 2004).

2.6.1 Sistema de Defesa Antioxidante

Em sistemas aeróbicos, é essencial o equilíbrio entre agentes oxidorreduzores e o sistema de defesa antioxidante. Como vimos, esses agentes são gerados endogenamente como conseqüência direta do metabolismo do O₂ e também em situações não fisiológicas, como a exposição da célula a xenobióticos que provocam a redução incompleta de O₂ (ROSS; MOLDEUS, 1991).

Para proteger-se, a célula possui um sistema de defesa que pode atuar em duas linhas. Uma delas atua como detoxificadora do agente antes que ele cause lesão. Esta linha é constituída por glutathiona reduzida (GSH), superóxido-dismutase (SOD), catalase, glutathiona-peroxidase (GSH-Px) e vitamina E. A outra linha de defesa tem a função de reparar a lesão ocorrida, sendo constituída pelo ácido ascórbico, pela glutathiona-redutase (GSH-Rd) e pela GSH-Px entre outros (ROSS; MOLDEUS, 1991).

Com exceção da vitamina E (α -tocoferol), que é um antioxidante estrutural da membrana, a maior parte dos agentes antioxidantes está no meio intracelular (HEBBEL, 1986).

Glutathiona reduzida (GSH) – está presente na maioria das células e é o tiol (-SH) mais abundante no meio intracelular (MEISTER; ANDERSON, 1983). Sua capacidade redutora é determinada pelo grupamento -SH, presente na

cisteína. A GSH pode ser considerada um dos agentes mais importantes do sistema de defesa antioxidante da célula, protegendo-a contra a lesão resultante da exposição a agentes como íons ferro (GALLEANO; PUNTARULO, 1995), oxigênio hiperbárico, ozona, radiação e luz ultravioleta (DENEKE; FANBURG, 1989).

Além disto, diminui a suscetibilidade à lesão renal decorrente da isquemia e reperfusão (SHAN; JONES, 1990) atua como transportadora e reservatório da cisteína e participa da detoxificação de agentes químicos e da eliminação de produtos da lipoperoxidação. Ainda, é requerida para síntese de DNA, de proteínas e de algumas prostaglandinas (DENEKE; FANBURG, 1989).

Glutathiona-peroxidase (GSH-Px) – catalisa a redução do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e peróxidos orgânicos para seus correspondentes álcoois, às custas da conversão da GSH a GSSG (SHAN; JONES, 1990). Embora a GSH-Px tenha ação fundamentalmente citosólica, *in vitro* ela é capaz de reduzir hidroperóxidos de membrana (HEBBEL, 1986).

Catalase – é uma hemoproteína citoplasmática que catalisa a redução do H_2O_2 a H_2O e O_2 . É encontrada no sangue, medula óssea, mucosas, rim e fígado (MAYES, 1990). Sua atividade é dependente de NADPH (SCOTT, 1991). A suplementação de catalase exógena previne a oxidação da GSH mediada pelo H_2O_2 , em eritrócitos humanos normais (SCOTT, 1991), e também inibe as lesões oxidativas do DNA de timo de carneiros submetidos à sobrecarga de Fe^{3+} (ARUOMA et al., 1989). Em modelo de estresse oxidativo decorrente de agressão térmica, os eritrócitos exibem diminuição da atividade da catalase durante o processo hemolítico termodependente (HATHERRIL; TILL; WARD, 1991).

TBARS (Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico) - O TBARS, teste das substâncias que reagem com o ácido tiobarbitúrico, dosa os aldeídos, substâncias que se destacam como metabólitos secundários da oxidação de lipídeos. Dentre esses, o malondialdeído é um dos mais abundantes (MAYNE, 2003; HALLIWELL; WHITEMAN, 2004; SOUZA; OLIVEIRA; PEREIRA, 2005).

3. OBJETIVOS

3.1 Geral

Avaliar o efeito de AgNPs 50 nm em modelos experimentais de lesão ocasionada por queimadura e na junção neuromuscular (JNM) e sua toxicidade.

3.2 Específicos

Avaliar o efeito das AgNPs contra o bloqueio neuromuscular com veneno de Bjsu em preparações nervo frênico-diafragma de camundongos e tratar com AgNPs 50 nm;

Avaliar o efeito das AgNPs contra a queimadura de segundo grau através de contato termal e tratar com AgNPs 50 nm, comparativamente a tratamento com solução salina (grupo controle);

Avaliar a mutagenicidade de AgNPs, do veneno de Bjsu e da mistura veneno-AgNPs através do teste de Ames em quatro linhagens de *Salmonella typhimurium* TA97a, TA98, TA100 e TA102 (com e sem ativação metabólica).

4. METODOLOGIA EXPERIMENTAL

4.1. Material

4.1.1. Reagentes

Halotano (Cristália®, Contagem), hidrocloridrato de ketamina (Nutrivet, Jaguariuna), hidrocloridrato de xilazina (Nutrivet, Jaguariuna), hematoxilina-

eosina (Interlab, São Paulo), tricromo de Masson (Sinergia, Campinas), orceína (Interlab, São Paulo).

4.1.2. Materiais

Lâminas de vidro de histologia e lâminas para micrótomo, Paraplast® (Sigma-Aldrich, Jurubatuba), carbogênio (95% O₂/5% CO₂), papel para fisiógrafo (Ugo Basile, Ribeirão Preto), tinta para fisiógrafo (Ugo Basile, Ribeirão Preto).

4.1.3. Cepas

As linhagens de *Salmonella typhimurium* TA98, TA100, TA102 e TA97a foram gentilmente cedidas pelo Dr. Bruce Ames da Universidade de Berkeley (Califórnia, EUA) à Prof^a. Dra. Eliana Aparecida Varanda do Departamento de Ciências Biológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, que por sua vez, gentilmente doou à Uniso. Outro conjunto de cepas foi gentilmente doado pela Prof^a. Dra. Flávia Aparecida Resende, da Uniara, Araraquara. Meios de cultura e reagentes para a realização do teste de Ames.

4.1.4. Animais

Camundongos machos pesando entre 25-30g, da linhagem *Swiss* foram adquiridos na Anilab® (Paulínia, SP) e ratos machos pesando entre 200-250 g da linha Wistar foram adquiridos no Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. Os animais foram ambientados em gaiolas nos biotérios da Universidade de Sorocaba. Foram colocados quatro camundongos/gaiola com exaustão e ventilação apropriada (sistema de microventilação ambiental, Smaflex®), com ciclos de claro/escuro de 12 em 12 h controlados por timer, no biotério do Apoio 2, campus Cidade Universitária. Os ratos foram colocados um rato/gaiola igualmente com exaustão e ventilação apropriada (sistema de microventilação ambiental, Alesco®), no biotério do Lapetox (Laboratório de Pesquisas Toxicológicas). Os animais foram acomodados em camas de maravalha livre de substâncias químicas. Os animais receberam ração e água *ad libitum*. O projeto foi submetido e aprovado pela Comissão de Ética em Uso de Animais – CEUA da Universidade de Sorocaba – SP, protocolo nº 065/2016.

4.1.5. Veneno de *Bothrops jararacussu* (Bjssu)

O veneno de Bjssu foi coletado de espécimes adultos do serpentário do Centro de Estudos da Natureza (CEN) da Universidade do Vale do Paraíba, UNIVAP, São José dos Campos, SP, Brasil, posteriormente liofilizado e certificado pelo prof. Dr. José Carlos Cogo, da Universidade Brasil, São Paulo, SP.

4.1.6. Nanopartículas de Prata (AgNPs)

4.1.6.1. Obtenção da Nanopartícula de Prata (AgNPs)

As AgNPs foram obtidas e doadas pela Prof^a. Dra. Carolina Alves dos Santos, pós-doutoranda Capes, do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Uniso. Brevemente, nitrato de prata (AgNO_3) na concentração de 45 mg foi utilizado como agente de prata da reação. Em solução aquosa o sal de prata foi submetido à redução, em reator químico, com solução de citrato de sódio na proporção final de 1:0,34 molar. Nas amostras nas quais agentes estabilizantes como PVP (polivinil pirrolidona), PVA (polivinil álcool) foram adicionados estes resultaram na concentração de 135 mg. Todo o processo foi efetuado com agitação e controle de temperatura. A obtenção de nanopartículas seguiu em paralelo à realização deste projeto.

4.2 Procedimentos Experimentais

4.2.1 Preparação Nervo Frênico-Diafragma de Camundongos

Os camundongos foram anestesiados com halotano, por via inalatória e posteriormente exsanguinados pela secção e sangria dos vasos cervicais. A preparação nervo frênico-diafragma foi retirada conforme o protocolo proposto

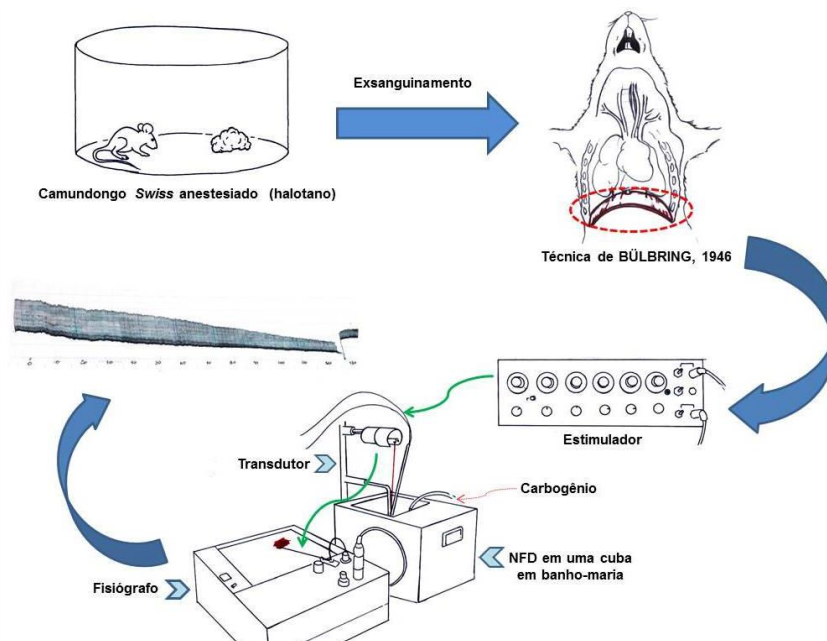
por Bülbring (1946) adaptado para camundongos e colocada em cuba com capacidade para 5 mL contendo solução de Tyrode (solução nutritiva Tyrode: pH 7,0; composição (mM): NaCl 137; KCl 2,7; CaCl₂ 1,8; MgCl₂ 0,49; NaH₂PO₄ 0,42; NaHCO₃ 11,9 e Glicose 11,1. Esta solução mantém as condições fisiológicas da preparação neuromuscular) e, presa através dos músculos da costela por ganchos existentes na base da cuba.

A temperatura foi mantida a 37°C e a preparação aerada com carbogênio (mistura de 95% O₂ e 5% CO₂). Uma tensão de 5 g/cm foi aplicada por meio de um fio preso a porção tendinosa. O nervo frênico fica sobreposto a um eletrodo que se mantém em contato com a superfície da solução nutritiva.

O registro da contração muscular foi alcançado através do transdutor isométrico cat.7003, acoplado a um fisiógrafo 2-Channel Recorder Gemini cat.7070, contendo amplificadores Basic Preamplifiers cat.7080 (Ugo Basile®). Em seguida, a preparação foi estimulada indiretamente, através do nervo frênico (estimulador fisiológico duplo ESF-15D), usando-se estímulos supramaximais e frequência de 0,06 Hertz com duração de 0,2 milissegundos (Figura 3). Após registro em condições controle durante 10 minutos de estabilização da preparação foram realizados os protocolos farmacológicos.

O parâmetro da neurotoxicidade foi avaliado pelo bloqueio neuromuscular frente aos seguintes tratamentos: controle Tyrode; Bjsu (60 µg/mL); curva concentração-resposta AgNPs (50 µL/mL, 100 µL/mL, 200 µL/mL, 500 µL/mL) e seleção da melhor concentração (a que não produz alteração da resposta basal); pré incubação da mistura veneno (60 µg/mL): AgNPs (concentração selecionada).

Figura 3. Esquema de isolamento da preparação do nervo frênico-diafragma.



Fonte: Elaboração Isadora Caruso Fontana Oliveira.

4.2.2 Análise Histológica

As preparações resultantes dos ensaios farmacológicos de pré-incubação foram quantitativamente analisadas e comparados com controles Tyrode, Bjsu e AgNPs. Ao final de cada experimento farmacológico (120 min), três preparações de cada grupo foram fixadas em solução de formalina 10% e processadas através de métodos histológicos de rotina. Secções de 5 μ m das preparações foram coradas com hematoxilina-eosina 0,5% (peso/volume) para a análise microscópica. O dano celular (edema, lise de membrana, lesões delta, presença de vacúolos, células *ghost*, contração de miofibrilas, aspecto hialino) foi expresso como índice de miotoxicidade (IM), i.e., a porcentagem do número de células danificadas dividido pelo número total de células em três áreas não superpostas e não adjacentes de cada preparação (FERRAZ et al., 2014).

Etapas do processamento: colheita, fixação, desidratação, diafanização, impregnação, inclusão, microtomia, coloração, montagem e observação.

Lavagem: Lavar a lâmina 1h antes do processamento de desidratação em água corrente.

Desidratação: Em pote de fundo longo deixar a peça por 1 h em álcool 70%, 1 h em álcool 95%, 1 h em álcool absoluto I, 1 h em álcool absoluto II, 1 h em álcool absoluto III.

Diafanização: Em pote de fundo estreito deixar a peça por 1 h em xilol I e 1 h em xilol II.

Inclusão: Logo após esse primeiro preparo aquecer e manter o Paraplast® em torno de 56 °C, logo após deixar 1 h em parafina I e 2 h em parafina II, caso desejar parar o processamento, deixar em álcool.

Microtomia: Após a inclusão, os blocos de parafina são cortados em micrótomo.

Banho-Maria: Os cortes são distendidos em água aquecida a 56 °C, para evitar microdobras.

Pescagem: As lâminas são mergulhadas no banho-maria para coletar o material.

Coloração: Após a secagem das lâminas, iniciar a coloração das mesmas.

4.2.2.1 Coloração de Hematoxilina/Eosina

Após o processamento deixar por 5 min no xilol I, 5 min no xilol II, 2 min e 30 s no álcool absoluto, 2 min e 30 s no álcool 95%, 10 mergulhos na água corrente, 2 min na hematoxilina, 3 min em água corrente, 1 min na eosina, passar rapidamente por água corrente, 1 min em álcool 70%, 1 min em álcool 95%, 1 min em álcool absoluto, 3 min em xilol I e para finalizar 3 min em xilol II. Após esse processo fazer a montagem com Entellan® e finalizar com lamínula.

4.2.2.2 Coloração de Tricromo de Masson (Com Azul de Anilina)

Após o processamento deixar por 5 min em xilol, rapidamente em álcool absoluto, álcool 95 %, álcool 70 %, água corrente, água destilada e secar as lâminas suavemente. Em um béquer pequeno colocar o reagente A do kit (10 gotas aproximadamente) e reagente B do kit (10 gotas aproximadamente), cobrir o tecido com a solução por 10 min, lavar em água corrente e secar suavemente. Após, colocar 10 gotas do reagente C do kit e deixar por 4 min, lavar em água

corrente, colocar no corte 10 gotas do reagente D do kit por 5 min, secar as lâminas suavemente sem secar. Colocar 10 gotas do reagente E do kit por 5 min, lavar em água destilada e desidratar rapidamente. Logo após colocar rapidamente em álcool 70 %, álcool 90 %, álcool absoluto e xilol. Após esse processo finalizar com Entellan[®] e finalizar com lamínula.

4.2.2.3 Coloração de Orceína

Dissolver 1 g de orceína em 80 mL de etanol 96 %, 19 mL de água destilada e 1 mL de ácido clorídrico (HCl).

Desparafinizar por 3 min em xilol. Deixar a orceína por 20 min a 56 °C, diferenciando com álcool acidificado por 2 min, transferir para etanol 96 % por 30 s. Esperar secar as lâminas finalizar com Entellan[®] e finalizar com lamínula.

4.2.3 Indução das Lesões *in vivo* e Tratamento com AgNPs (50 nm)

A indução da injúria foi feita de acordo com método validado por De Campos et al. (2015). Brevemente, os ratos foram divididos em dois grupos de 8 animais, anestesiados com hidrocloreto de ketamina (100 mg/kg) e com hidrocloreto de xylazina (6 mg/kg), bloqueador neuromuscular. Os animais foram epilados no dorso numa área de 3 cm², que corresponde a 2,16% da área total do corpo (GOUMA et al., 2012) e exatamente esta área foi queimada com um térmico de contato durante 10 s com diâmetro de 0,6 cm (WALKER; MASON, 1968). O tratamento foi iniciado 30 min após a indução da queimadura, 1 vez/dia com aplicação de 50 µL topicamente, da seguinte forma:

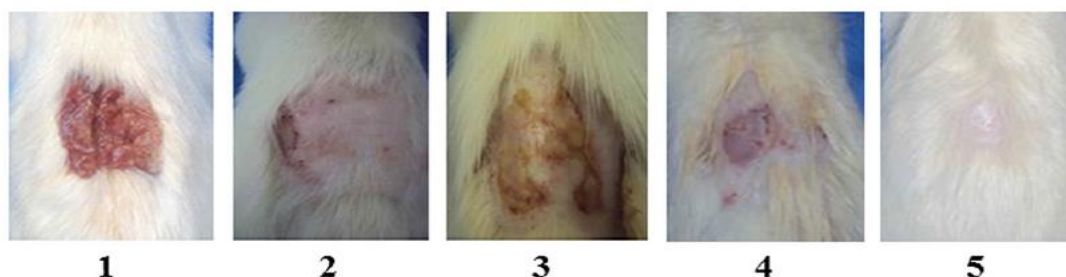
Grupo controle: recebeu diariamente 50 µL de solução salina 0,9%

Grupo experimental: recebeu diariamente 50 µL de solução de AgNPs (50 nm).

