UNIVERSIDADE DE SOROCABA

PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO, PESQUISA, EXTENSÃO E INOVAÇÃO

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

DÉBORA ANTUNES NETO MORENO

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIMUTAGÊNICO DE FITOQUÍMICOS DA DIPTERYX ALATA VOGEL E EFEITOS DA FARINHA DO BARU SOBRE O BLOQUEIO NEUROMUSCULAR DO VENENO DA LACHESIS MUTA MUTA

SOROCABA/SP

2024

DÉBORA ANTUNES NETO MORENO

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIMUTAGÊNICO DE FITOQUÍMICOS DA DIPTERYX ALATA VOGEL E EFEITOS DA FARINHA DO BARU SOBRE O BLOQUEIO NEUROMUSCULAR DO VENENO DA LACHESIS MUTA MUTA

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

Orientador: Profa. Dra. Yoko Oshima Franco

SOROCABA/SP

2024

Ficha Catalográfica

Moreno, Débora Antunes Neto
M842a Avaliação do potencial antimutagênico de fitoquímicos da *Dipteryx Alata Vogel* e efeitos da farinha do baru sobre o bloqueio neuromuscular do veneno da *Lachesis Muta Muta* / Débora Antunes Neto Moreno. – 2024.
94 f. : il.

Orientadora: Profa. Dra. Yoko Oshima-Franco.
Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade de Sorocaba, Sorocaba, SP, 2024.

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

Elaborada por Maria Carla P. F. Gonçalves – CRB-8/6721

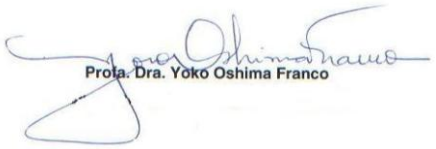
DÉBORA ANTUNES NETO MORENO

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIMUTAGÊNICO DE FITOQUÍMICOS DA DIPTERYX ALATA VOGEL E EFEITOS DA FARINHA DO BARU SOBRE O BLOQUEIO NEUROMUSCULAR DO VENENO DA LACHESIS MUTA MUTA

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

Aprovado em: 27/10/2023.

BANCA EXAMINADORA:

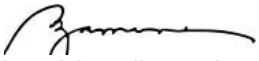


Prof.(a) Dr.(a) Yoko Oshima Franco
Universidade de Sorocaba

Prof.(a) Dr.(a) Marcela Pellegrini Peçanha
Universidade de Sorocaba

Prof.(a) Dr.(a) Angela Faustino Jozala
Universidade de Sorocaba

Prof.(a) Dr.(a) Rafael Stuani Floriano
Universidade do Oeste Paulista



Prof.(a) Dr.(a) Stella Regina Zamuner
Universidade Nove de Julho

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho primeiramente a Deus

por ter me permitido chegar até aqui.

À minha família que esteve ao meu lado me apoiando,

me incentivando, me dando amor e carinho.

Aos meus amigos que souberam estar ao meu lado nos

momentos de alegria e tristeza.

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 aos meus filhos: Íris Antunes Moreno, Ayla Antunes Moreno e Athus Antunes Moreno que estiveram sempre comigo em todos os momentos e com o jeitinho de cada um, paciência e sua inocência sempre souberam estar ao meu lado e compreenderam aos inúmeros momentos que deixei de dar a devida atenção.

Agradeço aos meus sogros Claudemir Moreno Gasques e Sara Silveira Moreno, por sempre me ajudar em todos os momentos que precisei deixar as crianças, 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, Eliana Aparecida Varanda, Flávia Aparecida Resende Nogueira, Jorge Amaral Filho e José Carlos Cogo.

Agradeço ao César Augusto Sandri, quem nos forneceu a farinha do Baru.

Agradeço aos meus companheiros de longa jornada de trabalho Natália Tribuiani, Ederson Constatino, Jaqueline de Cássia Proença Assunção que sempre estavam no laboratório para dar aquele apoio necessário.

Agradeço aos alunos de Iniciação Científica Gabriel Ferreira dos Santos, Lerrandra Mariah Ferreira Machado, Caroline Malavasi Barros, Anna Paula Farias de França, Isabella Ravazoli, Nathalia Margarida Cantuária, Giovanna Maria de Souza Nanini, que passaram e dedicaram seus dias para estarmos juntos em todas as etapas do projeto.

Agradeço aos pós-graduandos que chegaram nesse período, Jocimar de Souza, Fâni Ribeiro Silva, Gisele Pereira de Souza Chammas, Karollyna Corrêa Oliveira e desejo as boas-vindas aos que virão para completar o laboratório.

Agradeço a todos os companheiros e técnicos do Apoio 2, Valéria de Campos Orsi, Henrique Trombini Garcia, Márcia Regina das Mercedes, Jocimar de Souza, 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 pela disposição em analisar criticamente este trabalho, Edson Hideaki Yoshida, Priscila Randazzo de Moura e Sandro Rostelato Ferreira.

Agradeço aos professores da banca de defesa pela disposição em analisar criticamente este trabalho, Marcela Pellegrini Peçanha, Angela Faustino Jozala, Rafael Stuani Floriano, Stella Regina Zamuner, aos professores suplentes Denise Grotto e Flávia Aparecida Resende Nogueira.

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

“Quando tudo estiver parecendo ir contra você,

lembre-se que o avião decola contra o vento,

e não a favor dele.” (Henry Ford)

RESUMO

A Organização Mundial da Saúde estima que a quantidade de pessoas picadas por serpentes pode atingir anualmente a cifra de milhões, justificando a busca de alternativas para minimizar a gravidade do acidente ofídico. Os objetivos deste projeto foram avaliar o potencial antimutagênico da betulina e vanilina (*Dipteryx alata* Vogel) comparativamente ao resveratrol e os efeitos da farinha do fruto do baru sobre o bloqueio neuromuscular e a miotoxicidade induzidos pelo veneno da *Lachesis muta muta.* A eficácia da farinha contra o veneno foi avaliada por eletroforese e dosagem de proteínas. O delineamento do estudo foi *in vitro* e *ex vivo* com uso de animais, aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais. A antimutagenicidade foi realizada através do ensaio *Salmonella*/microssoma em cepas TA97a, TA98, TA100 e TA102, com (+S9) e sem (-S9) ativação metabólica. Os ensaios *ex vivo* foram realizados em preparações nervo frênico-diafragma (NFD) de camundongos, através de técnica miográfica convencional, em modelos de pré incubação, pré veneno e pós veneno. As preparações resultantes do melhor desfecho farmacológico foram analisadas por microscopia de luz. Os resultados (média ± E.P.M.) foram analisados utilizando-se Anova-One way seguido de teste de Tukey e valores com $p<0,05$ considerados significativos. A eletroforese de proteínas foi realizada em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) e a dosagem de proteínas através do método de Bradford. O resveratrol inibiu fortemente todos os mutágenos nas condições testadas (-S9 e +S9). A vanilina inibiu moderadamente o mutágeno de TA97a (-S9) e fortemente em todas as cepas sob +S9. A betulina inibiu moderadamente o mutágeno de TA97a (-S9), fortemente TA100 e TA102 (-S9) e todas as cepas sob +S9. Os resultados obtidos foram todos dependentes da concentração. Em preparações NFD, selecionou-se a concentração de 1000 µg/mL de farinha de baru para os ensaios posteriores com o veneno (100 µg/mL, n=6). Os modelos pré e pós falharam na proteção contra o bloqueio induzido pelo veneno. O veneno inibiu 62,1% (n=6), enquanto a pré incubação inibiu apenas 30,6% da resposta contrátil (n=6). O veneno lesionou significativamente 35,3 ± 1,72% das fibras musculares em relação aos demais tratamentos, como a farinha 21,6 ± 1,71%, o controle Tyrode, 13,8 ± 3,56% e pré incubação 19,3 ± 1,98%. A eletroforese permitiu a

visualização das bandas proteicas do veneno de *L. m. muta*, cuja intensidade diminuiu quando em mistura com a farinha de baru, confirmada pela quantificação de proteínas (de 6,84 µg ± 1,7 para 1,42 µg ± 0,003). Conclui-se que a *Dipteryx alata* é uma planta promissora cujos compostos devem ser explorados medicinalmente como pela propriedade antimutagênica demonstradas pela betulina e vanilina, além da farinha comestível do fruto do baru que atenuou os efeitos tóxicos do veneno de *L. m. muta*, por mecanismo a ser esclarecido.

Palavras-chave: antimutagenicidade; betulina; câncer; fitoterápicos; *Lachesis muta muta*; prevenção; vanilina; resveratrol.

ABSTRACT

The World Health Organization estimates that the number of people bitten by snakes could reach the number of millions annually, justifying the search for alternatives to minimize the severity of snakebites. The objectives of this project were to evaluate the antimutagenic potential of betulin and vanillin (*Dipteryx alata* Vogel) compared to resveratrol and the effects of baru flour on neuromuscular blockade and myotoxicity induced by *Lachesis muta muta* venom. The effectiveness of the flour against the poison was evaluated by electrophoresis and protein measurement. The study design was *in vitro* and *ex vivo* using animals, approved by the Ethics Committee on the Use of Animals. Antimutagenicity was performed using the *Salmonella*/microsome assay in strains TA97a, TA98, TA100 and TA102, with (+S9) and without (-S9) metabolic activation. The *ex vivo* assays were performed on mice phrenic nerve-diaphragm (PND) preparations, using a conventional myographic technique, in pre incubation, pre venom and post venom models. The preparations from the best pharmacological outcomes were analyzed by light microscopy. The results (mean ± S.E.M.) were analyzed by Anova-One way test followed by the Tukey test, and values with $p<0.05$ considered significant. Protein electrophoresis was performed in a polyacrylamide gel containing sodium dodecyl sulfate (SDS-PAGE), and the protein measurement by the Bradford method. Resveratrol strongly inhibited all mutagens under assayed conditions (-S9 and +S9). Vanillin moderately inhibited the TA97a mutagen (-S9) and strongly in all strains under +S9. Betulin moderately inhibited the TA97a (-S9) mutagen, strongly for TA100 and TA102 (-S9) and all strains under +S9. The obtained results were all concentration dependent. In PND preparations, the concentration of 1000 µg/mL baru flour was selected for furthering assays with the venom (100 µg/mL, n=6). The pre and post models failed against the blockade induced by the venom. The venom inhibited 62.1% (n=6), while the pre incubation inhibited only 30.6% of the contractile response (n=6). The venom significantly injured 35.3 ± 1.72% of muscle fibers in relation to other treatments, such as flour 21.6 ± 1.71%, Tyrode control, 13.8 ± 3.56% and pre-incubation 19.3 ± 1.98%. Electrophoresis allowed the visualization of protein bands from the venom of *L. m. muta*, whose intensity

decreased when mixed with baru flour, confirmed by protein quantification (from 6.84 µg ± 1.7 to 1.42 µg ± 0.003). In conclusion *Dipteryx alata* is a promising plant whose compounds should be explored medicinally, such as the antimutagenic properties demonstrated by betulin and vanillin, in addition to the edible flour of the baru fruit, which attenuated the toxic effects of the *L. m. muta*, by a mechanism to be clarified.