Diariamente a evolução da lesão foi monitorada de acordo com o seguinte score (Figura 4).

Dois animais de cada grupo (controle e experimental) foram sacrificados nos 7^o, 14^o, 21^o e 28^o dia, através de aprofundamento anestésico (hidrocloreto de ketamina, 148 mg/kg) (REBUELTO et al., 2002).

Figura 4. Parâmetros macroscópicos da lesão por escaldado.



Fonte: De CAMPOS et al., 2015. 0, infecção severa/grande extensão de necrose (não mostrado); 1, taxa de exsudação moderada/hiperemia; 2, sinais inflamatórios/bordas infectadas; 3, epiteliação inicial; 4, epiteliação parcial/ausência de área necrótica; 5, epiteliação/crescimento de pelos.

A área queimada foi retirada, observada macroscopicamente (análise de imagem – fotografia) e posteriormente processada como de rotina, corada com hematoxilina-eosina, tricromo de Masson e orceína e analisada por microscopia de luz, tomando-se o cuidado de não identificar qual o tratamento fora instituído em cada preparação. Secções seriadas de 5 µm foram feitas. O critério de avaliação foi: (a) epiteliação; (b) extensão da área regenerada baseada na extensão lateral; (c) infiltração inflamatória crônica; (d) neovascularização; (e) proliferação de fibroblasto; (f) colágeno jovem. Um score de 0-5 foi assinalado para cada critério avaliado, de acordo com a maior intensidade mostrada no *slide* histológico (REBUERTO et al., 2002).

4.2.4 Teste de Ames (*Salmonella*/Microsoma)/ Teste de toxicidade

Antes de realizar o teste de Ames devem-se conhecer as concentrações das amostras que causam toxicidade às linhagens de *S. typhimurium*. Toxicidade é evidenciada pela ausência completa de crescimento, redução no número de revertentes His⁺ ou como um crescimento de fundo (*background*) nas placas teste de ágar glicose mínimo em comparação com as placas de controle negativo e controle espontâneo. Uma diminuição no crescimento de colônias com mutação reversa abaixo do controle espontâneo pode indicar toxicidade parcial, neste caso as bactérias sobreviventes formam ainda micro colônias. A ausência de crescimento de colônias e de crescimento de fundo indica um elevado grau de toxicidade que impede o crescimento da bactéria e a formação

do crescimento de fundo (VARGAS; MOTTA; HENRIQUES, 1993; MORTELMANS; ZEIGER, 2000).

Foram testadas concentrações preliminares do veneno Bjsu (0,04, 0,2, 1, 5, 25 e 50 mg/mL), AgNPs 50 nm (0,081 mg/mL) e da mistura veneno-AgNPs (após seleção das concentrações não tóxicas), todos dissolvidos em DMSO e ensaiados com a linhagem TA98 e TA100. A partir dos resultados dos testes de toxicidade e observando-se a curva dose-resposta foram selecionadas as concentrações adequadas para o estudo.

4.2.5 Realização do Teste

O método utilizado para a realização do teste de Ames foi o teste de incorporação em placas (Figura 5). Este método consiste na exposição das linhagens de *S. typhimurium* e as amostras a serem testadas, em placa de agar glicose mínimo, na presença e ausência do sistema de ativação metabólica (mistura S9) (MARON; AMES, 1983), a seguir descrito.

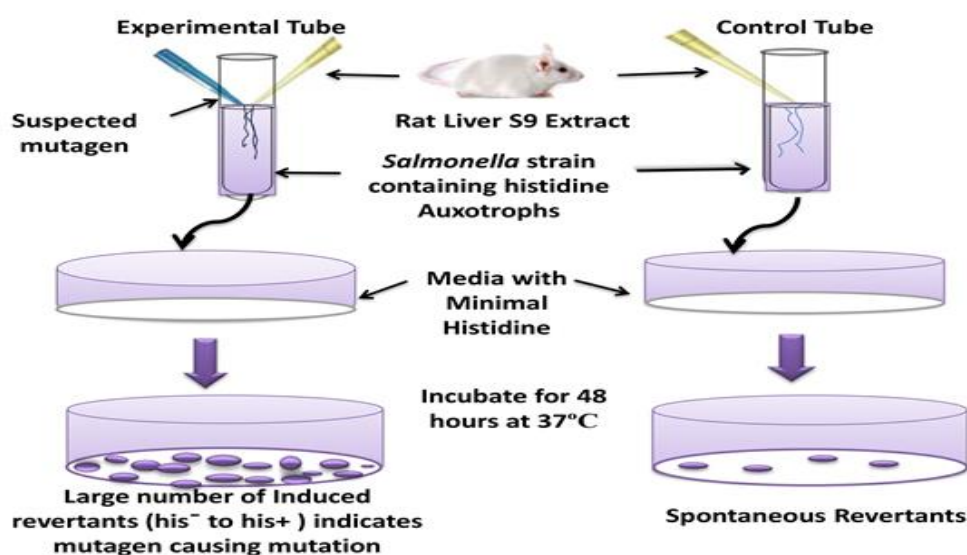
O método de incubação prévia é caracterizado por uma etapa de incubação antes do plaqueamento. Todos os materiais são previamente expostos à Luz de Ultravioleta para que possam ter uma barreira maior de proteção e esterilização (Figura 6). As culturas de bactérias e a mistura contendo a amostra teste, em presença e ausência do sistema de metabolização, são previamente incubadas por período de 20-30 min a 37 °C.

Após a identificação dos tubos, na sequência, adiciona-se a amostra. As amostras foram solubilizadas em dimetilsulfóxido (DMSO) ou em água purificada, pelo sistema MilliQ estéril. O teste foi realizado em triplicata. Na sequência foram adicionados os controles positivos e negativos, nos tubos correspondentes. A presença desses controles é importante para assegurar a capacidade de resposta da linhagem e a eficácia do sistema de ativação metabólica. Como controle negativo, utiliza-se o DMSO, o mesmo solvente utilizado para diluir a amostra, cuja quantidade segue sempre a máxima dose de amostra utilizada no teste. Como controles positivos para as cepas TA98 e TA100 foram utilizados compostos mutagênicos NPD (4-nitrofenilenodiamina) e Azida Sódica, respectivamente, em concentrações de 50 µL.

Em seguida foi adicionado o tampão fosfato e a bactéria, em todos os tubos, inclusive nos controles. Os tubos foram colocados na estufa, para uma prévia incubação de 20-30 min a 37 °C. Depois de cumprido o tempo de incubação, foi adicionado 2,0 mL de top Agar a 45 °C, suplementado com solução de biotina/histidina, em todos os tubos.

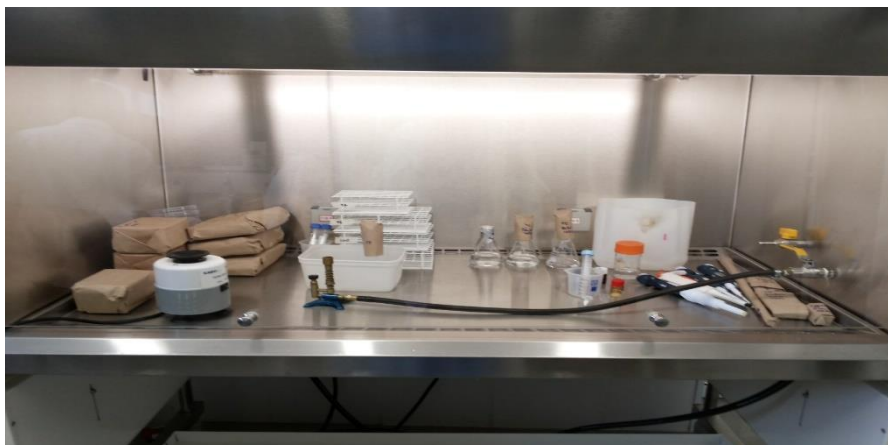
Os tubos foram homogeneizados e vertidos sobre a superfície da placa contendo ágar glicose mínimo. Com a solidificação do top ágar, as placas foram incubadas invertidas, por 48 h a 37 °C. Depois de cumprido o tempo desta segunda incubação realizou-se a contagem do número de revertentes por placa. Os ensaios com ativação metabólica seguem o mesmo procedimento, porém, em uma das etapas, substitui-se o tampão fosfato pela adição da fração S9.

Figura 5. Esquema do Teste de Ames. Método de incorporação em placas.



Fonte: https://bio-protocol.org/e2763?action=Questions#div_bbs

Figura 6. Materiais dentro do fluxo laminar com o Ultravioleta (UV) ligado, com todos os materiais utilizados para o Teste de Ames.



4.2.6 Forma de Análise dos Resultados

Os resultados provenientes dos ensaios *in vitro* foram mostrados como a média \pm EPM e foram estatisticamente analisados usando o teste *t*-Student. O nível de significância foi de 5% para todos os experimentos.

O teste de Bartlett foi utilizado nos resultados dos ensaios *in vivo* para avaliar a homogeneidade dos resultados. Diferenças entre cada tratamento foi analisada através de One-Way ANOVA, seguido de testes de comparações múltiplas de Tukey-Kramer. O nível de significância foi de 5% para todos os experimentos.

Para o teste de Ames, os resultados foram analisados utilizando o programa estatístico Salanal (U.S.Environmental Protection Agency, Monitoring Systems Laboratory, Las Vegas, NV, versão 1.0, do Research Triangle Institute, RTP, Carolina do Norte, EUA). Os dados (revertentes/placa) foram avaliados pela análise de variância (ANOVA), seguido de uma regressão linear. O índice de mutagenicidade (IM) também foi calculado para cada concentração testada, de acordo com a equação a seguir.

Equação 1: Índice mutagênico.

$$IM = \frac{\text{n}^{\circ} \text{ de revertentes (placa com a amostra)} - \text{revertentes induzidas}}{\text{n}^{\circ} \text{ de revertentes (placa de controle negativo)}}$$

A amostra é considerada mutagênica quando houver uma relação dose/resposta entre as concentrações testadas e o número de revertentes induzidos e/ou quando o IM foi maior ou igual a dois em pelo menos uma das

doses testadas (MORTELMANS; ZEIGER, 2000). Por outro lado, para as linhagens TA98, TA100, TA102 e TA97a, índices menores do que 2 acompanhados de ANOVA significativa e efeito dose, resposta reprodutível, indicam que a amostra apresenta indícios de mutagênese (VARGAS; MOTTA; HENRIQUES, 1993). A resposta é considerada negativa quando a ANOVA não for significativa nem for observado um efeito dose-resposta.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Efeito das AgNPs 50 nm sobre o Bloqueio Neurumuscular do Veneno de *Bothrops jararacussu*

A Figura 7 ilustra a curva concentração-resposta de AgNPs adicionadas às cubas contendo as preparações biológicas, nos volumes (em μL) de: 50, 100, 200 e 500 que correspondem às concentrações (em μg) de: 4,05 (n= 4); 8,1 (n=4); 16,2 (n=5) e 40,5 (n=5), durante 120 min de observação.

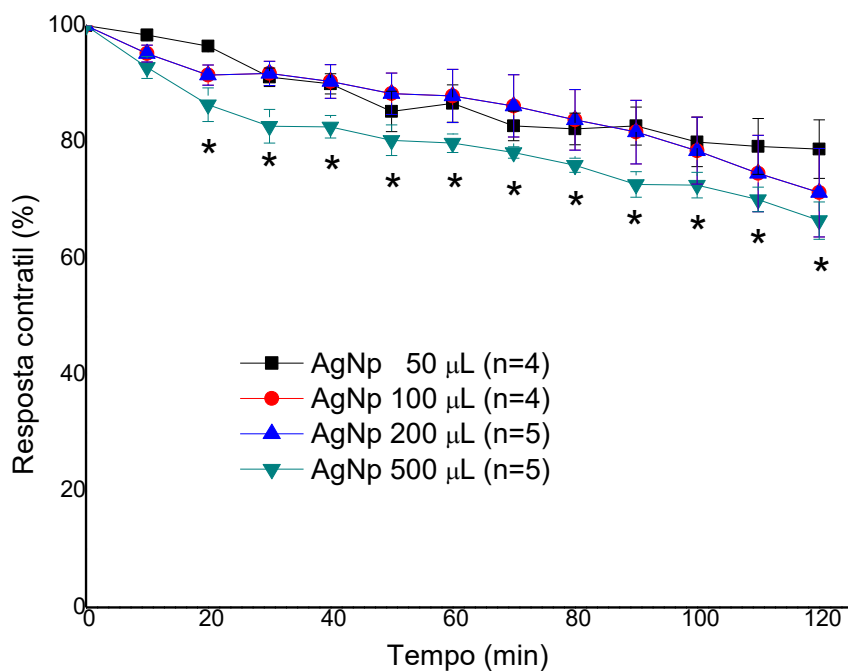
Note que a concentração de 4,05 $\mu\text{g}/50 \mu\text{L}$ manteve a resposta contrátil nos momentos iniciais, decaindo aos 30 minutos de experimento, sendo que aos 120 minutos foi o que mais manteve a resposta contrátil, não havendo diferença significativa com as concentrações de 8,1 $\mu\text{g}/100 \mu\text{L}$ e 16,2 $\mu\text{g}/200 \mu\text{L}$, porém tendo diferença significativa entre 40,5 $\mu\text{g}/500 \mu\text{L}$ (*, $p < 0,05$ comparada à concentração de 4,05 $\mu\text{g}/50 \mu\text{L}$).

A concentração de 8,1 $\mu\text{g}/100 \mu\text{L}$ se mistura às outras concentrações, não se notando diferença significativa entres as concentrações. Já com a concentração de 16,2 $\mu\text{g}/200 \mu\text{L}$ verifica-se uma diminuição logo aos 20 minutos, elevando-se nos próximos minutos e caindo, terminando os 120 minutos abaixo da resposta contrátil da concentração de 4,05 $\mu\text{g}/50 \mu\text{L}$.

Na concentração de 40,5 $\mu\text{g}/500 \mu\text{L}$ há uma diminuição, comparada às outras concentrações, terminando os 120 minutos com menor porcentagem de respostas contrátil.

Esses dados mostram que dentre as concentrações estudadas, a concentração de 4,05 $\mu\text{g}/50 \mu\text{L}$ foi a que provocou menor declínio da resposta contrátil aos 120 minutos. Entretanto, após novos testes, constatou-se que a dose de 0,405 $\mu\text{g}/5 \mu\text{L}$ foi a selecionada por provocar o menor efeito sobre a preparação.

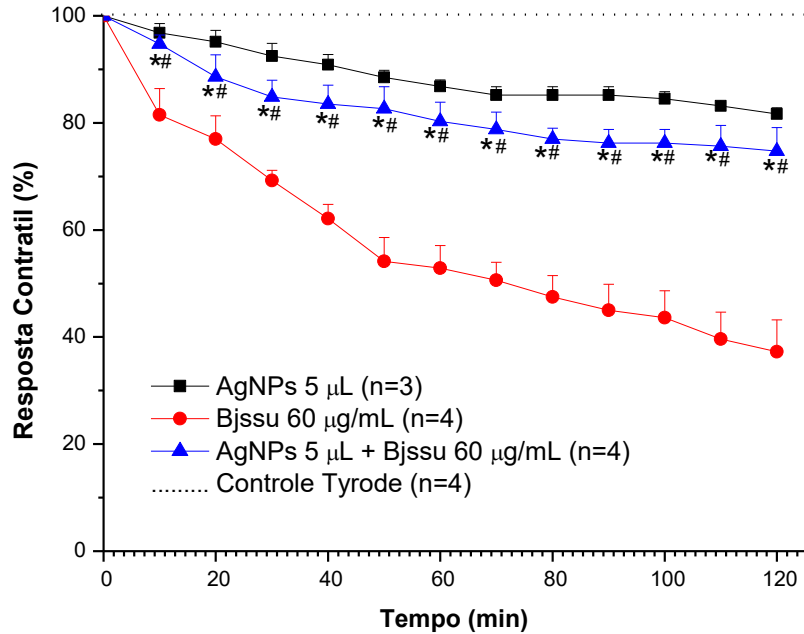
Figura 7. Preparação nervo frênico-diafragma de camundongos (estímulo indireto) – Curva resposta de volumes de 50, 100, 200 e 500 μL de AgNPs (concentrações dadas no texto). Cada ponto representa a média \pm E.P.M. do número de experimentos (n) representados na legenda da figura. *, $p < 0,05$ comparada à concentração de 4,05 $\mu\text{g}/50 \mu\text{L}$).



Dentre as concentrações estudadas de AgNPs, a concentração de 0,405 µg/5 µL foi a que menos interferiu na resposta contrátil ao decorrer de 120 min, sendo, portanto, eleita para os ensaios de neutralização. A Figura 8 ilustra os ensaios de Neutralização (AgNPs 5 µL + Bjssu 60 µg/mL), durante 120 min de observação.

O ensaio da neutralização do veneno no protocolo de prévia incubação consistiu em incubar previamente a mistura de AgNPs (0,405 µg/5 µL) + Bjssu (60 µg/mL) durante 30 min, para depois acrescentar-se à preparação NFD (▲, na figura). Note que houve a diminuição da resposta contrátil, estabilizando a resposta após 60 minutos do experimento. Houve diferença significativa tanto com a concentração de 5 µL/mL de AgNPs (*p<0,05 comparada ao veneno), quanto com a concentração de veneno Bjssu (60 µg/mL) (*p<0,05 comparado ao controle Tyrode), mostrando que houve neutralização do veneno de *Bothrops jararacussu*.

Figura 8. Preparação nervo frênico-diafragma de camundongos (estímulo indireto) – Ensaio de Neutralização. Cada ponto representa a média ± E.P.M. do número de experimentos (n) representados na legenda da figura. *, p<0,05. Comparado ao veneno. #, p<0,05, comparado ao controle Tyrode (n=4).

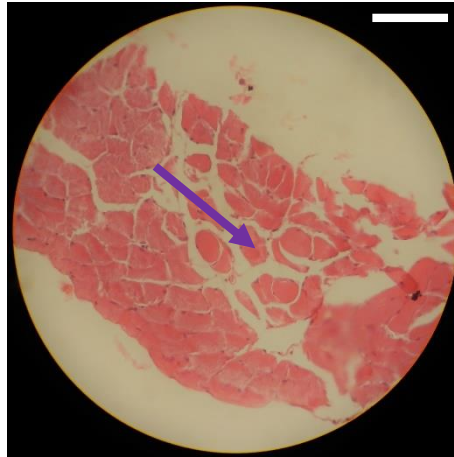


As preparações resultantes dos ensaios farmacológicos foram reservadas para processamento histológico de rotina, que quantitativamente, após a leitura cega realizada por 3 examinadores obtiveram-se os seguintes índices de miotoxicidade (I.M. \pm S.E.M, em %): controle Tyrode (n=4), $8,0 \pm 5,0$; AgNPs 5 μ L (n=4), $56,2 \pm 3,8$ (*); veneno de *B. jararacussu* (60 μ g/mL (n=4), $49,6 \pm 3,6$ (*); Neutralização (n=4), $45,2 \pm 4,3$ (*), onde *, $p < 0.05$ comparado ao controle. Do ponto de vista qualitativo, as lâminas histológicas das preparações biológicas NFD de camundongos resultantes dos experimentos farmacológicos são mostradas nas Figuras 10, 11, 12, 13 e 14.

5.2 Análise Histológica do Músculo Nervo Frênico-Diafragma (NFD) de Camundongos

Na Figura 9 visualiza-se uma lâmina representativa de preparações expostas à solução nutritiva de Tyrode, onde as células encontram-se em seu estado normal (seta roxa), ou seja, apresentam conformação poligonal com presença de núcleos periféricos.

Figura 9. Preparação biológica exposta à solução nutritiva de Tyrode. Coloração H/E.
(barra: 1 cm=40 μ m).



Na Figura 10 visualiza-se uma lâmina representativa de preparações expostas às AgNPs (0,405 μ g/5 μ L), onde há indícios de alterações celulares, principalmente constituídas por condensação de miofibrilas (setas azuis).

Figura 10. Preparação biológica exposta a AgNPs (0,405 μ g/5 μ L) coloração H/E.
(barra: 1 cm=40 μ m).



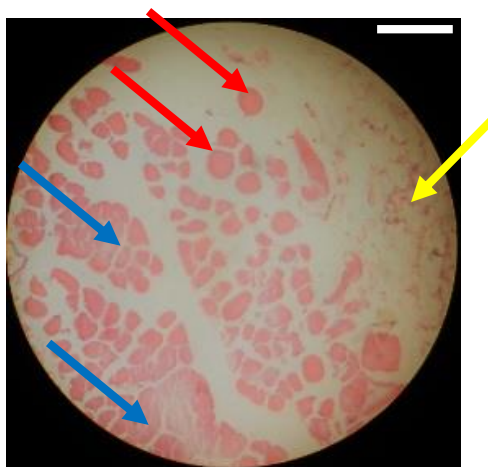
Na Figura 11, visualiza-se uma lâmina representativa de preparações expostas às AgNPs na concentração máxima testada de 40,5 μ g/500 μ L, cujo efeito foi devastador com áreas de células *ghost* e lise celular (vide setas vermelhas).

Figura 11. Preparação biológica exposta a AgNPs (40,5 μ g/500 μ L) coloração H/E,
(barra: 1 cm=40 μ m).



Na Figura 12, visualiza-se uma lâmina representativa de preparações expostas ao veneno de Bjsu na concentração de 60 $\mu\text{g/mL}$, contendo células edemaciadas (setas vermelhas), condensação de miofibrilas (setas azuis) e células *ghost* (setas amarelas).

Figura 12. Preparação biológica exposta ao veneno de Bjsu (60 $\mu\text{g/mL}$), coloração H/E (barra: 1 cm=40 μm).



Na Figura 13, visualiza-se uma lâmina representativa de preparações expostas a neutralização, contendo células edemaciadas (setas vermelhas).

Figura 13. Preparação biológica exposta ao veneno pré-tratado com AgNPs, coloração H/E (barra: 1 cm=40 μm).



A curva dose-resposta tem o intuito de representar o efeito ou resposta biológica desencadeada por uma substância frente a uma dose previamente determinada, a fim de obter um perfil farmacológico do composto utilizado (TAVARES, 2004). Neste estudo, os resultados foram submetidos a análise estatística (teste *t*-Student com o valor significativo de $p < 0,05$), constatando que não houve diferença significativa entre as concentrações de $8,1 \mu\text{g}/100 \mu\text{L}$, $16,2 \mu\text{g}/200 \mu\text{L}$ e $40,5 \mu\text{g}/500 \mu\text{L}$; porém, entre as concentrações de $4,05 \mu\text{g}/50 \mu\text{L}$ e de $40,5 \mu\text{g}/500 \mu\text{L}$ houve diferença significativa.

Em todas as concentrações das nanopartículas aqui estudadas o efeito se manteve semelhante sobre a preparação NFD, sendo que até mesmo a maior concentração estudada não produziu um bloqueio neuromuscular completo. Por outro lado, a falta de discriminação entre as concentrações estudadas entre 5 a $200 \mu\text{L}$, imputou valor medicinal à menor concentração ($0,405 \mu\text{g} / 5 \mu\text{L}$) sugerindo que um nanomedicamento à base de prata, não teria a necessidade de possuir uma alta concentração, devido à potência das AgNPs ser garantida.

Elas se caracterizam pela sua estabilidade química, atividade catalítica e um comportamento ótico não linear. Estas propriedades conferem um imenso potencial em tintas, microeletrônica e imagiologia médica. No entanto, é o largo espectro de atividade antimicrobiana da prata e o custo relativamente baixo de obtenção de AgNPs que as torna extremamente populares numa vasta gama de produtos de consumo incluindo plásticos, sabonetes, adesivos, metais e têxteis (FABREGA et al., 2011).

A interação entre proteínas e nanopartículas de prata dá origem à AgNPs estáveis com a formação do complexo nanopartícula-proteína, o qual foi estudado por diferentes técnicas. Estas interações bioquímicas e biofísicas

podem ocorrer através de ligações covalentes e interações eletrostáticas (BALLOTTIN, 2014).

A avaliação das nanopartículas contra os efeitos tóxicos do veneno (neurotoxicidade *in vitro* e miotoxicidade) permitiu constatar que esses dois eventos não guardam uma correlação positiva entre si. Apenas $37,2 \pm 6,0$ % das fibras musculares mostraram-se fisiologicamente ativas perante a exposição ao veneno, ao final de 120 min, enquanto a neutralização deste efeito do veneno, pelas nanopartículas, garantiu o funcionamento de $74,7 \pm 4,3$ % das fibras.

Quanto à miotoxicidade do veneno, que sozinho alterou $49,6 \pm 3,6$ % das células, as nanopartículas não tiveram eficácia estatisticamente significativa, mantendo o dano em $45,2 \pm 4,3$. Curiosamente, a menor concentração de nanopartículas sozinha lesionou $56,2 \pm 3,8$ das fibras celulares. Entretanto, há que se considerar que para este último o evento predominante foi a condensação de miofibrilas, enquanto para o veneno foi a necrose. Esta observação abre uma janela para a correlação neurotoxicidade & miotoxicidade, sobre qual seria o evento determinante de dano celular que comprometeria a maquinaria da excitação-acoplamento na junção neuromuscular, uma vez que o dano constatado para a menor concentração de nanopartícula não impediu a neurotransmissão.

Os sinais ou impulsos nervosos são transmitidos por potenciais de ação, que são variações rápidas do potencial de membrana neuronal. Um impulso nervoso é a transmissão de uma alteração elétrica ao longo da membrana do neurônio a partir do ponto em que ele foi estimulado. No neurônio não estimulado, a superfície interna da membrana plasmática tem uma grande quantidade de cargas negativas, quando comparada com o fluido tecidual adjacente. Proteínas negativamente carregadas e outras moléculas grandes contribuem para as cargas negativas relativas ao lado interno da membrana plasmática neuronal. Esse estado elétrico corresponde ao potencial de repouso da membrana. Durante essa fase diz-se que a membrana está polarizada (KANDEL et al., 2003).

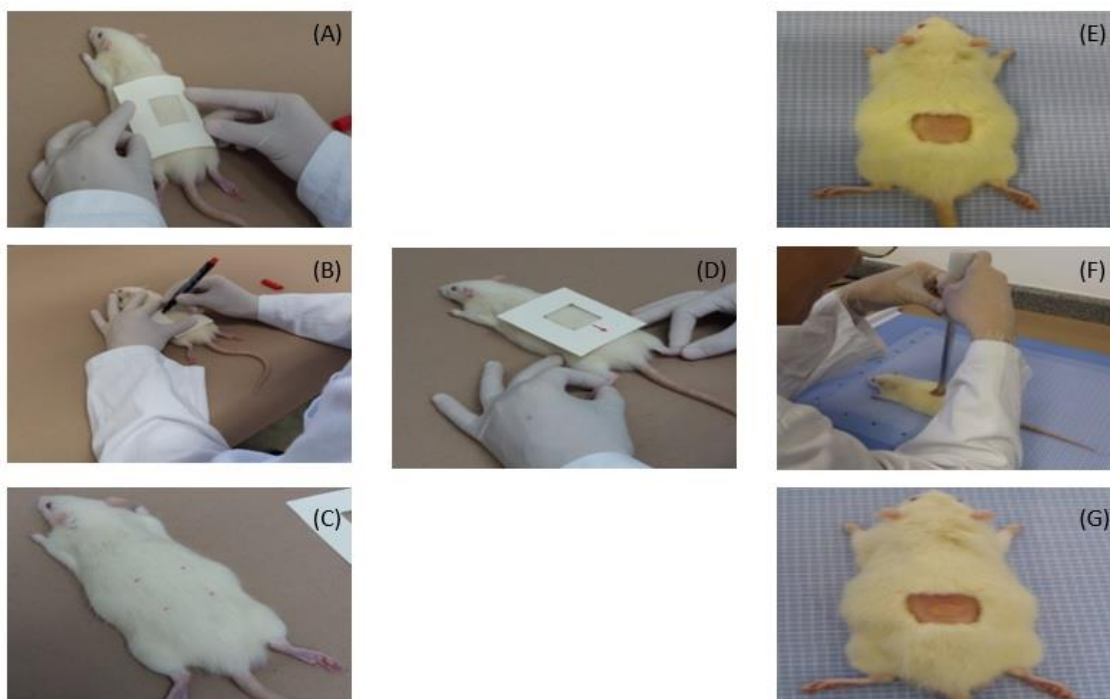
Os neurônios que se comunicam mediante sinapses elétricas são conectados por junções comunicantes (*gap junction*) através das quais os impulsos elétricos passam diretamente da célula pré-sináptica para a pós-sináptica. As sinapses químicas podem ser excitatórias ou inibitórias. Nas

excitatórias, o neurotransmissor liberado pela célula pré-sináptica produz uma mudança localizada na membrana da célula pós-sináptica que a leva a se despolarizar, promovendo a geração de um potencial elétrico. Nas sinapses inibitórias, o neurotransmissor causa uma mudança na permeabilidade de íons, que tende a bloquear o potencial da célula pós-sináptica por hiperpolarização de suas membranas (PURVES et al., 2001).

5.3 Efeitos das AgNPs 50 nm em Queimaduras de Segundo Grau por Contato Térmico, em Ratos

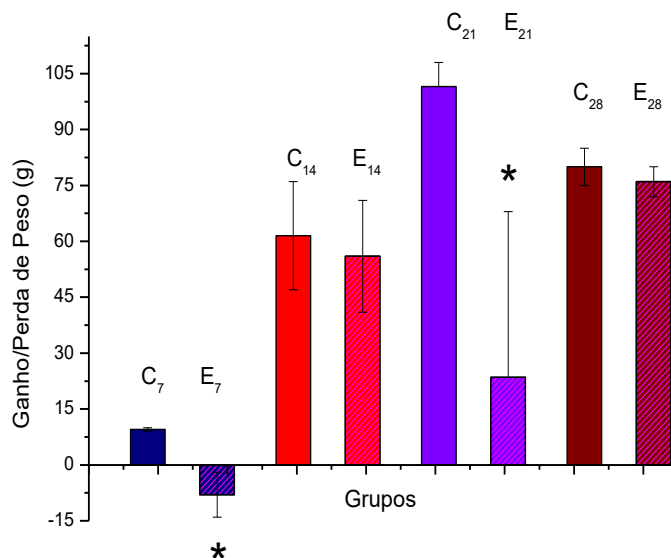
A Figura 14 mostra um esquema do primeiro dia, quando houve a marcação dos pontos de epilação e o momento da queimadura por contato dérmico e após a queimadura.

Figura 14. Procedimento utilizado para a execução de queimadura de segundo grau através de contato dérmico, em animais anestesiados. (A), epilação se deu em uma área de 3 cm² na região do dorso, (B), marcação dos pontos, (C), pontos demarcados para a epilação, (D), ajustes na área de epilação, (E), área totalmente epilada, (F), queimadura com um bastão de ferro aquecido em água a 70 °C, o qual era pressionado por 10 s no dorso da área epilada, (G), área queimada.



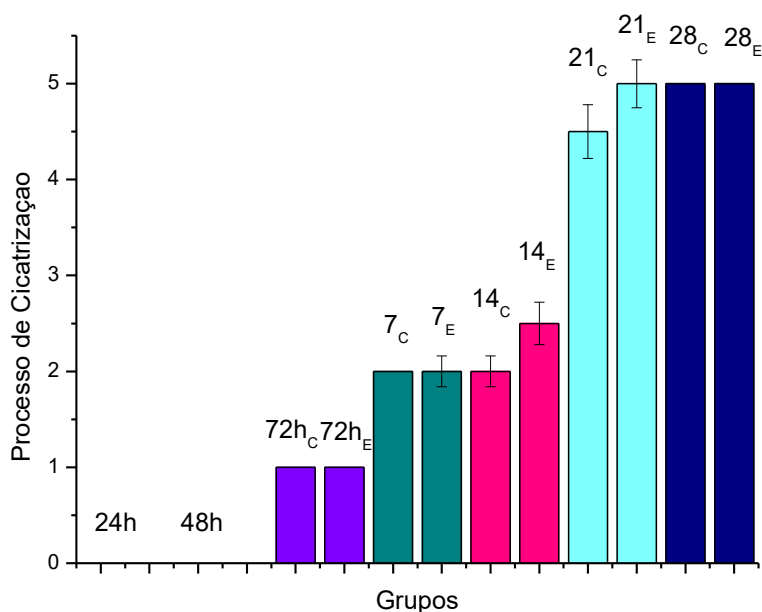
A Figura 15 ilustra a variação de peso (em g) entre os grupos controle (C) e experimental (E). Foram utilizadas a média \pm erro-padrão da média dos ganhos ou perdas de peso, tomados no primeiro dia e no dia do sacrifício (7°, 14°, 21° e 28° dias).

Figura 15. Diferenças de pesos tomados no primeiro dia e no dia do sacrifício dos animais dos grupos controle (C) (n=2) e experimental (E) (n=2) correspondentes aos 7°, 14°, 21° e 28° dias. Note que o grupo experimental apresentou diferença estatisticamente significativa na primeira e terceira semanas (* p< 0,05).



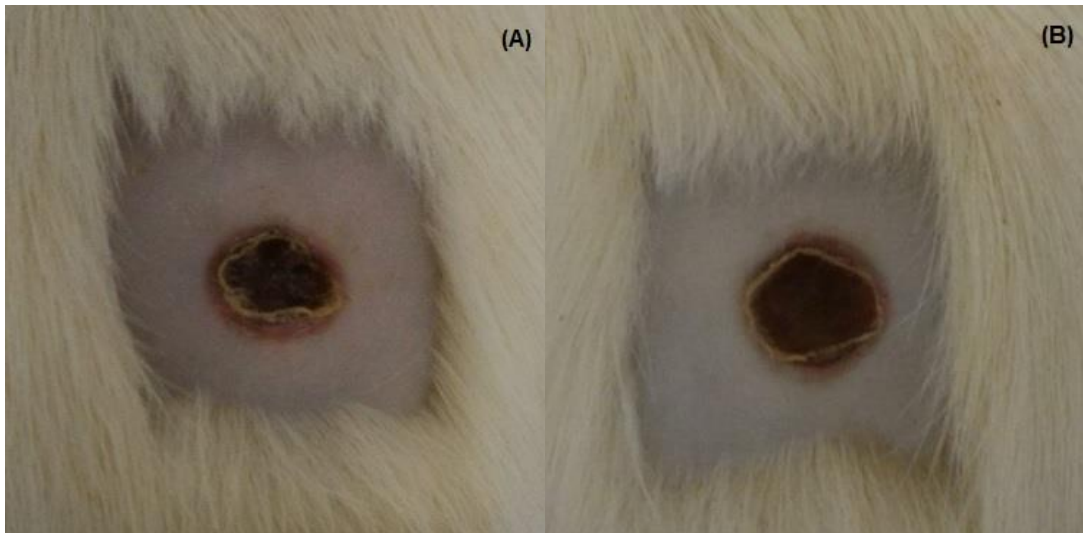
A Figura 16 ilustra o processo de cicatrização. Escores de 1 a 5 foram atribuídos de acordo com a cicatrização apresentada no decorrer do tratamento feito com AgNPs (grupo experimental) e com Salina 0,9% (grupo controle). Nas primeiras 48 horas pode-se notar que não houve cicatrização aparente e que não apresentou diferença significativa.