Keywords: antimutagenicity; botulin; cancer; herbal Medicines; *Lachesis muta muta*; prevention; resveratrol.

LISTA DE ILUSTRACÕES

Figura 1 - *Lachesis muta muta* **20**

Figura 2 - Árvore do baru (*Dipteryx alata* Vogel) com frutos de baru. .. **22**

Figura 3 - Estrutura da Betulina. **24**

Figura 4 - Estrutura da Vanilina. **25**

Figura 5 - Estrutura do Resveratrol. **28**

Figura 6 - Esquema da solução mãe **38**

Figura 7 - Esquema da viabilidade do controle espontâneo. **39**

Figura 8 - Esquema da viabilidade do controle negativo. **40**

Figura 9 - Esquema da viabilidade da substância teste (Vanilina, Betulina e Resveratrol). **41**

Figura 10 - Isolamento da preparação do nervo frênico-diafragma. **43**

Figura 11 - Curva concentração-resposta de farinha de Baru. **51**

Figura 12 - Respostas obtidas das diferentes concentrações de farinha de Baru aos 120 minutos. **53**

Figura 13 - Ensaios farmacológicos de pré incubação..... **54**

Figura 14 - Respostas contráteis (%) dos ensaios de pré incubação aos 120 min. **55**

Figura 15 - Ensaios farmacológicos pré veneno **56**

Figura 16 - Respostas obtidas dos ensaios pré veneno, comparados aos 120 min..... **57**

Figura 17 - Ensaios farmacológicos pós veneno..... **58**

Figura 18 - Respostas obtidas dos ensaios pós veneno, comparados aos 120 min. **59**

Figura 19 - Corte histológico de músculo diafragma exposto a diferentes tratamentos. **60**

Figura 20 - Análise histológica quantitativa de músculos expostos a diferentes tratamentos. **61**

Figura 21 - Eletroforese de Proteínas (ensaio 1). **62**

Figura 22 - Eletroforese de Proteínas (ensaio 2). **63**

Figura 23 - Curva padrão de soro albumina bovina (BSA) (Ensaio 1) **65**

Figura 24 - Curva padrão de soro albumina bovina (BSA) (Ensaio 2) **66**

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Protocolos farmacológicos estimados. **44**

Tabela 2 - Ensaio de viabilidade com as cepas TA98 e TA100. ..... **49**

Tabela 3 - Ensaio de antimutagenicidade na ausência de ativação metabólica (-S9), em $5x10^{-5}$. **50**

Tabela 4 - Ensaio de antimutagenicidade na presença de ativação metabólica (-S9), a $5x10^{-5}$. **51**

Tabela 5 - Análise quantitativa de dano celular. (*) $p<0,05$ comparado aos outros tratamentos. **61**

Tabela 6 - Absorbâncias do padrão medidas após 5 minutos de incubação em temperatura ambiente e suas respectivas médias e volumes/concentrações correspondentes. **64**

Tabela 7 - Absorbâncias medidas após 5 minutos de incubação de 1mL do veneno *de Lachesis muta muta*, farinha de Baru e mistura na concentração de 10 µg/mL e sua massa específica em proteínas. **65**

Tabela 8 - Absorbâncias medidas após 5 minutos de incubação do veneno *de Lachesis muta muta*, farinha de Baru e mistura na concentração de de 500 e 1500 mg/mL e sua massa específica em proteínas. **66**

LISTA DE ABREVIATURAS

4-NQO	4 nitroquinolina 1-oxido
AF-2	Furilfuramida
ALT	Alanina Aminotransferase
BPPs	Peptídeos Potenciadores de Bradicinina
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
Ch-E	*Coutarea hexandra*
CK	Creatina Quinase
CRISP	Proteínas Secretórias Ricas em Cisteína
D. alata	*Dipteryx alata* Vogel
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido Desoxirribonucleíco
HDL	Lipoproteína de Alta Densidade
HEGg	*Galatia glaucescens*
IL-1β	Interleucina 1 Beta
IL-6	Interleucina 6
IM	Índice de Miotoxicidade
IUPAC	Internaticional Union of Pure and Applied Chemistry
LAAO	L-aminoácido Oxidase
LHF-I	Fator Hemorrágico I
LHF-II	Fator Hemorrágico II
LNC	Lista de Notificação Compulsória
NPD	4-nitro-O-fenilenediamino
OMS	Organização Mundial da Saúde
PAGE	Eletroforese em Gel de Policrilamida
PLA_2	Fosfolipase A_2
S9	Ativação Metabólica
SABL	Soro Antibotrópicolaquético
SAL	Soro Antilaquético
SDS-PAGE	Dodecil Sulfato de Sódio-PAGE
SINAN	Sistema de Informação de Agravos de Notificação
TNF-α	Fator de Necrose Tumoral Alfa
UFC	Unidades Formadoras de Colônias
UV	Ultravioleta

SUMÁRIO

1 Introdução **17**
2 Revisão Bibliográfica **21**
2.1 *Dipteryx alata* Vogel (Baruzeiro) **21**
2.2 Betulina **24**
2.3 Vanilina **25**
2.4 Resveratrol **27**
2.5 Veneno de *Lachesis muta muta* **28**
2.6 Eletroforese SDS-PAGE **32**
2.7 Teste de Ames **34**
3 Objetivos **36**
3.1 Geral **36**
3.2 Específicos **36**
4 Material e Métodos **37**
4.1 Vanilina, Betulina e Resveratrol **37**
4.2 Farinha do Fruto do Baru **37**
4.3 Veneno de *Lachesis muta muta* **37**
4.4 Animais **37**
4.5 Ensaio de Viabilidade **38**
4.6 Ensaios de Antimutagenicidade *Salmonella* Typhimurium **41**
4.7 Preparação Nervo Frênico-Diafragma de Camundongos **43**
4.8 Análise Histológica **45**
4.9 Protocolo de Rotina **45**
4.10 Coloração de Hematoxilina/Eosina **46**
4.11 Microscopia Óptica **46**
4.12 Eletroforese SDS-PAGE **47**
4.13 Coloração Comassie-Bio Rad **47**
4.14 Dosagem de Proteínas **47**
4.15 Análise Estatística **48**
5 Resultados **48**
6 Discussão **67**
7 Conclusão **78**
Referências **79**

1 INTRODUÇÃO

A busca por compostos com potencial antimutagênico naturalmente remete a uma doença que é temida mundialmente, o câncer. Trata-se da segunda principal causa de morte no mundo e que dizimou 9,6 milhões de pessoas em 2018, sendo que 70% das mortes por câncer ocorrem em países de baixa e média renda (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2018). O câncer surge a partir da falha no reparo de uma mutação genética, ou seja, de uma alteração no DNA da célula, que passa a receber instruções erradas para as suas atividades. As alterações podem ocorrer em genes especiais, denominados proto-oncogenes ou em genes supressores do tumor (BRASIL, 2019).

A exposição diária a diversos compostos poluentes de indústria e trânsito presentes no ar, em cosméticos e até mesmo em grande parte dos alimentos – industrializados ou não –, podem carrear contaminantes com potencial mutagênico (FIORINO *et al*., 1994; NAMIKI, 1990; SAEIDNIA; ABDOLLAHI, 2013). A mutação é um evento iniciador do câncer, de forma que identificar antimutágenos no combate ou na prevenção, ou quimioprevenção (ROY *et al*., 2011) de eventos mutagênicos é de extrema importância (VARANDA *et al*., 1997; VARGAS *et al*., 1990). De acordo com Waters e McCuthan (1990), o termo “antimutagênico” foi primeiramente utilizado por Novick e Szilasrd (1952) para descrever aqueles agentes que apresentam a propriedade de reduzir a taxa de mutações espontâneas ou induzidas, independentemente dos mecanismos envolvidos.

Após a observação inicial de efeitos antimutagênicos de certos vegetais, vários compostos têm sido isolados de plantas e testados quanto à ação protetora sobre lesões induzidas no ácido desoxirribonucleico, DNA (KADA; MORITA; INOUE, 1978). No Brasil, há que se ressaltar a rica biodiversidade de seus biomas (ALMEIDA *et al*., 1998), dentre os quais, o do Cerrado, que possui mais de 6.000 plantas vasculares (MENDONÇA *et al*., 1998).

Contudo, são poucos os investimentos em conservação e pesquisa, o que proporciona lacunas na caracterização da flora desse bioma. Algumas espécies do Cerrado possuem potencial para servirem como fontes de substâncias bioativas, objetivando potenciais medicinais como os compostos fenólicos. Estes já foram identificados em *Dipteryx alata* Vogel justificando estudos terapêuticos em doenças crônicas. A *D. alata* é utilizada, na cultura popular, como antirreumático, regulador menstrual e redutor de taxas de colesterol (ESTEVES-PEDRO *et al*., 2012; SOUZA; FELFILI, 2006). A utilização de plantas em tratamentos é milenar e ocorre em regiões pobres do país, mas podem ser comercializadas em feiras e mercados populares de grandes cidades. Algumas populações não possuem acesso a drogas sintéticas, portanto, a terapia herbal é utilizada de forma cultural (SILVA *et al*., 2011). Apesar de não terem seus compostos bioativos conhecidos, as observações populares dos efeitos contribuem para as pesquisas sobre aplicações terapêuticas no mundo todo (MACIEL *et al*., 2002).

A espécie *Dipteryx alata* Vogel (*D. alata*), popularmente conhecida como Baru, árvore da família Leguminosae-Papilionoideae faz parte do grupo das espécies nativas usadas pela população regional como fonte de renda familiar. É uma das espécies mais promissoras para cultivo devido ao seu uso múltiplo, alta taxa de germinação de sementes e de estabelecimento de mudas (ALMEIDA; SILVA; RIBEIRO, 1990; SANO; RIBEIRO; BRITO, 2004), possui alto teor de fibra (TOGASHI, 1993), é rica em açúcar, potássio, cobre e ferro (VALLILO; TAVARES; AUED, 1990) e pode ser utilizada para ração. A amêndoa, apreciada como alimento humano, é rica em óleo insaturado, proteína, cálcio e fósforo, assemelhando-se ao amendoim (TOGASHI, 1993). Sua madeira apresenta alta durabilidade e é utilizada para confecção de mourões. A planta é classificada como espécie-chave do Cerrado, uma vez que seu fruto amadurece na época seca e alimenta várias espécies da fauna dessa região, incluindo o gado (SCHEFFER; MING; ARAUJO, 2002). Além dos três fitoquímicos identificados por Kaplan *et al*. (1966), mais 15 fitoquímicos foram isolados e identificados por Puebla *et al*. (2010) sendo, portanto, conhecido um total de 18 substâncias, sendo elas: quatro triterpenos, lupeol, lupenona; 28-hidroxi-lup-20(29)-en-3-ona e betulina; nove flavonoides, 8-*O*-metilretusina, 7-hidroxi-5,6,4’-

trimetoxisoflavona, afrormosina, 7-hidroxi-8,3',4'-trimetoxiisoflavona, 7,3'-dihidroxi-8,4'-dimetoxiisoflavona, odoratina, 7,8,3'-trihidroxi-4'-metoxiisoflavona,7,8,3'-trihidroxi-6,4'-dimetoxiisoflavona, dipterixina; uma chalcona, isoliquiritigenina; uma aurona, sulfuretina; e três compostos fenólicos, ácido vanilico, vanilina e ácido protocatechuico.