Figura 16. Processo de Cicatrização. Nota-se que não houve diferença estatística no processo de cicatrização entre os grupos experimentais (E) e controles (C).



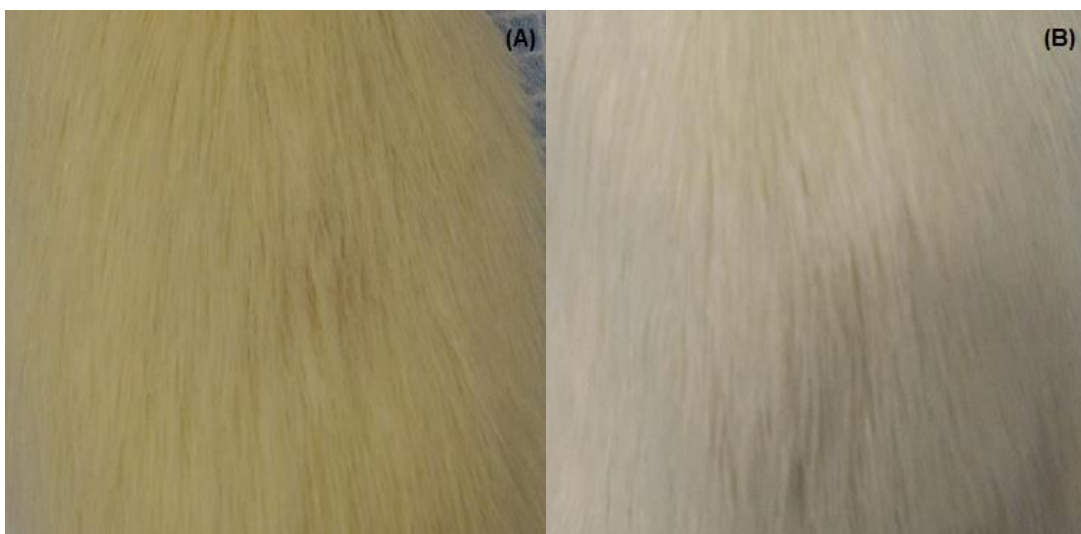
A Figura 17 ilustra a cicatrização da área queimada após 7 dias de tratamento. À esquerda rato do grupo controle (A) (Salina 0,9%) e à direita rato do grupo experimental (B) (AgNPs).

Figura 17. Comparação da Cicatrização no 7° dia. Controle (A); Experimental (B).



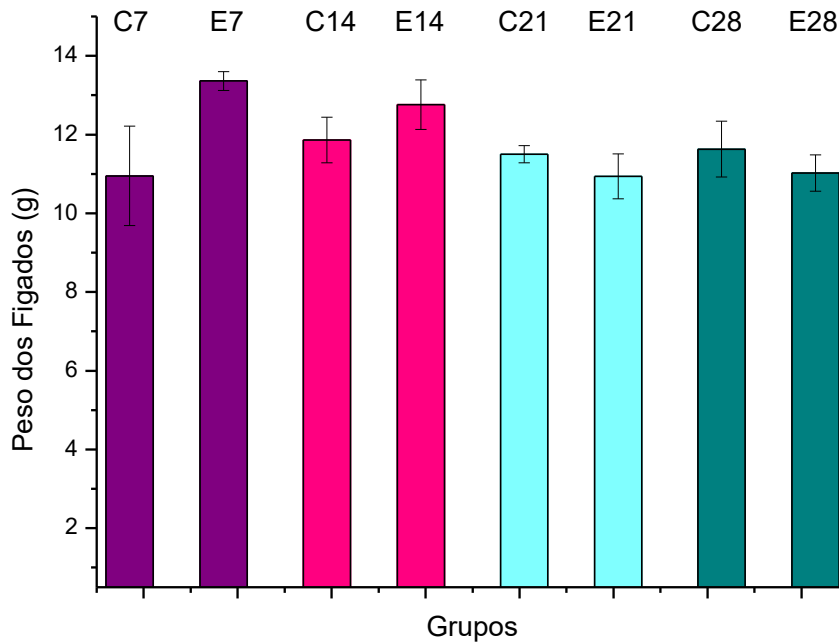
A Figura 18 ilustra a cicatrização no 28° dia de tratamento. Controle (A) e Experimental (B).

Figura 18. Comparação do Processo de Cicatrização no final do tratamento (28° dia).



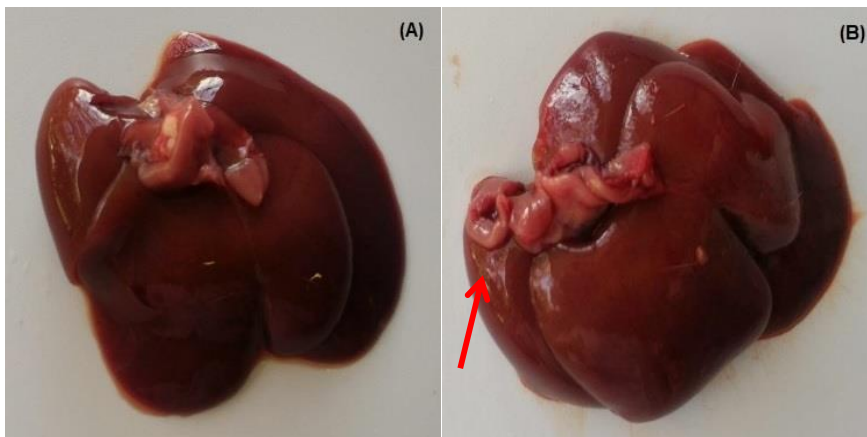
Os fígados também foram coletados e pesados conforme ilustra a Figura 19, que foram também avaliados macroscopicamente através de mudanças de cor e rigidez (Figura 20).

Figura 19. Peso dos Fígados. Não houve diferença estatística entre os grupos controle e experimental ($p>0,05$).



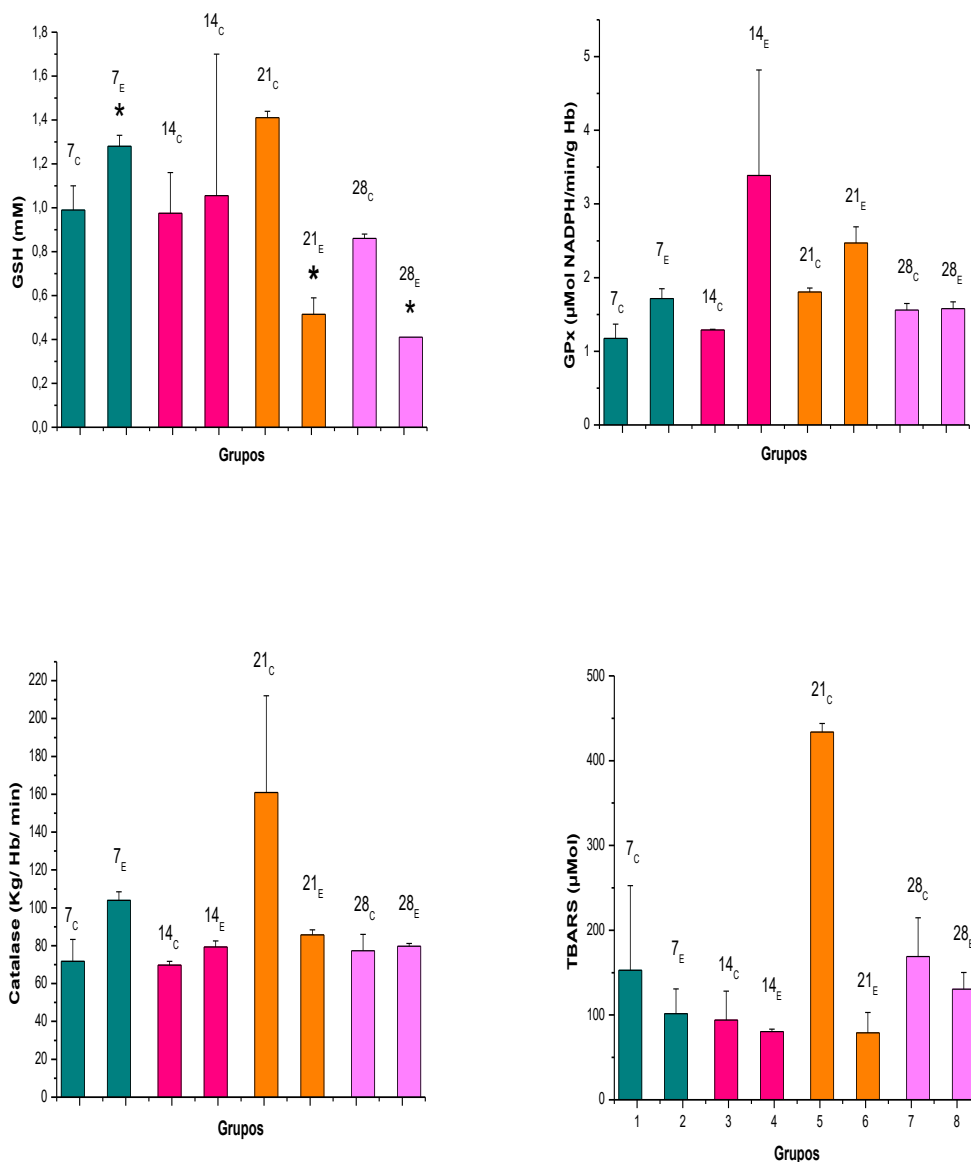
A Figura 20 ilustra a aparência dos fígados de ratos após 7 dias de tratamento. Note a diferença de cor (note pigmentos amarelados, indicados pela flecha) e de aparência (aspecto volumoso do grupo experimental).

Figura 20. Comparação entre os fígados do grupo controle (à esquerda) com o grupo experimental (à direita), no 7º dia após a queimadura.



As dosagens de Estresse Oxidativo (Figura 21) foram feitas a partir de amostras de sangue coletados nos dias de sacrifício. A avaliação da GSH revelou diferença significativa entre os grupos, nos dias 7º e 21º.



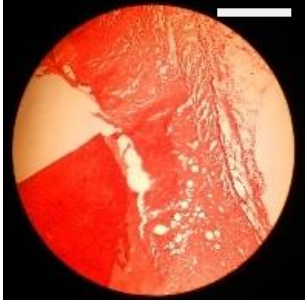
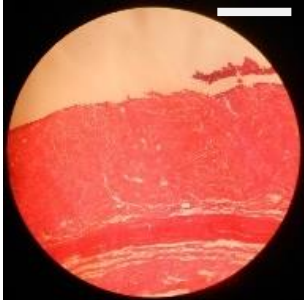
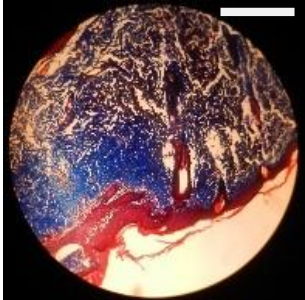

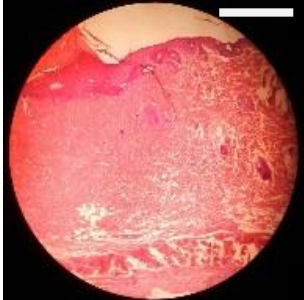
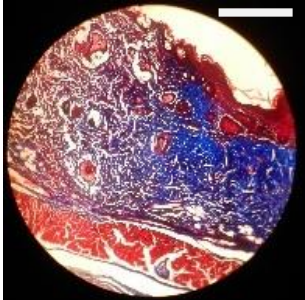
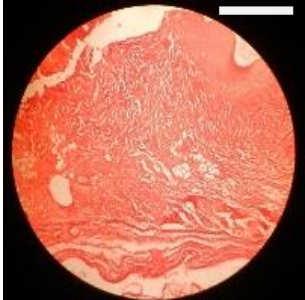
Figura 21. Dosagens bioquímicas do Estresse Oxidativo (GSH; GPx; Catalase; e TBARS). Houve diferenças estatísticas nas dosagens de GSH, no 7º e 21º de sacrifício para GSH (* $p < 0,05$).

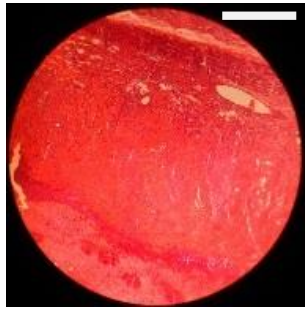


A Tabela 2, ilustra as fotos da histologia com as colorações feitas com os tecidos das peles dos ratos nos sacrifícios, onde foram utilizadas técnicas como Hematoxilina/Eosina, que cora características estruturais, mas também coram todos os componentes celulares, Tricromo de Massom, que cora em azul fibras

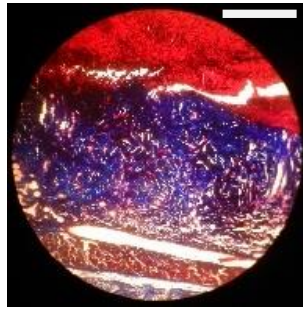
colágenas, o núcleo em preto, o músculo, citoplasma e queratina em vermelho e a Orceína, que cora as fibras elásticas em vermelho-escuro.

Tabela 2. Tecidos extraídos nos 7º, 14º, 21º e 28º dias de ratos submetidos à queimadura de segundo grau e tratados com salina (controle) e AgNPs 50 nm (experimentais), corados com H/E (coram o citoplasma, filamentos citoplasmáticos, fibras extracelulares e estruturas em rosa ou vermelho), Tricromo de Massom (diferencia o colágeno das paredes vasculares em azul, contra o tecido em róseo) e Orceína (cora fibras elásticas em vermelho).

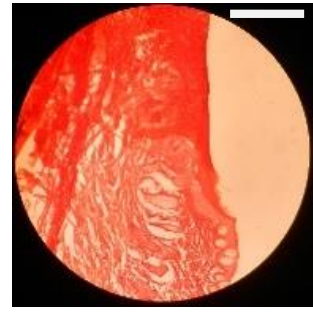
Lâmina	H/E	Tricromo de Massom	Orceína
C1/E1			
	C1: barra = 10 µm	C1: barra = 10 µm	C1: barra = 10 µm
E1			
	E1: barra = 10 µm	E1: barra = 10 µm	E1: barra = 4 µm
C2/E2			
	C2: barra = 10 µm	C2: barra = 10 µm	C2: barra = 10 µm



E2: barra = 10 μm



E2: barra = 10 μm

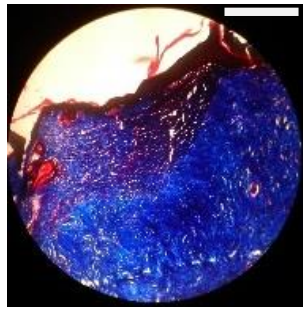


E2: barra = 10 μm

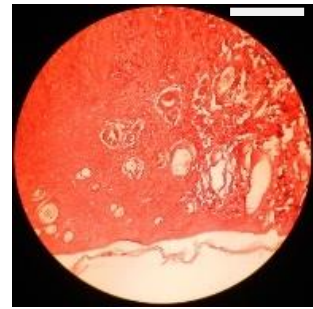
C3/E3



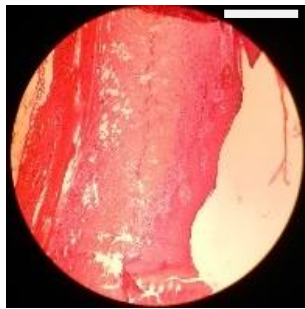
C3: barra = 10 μm



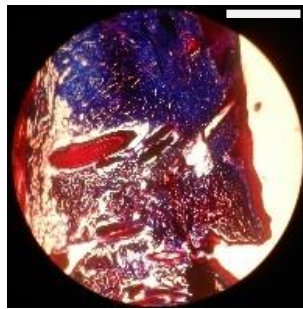
C3: barra = 10 μm



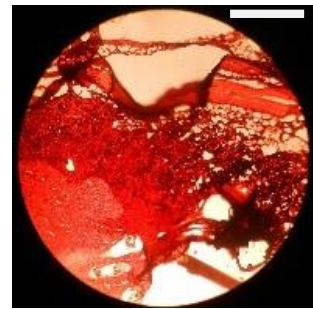
C3: barra = 10 μm



E3: barra = 10 μm

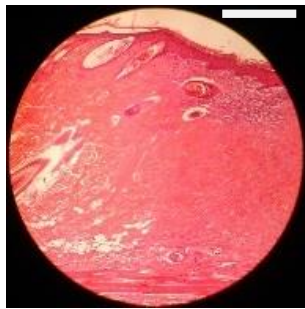


E3: barra = 10 μm

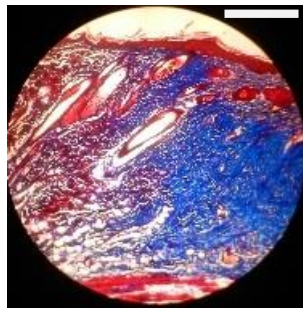


E3: barra = 10 μm

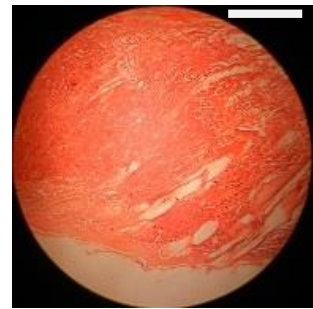
C4/E4



C4: barra = 10 μm



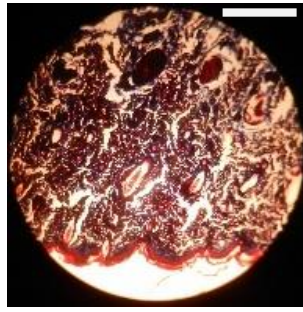
C4: barra = 10 μm



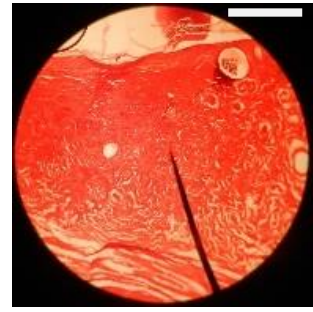
C4: barra = 10 μm



E4: barra = 4 μ m

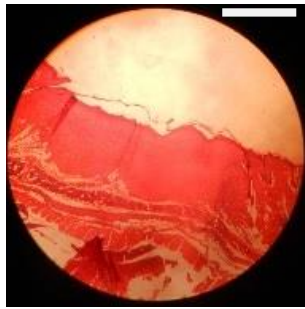


E4: barra = 10 μ m

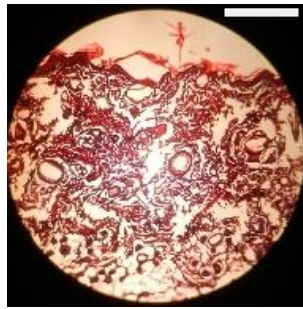


E4: barra = 10 μ m

C5/E5



C5: barra = 4 μ m



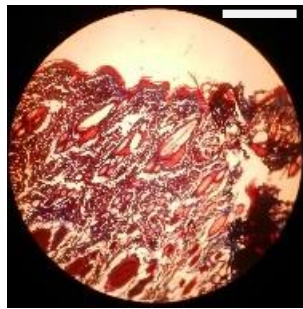
C5: barra = 10 μ m



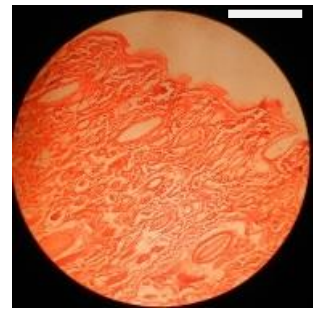
C5: barra = 10 μ m



E5: Aum barra = 10 μ m

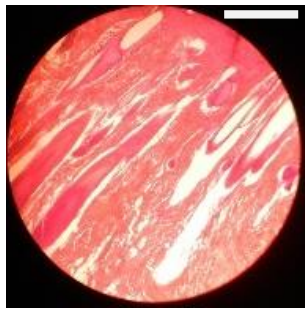


E5: barra = 10 μ m

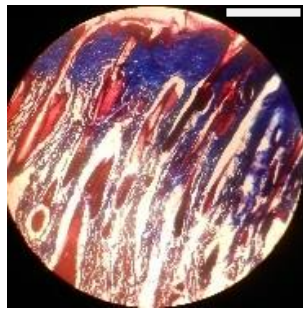


E5: barra = 10 μ m

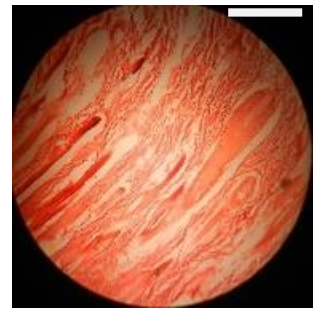
C6/E6



C6: barra = 10 μ m



C6: barra = 10 μ m



C6: barra = 10 μ m



E6: barra = 10 μ m

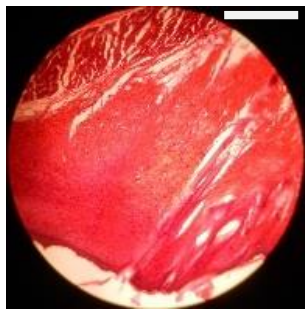


E6: barra = 10 μ m

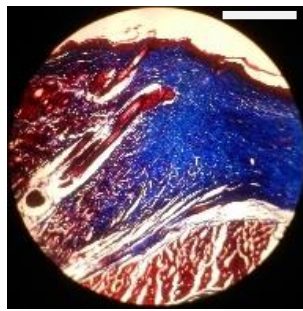


E6: barra = 10 μ m

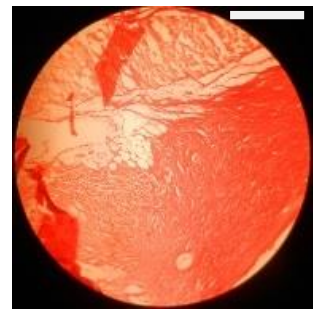
C7/E7



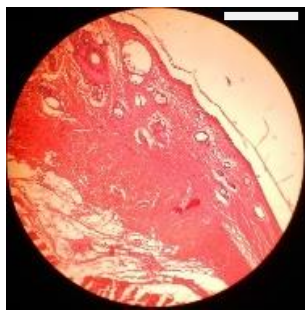
C7: barra = 10 μ m



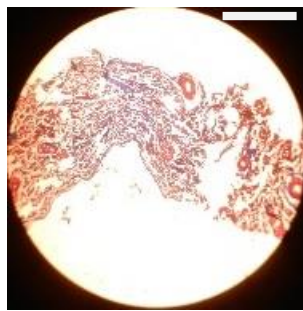
C7: barra = 10 μ m



C7: barra = 10 μ m



E7: barra = 10 μ m

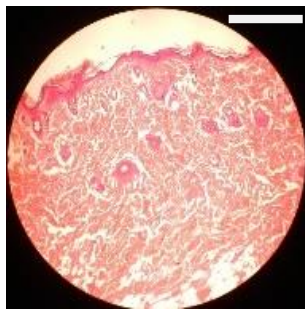


E7: barra = 10 μ m

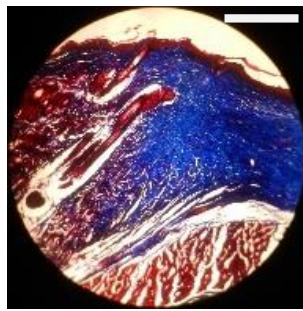


E7: barra = 10 μ m

C8/E8



C8: barra = 10 μ m



C8: barra = 10 μ m



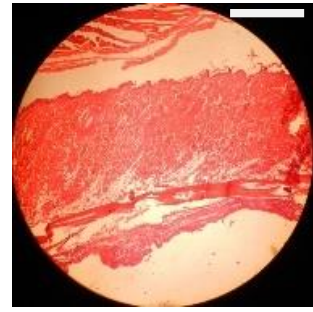
C8: barra = 4 μ m



E8: barra = 10 μm

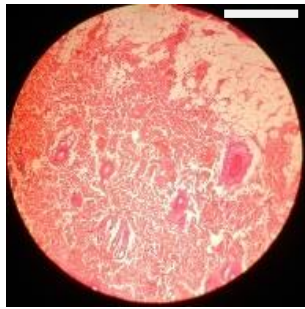


E8: barra = 10 μm

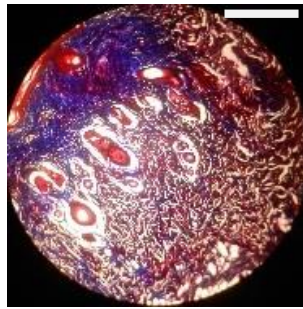


E8: barra = 10 μm

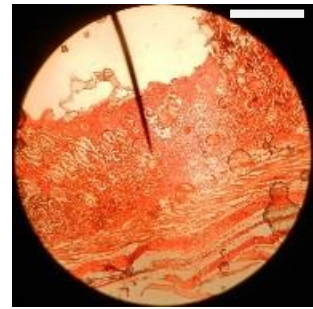
C9/E9



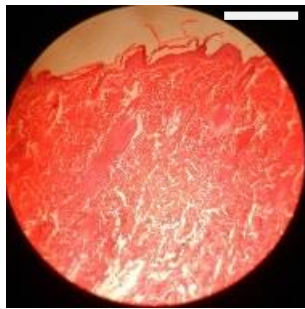
C9: barra = 10 μm



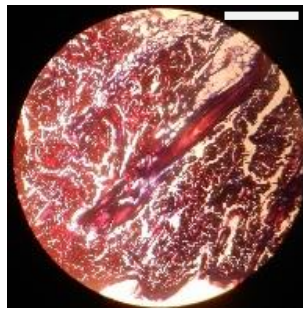
C9: barra = 10 μm



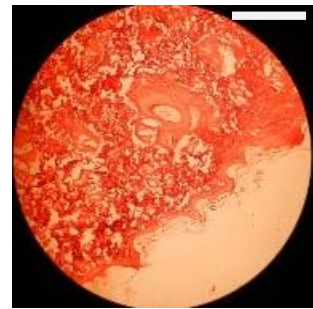
C9: barra = 4 μm



E9: barra = 10 μm



E9: barra = 10 μm



E9: barra = 10 μm

Os resultados foram submetidos a análises estatísticas (testes realizados no Origin 8.0), constatando que não houve diferença significativa da AgNPs na cicatrização de queimaduras, no peso dos fígados. Porém, houve diferença significativa no ganho de massa dos ratos nos grupos experimentais nos dias 7^o e 21^o.

Kim et al. (2008) administrando AgNPs a 60 nm nas concentrações de 30, 300 e 1000 mg/kg e pelo período de 28 dias em ratos, encontraram alterações nos níveis de fosfatase alcalina e colesterol, mostrando que a exposição das AgNPs pode resultar em alguma lesão hepática. Em doses altas (acima de 125 mg/kg a 56 nm), além de diferenças na fosfatase alcalina e no colesterol,

observa-se queda na massa corporal e na dose de 300 mg/kg aumento da massa testicular (KIM et al., 2010).

De acordo com El Mahdy et al. (2015), há uma discussão em relação ao mecanismo das AgNPs que induz hepatotoxicidade por administração oral, onde se descobriu que as nanopartículas são removidas do fígado por macrófagos devido ao processo de fagocitose. A repetição desse processo produz um aumento nos níveis de radicais de oxigênio. Neste projeto foi possível fazer análises de pesos dos animais e macroscópicas dos fígados, constatando que não houve diferença significativa entre os pesos dos fígados dos animais, entretanto foi observada a presença de hemorragias na cavidade abdominal dos animais E7 e diferenças na coloração e consistências dos mesmos, permitindo a suspeita de início de hepatotoxicidade. Além disso, em queimaduras o estresse oxidativo produz uma resposta inflamatória que piora progressivamente o estado metabólico do paciente, liberando os radicais livres que desempenham um papel importante no recrutamento de células inflamatórias (de CAMPOS et al., 2015). Relacionando com as nanopartículas, de acordo com Piao et al. (2011), o estresse oxidativo foi citado como um dos mais importantes mecanismos de toxicidade, podendo ser responsável pelas alterações no nível de GSH, também corroborado pelos nossos resultados principalmente na primeira semana.

Para proteger-se, a célula possui um sistema de defesa que pode atuar em duas linhas. Uma delas atua como detoxificadora do agente antes que ele cause lesão. Esta linha é constituída por glutathione reduzida (GSH), superóxido-desmutase (SOD), catalase, glutathione-peroxidase (GSH-Px) e vitamina E. A outra linha de defesa tem a função de reparar a lesão ocorrida, sendo constituída pelo ácido ascórbico, pela glutathione-redutase (GSH-Rd) e pela GSH-Px, entre outros. Com exceção da vitamina E (a-tocoferol), que é um antioxidante estrutural da membrana, a maior parte dos agentes antioxidantes está no meio intracelular (ROSS; MOLDEUS, 1991; HEBBEL, 1986).

Neste projeto foi constatado que houve uma mudança significativa nos níveis de GSH, do grupo experimental com aumento no 7º dia e queda nos 21º e 28º dias, conforme a exposição ao tratamento. As AgNPs não apresentaram diferença significativa na cicatrização da queimadura, nem no peso dos fígados dos animais, entretanto mostraram diferenças em níveis de GSH, podendo indicar possível hepatotoxicidade.

A alteração no fígado no 7º dia, pode dar-se devido à exposição da queimadura, pois estava mais exposto enquanto a lesão estava com um maior grau, sendo assim as AgNPs pode ter tido um maior contato com o órgão. Já no 28º dia, houve uma diferença, pois já havia tido o processo de cicatrização então houve uma barreira maior para a AgNPs poder penetrar.

5.4 Avaliação da Mutagenicidade pelo Teste de Ames do Veneno de *Bothrops jararacussu* (Bjssu) 50 mg/mL e das AgNPs 50 nm na Concentração de 0,081 mg/mL e da Mistura Bjssu + AgNPs

A realização do teste de Ames é precedida por testes de toxicidade para se conhecer a concentração tóxica da substância-teste às cepas de *Salmonella typhimurium*. Obviamente, a substância-teste não pode matar as cepas por inviabilizar a execução do teste propriamente dito. Assim, toxicidade neste contexto é contabilizada por uma redução notável do crescimento de colônias no fundo da placa e/ou uma redução maior que 50% no número médio de colônias de revertentes comparativamente ao controle do veículo, estatisticamente significativa (* $p < 0,05$) (BOWLES, 2009).

Dentro do teste de toxicidade realizados com as AgNPs 0,081 mg/mL, em duas cepas, TA98 e TA100. Note que, de acordo com a compreensão de toxicidade para este teste, os valores do controle negativo (que contém apenas o veículo DMSO) apresentaram valores médios de 63,67 para a linhagem TA98 e 150 para a linhagem TA100 e que, portanto, houve redução significativa (com $p < 0,05$) acima de 50% foi vista no volume tomado de 25 μ L para a linhagem TA98 e 50 μ L para a linhagem TA100 (Tabela 3).

Os resultados do teste de toxicidade realizados com o veneno de Bjssu (50 mg/mL), em duas cepas, TA98 e TA100. Mostraram os valores do controle negativo (que contém apenas o veículo DMSO) apresentaram valores médios de 63,67 para a linhagem TA98 e 239,33 para a linhagem TA100 e que, portanto, redução significativa (com *, $p < 0,05$) acima de 50% foi vista no volume tomado de 12,5 μ L para a linhagem de TA98 e 50 μ L para a linhagem de TA100 (Tabela 3).

Tabela 3. Teste de toxicidade de AgNPs 0,081 mg/mL e do Veneno de Bjssu com a cepa TA98.

Sem Ativação Metabólica (-S9)	Toxicidade do Veneno Bjssu 50 mg/mL	Toxicidade AgNPs 0,081 mg/mL
Linhagem	TA98 (-S9)	TA98 (-S9)
Controle +	1306,67	1306,67
Controle -	63,67	63,67
Controle Espontâneo	74,33	74,33
100 µL	53,33	0,67
50 µL	43	7,3
25 µL	41,33	18,3*
12,5 µL	32,33*	---
6,2 µL	37,33	---

Tabela 4. Teste de toxicidade de AgNPs 0,081 mg/mL e do Veneno de Bjssu com a cepa TA100.

Sem Ativação Metabólica (-S9)	Toxicidade do Veneno Bjssu 50 mg/mL	Toxicidade AgNPs 0,081 mg/mL
Linhagem	TA100 (-S9)	TA100 (-S9)
Controle +	1819	1681
Controle -	239,33	150
Controle Espontâneo	250,66	154,66
100 µL	0	4,66
50 µL	5,66*	73*
25 µL	131,66	145,33
12,5 µL	92	---
6,2 µL	266	---

*, p<0,05

5.4.1 Teste de Ames das AgNps 50 nm, Veneno de *Bothrops jararacussu* (Bjssu) e Mistura de Bjssu + AgNPs

Resultados do teste de ames realizados com o veneno de Bjssu 50 mg/mL, as AgNPs 0,081 mg/mL e a mistura do veneno de Bjssu 50 mg/mL + AgNPs 0,081 mg/mL, em quatro cepas, TA97a, TA98, TA100 e TA102. Note que, de acordo com a compreensão de toxicidade para este teste, os valores do controle negativo (que contém apenas o veículo DMSO) apresentou valores médios de 63,67 para a linhagem TA98 e 150 para a linhagem TA100 e que, portanto, houve redução significativa (com $p < 0,05$) acima de 50% foi vista no volume tomado de 25 μ L para a linhagem TA98 e 50 μ L para a linhagem TA100.

Tabela 5. Teste de Ames do veneno de Bjssu a 50 mg/mL, das AgNPs 0,081 mg/mL e da mistura do veneno de Bjssu 50 mg/mL + AgNPs 0,081 mg/mL sem ativação metabólica com a cepa TA97a.

Sem Ativação Metabólica (-S9)	Teste de Ames do Veneno Bjssu 50 mg/mL	Teste de Ames da AgNPs 0,081 mg/mL	Teste de Ames da Mistura Bjssu 50 mg/mL + AgNPs 0,081 mg/mL
Linhagem	TA97a	TA97a	TA97a
Controle +	767,6	767,6	767,6
Controle -	114,7	114,7	114,7
Controle Espontâneo	111,8	111,8	111,8
50 μL	0,17	0,10	0,58
25 μL	0,29	1,40	0,96
12,5 μL	0,26	1,63	1,01
6,2 μL	1,57	1,01	1,32

*, $p < 0,05$. Os valores dos ensaios representam o índice de mutagenicidade (I.M.).

Tabela 6. Teste de Ames do veneno de Bjssu a 50 mg/mL, das AgNPs 0,081 mg/mL e da mistura do veneno de Bjssu 50 mg/mL + AgNPs 0,081 mg/mL sem ativação metabólica com a cepa TA98.

Sem Ativação Metabólica (-S9)	Teste de Ames do Veneno Bjssu 50 mg/mL	Teste de Ames da AgNPs 0,081 mg/mL	Teste de Ames da Mistura Bjssu 50 mg/mL + AgNPs 0,081 mg/mL
Linhagem	TA98	TA98	TA98
Controle +	756	756	756
Controle -	20	20	63,67
Controle Espontâneo	25	25	74,33
50 µL	0,16	0,05	1,70
25 µL	0,48	0,60	1,14
12,5 µL	0,44	0,60	1,16
6,2 µL	0,61	0,62	1,29

*, p<0,05. Os valores dos ensaios representam o índice de mutagenicidade (I.M.).

Tabela 7. Teste de Ames do veneno de Bjssu a 50 mg/mL, das AgNPs 0,081 mg/mL e da mistura do veneno de Bjssu 50 mg/mL + AgNPs 0,081 mg/mL sem ativação metabólica com a cepa TA100.