Por outro lado, o composto resveratrol, ou 3,5,4'-trihidroxi-droxi-estilbeno, é um polifenol encontrado principalmente em uvas, vinho tinto, amendoins, chocolate amargo e algumas frutas silvestres (BIRREL *et al*., 2005; RAHMAN; BISWAS; KIRKHAM, 2006). As fontes alimentares e suplementos contêm tanto isômeros *cis* quanto *trans* de resveratrol, porém a forma *trans* é a mais frequentemente encontrada (ABU-AMERO; KONDKAR; CHALAM, 2006; WANG *et al*., 2017). O resveratrol foi identificado pela primeira vez em 1940 nas raízes de heléboro branco (AGGARWAL *et al*., 2004) e, posteriormente, em 1963, em raízes utilizadas pela medicina chinesa e japonesa no tratamento de doenças relacionadas ao fígado, pele, coração, circulação e metabolismo lipídico (SOLEAS; DIAMANDIS; GOLDBERG, 1997). O resveratrol possui propriedades de promoção da saúde e características antioxidantes, anti-inflamatórias, cardioprotetoras, anti-diabetes, anti-câncer, quimiopreventivas e neuroprotetoras (CATALGOL *et al*., 2012; TIMMERS *et al*., 2011).

A Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que a quantidade de pessoas que são picadas por serpentes a cada ano no mundo pode chegar a 5,4 milhões. Desses, entre 81.000 e 138.000 morrem e até 400.000 ficam permanentemente incapacitadas ou desfiguradas. Os acidentes por animais peçonhentos, especialmente os acidentes ofídicos, foram incluídos pela OMS na lista das doenças tropicais negligenciadas que acometem, na maioria das vezes, populações pobres que vivem em áreas rurais, desencadeando discriminação, abandono, perda de renda, dívidas, problemas de saúde mental e redução da qualidade de vida (BIBLIOTECA VIRTUAL EM SAÚDE, 2019).

As serpentes de importância médica que ocorrem em território brasileiro estão representadas pelas jararacas do gênero *Bothrops*, as cascavéis do gênero *Crotalus*, as surucucus do gênero *Lachesis* (família Viperidae), corais-verdadeiras do gênero *Micrurus* (família Elapidae), espécies de cobra-verde

Philodryas spp. e as muçuranas Clelia spp. e boiruna spp. (família Dipsadidae) (BRASIL, 2001).

No Brasil, a única espécie do gênero *Lachesis* encontrada é a *Lachesis muta* (Figura 1) subdividida em duas subespécies: *Lachesis muta muta* e *Lachesis muta noctívaga* (BARRAVIEIRA, 1997).

Distribuem-se pelas grandes florestas tropicais brasileiras como a Zona da Mata Atlântica, a Floresta Amazônica e o norte do Mato Grosso, abarca o Panamá na América Central embora haja registro de acidentes e captura desta espécie em regiões serranas úmidas do Ceará (FEITOSA; MELO; MONTEIRO, 1997; FERNANDES; FRANCO; FERNANDES, 2004; BRASIL, 1998; 2001). Sua presença no Brasil é basicamente registrada em áreas conservadas e seus arredores, onde florestas nativas ainda se mantêm em bom estado de conservação (ALMEIDA *et al.*, 2007; CAMPBELL; LAMAR, 2004; MELGAREJO, 2009).

Figura 1: *Lachesis muta muta.*

Fonte: SANJAY VEIGA. Disponível em: https://www.flickr.com/photos/sanjayveiga/2657632100/. Acesso em: 22 de fevereiro de 2021.

A serpente *Lachesis muta* Linnaeus (1766), conhecida popularmente pelos nomes surucucu, surucucu-pico-de-jaca, surucutinga e malha-de-fogo é a maior serpente peçonhenta das Américas, podendo chegar a 3,5 metros de comprimento (MELGAREJO, 2009). Apresenta um padrão de cor marrom

amarelado, com grandes manchas triangulares pretas, as quais apresentam uma mancha clara no centro e o lado ventral de cor creme-esbranquiçada. São conhecidas como surucucu, surucucu pico-de-jaca ou surucutinga (GRANTSAU, 1991). É um animal terrícola e de hábito noturno, alimenta-se principalmente de mamíferos de pequeno e médio porte (CAMPBELL; LAMAR, 2004). O envenenamento humano por esta serpente é considerado grave devido ao seu potencial de injetar quantidades consideravelmente grandes de veneno (200–400 mg) (STRANSKY *et al*., 2018).

A busca por alternativas que minimizem a gravidade do acidente ofídico é crescente, mas também se verifica uma tendência em utilizar o potencial biotecnológico do veneno ofídico para tratar outras doenças. A bioprospecção de venenos ofídicos na busca de novos medicamentos tem sido crescente. A avaliação de toxicidade de veneno ofídico – através de testes *in vitro* como citotoxicidade, apoptose celular e genotoxicidade – demonstra a primeira etapa para esta finalidade com foco principalmente no câncer para identificar potenciais carcinógenos ou antimutagênicos (SOARES, 2012).

Este projeto dá seguimento a estudos prévios com a *D. alata* (ESTEVES-PEDRO *et al.*, 2011; 2012; FERRAZ *et al.*, 2012; 2014; 2015; NAZATO *et al.*, 2010; PUEBLA *et al.*, 2010; YOSHIDA *et al.*, 2015), justificado pela gravidade do acidente causado pela serpente *L. m. muta* e na importância de explorar o potencial farmacológico desta rica planta.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 *Dipteryx alata* VOGEL (BARUZEIRO)

A *D. alata* Vogel é uma espécie nativa do cerrado brasileiro, principalmente em Minas Gerais, Goiás, Distrito Federal e Mato Grosso. Esta espécie é conhecida popularmente como “baru” em Minas Gerais, “barujo” e “combaru” em Mato Grosso, e “cumaru” em outros estados. A planta tem grande potencial econômico por causa de seus usos múltiplos (SANO; BRITO; RIBEIRO, 2006).

É uma árvore com altura média de 15m, podendo alcançar mais de 25m, de caule reto. O aspecto geral do tronco é de cor cinza clara ou creme, pode ser liso ou apresentar placas de formato irregular, descamantes, deixando reentrâncias de cor creme. As folhas são alternas, exceto as folhas primordiais, compostas pinadas, pecioladas, sem estípulas e raque alada, que originou o nome da espécie (Figura 2).

Figura 2: Árvore do baru (*Dipteryx alata* Vogel) com frutos de baru.

Fonte: A PLANTA DA VEZ. Foto: Julcéia Camillo. Disponível em: https://www.aplantadavez.com.br/2015/11/baru-dipteryx-alata-vog.html. Acesso em: 22 de fevereiro de 2021.

O baruzeiro é uma árvore com intensa frutificação na fase adulta (CZEDER *et al*., 2012; SANO; BRITO; RIBEIRO, 2006), cujo fruto é descrito como sendo uma drupa, ovoides, levemente achatados e de coloração marrom, com uma única semente (amêndoa) comestível e comercializada em empórios nos grandes centros, bastante apreciada pela população local. Com polpa rica em proteína, aromática, fibras e ácidos graxos insaturados, é usado como alimento humano e animal, bem como em formulações cosméticas (FERNANDES *et al*., 2010; TAKEMOTO *et al*., 2001; VERA *et al*., 2009). Muito consumida pelo gado e animais silvestres (LORENZI, 1992) e pelo homem, na forma de doces, como na região de Pirenópolis, Estado de Goiás, sob a denominação “pé-de-moleque” (TOGASHI; SGARBIERI, 1995) sua semente é

comestível, nutritiva e contém óleo com propriedades medicinais (LORENZI, 1992; PIO CORRÊA, 1984; RIZZINI; WORS, 1976).

Tradicionalmente, os habitantes locais usam o óleo extraído das amêndoas para tratar febres altas e o extrato hidroalcóolico de suas folhas demonstrou propriedade contra o efeito neurotóxico do veneno de *Bothrops jararacussu*, em preparações isoladas (PUEBLA *et al*., 2010).

O baru é utilizado na medicina tradicional no combate à bronquite, diarreia, disenteria, dor, dor de garganta, gripe, picada de serpente, tosse e como cicatrizante (BIESKI *et al*., 2012). Entretanto, não há relatos na literatura que comprovem a grande maioria desses usos medicinais (SANO; RIBEIRO; BRITO; 2004).

Segundo Araújo *et al*. (2016), tanto a polpa quanto a amêndoa do baru apresentam compostos bioativos com potencial antioxidante natural. A amêndoa torrada apresentou capacidade de redução da gordura abdominal em mulheres com sobrepeso e obesas, além de melhorar os níveis de lipoproteína de alta densidade (HDL), de acordo com a pesquisa de De Souza *et al*. (2018).

O gênero *Dipteryx*, pertencente à família Fabaceae, é constituído por 15 espécies que se destacam por serem utilizadas como plantas medicinais. São encontradas nas regiões amazônica, nordeste e central do Brasil. A espécie D. odorata é a mais estudada, suas sementes são ricas em cumarinas, importantes na indústria de cosméticos e perfumaria, é também um importante composto fenólico que inibe a germinação (FELIX *et al*., 2007), além de serem comercializadas para distúrbios vasculares e linfáticos (BESSA; MENDONÇA; ARAUJO, 2001) e exibirem atividade farmacológica no sistema muscular (MENDES; SILVEIRA, 1994).

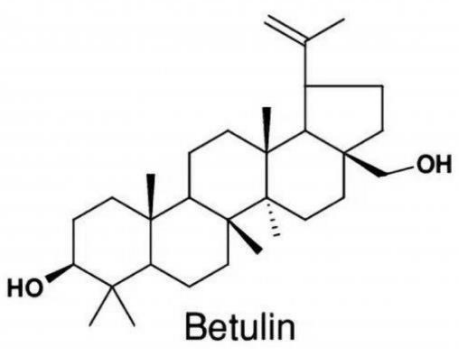
Estudos mostram que as cascas apresentam cumarinas, lupeol,31 β-farneseno, betulina e ésteres metílicos de ácidos graxos (HAYASHI; THOMSON, 1974; NAKATO; SUAREZ, 1970; NAKATO *et al*., 1979) e o óleo essencial das flores é rico em germacreno D e espatulenol (BROINIZI *et al*., 2008). Em pesquisas realizadas com as sementes de *D. odorata*, isolou-se um novo diterpenóide furanocassano, uma nova isoflavolignana e a chalcona

isoliquiritigenina que exibem um alto potencial preventivo contra câncer em glândulas mamárias de ratos (JANG *et al*., 2003).