Sem Ativação Metabólica (-S9)	Teste de Ames do Veneno Bjssu 50 mg/mL	Teste de Ames da AgNPs 0,081 mg/mL	Teste de Ames da Mistura Bjssu 50 mg/mL + AgNPs 0,081 mg/mL
Linhagem	TA100	TA100	TA100
Controle +	1206,66	1413	1413
Controle -	116,66	162	162
Controle Espontâneo	137	176	176
50 µL	2,28*	0,60	0,57
25 µL	1,18	0,89	0,84
12,5 µL	1,11	1,10	0,93
6,2 µL	0,70	1,04	0,79

*, p<0,05. Os valores dos ensaios representam o índice de mutagenicidade (I.M.).

Tabela 8. Teste de Ames do veneno de Bjssu a 50 mg/mL, das AgNPs 0,081 mg/mL e da mistura do veneno de Bjssu 50 mg/mL + AgNPs 0,081 mg/mL sem ativação metabólica com a cepa TA102.

Sem Ativação Metabólica (-S9)	Teste de Ames do Veneno Bjssu 50 mg/mL	Teste de Ames da AgNPs 0,081 mg/mL	Teste de Ames da Mistura Bjssu 50 mg/mL + AgNPs 0,081 mg/mL
Linhagem	TA 102	TA102	TA102
Controle +	1203	1203	1200
Controle -	350	350	148
Controle Espontâneo	273	273	117
50 µL	0,17	0,95	1,85
25 µL	0,21	1,62	1,17
12,5 µL	0,31	1,61	0,85
6,2 µL	0,74	1,55	0,82

*, p<0,05; Os valores dos ensaios representam o índice de mutagenicidade (I.M.).

Tabela 9. Teste de Ames do veneno de Bjssu a 50 mg/mL, das AgNPs 0,081 mg/mL e da mistura do veneno de Bjssu 50 mg/mL + AgNPs 0,081 mg/mL com ativação metabólica com a cepa TA97a.

Sem Ativação Metabólica (+S9)	Teste de Ames do Veneno Bjssu 50 mg/mL	Teste de Ames da AgNPs 0,081 mg/mL	Teste de Ames da Mistura Bjssu 50 mg/mL + AgNPs 0,081 mg/mL
Linhagem	TA97a	TA97a	TA97a
Controle +	2189,33	1200	2189,33
Controle -	127	255	127
Controle Espontâneo	115	256	115
50 µL	4,77*	1,08	2,75*
25 µL	3,55*	1,18	2,72*
12,5 µL	2,04*	0,97	2,58*
6,2 µL	1,80	1,11	2,27*

*, p<0,05. Os valores dos ensaios representam o índice de mutagenicidade (I.M.).

Tabela 10. Teste de Ames do veneno de Bjssu a 50 mg/mL, das AgNPs 0,081 mg/mL e da mistura do veneno de Bjssu 50 mg/mL + AgNPs 0,081 mg/mL com ativação metabólica com a cepa TA98.

Sem Ativação Metabólica (+S9)	Teste de Ames do Veneno Bjssu 50 mg/mL	Teste de Ames da AgNPs 0,081 mg/mL	Teste de Ames da Mistura Bjssu 50 mg/mL + AgNPs 0,081 mg/mL
Linhagem	TA98	TA98	TA98
Controle +	1932	1932	1932
Controle -	129,66	129,66	129,66
Controle Espontâneo	136	136	136
50 µL	4,44*	3,59*	2,73*
25 µL	3,83*	3,28*	1,72
12,5 µL	2,35*	1,98	1,44
6,2 µL	1,07*	1,75	0,64

*, p<0,05. Os valores dos ensaios representam o índice de mutagenicidade (I.M.).

Tabela 11. Teste de Ames do veneno de Bjssu a 50 mg/mL, das AgNPs 0,081 mg/mL e da mistura do veneno de Bjssu 50 mg/mL + AgNPs 0,081 mg/mL com ativação metabólica com a cepa TA100.

Sem Ativação Metabólica (+S9)	Teste de Ames do Veneno Bjssu 50 mg/mL	Teste de Ames da AgNPs 0,081 mg/mL	Teste de Ames da Mistura Bjssu 50 mg/mL + AgNPs 0,081 mg/mL
Linhagem	TA100	TA100	TA100
Controle +	1290,66	1290,66	1280
Controle -	107,66	107,66	372
Controle Espontâneo	130	130	203
50 µL	3,25*	2,66*	0,54
25 µL	2,72*	2,04*	1,05
12,5 µL	2,21*	1,55	1,14
6,2 µL	1,91	1,17	0,79

*, p<0,05. Os valores dos ensaios representam o índice de mutagenicidade (I.M.).

Tabela 12. Teste de Ames do veneno de Bjssu a 50 mg/mL, das AgNPs 0,081 mg/mL e da mistura do veneno de Bjssu 50 mg/mL + AgNPs 0,081 mg/mL com ativação metabólica com a cepa TA102.

Sem Ativação Metabólica (+S9)	Teste de Ames do Veneno Bjssu 50 mg/mL	Teste de Ames da AgNPs 0,081 mg/mL	Teste de Ames da Mistura Bjssu 50 mg/mL + AgNPs 0,081 mg/mL
Linhagem	TA 102	TA102	TA102
Controle +	1929,33	1616	1616
Controle -	366	388	388
Controle Espontâneo	268	414	414
50 µL	2,00*	0,76	1,58
25 µL	1,37	0,95	1,27
12,5 µL	1,08	0,99	1,49
6,2 µL	0,51	0,65	0,63

*, p<0,05; Os valores dos ensaios representam o índice de mutagenicidade (I.M.).

A tabela 13 resume os principais achados obtidos sobre o estudo de mutagenicidade (com e sem ativação metabólica) das AgNPs isoladamente, do veneno de Bjssu isoladamente e da mistura AgNPs + veneno de Bjssu.

Tabela 13. Resultados do teste de Ames expressos em negativo (não mutagênico) e positivo (mutagênico).

	AgNPs 0,081 mg/mL (em µL)				Veneno Bjssu 50 mg/mL (em µL)				Mistura AgNPs + Bjssu (em µL)			
	50	25	12,5	6,2	50	25	12,5	6,2	50	25	12,5	6,2
-S9												
TA97a	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TA98	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TA100	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
TA102	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
+S9												
TA97a	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+
TA98	+	+	-	-	+	+	+	-	+	-	-	-
TA100	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-
TA102	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-

Inicialmente o projeto foi descrito para o teste de toxicidade ser realizado com as linhagens TA98 e TA102. Devido às pesquisas bibliográficas demonstrarem a eficiência da linhagem TA100 para realização do ensaio e o tipo de mutação desta cepa ser igual a TA102 (MORTELMANS; ZIEGER, 2000), substituiu-se esta linhagem pela TA100 a fim de obter um melhor resultado com um menor custo, visto que a mitomicina C utilizada no controle positivo na linhagem TA102 tem um custo mais elevado do que a azida sódica utilizada no controle positivo da linhagem TA100.

Yoshida et al. (2016) demonstraram a segurança da betulina através da ausência de mutagenicidade deste composto por meio do teste de Ames. Nesse trabalho, observaram-se as médias e os desvios padrões de seus controles positivos (1044 ± 56) e negativos (19 ± 2) da linhagem TA98. Comparando-os com os resultados obtidos do presente estudo, após a correção das alçadas desta linhagem, nota-se que os controles negativos estão próximos, porém há uma grande diferença entre os controles positivos. Comparando, também, com os valores de revertentes considerados aceitáveis do controle espontâneo (MORTELMANS; ZEIGER, 2000), que está entre 20 e 50 revertentes por placa, observa-se que a média do controle espontâneo está dentro deste limiar, porém, no limiar mínimo. Portanto, além de se concluir que o agente mutagênico NPD utilizado no controle positivo deste estudo não está surtindo o efeito esperado, a viabilidade da linhagem também não está adequada.

As linhagens TA100 e TA98 são as mais utilizadas para os testes de toxicidade. Como o controle positivo da linhagem TA98 resultou em valor abaixo do referido por Yoshida et al. (2016), foi acertada a realização do teste de toxicidade utilizando-se duas linhagens, uma vez que com os resultados obtidos da cepa TA100 garante-se a realização da etapa seguinte, o teste de Ames ou de mutagenicidade (MORTELMANS; ZEIGER, 2000).

Segundo Mortelmans e Zeiger (2000), a toxicidade será evidenciada pela ausência completa de crescimento, redução no número de revertentes *His*⁺ ou com um crescimento de fundo (*background*) nas placas teste de ágar mínimo em comparação com as placas de controle negativo e controle espontâneo. A ausência de crescimento de colônias e de crescimento de fundo indica um elevado grau de toxicidade que impede o crescimento da bactéria e a formação

do crescimento de fundo (VARGAS; MOTTA; HENRIQUES, 1993). Posto isto, pode-se concluir que a ausência de crescimento com as AgNPs (50 nm) na concentração 0,081 mg/mL e do veneno de Bjssu na concentração 50 mg/mL e da mistura Bjssu (50 mg/mL) demonstra um elevado grau de toxicidade.

As AgNPs são compostos que podem ser muito bem absorvidos pela pele, mucosas e membranas celulares, por serem muito pequenas, podendo ter sua toxicidade muito aumentada em função do seu tamanho (PASCHOALINO et al., 2010). Podem ser encontrados como contaminantes ambientais no solo, na água e no ar (MUELLER; NOWACK, 2008).

A prata possui diversos tecidos alvo, podendo causar efeitos tóxicos sobre os pulmões, fígado, órgãos reprodutivos, tecidos nervosos e células sanguíneas (AHAMED; ALSALHI; SIDDIQUI, 2010) e diversos efeitos nocivos desses materiais sobre os mais variados sistemas biológicos e componentes celulares, de tal modo a sujeitar seres vivos a intoxicações devido à grande utilização das AgNPs (FARD; JAFARI; EGHBAL, 2015).

Tamanhos diferentes, agregações, taxa de dissolução e revestimentos diversos, podem produzir diferentes taxas de absorção, distribuição, metabolização e excreção, além de citotoxicidade em tipos celulares distintos, sendo necessárias avaliações diferentes em tecidos diferentes (FURTADO; BUNDSCHUH; METCALFE, 2016; GLIGA et al., 2014; LIU et al., 2010). Como são encontrados em vários produtos que possuem íntimo contato com o sistema reprodutivo de seres humanos, como produtos contraceptivos e de higiene íntima, as AgNPs podem causar toxicidade para as células germinativas através de redução da função mitocondrial e indução de apoptose (AHAMED; ALSALHI; SIDDIQUI, 2010).

Neste estudo, as AgNPs na ausência de ativação metabólica não apresentaram mutagenicidade a nenhuma cepa. Entretanto, quando ativadas metabolicamente elas mostraram-se mutagênicas às cepas TA98 e TA100, nas concentrações de 50 e 25 µL AgNPs, respectivamente. Pode-se sugerir que os resultados negativos podem ser devidos à incapacidade das NPs para penetrar na parede celular bacteriana (LANDSIEDEL et al., 2009; NABESHI et al., 2011). Geralmente, partículas insolúveis elas entram nas células via fagocitose e a parede celular bacteriana, pode não ser capaz de realizar essa função para que

as NPs possam entrar nas células bacterianas para danificar o DNA e induzir mutações. A respeito das NPs que foram positivas no teste de Ames, elas foram solúveis e conseguiram penetrar a parede celular (MAENOSONO; YOSHIDA; SAITA, 2009; SERA; TOKIWA; MIYATA, 1996).

Já o veneno de *B. jararacussu*, na ausência do sistema de metabolização mostrou-se mutagênico à cepa TA100 em sua maior concentração. As linhagens TA100 tem uma mutação *hisG46*, que codifica o gene para a primeira enzima de sua biossíntese (AMES, 1971). Resulta da substituição de uma leucina (GAG/CCC) por uma prolina (GGG/CCC) sendo marcador para mutagênicos que causam substituição de pares de bases (MARON; AMES, 1983). Ambas as cepas possuem mutação para biotina, de reparo e plasmídeo pKM101.

Por outro lado, quando foi acrescentado o sistema de metabolização o veneno de *B. jararacussu* mostrou-se mutagênico a todas as cepas TA97a, TA98, TA100 e TA102, em suas máximas concentrações. Esses resultados se complementam aos de Marcussi et al. (2011) que imputaram genotoxicidade, através do método do micronúcleo aplicado em linfócitos humanos, aos venenos de *Crotalus durissus terrificus* e alguns venenos botrópicos, incluindo *Bothrops jararacussu*. A presença de micronúcleos indica quebra e/ou indução aneuploide em DNA produzido pelo veneno e toxinas testadas pelos autores.

Sobre as demais linhagens, tem-se que a linhagem TA97a detectam substâncias, que causam erro no quadro de leitura (+1C), sendo uma citosina adicional na sequência de seis citosinas no sítio de mutação. A especificidade da TA97a é semelhante à da 1537. Como possui um segundo sítio para mutação em pares de bases –GC- é sensível a compostos que revertem TA1538 e TA98 (LEVIN; YAMASAKI; AMES, 1982).

As linhagens TA98 tem uma mutação *hisD3052* que ocorre na codificação do gene para histidinol desidrogenase. É uma mutação que afeta a leitura correta (-1C) de uma sequência próxima, constituída de oito resíduos GC-CGCGCGCG-repetitivos (*hot spot*). Essa música é revertida por agentes mutagênicos como 2-nitrofluoreno e derivado nitro aromáticos (MARON; AMES, 1983).

As linhagens TA102, contém AT no sítio de mutação *hisG428*. Na TA102 este sítio inserido no plasmídeo multicópia pAQ1. O plasmídeo confere resistência à tetraciclina, sendo esta utilizada como marcador de sua presença. A *hisG428* é uma mutação *ochre*, TAA, que pode ser revertida por todas as seis possíveis modificações de pares de bases levando a transições e transversões. Esta mutação confere sensibilidade a agentes oxidativos. A TA102, por ser proficiente em mecanismos de reparo, ainda detecta agentes que causam permutas como bleomicina e mitomicina C (LEVIN; YAMASAKI; AMES, 1982).

O significado de o veneno de *Bothrops jararacussu* ter se mostrado mutagênico após ativação metabólica deve ser mais investigado e os mecanismos melhor compreendidos, em que pese o fato de que as linhagens *Salmonella*/microssoma apresentam certas vulnerabilidades genéticas para simular condições em que organismo sofre as mutações somáticas de DNA.

Por outro lado, quando em mistura, ambos os compostos e na ausência de ativação metabólica, não foram mutagênicos a nenhuma cepa. A interação AgNPs com o veneno atenuou a mutagenicidade do veneno causado à cepa de TA100, já discutida anteriormente. Entretanto, a mistura na presença do sistema de metabolização, foi mutagênica às cepas TA97a (em todas as suas concentrações) e TA98 (em sua maior concentração), mas não foi mutagênica às cepas TA100 e TA102. Este resultado levanta a hipótese de que as AgNPs atenuaram o efeito mutagênico do veneno de *B. jararacussu* às cepas TA100 e TA102, principalmente.

O mecanismo de ação das AgNPs não é completamente esclarecido. No entanto, sua atuação resulta em inibição do crescimento e da capacidade de reversão de colônias, ao impedir os processos que ocorrem na superfície e no interior da célula dos microrganismos. A diminuta dimensão da nanop prata é essencial para sua melhor penetração à membrana celular, podendo assim, prejudicar o funcionamento celular, retardando a velocidade de suas atividades vitais, podendo então, ocasionar danos celulares (MORONES et al., 2005; SHARMA; YNGARD; LIN, 2008).

Vários estudos relatam que a carga positiva do íon Ag^+ (cedido pelas AgNPs após atravessarem a parede celular dos micro-organismos) é primordial para a sua atividade antimicrobiana, por meio da atração eletrostática entre a membrana celular dos microrganismos (negativamente carregadas) e as nanopartículas (positivamente carregadas). Conseqüentemente, as AgNPs afetam a permeabilidade seletiva da membrana (é aumentada), bem como a respiração, resultando na morte celular (MORONES et al., 2005; SHARMA; YNGARD; LIN, 2008).

Em um segundo momento, as nanopartículas de prata são capazes de invadir as células, interagindo com ligações dissulfeto dos conteúdos de glicoproteína / proteína de microrganismos tais como vírus, bactérias e fungos, ou seja, é nociva às proteínas, e conseqüentemente afeta negativamente o DNA (dificulta sua replicação) e o RNA (impossibilita sua transcrição) (LARA et al., 2011).

Tais fatos ocorrem porque a prata tem alta afinidade com os elementos enxofre e fósforo. A membrana celular, assim como muitas proteínas, é rica em enxofre. Já o DNA, é rico em fósforo. Estas modificações nas estruturas prejudicam os processos bacterianos, podendo ocasionar sua morte celular (MORONES et al., 2005; SHARMA; YNGARD; LIN, 2008).

6 CONCLUSÃO

Com os resultados observados pudemos responder as questões iniciais que nortearam nosso estudo, sobre as nanopartículas de prata (AgNPs).

1. Como atuariam as AgNPs frente aos efeitos tóxicos (neurotoxicidade e miotoxicidade) do veneno da serpente *Bothrops jararacussu* (Bjssu)?

São eficazes em atenuar o bloqueio neuromuscular (neurotoxicidade *in vitro*), mas não a miotoxicidade, induzidos pelo veneno de *B. jararacussu*;

2. Como atuariam as AgNPs frente à lesão dérmica provocada por queimadura de segundo grau?

Não apresentam vantagens no processo de cicatrização de lesão de queimadura de segundo grau em comparação ao controle salina (e na primeira semana apresentou efeitos deletérios no biomarcador GSH e alterações macroscópicas no fígado);

3. Qual o potencial tóxico das AgNPs, do veneno de *B. jararacussu* e da mistura (AgNPs + Bjssu), pelo parâmetro da mutagenicidade (Teste de Ames)?

As AgNPs não são mutagênicas quando testadas sem ativação metabólica; mas tornam-se mutagênicas (TA98 e TA100) quando expostas a enzimas metabolizadoras (+S9). O veneno de *B. jararacussu* apresentou mutagenicidade apenas à cepa TA100, na ausência de ativação metabólica. Quando o veneno foi testado na presença de enzimas metabolizadoras todas as cepas tornaram-se mutagênicas. A mistura veneno de *B. jararacussu* + AgNPs não é mutagênica a nenhuma das cepas, na ausência de ativação metabólica; mas torna-se mutagênica na presença do sistema metabolizador às cepas TA97a e TA98. Esses resultados em conjunto mostram que as AgNPs atenuam

in vitro o efeito mutagênico do veneno de *B. jararacussu* sobre a cepa TA100 (-S9) e sobre as cepas TA100 e TA102 (+S9).

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS E SUGESTÕES PARA TRABALHO FUTURO

Nesta pesquisa estudou-se a toxicidade de AgNPs e suas aplicações em lesões nervo músculo e em queimaduras. O uso de AgNPs sobre lesões de queimadura de segundo grau (*in vivo*) foi de extrema importância para se conhecer seus efeitos deletérios sobre o fígado.

In vitro, revelou uma importante influência sobre os efeitos tóxicos do veneno de *B. jararacussu* em sua capacidade de lesionar o DNA. O veneno altamente proteolítico destrói proteínas do citoplasma de uma célula eucariótica e afeta em maior grau, o de células procarióticas, como as linhagens de cepas TA97a, TA98, TA100 e TA102, aumentando a susceptibilidade dessas cepas à reversão retrógrada. Ainda, *in vitro*, as AgNPs aboliram o efeito bloqueador do veneno de *B. jararacussu* na junção neuromuscular.

Tais resultados levantam várias questões interessantes a serem investigadas. Seriam apenas venenos ofídicos proteolíticos capazes de promover reversão retrógrada quando submetidos ao teste de Ames? E os venenos neurotóxicos? Qual a relação entre acidente ofídico e ocorrência posterior de câncer na população? Quais os constituintes do veneno que levam à mutagenicidade? Como o sistema microssomal hepático atua sobre as AgNPs e sobre o veneno para torná-los mutagênicos? Há relação entre animais que são imunizados para obtenção de soro antiofídico e câncer?

REFERÊNCIAS

- ADHYA, A. et al. Healing of burn wounds by topical treatment: A randomized controlled comparison between silver sulfadiazine and nano-crystalline silver. **Journal Basic and Clinical Pharmacy**, v. 6, n. 1, p. 29–34, 2014.
- AHAMED, M.; ALSALHI, M. S.; SIDDIQUI, M. K. J. Silver nanoparticle applications and human health. **Clinica Chimica Acta**, v. 411, n. 23, p. 1841-1848, 2010.
- AMES, B. N. The detection of chemical mutagens with enteric bacteria, in: A Hollaender (Ed.), *Chemical Mutagens, Principles and Methods for Their Detection*. **Plenum**. v. 1, p. 267-282, 1971.
- ARUOMA, O. I. et al. Damage to the bases in DNA induced by hydrogen peroxide and ferric ion chelates. **Journal of Biological Chemistry**. v. 264, n. 20, p. 509-512, 1989.
- ASHARANI, P. V. et al. Cytotoxicity and genotoxicity of silver nanoparticles in human cells. **ACS Nano**, v. 3, n. 2, p. 279–290, 2009.
- ATIYEH, B. S. et al. Effect of silver on burn wound infection control and healing: review of the literature. **Burns**, v. 33, n. 2, p. 139-148, 2007.
- BALLOTIN, D. Caracterização de Nanopartículas de Prata e sua Aplicação na Produção de Tecidos Antimicrobianos. UNICAMP, Campinas, Tese (Doutorado em Ciências no Instituto de Química), p. 3, 2014.
- BANG, R. L. et al. Burn septicaemia: an analysis of 79 patients. **Burns**, v. 24, n. 4, p. 354-361, 1998.
- BARBOSA, E. et al. Suplementação de antioxidantes: enfoque em queimados. **Revista de Nutrição**. v. 20, n. 6, p. 693-702, 2007.
- BIANCHI, M. L. P.; ANTUNES, L. M. G. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. **Revista de Nutrição**. v. 12, n. 12, p. 123-130, 1999.
- BJARNASON, J. B.; FOX, J. W. Hemorrhagic metalloproteinases from snake venoms. **Pharmacology & Therapeutics** v. 62, p. 325-372, 1994.
- BOWLES, A. Reverse Mutation Assay “Ames Test” Using *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli*. **PacificBeam Shell/PB – SHELL3**. Project Number: 25330017, 2009.
- BRAZIL, V. Contribuição ao estudo do veneno ofídico: tratamento de mordeduras das cobras. **Revista de Medicina de São Paulo**. v. 13, p. 265-278, 1903.
- BRAZIL, V. *La Défense contre L'Ophidisme*. 2nd ed. Pocaí & Weiss, São Paulo, 1911.

- BRAZIL, V.; PESTANA, R. Nova contribuição ao estudo do envenenamento ophidico. **Revista de Medicina de São Paulo**, v. 19, n. 2, p. 21-22, 1909.
- BUSTILLO, S. et al. Sinergism between baltergin metalloproteinase and Ba SPII RP4 PLA2 from *Bothrops alternatus* venom on skeletal muscle (C2C12) cells. **Toxicon**. v. 59, n. 2, p. 338-343, 2002.
- BUZEA, C.; PACHECO, I. I.; ROBBIE, K. Nanomaterials and nanoparticles: sources and toxicity. **Biointerphases**, v. 2, n. 4, p. 17-71, 2007.
- BÜLBRING, E. Observations on the isolated phrenic nerve diaphragm preparation of the rat (Reprinted from Br J Pharmacol, vol 1, pg 38-61, 1946): **British Journal of Pharmacology**, v. 120, n. 1, p. 3-26, 1997.
- CALMETTE, A. Contribution a l'étude du venin des serpents. Immunisation des animaux et traitement de l'envenimation. **Annales de l'Institut Pasteur**. v. 8, p. 275-291, 1894.
- CARDOSO, A. G. T. Ação do veneno de *Bothrops moojeni* e sua fração L-aminoácido oxidase, submetida ao tratamento com raios gama de 60CO, em *Leishmania spp.* **IPEN - CNEN/SP**, São Paulo, Tese (Mestrado em Ciências na Área de Tecnologia Nuclear – Aplicações), p. 68, 1999.
- CARDOSO, J. L. C. *Animais peçonhentos no Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos acidentes*. Editora Sarvier, São Paulo, Brazil, n. 1, 2003.
- CARLSON, C. Unique cellular interaction of silver nanoparticles: size-dependent generation of reactive oxygen species. **The Journal Physical Chemistry B**, v. 112, n. 43, p. 13608–13619, 2008.
- CHALBOT, S. et al. Blood-cerebrospinal fluid barrier permeability in Alzheimer's disease, **Journal of Alzheimer's Disease**, v. 25, n. 3, p. 505–515, 2011.
- CHAPMAN, E. R. How does synaptotagmin trigger neurotransmitter release? **Annual Review of Biochemistry**, v. 77, p. 615–41, 2008.
- CHEN, X.; SCHLUESENER, H. J. Nanosilver: a nanoparticle in medical application. **Toxicology Letters**, n. 176, n. 1, p. 1-12, 2008.
- CHIPPAUX, J. P. Snake-bites: Appraisal of the global situation. **Bulletin World Health Organization**, v. 76, n. 5, p. 515-524, 1998.
- CHOI, O. et al. Interactions of nanosilver with *Escherichia coli* cells in planktonic and biofilm cultures, **Water Research**, London, v. 44, n. 20, p. 6095-6103, 2010.
- DA SILVA, S. L. et al. Isolation and characterization of a natriuretic peptide from *Crotalus oreganus abyssus* (grand canyon rattlesnake) and its effects on systemic blood pressure and nitrite levels, **International Journal of Peptide Research and Therapeutics**, v. 17, n. 3, p. 165–173, 2011.

DA SILVA, S. L. et al. Vascular effects and electrolyte homeostasis of the natriuretic peptide isolated from *Crotalus oreganus abyssus* (North American Grand Canyon rattlesnake) venom, **Peptides**, v. 36, n. 2, p. 206–212, 2012.

DAMICO, D. C. S. et al. Pharmacological study of edema and myonecrosis in mice induced by venom of the bushmaster snake (*Lachesis muta muta*) and its basic Asp49 phospholipase A₂ (LmTX-I), **Protein Journal**, v. 27, n. 6, p.384–391, 2008.

DANIEL, M. C.; ASTRUC, D. Gold nanoparticles: assembly, supramolecular chemistry, quantum-size-related properties, and applications toward biology, catalysis, and nanotechnology. **Chemical Reviews** v. 104, n. 1, p. 293-346, 2004.

DE CAMPOS, E. P. et al. Healing activity of *Casearia sylvestris* Sw. in second-degree scald burns in rodents. **BMC Research Notes**, v. 8, p. 269-276, 2015.

DENEKE, S. M.; FANBURG, B. L. Regulation of cellular glutathione. **American Journal of Physiology**. v. 257, n. 4, p. 163-173, 1989.

DIAS DA SILVA, W. et al. Cross-reactivity of horse monovalente antivenoms to venoms of tem Bothrops species. **Instituto Butantan**, v. 51, n. 4, p.153-168, 1989.

DOS-SANTOS, M. C. et al. A eficácia do antiveneno botrópico-crotálico na neutralização das principais atividades do veneno de Bothrops jararacussu. **Revista do Instituto de Medicina Tropical São Paulo**. v. 34, n. 2, p. 77-83, 1992.

DURÁN, N. et al. Potential use of silver nanoparticles on pathogenic bacteria, their toxicity and possible mechanisms of action. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 21, n. 6, p. 949–959, 2010.

EL MAHDY, M. M. et al. Evaluation of hepatotoxic and genotoxic potential of silver nanoparticles in albino rats. **Experimental and Toxicologic Pathology - Journal**, v. 67, n. 1, p. 21-29, 2015.

ELECHIGUERRA, J. L. et al. Interaction of silver nanoparticles with HIV-1. **Journal of Nanobiotechnology**, London, v. 3, p. 6, 10 pages, 2005.

ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. State of the science literature review: everything nanosilver and more. Scientific, Technical, Research, Engineering and Modeling Support Final Report, 2010.

FABREGA, J. et al. Silver nanoparticles: behaviour and effects in the aquatic environment. **Environment Internacional**, v. 37, n. 2, p. 517-531, 2011.

FARD, J. K.; JAFARI, S.; EGHBAL, M. A. A review of molecular mechanisms involved in toxicity of nanoparticles. **Advanced Pharmaceutical Bulletin**, v. 5,

n. 4, p. 447, 2015.

FAROOQUI, A. A. et al. Inhibitors of intracellular phospholipase A2 activity: their neurochemical effects and therapeutical importance for neurological disorders, **Brain Research Bulletin**, v. 49, n. 3, p. 139–153, 1999.

FERNANDES, R. S. et al. Neutralization of pharmacological and toxic activities of *Bothrops jararacussu* snake venom and isolated myotoxins by *Serjania erecta* methanolic extract and its fractions. **Journal of Venomous Animals Toxins Including Tropical Diseases**, v. 17, n. 1, p. 85-93, 2011.

FERRAZ, M. C. et al. An isoflavone from *Dipteryx alata* Vogel is active against the *in vitro* neuromuscular paralysis of *Bothrops jararacussu* snake venom and bothropstoxin I, and prevents venom-induced myonecrosis. **Molecules**, v. 19, n. 5, p. 5790-5805, 2014.

FURNO, F. et al. Silver nanoparticles and polymeric medical devices: a new approach to prevention of infection? **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, Oxford, v. 54, n. 6, p. 1019-1024, 2004.

FURTADO, L. M.; BUNDSCHUH, M.; METCALFE, C. D. Monitoring the fate and transformation of silver nanoparticles in natural waters. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 97, n. 4, p. 449-455, 2016.

GALLEANO, M.; PUNTARULO, S. Role of antioxidants on the erythrocytes resistance to lipid peroxidation after acute iron overload in rats. **Biochimica et Biophysica Acta**. v. 1271, n. 2-3, p. 321-326, 1995.

GLIGA, A. R. et al. Size-dependent cytotoxicity of silver nanoparticles in human lung cells: the role of cellular uptake, agglomeration and Ag release. **Particle and Fibre Toxicology**, v. 11, n. 1, p. 1, 2014.

GODIN, B. et al. Emerging applications of nanomedicine for the diagnosis and treatment of cardiovascular diseases. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 31, n. 5, p. 199–205, 2010.

GONÇALVES, J. M. Purification and properties of crotamine. In: BUCHERL, W, BUCKLEY, EE, DEULOFEU, V. (Eds.). **Venomous Animals and their Venoms**, Academic Press, New York, v. 1, p. 261-274, 1956.

GOUMA, E. et al. A simple procedure for estimation of total body surface area and determination of a new value of Meeh's constant in rats. **Laboratory Animals**, v. 46, n. 1, p. 40-45, 2012.

GREEN, K.; BRAND, M. D.; MURPHY, M. P. Prevention of mitochondrial oxidative damage as a therapeutic strategy in diabetes. **Diabetes**. v. 53, n. 1, p. 110-118, 2004.

GUARNIERI, M. C. Estudo dos efeitos da radiação gama de ⁶⁰Co nas propriedades bioquímicas, biológicas e imunológicas do veneno de *Bothrops*

- jararaca. Tese (Doutorado em Ciências na Área de Tecnologia Nuclear – Aplicações) – **IPEN-CNEN/SP**, São Paulo, p. 59, 1992.
- GUDAVICIENE, D.; RIMDEIKA, R. Analysis of burn-related deaths in Kaunas University of Medicine Hospital during 1993-2001. **Medicina (Kaunas)**, v. 40, n. 4, p. 374-378, 2004.
- GUIRRO, E.; GUIRRO, R. Queimaduras. In: Fisioterapia dermatofuncional: fundamentos, recurso e patologias. São Paulo: Manole; p. 491-497, 2004.
- GUTIÉRREZ, J. M.; CERDAS, L. Mechanism of action of myotoxins isolated from snake venoms. **Revista de Biología Tropical**. v. 32, n. 2, p. 213-222, 1984.
- GUTIÉRREZ, J. M. Clinical Toxicology of snakebites in Central American. In: Mier, J., White, J. (Eds). Handbook of clinical Toxicology of Animal Venoms and Poisons. **CRC Press**, Boca Raton, FL, p. 645-665, 1995.
- GUTIÉRREZ, J.; LOMONTE, B. Phospholipase A₂ myotoxins from *Bothrops* snake venoms. **Toxicon**, v. 33, n. 11, p. 1405-1424, 1995.
- GUTIÉRREZ, J. M. et al. Neutralization of local tissue damage induced by *Bothrops asper* (terciopelo) snake venom. **Toxicon**. v. 36, n. 11, p. 1529-1538, 1998.
- GUTIÉRREZ, J.M.; LEÓN, G.; LOMONTE, B. Pharmacokinetic-pharmacodynamic relationships of immunoglobulin therapy for envenomation. **Clinical Pharmacokinetics**. v. 42, n. 8, p. 721-741, 2003.
- GUTIÉRREZ, J. M.; OWNBY, C. L. Skeletal muscle degeneration induced by venom phospholipase A₂: insights into the mechanisms of local and systemic myotoxicity. **Toxicon**. v. 42, n. 8, p. 915-931, 2003.
- GUTIÉRREZ, J. M.; THEAKSTON, R. D.; WARREL, D. A. Confronting the neglected problem of snake bite envenoming: the need for a global partnership. **PLOS Medicine**. v. 3, n. 6, p. 150, 2006.
- GUYTON, A. C. Fisiologia Médica. Guanabara Koogan, n.10, p. 49–80, 2002.
- HALLIWELL, B.; WHITEMAN, M. Measuring reactive species and oxidative damage *in vivo* and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? **British Journal of Pharmacology**. v. 142, n. 2, p. 231-255, 2004.
- HANSSON, E. et al. Using geographical information systems to identify populations in need of improved accessibility to antivenom treatment for snakebite envenoming in Costa Rica. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 7, n. 1, p. 1-13, 2013.

HARRIS, J. B.; CULLEN, M. J. Muscle necrosis caused by snake venoms and toxins. **Electron Microscopy Reviews**. v. 3, n. 2, p. 183-211.

HATHERRIL, J. R.; TILL, G. O.; WARD, P. A. Mechanisms of oxidant-induced changes in erythrocytes. **Agents and Actions**. v. 32, n. 3-4, p. 351-358, 1991.

HEBBEL, R. P. Erythrocyte antioxidants and membrane vulnerability. **Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, v. 107, n. 5, p. 401-404, 1986.

[Http://fda.gov](http://fda.gov). Acesso em 24 de outubro de 2018.

HUSAIN, M. T.; KARIM, Q. N.; TAJURI, S. Analysis of infection in a burn ward. **Burns**, v. 15, n. 5, p. 299-302, 1989.

JORGE, M. T.; RIBEIRO, L. A. Infections in the bite site after envenoming by snakes of the *Bothrops* genus. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v. 3, n. 2, p. 1-10, 1997.

KANDEL, E. R.; SCHWARTZ, J. M.; JESSEL, T. M. Fundamentos da Neurociência e do Comportamento. Guanabara Koogan, p. 161–177, 1997.

KANDEL, E. R.; SCHWARTZ, J. H.; JESSELL, T. M. Principios de Neurociência. n. 4, p. 992, 2003.