2.2 BETULINA

A Betulina (lup-20(29)-ene-3β, 28-diol) é um lupano pertencente à classe dos triterpenos pentacíclicos (Figura 3).

Figura 3: Estrutura da Betulina.



Fonte: RESEARCH GATE. Disponível em: https://www.researchgate.net/figure/Chemical-structure-of-betulin-a-and-betulinic-acid-b_fig1_353573442?. Acesso em: 22 de fevereiro de 2021.

A molécula apresenta propriedade anti-inflamatória e antimicrobiana, em especial contra os micro-organismos formadores do biofilme bucal (RECIO *et al*.,1995) e efeitos inibidores ao vírus Epstein-Barr, agente etiológico do linfoma de Burkitt e carcinoma da nasofaringe (UKIYA *et al*., 2002). Apresenta-se como fármaco potencial para a indústria farmacêutica. Essas moléculas são candidatas ideais para a obtenção de derivados via biotransformação, devido à complexidade e ao grande número de carbonos não ativados, geralmente inacessíveis a reagentes químicos tradicionais (ABRAHAM *et al*., 1992).

Em sua estrutura química observam-se três posições ativas, um grupo hidroxila secundário na posição C-3, o grupo hidroxila primário na posição C-28 e uma dupla ligação C-C no C-20, onde podem ocorrer modificações químicas para se obter diferentes derivados (DINH NGOC *et al*., 2014). Apesar de sua

gama de atividades é extensivamente estudada como um potente agente antitumoral (ZUCO *et al*., 2002).

A betulina foi um dos primeiros produtos naturais isolados de plantas como substância quimicamente pura. Ela foi isolada em 1788, por sublimação de raízes de bétula. A estrutura química da betulina foi completamente elucidada em 1952. Alguns anos mais tarde esta substância foi encontrada em outras espécies de plantas da família Betulaceae (PATOKA, 2003).

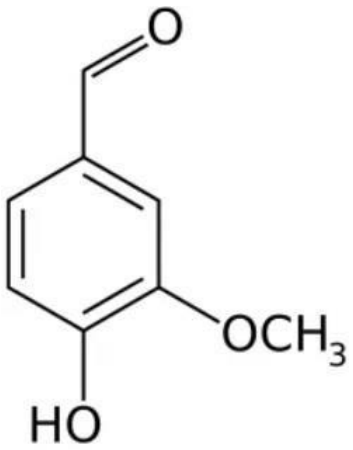
A betulina é um valioso componente de produtos cosméticos. A substância pura e o extrato de raízes de bétula são utilizados em condicionadores de cabelo e como aditivos na produção de xampu. Na Finlândia, foram feitas intensivas pesquisas conduzindo a utilização da betulina como um precursor na manufatura de vernizes, para proteção e resistência de tintas contra água, agentes químicos e biológicos (PATOKA, 2003).

A betulina possui atividade anti-inflamatória descrita na literatura, mostrando ser um potente inibidor da fosfolipase A_2. Estudos mostram a sua habilidade em induzir e modular a produção de citocina humana em culturas de células do sangue, indução moderada de TNF-α e, também, na indução mitogênica na produção de TNF-α (ZDZISISKA *et al*., 2003).

2.3 VANILINA

Um exemplo de substância natural popularmente conhecida e que apresenta grande importância, devido suas diversas aplicações e atividades biológicas, é a vanilina (Figura 4).

Figura 4: Estrutura da Vanilina.



Fonte: PINTEREST. Disponível em: https://www.pinterest.se/pin/548172585864135923/. Acesso em: 22 de fevereiro de 2021.

A vanilina, 4-hidroxi-3-metoxibenzaldeído, é uma substância bastante utilizada na indústria alimentícia e de cosméticos, por ser o ingrediente ativo responsável pelo aroma de baunilha (WU *et al*., 2009). Além da sua importância industrial e econômica, a vanilina também tem sido reconhecida como um composto bioativo, apresentando atividade antioxidante (TAI *et al*., 2011), antimutagênica (SHAUGHNESSY; SETZER; DEMARINI, 2001), anti-inflamatória (MAKNI *et al*., 2011) e potencial efeito de proteção contra o câncer (DURANT; KARRAN, 2003).

Suas propriedades antioxidantes se devem ao fato de a vanilina interagir com espécies radicalares, evitando assim os processos oxidativos (ANGELO; JORGE, 2007).

A vanilina representa um dos aromatizantes mais importantes do mundo, sendo largamente utilizada em alimentos como bolos, doces, sorvetes, chocolates, bebidas e em perfumes, tabacos e fármacos (BAQUEIRO-PENA; GUERRERO-BELTRÁN, 2017).

Ohta foi o primeiro pesquisador a descobrir, em 1986, que a vanilina tem a capacidade de reduzir as mutações causadas pelos agentes químicos 4-nitroquinolina 1-oxide (4-NQO) e furilfuramida (AF-2) em bactérias (OHTA *et al*.,1986). Posteriormente, foi descoberto que a vanilina era capaz de inibir

também mutações espontâneas em bactérias (FLORA *et al*.,1994; SHAUGHNESSY; SETZER; DEMARINI, 2001).

Imanishi e colaboradores constataram que a vanilina reduz significativamente as mutações causadas por radiação ultravioleta, raios-X e etilnitrosoureia também em células de mamíferos (células V79 pulmonares de hamster) (IMANISHI *et al*.,1990). Adicionalmente, a vanilina tem a capacidade de suprimir a metástase de células de câncer de mama em ratos (LIRDPRAPAMONGKOL *et al*., 2005) e atenua a expressão dos níveis de citocinas pró-inflamatórias, tais como TNF-α, IL-1β e IL-6, em ensaios com ratos (MAKNI *et al*., 2011).

O grupo aldeído presente na estrutura da vanilina possui elevada reatividade e, como consequência, muitos derivados da vanilina são originados por reações que têm este grupo como centro reativo. Dentre os derivados, as bases de Schiff, formadas pela condensação da amina primária com o aldeído vanilina, se destacam nesse trabalho. Reações com a vanilina para a formação de bases de Schiff possibilitam diversas aplicações na área da química e da biologia (SABAA; MOHAMED; ORABY, 2009), com elevado potencial em atividades antibacterianas e antitumorais (ZHANG; WANG; DING, 2010).

A vanilina também possui em sua estrutura o grupo vanilóide – constituído pelo anel aromático e os grupos substituintes metoxi e fenol – o qual apresenta importantes atividades em sistemas biológicos. Compostos que, semelhantemente à vanilina, possuem o grupo vanilóide em suas estruturas, normalmente favorecem a apoptose, além de apresentarem importantes características antioxidantes e antimicrobianas (MEDEIROS, 2014).

2.4 RESVERATROL

O resveratrol, um importante polifenol, presente especialmente na uva e seus derivados, vem sendo amplamente estudado devido seus vários benefícios à saúde. Entre eles, está a capacidade antioxidante (SAUTTER *et al*., 2005).

O resveratrol é um composto químico que pertence à classe dos estilbenos e consiste em dois anéis aromáticos unidos por um grupo vinila. A

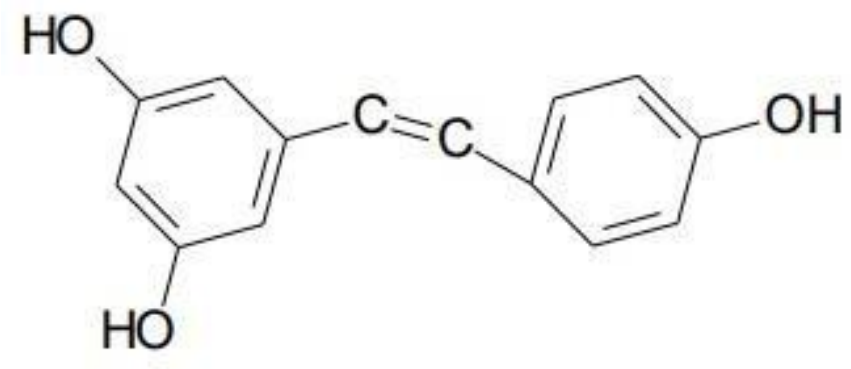
nomenclatura da IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry) para o resveratrol é 3,4',5-triidroxi-estilbeno (Figura 5), embora seja também conhecido como 3,4',5-estilbenotriol. Sua fórmula química é C14H12O3 e sua massa molar é 228,25 $g.mol^{-1}$ (LU *et al*., 2009).

O resveratrol (Figura 5) é uma fitoalexina fenólica natural, produzido por uma variedade de espécies vegetativas em resposta a estresses exógenos, como lesões, infecções fúngicas ou radiação UV. É formado por meio de uma reação de condensação entre três moléculas de malonil-CoA e uma molécula de 4-coumaroil-CoA, catalisada pela resveratrol sintase, que também gera quatro moléculas de CO_2 (DAS; NG; HO, 2010).

Vários estudos têm comprovado os benefícios do resveratrol à saúde. Esse composto tem demonstrado propriedades quimiopreventivas, antioxidantes, antiplaquetárias, antifúngicas, anti-inflamatórias, analgésicas, cardioprotetoras e neuroprotetoras (BAUR; SINCLAIR, 2006; DAS; NG, 2009; LUCAS-ABELLÁN *et al*., 2007; RASTIJA; MEDIC-SARIC, 2009).

O resveratrol é um composto biologicamente ativo, o qual representa uma parte importante dos mecanismos de defesa das plantas (ALVES *et al*., 2015), ou seja, é um composto químico de baixo peso molecular e antimicrobiano que é produzido pelas plantas (MAZARO, 2008).

Figura 5: Estrutura do resveratrol.



Fonte: RESEARCH GATE. Disponível em: https://www.researchgate.net/figure/Structure-of-resveratrol_fig15_221965359. Acesso em: 22 de fevereiro de 2021.

O resveratrol age com efetor biológico pleiotrópico, que regula as três fases do processo da carcinogênese, o início, a promoção e a progressão do

tumor. Uma vez absorvido, pode atuar por diferentes mecanismos, como a inibição da ativação metabólica de compostos carcinogênicos, o estímulo da detoxificação de metabólitos reativos, a prevenção do DNA celular e a supressão da progressão do tumor (NEMEN; LEMOS-SENNA, 2011).

O resveratrol possui algumas propriedades farmacológicas que estão relacionadas com diferentes mecanismos de ação. Entretanto, os efeitos “anti-iniciação” da gênese do tumor produzidos pelo resveratrol parecem estar relacionados essencialmente com suas habilidades antioxidante e redutora de radicais livres (RENAUD; LORGERIL, 1992; RICHARD, 1987).

A capacidade protetora do resveratrol está relacionada ao atuar como ligante dos receptores da dioxina, mecanismo esse que confere um papel cardioprotetor e, possivelmente, esteja relacionado com o seu efeito antitumoral (CASPER *et al*., 1999; CIOLINO; DASCHNER; YEH, 1998).

2.5 VENENO DE *LACHESIS MUTA MUTA*

Os venenos são encontrados em várias espécies de seres vivos, desde organismos unicelulares a pássaros (DUMBACHER; SPANDE; DALY, 2000; RUSSEL; DART, 1991). De acordo com a presença ou a ausência de estruturas especializadas para injetá-lo, estes organismos podem ser classificados como animais peçonhentos ou não-peçonhentos, respectivamente.

Nos primeiros, o veneno é produzido por glândulas especializadas como um complexo enzimático de finalidades principalmente digestivas com atividades tóxicas que neutralizam e matam a presa durante a captura, acrescido de um efeito defensivo contra predadores (BRASIL, 1996). No caso das serpentes, estas apresentam ainda um órgão sensorial importante que é a fosseta loreal – um sensor térmico muito desenvolvido – situado entre a narina e os olhos. Através desse sensor, a serpente pode localizar a sua presa em ambientes escuros apenas pela captação do calor (NOGUEIRA; SAKATE, 2004).

Entre os anos de 2000 e 2015, ocorreram aproximadamente 250 mil acidentes com serpentes no Brasil, dos quais, cerca de 100 mil casos foram classificados entre moderados e graves (SINAN, 2017).

Por conta do alto número de ocorrências, este tipo de agravo pertence à Lista de Notificação Compulsória (LNC) brasileira, mencionado na Portaria no

204, de 17 de fevereiro de 2016. De acordo com os dados disponíveis no site do Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN), plataforma digital disponibilizada pelo Ministério da Saúde, que contém uma série de indicadores valiosos para análises em saúde, no período entre 2007 e 2015 foram notificados mais de 7.000 acidentes com *Lachesis muta muta*, e dentre eles, aproximadamente 50 óbitos (SINAN, 2017).

Em geral, as vítimas de acidentes laquéticos podem apresentar: dor agonizante e latejante no local, edema e inflamação nos primeiros minutos, além de distúrbios hemorrágicos, náuseas, vômito, cólica abdominal, diarreia, mau funcionamento dos rins, sudorese, hipotensão, bradicardia e choque (JORGE *et al.*, 1997; PARDAL *et al.*, 2007; SOUZA, 2009). O veneno de serpentes contém uma infinidade de substâncias com estruturas simples e complexas, cuja proporção e características individuais variam com a espécie (VARANDA; GIANNINI, 1994).

As peçonhas das serpentes são constituídas por três grupos de compostos: proteínas, compostos orgânicos de baixo peso molecular e compostos inorgânicos. O veneno laquético é constituído principalmente por componentes de natureza proteica que são agrupadas em poucas famílias de proteínas. Sendo assim, as proteínas encontradas no veneno da serpente *Lachesis muta* são distribuídas em 8 famílias diferentes: Peptídeos Potenciadores de Bradicinina (BPPs), fatores de crescimento do nervo, Fosfolipase A_2 (PLA_2), serinoproteases, proteínas secretórias ricas em cisteína (CRISP), lectinas-*símile* do tipo-C, L-aminoácido oxidase (LAAO) e metaloproteinases dependente de Zn^{2+} (SANZ *et al.,* 2008).

No veneno laquético há pelo menos duas metaloproteinases bem conhecidas: o LHF-I (fator I), que é uma proteína ácida, de alto peso molecular (100 kDa), com alta atividade hemorrágica (RUCAVADO *et al.*,1999) e o LHF-II (fator hemorrágico II), proteína de 22 kDa e com fraca atividade hemorrágica. Estas metaloproteinases são chamadas de hemorraginas. A combinação de desfibrinação e lesão direta da parede do vaso podem levar a hemorragias maciças e potencialmente fatais. Algumas metaloproteinases inibem a coagulação do sangue. A maioria das metaloproteinases são fibrinogenases e elas clivam peptídeos da região C terminal do fibrinogênio. São classificadas em

“a” e “b”-fibrinogenases. A a-fibrogenase inibe a coagulação do sangue porque o fibrinogênio “truncado” não forma um coágulo de fibrina tão forte como o fibrinogênio nativo. Desta forma, uma sutil destruição física do fibrinogênio leva à ação anticoagulante das metaloproteinases (SANZ *et al.*, 2008).

Seu veneno apresenta atividade proteolítica provocando intensas reações nos locais das picadas; altera a coagulação sanguínea e é capaz de promover hemorragias. Seu veneno tem ação parecida com a ação da toxina botrópica diferenciando-se na sintomatologia com a toxina laquética causando diarreias, bradicardia, hipotensão arterial e choque (DANTAS; SILVA; SILVA, 2022). “O Amazonas é um estado grande, com maior dificuldade de deslocamento e grandes áreas muito distantes dos polos de atendimento, mas a maior parte da população é mais concentrada, como nas regiões de Manaus e Parintins, por exemplo (DANTAS; SILVA; SILVA, 2022). Ou seja, muitas vezes é uma distância urbana que se tem que percorrer para acessar os soros. E aponta uma situação distinta no estado do Maranhão que segundo Dantas “a população é mais dispersa no território e há grandes proporções de população distantes dos polos de atendimento, por isso é que se tem quase 30% da população local há mais de duas horas de distância do atendimento”. Levantando uma problemática na distribuição e consequentemente no socorro às vítimas.

O tratamento é feito com o soro específico para cada tipo de envenenamento. Os soros antiofídicos específicos são o único tratamento eficaz e, quando indicados, devem ser administrados em ambiente hospitalar e sob supervisão médica (SECRETARIA DA SAÚDE, 2021).

Tratamento específico é o soro antilaquético (SAL), ou antibotrópico-laquético (SABL), que deve ser utilizado por via intravenosa. Nos casos de acidente laquético comprovado e na falta dos soros específicos, o tratamento deve ser realizado com soro antibotrópico, apesar deste não neutralizar de maneira eficaz a ação coagulante do veneno laquético (BRASIL, 2005).

O tratamento é feito com a aplicação do soro (antiveneno) específico para cada tipo de acidente, de acordo com a gravidade do envenenamento. Moderado: quadro local presente, pode haver sangramentos, sem manifestações vagais, deve ser aplicado 10 ampolas. Grave: quadro local

intenso, hemorragia intensa com manifestações vagais, deve ser aplicado 20 ampolas (BRASIL, 2005).

Durante a infusão e nas primeiras horas após a administração do soro, o paciente deve ser rigorosamente monitorado para a detecção precoce da ocorrência de reações, tais como urticária, náuseas/vômitos, rouquidão e estridor laríngeo, broncoespasmo, hipotensão e choque. Uma vez diagnosticada a reação, a soroterapia deve ser interrompida e posteriormente reinstituída após tratamento da anafilaxia (BRASIL, 2005).

Reações tardias (doença do soro) podem ocorrer uma a quatro semanas após a soroterapia, com urticária, febre baixa, artralgia e adenomegalia. Não há evidências de que fármacos (anti-inflamatórios, heparina) neutralizem os efeitos dos venenos.

O sucesso do tratamento contra picada de serpente depende no tempo entre a picada e o tratamento adequado (LIMA; HADDAD JUNIOR, 2015), o que pode auxiliar principalmente na identificação da serpente. Na função da terapia inexpressiva eficácia do antiveneno botrópico não específico (BARD *et al*., 1994), antivenenos polivalentes de *Bothrops/Crotalus* (JORGE *et al.,* 1997), antiveneno de *Bothrops atrox* (COLOMBINI *et al.*, 2001), e devido ao difícil captura e manutenção em cativeiro — ou porque essas mordidas são raras ou não relatadas – a produção de antiveneno específico para *L. m. muta* não é viável, razão pela qual uma mistura de venenos de *Bothrops-Lachesis* são usados (cada mL deste antiveneno neutraliza pelo menos 5,0 mg de *Bothrops sp*. veneno de referência e 3,0 mg de *L. m. muta* veneno de referência). Além disso, sabe-se que os venenos de serpente podem compartilhar tanto um antigênico (IBRAHIM; EL-KADY, 2016) quanto as outras reatividades cruzadas de anticorpos (LEDSGAARD *et al.*, 2018).

As frações isoladas do veneno de *L. m. muta* ajudaram a entender a fisiopatologia do envenenamento e para o uso do antiveneno de *Bothrops-Lachesis*, abrindo uma ampla janela terapêutica para inúmeras aplicações (PILON; FRANCO, 2021).

2.6 ELETROFORESE EM GEL – SDS-PAGE

A eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) é relativamente simples e de baixo custo, possibilitando a visualização de concentrações proteicas extremamente baixas e a identificação de 20 a 30 proteínas, requerendo microquantidade de amostra (GORDON, 1995). Essa técnica tem sido utilizada para obtenção do proteinograma em diversas espécies (FAGLIARI *et al.*, 1998; SAQUETTI *et al.*, 2008).

A eletroforese é um método relacionado à migração de partículas carregadas em um determinado meio, sob a influência de uma diferença de potencial. A mobilidade eletroforética da molécula ou partícula carregada é influenciada, entre outros fatores, pela carga, pela massa molecular e pela concentração da mesma (WESTERMEIER, 2005).

A eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) é um método de separação clássico, que com a ajuda de técnicas de digitalização e análise de imagens, permite a quantificação das bandas dos géis, e assim, fornece boa separação, alta resolução e precisa quantificação, levando a resultados precisos e reprodutíveis (LIN *et al.*, 2010). Além disso, apresenta vantagens de ser uma técnica de separação de fácil execução, rápida e de baixo custo (AMIGO *et al.*, 1991).

A PAGE na presença do desnaturante dodecil sulfato de sódio (SDS) é uma técnica bastante utilizada no estudo de proteínas para a determinação da massa molecular ou tamanho das proteínas e é capaz de separar essas moléculas de tamanhos moleculares entre 5-150 kDa em um único gel (CONSIDINE *et al.*, 2007).

A incubação das amostras proteicas com SDS e um agente redutor, como o β-mercaptoetanol, que promove o rompimento das ligações dissulfeto das proteínas facilitando o acesso do SDS, conduz a uma normalização da carga e da forma das proteínas, de modo que o elemento de distinção entre essas moléculas passa a ser a massa molecular (SILVA JUNIOR, 2001). A maioria das proteínas apresenta mobilidade em tampão contendo SDS e o uso desta técnica permite a determinação das massas moleculares de proteínas através da

relação linear existente entre o logaritmo de massas moleculares conhecidas (padrão) e a mobilidade eletroforética das mesmas (WESTERMEIER, 2005).