KASTURIRATNE, A. et al. The global burden of snakebite: a literature analysis and modelling based on regional estimates of envenoming and deaths. **PLOS Medicine**, v. 5, n. 11, p. 1591–1604, 2008.

KIM, Y. S. et al. Subchronic oral toxicity of silver nanoparticles. **Particle and Fibre Toxicology**, v. 7, n. 1, p. 1, 2010.

KIM, Y. S. et al. Twenty-eight-day oral toxicity, genotoxicity, and gender-related tissue distribution of silver nanoparticles in Sprague-Dawley rats. **Inhalation Toxicology**, v. 20, n. 6, p. 575-583, 2008.

KIM, S. et al. Oxidative stress-dependent toxicity of silver nanoparticles in human hepatoma cells. **Toxicology In Vitro**, v. 23, n. 6, p. 1076–1084, 2009.

KOHL, Y. et al. Preparation and biological evaluation of multifunctional PLGA-nanoparticles designed for photoacoustic imaging. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine**, v. 7, n. 2, p. 228–237, 2011.

KREUTER, J.; GELPERINA, S. Use of nanoparticles for cerebral cancer. **Tumori**, v. 94, n. 2, p. 271–277, 2008.

LALLOO, D. G.; THEAKSTON, R. D. Snake antivenoms. **Journal of Toxicology: Clinical Toxicology**. v. 41, n. 3, p. 277-290, 2003.

LANDSIEDEL, R. et al. Genotoxicity investigations on nanomaterials: methods, preparation and characterization of test material, potential artifacts and limitations—many questions, some answers. **Mutation Research**. v. 681, n. 2-3, p. 241-258, 2009.

LANSDOWN, A. B. Silver in health care: antimicrobial effects and safety in use. **Current Problems in Dermatology**, Basel, v. 33, p. 17-34, 2006.

LARA, H. H. et al. Silver nanoparticles are broad-spectrum bactericidal and virucidal compounds. **Journal of Nanobiotechnology**. v. 9, n. 3, p. 30, 2011.

LEVIN, D. E.; YAMASAKI, E.; AMES, B. N. A new *Salmonella* tester strain for the detection of frame shift mutagens: a run of cytosines as a mutational hot-spot. **Mutation Research**. v. 94, n. 2, p. 315-330, 1982.

LI, Y. et al. Genotoxicity of silver nanoparticles evaluated using the Ames test and in vitro micronucleus assay. **Mutation Research**, v. 745, n. 2012, p. 4-10, 2012.

LIMA, T. H. Modificação do cimento ortopédico com nanopartículas de prata. Dissertação (Mestrado) Pós-Graduação em Engenharia Metalúrgica e de Minas. Belo Horizonte: UFMG, 2011.

LIMA, R. et al. Cytotoxicity and genotoxicity of biogenic silver nanoparticles. **Journal of Physics: Conference Series**. v. 429, n. 1, p. 012020, 2013.

LIU, W. et al. Impact of silver nanoparticles on human cells: effect of particle size. **Nanotoxicology**, v. 4, n. 3, p. 319-330, 2010.

LIZANO, S.; DOMONT, G.; PERALES, J. Natural phospholipase A₂ myotoxin inhibitor proteins from snakes, mammals and plants, **Toxicon**, v. 42, n. 8, p. 963–977, 2003.

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, n. 8, p. 885-901, 2003.

MAENOSONO, S.; YOSHIDA, R.; SAITA, S. Evaluation of genotoxicity of aminoterminated water-dispersible FePt nanoparticles in the Ames test and in vitro chromosomal aberration test. **The Journal of Toxicology Science**. v. 34, n. 3, p. 349–354, 2009.

MALLAT, Z.; LAMBEAU, G.; TEDGUI, A. Lipoprotein-associated and secreted phospholipases A₂ in cardiovascular disease: roles as biological effectors and biomarkers, **Circulation**, v. 122, n. 21, p. 2183–2200, 2010.

- MARCUSSI, S. et al., Evaluation of the genotoxicity of *Crotalus durissus terrificus* snake venom and its isolated toxins on human lymphocytes, *Mutation Research, Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, v. 724, n. 1-2, p. 59–63, 2011.
- MARCUSSI, S. et al. Genotoxic effect of *Bothrops* snake venoms and isolated toxins on human lymphocyte DNA. *Toxicon*, v. 65, n. 2013, p. 9-14, 2013.
- MARON, D. M.; AMES, B. N. Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test. *Mutation Research*, v. 113, n. 3-4, p. 173-215, 1983.
- MAYES, P. A. Biologic oxidation. In Murray, R. K. et al. (eds): Harper's biochemistry. San Mateo, Appleton & Lange, p. 105-111, 1990.
- MAYNE, S. T. Antioxidant nutrients and chronic disease: use of biomarkers of exposure and oxidative stress status in epidemiologic research. *Journal of Nutrition*. v. 133, n. 3, p. 933-940, 2003.
- MEISTER, A.; ANDERSON, M. E. Glutathione. *Annual Review of Biochemistry*. v. 52, p. 711-760, 1983.
- MENG, H. et al. Engineered design of mesoporous silica nanoparticles to deliver doxorubicin and P-glycoprotein si RNA to overcome drug resistance in a cancer cell line. *ACS Nano*, v. 4, n. 8, p. 4539–4550, 2010.
- MILANI JR, R. et al. Snake bites by the jararacuçu (*Bothrops jararacussu*): clinicopathological studies of 29 proven cases in São Paulo State. *QJM an International Journal of Medicine*, v. 90, n. 5, p. 323-334, 1997.
- MODY, V. V. et al. Introduction to metallic nanoparticles. *Journal of Pharmacy and Bioallied Science*, Mumbai, v. 2, n. 4, p. 282-289, 2010.
- MOHANPURIA, P.; RANA, N. K.; YADAV, S. K. Biosynthesis of nanoparticles: technological concepts and future applications. *Journal of Nanoparticle Research*, Holanda, v. 10, n. 3, p. 507-517, 2008.
- MORONES, J. R. et al. The bactericidal effect of silver nanoparticles. *Nanotechnology*, v. 16, n. 10, p. 2346-2353, 2005.
- MORTELMANS, K.; ZEIGER, E. The Ames *Salmonella*/microsome mutagenicity assay. *Mutation Research*, v. 455, n. 1, p. 29-60, 2000.
- MOSIER, M. J. et al. Early enteral nutrition in burns: compliance with guidelines and associated outcomes in a multicenter study. *Journal of Burn Care & Research*. v. 32, n. 1, p. 104-109, 2011.
- MUELLER, N. C.; NOWACK, B. Exposure modeling of engineered nanoparticles in the environment. *Environmental Science & Technology*, v. 42, n. 12, p. 4447-4453, 2008.

NABESHI, H. et al. Amorphous nanosilica induce endocytosis-dependent ROS generation and DNA damage in human keratinocytes. **Particle and Fibre Toxicology**, v. 8, p. 1, 2011.

NELSON, D. L.; COX, M. M. Princípios de bioquímica de Lehninger. Porto Alegre: Artmed, n. 6, 2011.

NOWACK, B.; KRUG, H. F.; HEIGHT, M. 120 Years of Nanosilver History: Implications for Policy Makers. **Environmental Science & Technology**, Washington, v. 45, n. 4, p. 1177-1183, 2011.

OLIVEIRA, F. N. et al. Accidents caused by Bothrops and Bothropoides in the State of Paraíba: epidemiological and clinical aspects. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 43, n. 6, p. 662-667, 2010.

OMS – Organização Mundial da Saúde. La OMS difunde um nuevo patrón de crecimiento infantil. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2006/pr21/es/index.html>
Accessed em: 07 de fevereiro de 2019.

OWNBY, C. L. Locally acting agentes: myotoxins, hemorrhagic toxins and dermonecrotic factors. In: Shier, W. T., Mebs, D (Eds). **Handbook of Toxicology**. Marcel Decker, New York, p. 601-654, 1990.

PARK, M. V. et al. The effect of particle size on the cytotoxicity, inflammation, developmental toxicity and genotoxicity of silver nanoparticles. **Biomaterials**, v. 32, n. 36, p. 9810–9817, 2011.

PASCHOALINO, M. P. et al. Os nanomateriais e a questão ambiental. **Química Nova**, v. 33, n. 2, p. 421-430, 2010.

PÉREZ, J.; BAX, L.; ESCOLANO, C. Roadmap report on nanoparticles. **Roadmap Report on Nanoparticles**, 2005.

PIAO, M. J. et al. Silver nanoparticles induce oxidative cell damage in human liver cells through inhibition of reduced glutathione and induction of mitochondria-involve apoptosis. **Toxicology Letters**, v. 201, n. 1, p. 92-100, 2011.

PURVES, D. et al. Neuroscience. **Sinauer Associates**, n. 2, p. 681, 2001.

QIN, Y. Silver-containing alginate fibres and dressings. **International Wound Journal**, Oxford, v. 2, n. 2, p. 172-6, 2005.

QUEIROZ, L. S. et al. Muscle necrosis and regeneration after envenomation by Bothrops jararacussu snake venoms. **Toxicon**, v. 22, n. 3, p. 339-346, 1984.

REBUELTO, M. et al. Treatment-time-dependent difference of ketamine pharmacological response and toxicity in rats. **Chronobiology International**, v. 19, n. 5, p. 937-945, 2002.

ROBBINS, Patologia Básica. Vinay Kumar et al. Rio de Janeiro: Elsevier, 2013. p. 928.

ROCO, M. C. Nanotechnology: convergence with modern biology and medicine. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 14, n. 3, p. 337-346, 2003.

RODRIGUES-SIMIONI, L.; BORGES, N.; CECCARELLI, B. The effects of *Bothrops jararacussu* venom and its components on frog nerve-muscle preparation. **Neuroscience**, v. 10, n. 2, p. 475-489, 1983.

ROMERO, L. et al. Enzymatic and structural characterization of a basic phospholipase A₂ from the sea anemone *Condylactis gigantea*, **Biochimie**, v. 92, n. 8, p. 1063–1071, 2010.

ROSS, D.; MOLDEUS, P. Antioxidant defense systems and oxidative stress. In Vigo-Pelfrey C (ed): *Membrane lipid oxidation*. 1th ed. Boca Raton, **CRC Press**, 1991;151-70.

SALEH, P.; NOSHAD, H. Bacteremia in burned patients admitted to Sina Hospital, Tabriz, Iran. **Journal of Analytical Research in Clinical Medicine**, v. 2, n. 4, p. 211-216, 2014.

SANTOS, A. L. B. et al. Abordagem nutricional em um paciente pediátrico gravemente queimado: relato de caso. **Comunicação em Ciência da Saúde**. v. 20, n. 2, p. 157-166, 2009.

SANTOS, C. A. et al. Silver nanoparticles: Therapeutical Uses, Toxicity and Safety Issues. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 103, n. 7, p. 1931-1944, 2014.

SCOTT, M. D. et al. Erythrocyte defense against hydrogen peroxide: preeminente importance of catalase. **Journal of Laboratory and Clinical Medicine**. v. 118, n. 1, p. 7-16, 1991.

SERA, N.; TOKIWA, H.; MIYATA, N. Mutagenicity of the fullerene C60-generated singlet oxygen dependent formation of lipid peroxides. **Carcinogenesis**. v. 17, n. 10, p. 2163-2169, 1996.

SERRA, M. C. V. F. et al. Cálculo da área queimada e indicadores para internação hospitalar. In: Maciel E, Serra MC, eds. **Tratado de queimaduras**. São Paulo: Atheneu; 2004. p. 43-49.

SHAMI, N. J. I. E.; MOREIRA, E. A. M. Licopeno como agente antioxidante. **Revista de Nutrição**. v. 17, n. 2, p. 227-236, 2004.

SHAN, X.; AW, T. Y.; JONES, D. P. Glutathione-dependent protection against oxidative injury. **Pharmacology & Therapeutics**. v. 47, n. 1, p. 61-71, 1990.

- SHANNON, T. et al. Much ado about nothing: methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Journal of Burn Care & Rehabilitation**, v. 18, n. 4, p. 326-331, 1997.
- SHARMA, V. K.; YNGARD, R. A.; LIN, Y. Silver nanoparticles: Green synthesis and their antimicrobial activities. **Advances in Colloid and Interface Science**. v. 145, n. 1-2, p. 83–96, 2008.
- SILVER, S.; PHUNG, L. E. T.; SILVER, G. Silver as biocides in burn and wound dressings and bacterial resistance to silver compounds. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 33, n. 7, p. 627-634, 2006.
- SILVEIRA, J. M. S.; GOMES, D. R.; SERRA, M. C. Atendimento pré-hospitalar. In: Maciel E, Serra MC, eds. **Tratado de queimaduras**. 1ª ed. São Paulo: Atheneu; 2004, p. 51-63.
- SILVEIRA, L. B. et al. Isolation and expression of a hypotensive and anti-platelet acidic phospholipase A₂ from *Bothrops moojeni* snake venom, **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 73, p. 35–43, 2013.
- SOARES, A. M.; FONTES, M. R. M.; GIGLIO, J. R. Phospholipase A₂ myotoxins from *Bothrops* snake venoms: structure-function relationship. **Current Organic Chemistry**, v. 8, n. 17, p. 1677-1690, 2004.
- SOARES, A. M. Use of snake venom for biomedical researches and drug development. **Biochemistry and Biotechnology Journal**, v. 1, n. 2012, p. 1-3, 2012.
- SOUZA JR, T. P.; OLIVEIRA, P. R.; PEREIRA, B. Efeitos do exercício físico intenso sobre a quimioluminescência urinária e malondialdeído plasmático. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**. v. 11, n. 1, p. 91-96, 2005.
- STEPANOV, A. L.; POPOK, V. N.; HOLE, D. E. Formation of Metallic Nanoparticles in Silicate Glass through Ion Implantation. **Glass Physics and Chemistry**, London, v. 28, n. 2, p. 90-5, 2002.
- STOCKER, K. Snake venom proteins affecting hemostasis and fibrinolysis. In: Stocker, K. (Ed). *Medical use of Snakes Venom Proteins*. **CRC Press** Boca Raton, FL, p. 97-160, 1990.
- SU, J. et al. Exploring feasibility of multicolored CdTe quantum dots for in vitro and in vivo fluorescent imaging. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, v. 8, n. 1, p. 1174–1177, 2008.
- TAVARES, L. C. QSAR: A abordagem de Hansch. **Química Nova**, v. 27, n. 4, p. 631-639, 2004.

THEAKSTON, R. D.; WARREL, D. A.; GRIFFITHS, E. Reporto f a WHO workshop on the standardization and controlo of antivenoms. **Toxicon**. v. 41, n. 5, p. 541-557, 2003.

UMBUZEIRO, G. A.; VARGAS, V. M. F. Teste de mutagenicidade com *Salmonella typhimurium* (teste de Ames) como indicador de mutagenicidade em potencial para mamíferos. In: Ribeiro LR, Salvadori DMF, Marques EK. **Mutagênese Ambiental**. Canoas: ULBRA, 2003. p. 355.

VARGAS, V. M. F. et al. Mutagenic and genotoxic effects of aqueous extracts of *Achyrocline satureioides* in prokaryotic organisms. **Mutation Research**, v. 240, n. 1, p. 13-18, 1990.

VARGAS, V. M. F.; MOTTA, W. E. P.; HENRIQUES, J. A. E. Mutagenic activity detected by the Ames test in river water under the influence of petrochemical industries. **Mutation Research**, v. 319, n. 1, p. 31-45, 1993.

VARANDA, E. A. et al. Mutagenic and cytotoxic activity of na isocoumarin (paepalantine) isolated from *Paepalanthus vellozioides*. **Teratogenesis, Carcinogenesis and Mutagenesis**, v. 17, n. 2, p. 85-95, 1997.

VILLAR, J. A. F. P. et al. Synthesis and evaluation of nitrostyrene derivative compounds, new snake venom phospholipase A₂ inhibitors, **Toxicon**, v. 51, n. 8, p. 1467–1478, 2008.

VITAL BRAZIL, O. Pharmacology of crystalline crotoxin. II. Neuromuscular blocking action. **Memórias do Instituto Butantan**, v. 33, n. 3, p. 981-992, 1966.

WALKER, H. L.; MASON, A. D. A standard animal burn. **The Journal of Trauma and Acute Care Surgery**, v. 8, n. 6, p. 1049-1071, 1968.

WARREL, D. A. The global problem of snake bite: Its prevention and treatment. Em: GOPALAKRISHNAKONE, P., TAN, C. K. (Editores) Recent advances in toxinology reserach, Venom and Toxin Research Group, National University of Singapore, Cingapura, p. 121-153, 1992.

WEN, F. H. et al. Soroterapia. Animais peçonhentos no Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos acidentes, Sarvier, São Paulo, p. 380-393, 2003.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. 2007. Rabies and envenomings: a neglected public health issue. Available at: http://www.who.int/bloodproducts/animal_sera/Rabies.pdf. Accessed on 25 de outubro de 2018.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Neglected tropical diseases. 2011. Available from: http://www.who.int/neglected_diseases/diseases/snakebites/en/. Accessed on 24 de outubro de 2018.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Neglected tropical diseases. 2013. Available from: http://www.who.int/neglected_diseases/diseases/snakebites/en/. Accessed on 24 de outubro de 2018.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Snake antivenoms. 2015. Available: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs337/en/>. Accessed 23 de outubro de 2018.

XU, W. The curative effect and safety evaluation of nanometer silver used on II degree burn wound. **Wound Repair Regen**, v. 17, n. 4, p. a61-a61, 2009.

YOON, K. Y. et al. Susceptibility constants of Escherichia coli and Bacillus subtilis to silver and copper nanoparticles. **Science of the Total Environment**, v. 373, n. 2-3, p. 572–575, 2007.

YOSHIDA, E. et al. Evaluation of Betulin Mutagenicity by *Salmonella* Microsome Test. **Advanced Pharmaceutical Bulletin**, v. 6, n. 3, p. 443-447, 2016.