A identificação das proteínas separadas por SDS-PAGE pode ser realizada pela comparação da sua mobilidade no gel e da massa molar de proteínas padrão, assim como pela comparação de eletroferogramas de estudos prévios (HERNÁNDEZ; HARTE, 2009; HOLLAND *et al.*, 2010; JOVANOVIC *et al.*, 2007).

2.7 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).

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).

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 (MORTELMANS; ZEIGER, 2000; UMBUZEIRO; VARGAS, 2003).

3 OBJETIVOS

3.1 GERAL

Avaliar o potencial antimutagênico da vanilina e da betulina (*D. alata*) através do ensaio *Salmonella*/microssoma, utilizando-se o resveratrol como referência.

Avaliar os efeitos da farinha do fruto de baru sobre o bloqueio neuromuscular e a miotoxicidade, eletroforese e dosagem de proteínas induzidos pelo veneno da *L. m. muta*.

3.2 ESPECÍFICOS

Avaliar o potencial antimutagênico da vanilina e da betulina (*D. alata*) através do ensaio *Salmonella*/microssoma, utilizando-se o resveratrol como referência.

Avaliar o efeito da farinha do fruto de baru sobre o bloqueio neuromuscular e a miotoxicidade induzidos pelo veneno da *L. m. muta*, em preparações nervo frênico diafragma de camundongos e modelos farmacológicos de pré incubação, pré veneno e pós veneno.

Realizar a análise histológica de músculos diafragma resultantes dos experimentos farmacológicos, do modelo que melhor protegeu contra o bloqueio neuromuscular induzido pelo veneno.

Separar, quantificar e identificar as proteínas presentes no veneno de *L. m. muta*, na farinha do Baru e em sua neutralização (veneno + farinha).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 VANILINA, BETULINA E RESVERATROL

Pela quantidade obtida do isolamento de vanilina e betulina da *D. alata* (PUEBLA *et al*., 2010) optou-se por adquirir este composto comercialmente do laboratório Sigma Chemical Co.® (St. Louis, MO, USA). O resveratrol (grau de pureza 98,7%) foi obtido da farmácia de manipulação Phito Fórmulas (Sorocaba, SP, Brasil).

4.2 FARINHA DO FRUTO DO BARU

A farinha do fruto do Baru é comercializada como Baruzeiro, chocolate do Baru, polpa do fruto do baru, extraída da *Dipteryx alata* pelo Engenheiro Agrônomo Cesar Augusto Sandri, fazenda Babilônia, Mineiros, Goiás, Brasil. A farinha de Baru foi inicialmente tamisada (48 Mesh) para posterior pesagem e uso nos ensaios.

4.3 VENENO DE *Lachesis muta muta*

O veneno de *L. m. muta* foi fornecido pelo professor Dr. Rafael S. Floriano, Universidade do Oeste Paulista, SP, Brasil; coletado e certificado pelo Dr. Nelson J. da Silva Jr. do Centro de Estudos e Pesquisas Biológicas da Universidade Católica de Goiás (Goiânia, GO). O veneno foi fornecido na forma liofilizada e soluções foram preparadas em solução nutritiva de Tyrode no momento do uso. O lote do veneno foi registrado no Sisgen sob no. A843915.

4.4 ANIMAIS

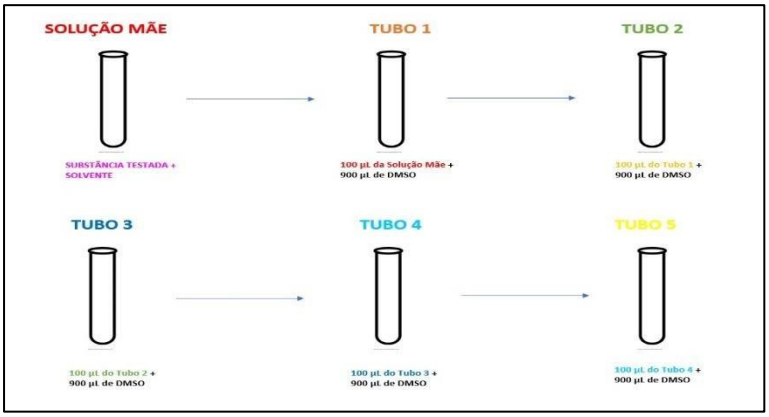
Camundongos machos pesando entre 25-30g, da linhagem Swiss foram adquiridos na Anilab - Animais de Laboratório (Paulínia, SP) e ambientados em gaiolas no biotério do Apoio 2 da Universidade de Sorocaba. Foram colocados 4 camundongos/gaiola com exaustão e ventilação apropriada (sistema de

microventilação ambiental, Smaflex®), com ciclos de claro/escuro de 12 em 12 horas controlados por timer. Os animais foram acomodados em camas de maravalha livre de substâncias químicas e receberam ração e água *ad libitum*. O projeto foi submetido à Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA da Universidade de Sorocaba – SP, com o número do protocolo 192/2020, aprovado em 08/10/2020.

4.5 ENSAIO DE VIABILIDADE

Este teste é necessário para determinar a concentração a ser utilizada no teste de antimutagenicidade evitando a obtenção de resultados falsos positivos em decorrência de toxicidade. Utilizou-se o procedimento de Espanha (2014) para o teste de viabilidade, onde foi feita uma solução mãe de vanilina de 50 mg/500 µL de dimetil sulfóxido (DMSO). Em seguida, com essa solução mãe foi feita uma diluição seriada da seguinte forma: 100 µL da solução mãe foi completada com 900 µL com DMSO, agitando em vórtex para ter uma concentração de 0,5 mg/placa. Dessa diluição foi pipetado 100 µL da solução e novamente completada com DMSO até atingir 1000 µL, agitando em vórtex, para ter uma concentração de 0,05 mg/placa. O processo de diluição foi repetido até obter-se uma concentração de 0,00005 mg/placa (Figura 6). O mesmo procedimento foi utilizado com a betulina e com o resveratrol para obter a diluição seriada.

Figura 6. Esquema da solução mãe.

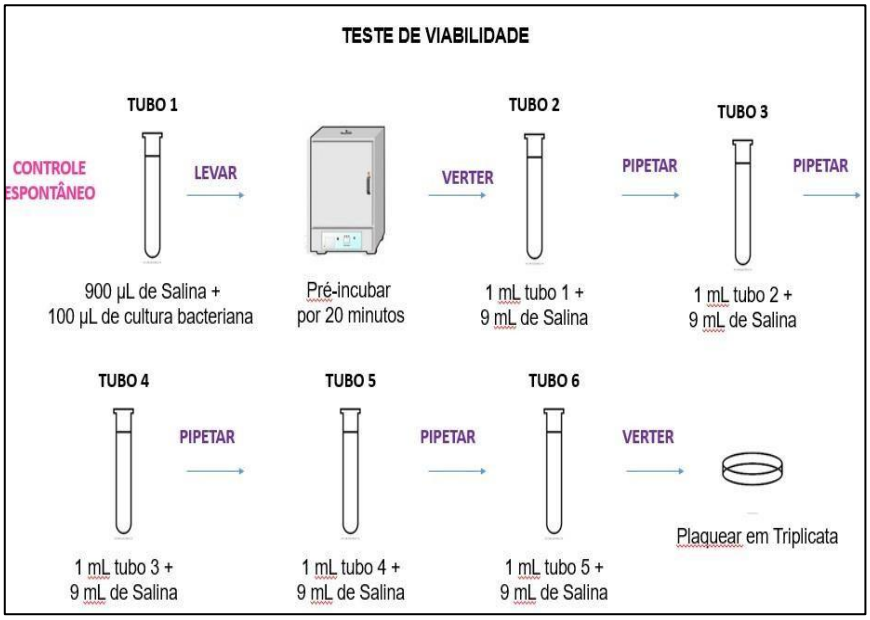


FONTE: Elaboração própria.

Após a diluição seriada foi realizado o teste de viabilidade. Os ensaios foram realizados em triplicata. Todos os ensaios foram realizados com controles,

O Controle Espontâneo consistiu em 900 µL de salina + 100 µL de cultura bacteriana (Figura 7).

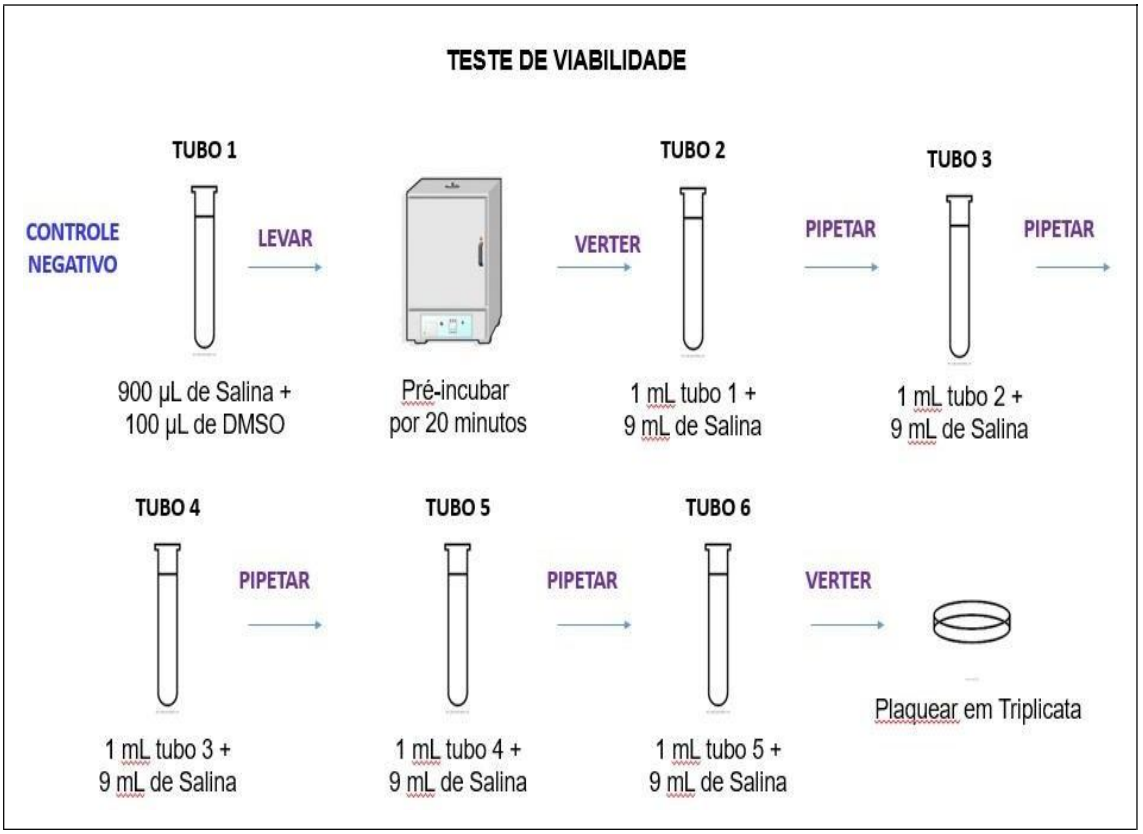
Figura 7. Esquema da viabilidade do controle espontâneo.



FONTE: Elaboração própria.

O Controle Negativo consistiu de 800 µL de salina + 100 µL de DMSO + 100 µL de cultura bacteriana (Figura 8).

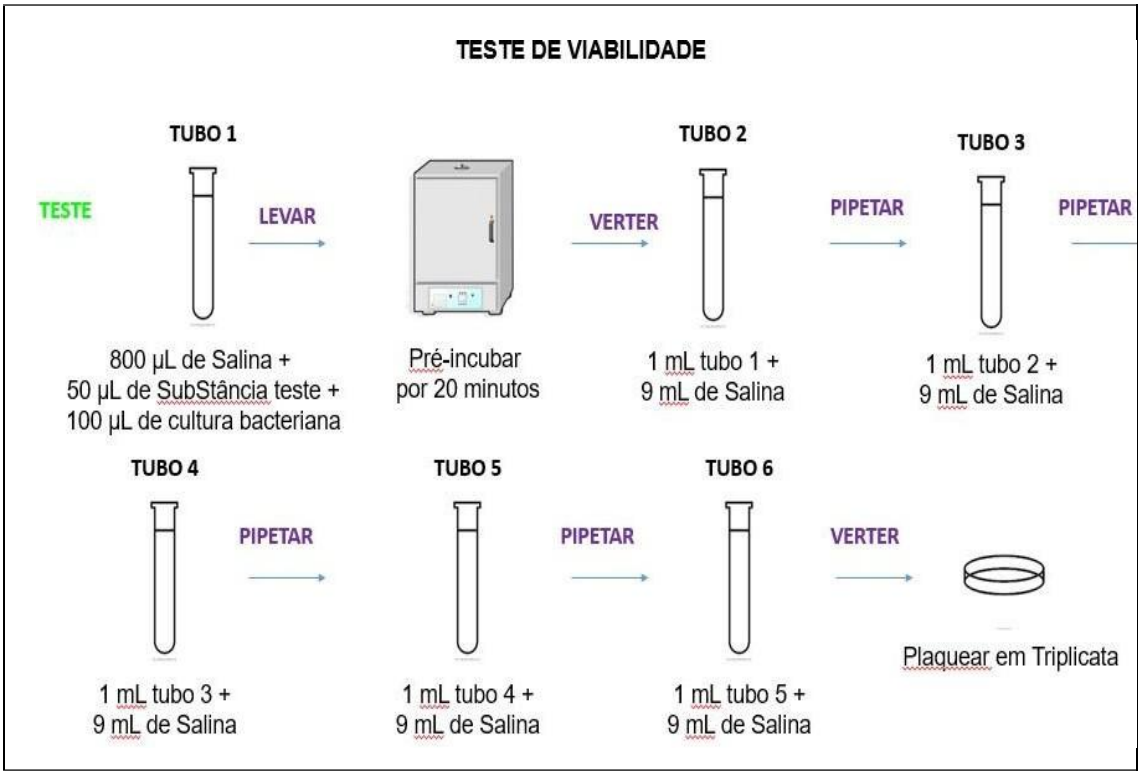
Figura 8. Esquema da viabilidade do controle negativo.



FONTE: Elaboração própria.

A Figura 9 ilustra as quantidades utilizadas nos testes seguintes com Vanilina, Betulina e Resveratrol. **Teste Vanilina:** 800 µL de salina + 50 µL de vanilina (50 mg⁄500 µL de DMSO) + 50 µL de mutágeno (NPD ou Azida Sódica) + 100 µL de cultura bacteriana; **Teste Betulina:** 800 µL de salina + 50 µL de betulina (50 mg⁄500 µL de DMSO) + 50 µL de mutágeno (NPD ou Azida Sódica) + 100 µL de cultura bacteriana; **Teste Resveratrol:** 800 µL de salina + 50 µL de resveratrol (50 mg ⁄ 500 µL de DMSO) + 50 µL de mutágeno (NPD ou Azida Sódica) + 100 µL de cultura bacteriana; Todos os tubos foram pré incubados a 37ºC por 20 minutos. Após a pré incubação, foram homogeneizados em vórtex, flambados e vertidos em um tubo com 9 mL de salina. Seguiu-se o mesmo procedimento agitando em vórtex e adicionando 1 mL da solução em 9 mL de salina. Foi pipetado 100 µL em um novo tubo com 1 mL de Top Ágar suplementado com solução de Biotina⁄Histidina. Foi agitado em vórtex, flambado, vertido em placa e incubado em estufa a 37ºC por 48 horas. Feito isso, as colônias foram contadas e calculadas as unidades formadoras de colônias (UFC).

Figura 9. Esquema da viabilidade da substância teste (Vanilina, Betulina, Resveratrol).



FONTE: Elaboração própria.

O percentual de viabilidade para cada tratamento foi comparado com o número de colônias do controle negativo. As respostas foram consideradas citotóxicas quando o percentual de sobrevivência da amostra foi inferior a 80% do total observado para o controle negativo.

4.6 ENSAIOS DE ANTIMUTAGENICIDADE *Salmonella* Typhimurium

Os referenciais teóricos utilizados neste estudo basearam-se em estudos prévios que demonstraram que a vanilina e betulina não foram mutagênicas pelo ensaio *Salmonell*a/microssoma tanto na ausência (-S9) como na presença (+S9) de ativação metabólica (YOSHIDA *et al*., 2015; 2016), o que as tornam fortes candidatas para o teste de antimutagenicidade. Assim, utilizou-se o procedimento descrito do teste de mutagenicidade *Salmonella*/microssoma (MARON, AMES, 1983), com a diferença que para o teste de antimutagenicidade, os controles positivos de cada linhagem foram incubados com a vanilina e a betulina, para avaliar o grau de inibição do crescimento de colônias induzido por ela. Utilizou-se como referência o resveratrol, pois já foi

testado no mesmo ensaio de mutagenicidade em bactérias *Salmonella*/microssoma e *Escherichia coli*, ensaio cometa e aberração cromossômica, não apresentando genotoxicidade em nenhum desses ensaios (JEONG *et al*., 2014). Os ensaios foram realizados em triplicata. Todos os ensaios foram rigorosamente submetidos a controles, como descrito a seguir: **Controle positivo:** 500 µL de Tampão Fosfato pH = 7,4 + 50 µL de mutágeno (NPD, Azida Sódica ou Mitomicina C) + 100 µL de cultura bacteriana; **Controle Negativo:** 500 µL de Tampão Fosfato pH = 7,4 + 100 µL de dimetilsulfóxido (DMSO, Sigma®) ou S9 (Moltox®) + 100 µL de cultura bacteriana; **Controle Espontâneo:** 500 µL de Tampão Fosfato pH = 7,4 + 100 µL de cultura bacteriana; **Teste:** 500 µL de Tampão Fosfato pH = 7,4 + 50 µL de mutágeno (NPD, Azida Sódica ou Mitomicina C) + vanilina (diferentes concentrações da diluição seriada,) + 100 µL de cultura bacteriana. O mesmo procedimento foi realizado com a betulina e com o resveratrol.

Os mutágenos utilizados (controles positivos) na ausência de ativação metabólica foram 4-nitro-O-fenilenodiamina para as linhagens TA97a e TA98; azida sódica para TA100; e mitomicina para TA102. Na presença de sistema microssomal (+S9) o mutágeno foi o 2-aminoantraceno (2-antramina) para todas as linhagens.

Os resultados de antimutagenicidade foram expressos por porcentagem de inibição, ou seja, a capacidade dos compostos em inibir a ação do agente mutagênico conhecido, conforme a equação 1 (LOH; ER; CHEN, 2009; TACHINO *et al*., 1994).

$$\text{Inibição (\%)} = 100 - [(T/M) \times 100] \quad \text{(equação 1)}$$

Onde T é o número de colônias revertentes em uma placa contendo mutágeno e amostra e M é o número de colônias revertentes em uma placa contendo apenas o mutágeno sozinho.

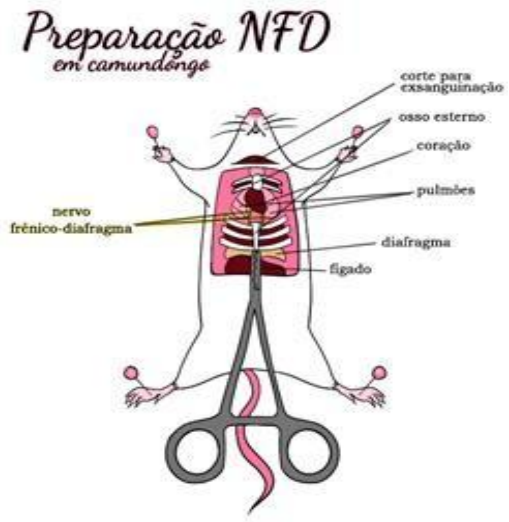
A ausência de efeito antimutagênico é constatada quando o porcentual de inibição for inferior a 25%; o efeito será moderado quando o porcentual de inibição estiver entre 25 – 40% e, será um forte antimutagênico quando o

porcentual de inibição foi superior a 40% (LIRA *et al*., 2008; NEIGI; JAYAPRAKASHA; JENA, 2003).

4.7 PREPARAÇÃO NERVO FRÊNICO-DIAFRAGMA DE CAMUNDONGOS

A preparação nervo frênico-diafragma (BÜLBRING, 1997) adaptada para camundongo foi cuidadosamente isolada após anestesia do animal com isoflurano (100 mg/mL, BioChimico, Itatiaia, RH, Brasil) e sacrificado por exsanguinação (Figura 10).

Figura 10. Isolamento da preparação do nervo frênico-diafragma.



Fonte: Isabella Ravazolli, 2020.

A preparação foi removida e montada sob uma tensão de 5 g/cm em um banho com 5 mL de capacidade aerada com carbogênio (95% O_2/5% CO_2, White Martins – Sorogases, Sorocaba, São Paulo, Brasil) e contendo solução de Tyrode (controle) com a seguinte composição (mM): NaCl 137; KCl 2,7; $CaCl_2$ 1,8; $MgCl_2$ 0,49; NaH_2PO_4 0,42; $NaHCO_3$ 11,9; e glicose 11.1, em pH ajustado para 7,0. As preparações foram estimuladas indiretamente com estímulos supramaximais (limiar de 4X, 0,06 Hz, 0,2 ms) fornecidos a partir de um estimulador (modelo ESF-15D, Ribeirão Preto, Brasil). A força de contração medida através de transdutor isométrico (cat. 7003, Ugo Basile, Itália) foi registrada pelo sistema digital (Data Capsule, cat. 17.400, Ugo Basile, Itália) contendo um pré-amplificador básico (cat. 7080, Ugo Basile, Itália), acoplado a

um computador através de uma interface USB para o armazenamento de dados. As preparações foram estabilizadas por pelo menos 20 min antes do início dos experimentos, cujos protocolos são mostrados na tabela 1.

Tabela 1. Protocolos farmacológicos estimados

Protocolo	Número de experimentos/Quantidade de veneno	Animais
Treinamento	n=6	6
Controle Tyrode	n=6	3
Controle farinha de baru	3 concentrações (200; 500 e 1000 µg/mL) n=6 cada	9
Controle Veneno	2 concentrações (100 e 150), de acordo com Damico et al. (2005), n=6 cada. Quantidade de veneno estimada=7500 µg	6
Pré incubação	n=6. Quantidade de veneno estimada=4500 µg	3
Pré veneno	n=6. Quantidade de veneno estimada=4500 µg	3
Pós veneno	n=6. Quantidade de veneno estimada=4500 µg	3
	Quantidade de veneno = 21000 µg = 21 mg	33

FONTE: Elaboração própria.

Método Pré Incubação: Incuba-se a mistura veneno 100 µg/mL + Farinha de Baru 1000 µg/mL por 30 minutos sob proteção da luz. Após a pré incubação adiciona-se a mistura à cuba contendo a preparação neuromuscular (n=6). O objetivo deste protocolo foi verificar a atenuação dos efeitos tóxicos (bloqueio neuromuscular e miotoxicidade) do veneno pela farinha de Baru;

Método Pré Veneno: Adiciona-se a Farinha do Baru 1000 µg/mL à cuba contendo a preparação neuromuscular e após 10 minutos adiciona-se o veneno 100 µg/mL (n=6). O objetivo deste protocolo foi verificar se a farinha de Baru teria algum efeito preventivo ao ser administrado antes do veneno;

Método Pós Veneno: Adiciona-se o veneno 100 µg/mL à cuba contendo a preparação neuromuscular e após 10 minutos adiciona-se a Farinha do Baru 1000 µg/mL (n=6). O objetivo deste protocolo foi simular o acidente ofídico, com a administração de farinha de Baru após a deflagração dos efeitos pelo veneno. Na prática, após o tempo de estabilização da preparação neuromuscular retiraram-se 500 µL de Tyrode para dissolver os 500 µg de veneno, que após isso, foram adicionados novamente à cuba e monitorados por 10 minutos até estabilizar. Em seguida foi retirado 2,5 mL da solução da cuba para dissolver a farinha de Baru e após isso, essa solução foi colocada novamente na cuba.

4.8 ANÁLISE HISTOLÓGICA

O ensaio farmacológico que melhor protegeu contra o bloqueio neuromuscular induzido pelo veneno de *L. m. muta*, foi quali- e quantitativamente analisado por microscopia de luz e comparado com o controle Tyrode, veneno e farinha do baru. Para isso, foram selecionadas três preparações que foram fixadas em solução de formalina 10% e processadas através de métodos histológicos de rotina. Secções de 5 µm das preparações foram coradas com hematoxilina-eosina 0,5% (peso/volume) para posterior análise microscópica e quantificação do dano. Etapas do processamento: colheita, fixação, desidratação, diafanização, impregnação, inclusão, microtomia, coloração, montagem e observação.

4.9 PROTOCOLO DE ROTINA

- Lavagem: Foram lavadas as lâminas 1h antes do processamento de desidratação em água corrente.
- Desidratação: Em pote de fundo longo foram deixadas as peças 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 foram deixadas as peças por 1 h em xilol I e 1 h em xilol II.
- Inclusão: Logo após esse primeiro preparo foi aquecido e mantido o Paraplast® (Sigma-Aldrich, Jurubatuba, Brasil) em torno de 56 ºC, 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 foram cortados em micrótomo (Criostato 300 Ancap®, São Paulo, Brasil).
- Banho-Maria: Os cortes foram distendidos em água aquecida a 56 ºC em banho histológico (Ancap®, São Paulo, Brasil), para evitar microdobras.
- Pescagem: As lâminas foram mergulhadas no banho-maria para coletar o material.
- Coloração: Após a secagem das lâminas iniciou-se a coloração.

4.10 COLORAÇÃO DE HEMATOXILINA/EOSINA

Após o processamento foi deixado 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 (Interlab, São Paulo, Brasil), 3 min em água corrente, 1 min na eosina (Interlab, São Paulo, Brasil), 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 foi feita a montagem com Entellan® (Merck, São Paulo, Brasil) e finalizado com lamínula.

4.11 MICROSCOPIA ÓPTICA

Após a montagem, foi feita a análise das lâminas em microscópio óptico. Para realizar a contagem das células foram definidas três linhas aleatórias e virtuais. Após análise quantitativa do material histológico, o corte da lâmina fidedigno à análise quantitativa foi selecionado para a documentação fotográfica dos resultados obtidos, utilizando-se o fotomicroscópio Zeiss AXIOSTAR Plus (Oberkochen, Alemanha). As fotos foram retiradas em um aumento de 400x (objetiva de 40x, onde uma barra de 1 cm=50 µm) com a câmera fotográfica digital Iphone 7 com 12 megapixels e Samsung A71 com 64 megapixels de resolução.

As contagens (triplo cego) das células foram realizadas por 3 examinadores, seguindo critérios estabelecidos onde cada pessoa fez 72 leituras, sendo no total 216 leituras de 72 lâminas, divididas entre os grupos farmacológicos: Farinha de Baru (1000 µg/mL), Controle Tyrode, Veneno *L. m. muta* (100 µg/mL) e a pré incubação (farinha de baru + veneno de *L. m. muta).* Definem-se os padrões de células normais, apresentando estrutura poligonal integra e núcleo periférico, ambos bem evidenciados. O dano celular (edema, lise de membrana, lesões delta, presença de vacúolos, células *ghost*, condensação 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).

4.12 ELETROFORESE SDS-PAGE

O ensaio foi realizado de acordo com a metodologia descrita por Laemmli (1970), no qual utilizou-se do perfil proteico do veneno analisado em eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE). Utilizou-se uma concentração de 4% no gel de aplicação e 10% no de separação (100V; 30 mA; 10W). As amostras do veneno (0,2 µg), da farinha (0,2 µg) e da neutralização (veneno - 0,2 µg + farinha 0,2 µg) foram aplicadas na presença de β-mercaptoetanol e paralelamente foi utilizado um padrão de massa molecular de 10 a 250 kD, Dual Color Precision Plus (Bio Rad). Foi utilizado para a coloração do gel de eletroforese Comassie-Bio Rad. Quando necessário reproduziu-se a metodologia.

4.13 COLORAÇÃO COMASSIE-BIO RAD

Após a corrida lavou-se o gel em água corrente por 5 minutos, repetindo o mesmo procedimento 3 vezes. Removeu-se a água e adicionou a coloração Comassie-Bio Rad, 50 mL por gel; agitou-se suavemente o gel por 1 hora. Foi lavado o gel por 30 minutos com água. Os géis podem ficar armazenados em água.

4.14 DOSAGEM DE PROTEÍNAS

A curva padrão foi desenvolvida com a Proteína Albumina do Kit Dosagem mono reagente proteínas totais, teste colorimétrico, Bioclin (Quibasa Química Básica Ltda., Belo Horizonte, MG, Brasil). Sua concentração inicial é de 4 g/dL, sendo necessário ajustar sua concentração para atingir a concentração proteica solicitada para a realização do método de Bradford (1976) de dosagem proteica. A concentração foi ajustada da seguinte forma, 50 µL da proteína em concentração conhecida (Albumina 4 g/dL) que foi diluída em 950 µL de Tyrode (solução nutritiva utilizada para conservar a viabilidade das preparações de NFD e solubilização do veneno) em *eppendorf* de 1,5 mL em temperatura ambiente, atingindo assim a concentração desejada de 2 mg/mL. A partir deste momento foram iniciadas as diluições necessárias para confecção da curva de calibração, seguindo as recomendações da literatura. Os volumes finais foram destinados a

uma cubeta de 2mL para leitura no espectrofotômetro UV-VIS MultiSpec-1501 Espectrofotômetro Shimadzu. Após a proteína entrar em contato com 1 mL do reagente de Bradford (Sigma-Aldrich) permanecendo em repouso por 5 minutos controlado por um cronômetro, procedeu-se à leitura da absorbância a 595 nm de cada tubo em triplicata nas cubetas. Quando necessário reproduziu-se a metodologia.

4.15 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados (revertentes/placas) foram analisados por Análise de Variância (Anova One-way) e, também, utilizou-se o método estatístico Salanal (Research Triangle Institute, RTP, North Carolina, USA). Os demais resultados foram expressos como média ± erro padrão da média. A significância das diferenças observadas foi determinada por Anova One-way, seguido do teste de Tukey, com valor $p < 0,05$, utilizando-se o software estatístico Origin 9.5 (OriginLab Corporation, Northampton, MA, USA).

5 RESULTADOS

Os componentes isolados da *Dipteryx alata*, betulina e vanilina não foram mutagênicas pelo ensaio *Salmonella*/microssoma na presença e ausência de ativação metabólica, o que as tornam fortes candidatas como antimutagênicas. Neste estudo buscou-se avaliar um novo potencial farmacológico a esses fitoquímicos, o de antimutagenicidade.

Os usuais mutágenos comumente utilizados no ensaio (com e sem ativação metabólica) foram empregados com o fitoquímico vanilina e betulina, tendo como referência o resveratrol. Porém, antes de aplicar o teste de antimutagenicidade é mandatória a avaliação do teste de viabilidade com o objetivo de determinar se as substâncias testes têm efeitos sobre a proliferação celular ou se apresentam efeitos citotóxicos diretos que eventualmente levam à morte celular. O teste de viabilidade deve demonstrar percentual de sobrevivência maior que 80% na maioria das concentrações e cepas, o que foi demonstrado neste trabalho utilizando TA98 e TA100 (tabela 2).

Tabela 2. Ensaio de viabilidade com as cepas TA98 e TA100.

Tratamento		**TA98**	**TA100**
Controles	C-	136.6 ± 8.3	85.6 ± 16.2
	Cs	177.6 ± 12.0	100.3 ± 3.2
Resveratrol	C1	5 ± 2 (3.6%) *	45.6 ± 6.9 (82.8%)
	C2	5 ± 3 (3.6%) *	76.6 ± 57.5 (111.6%)
	C3	152.6 ± 20 (111.7%)	102.3 ± 29 (83.6%)
Vanilina	C1	4.3 ± 4.1 (3.1%) *	110.3 ± 26.3 (128.7%)
	C2	4 ± 1 (2.9%) *	157.3 ± 12.8 (183.6%)
	C3	166 ± 6.5 (121.4%)	69.6 ± 18.5 (81.3%)
Betulina	C1	4.6 ± 29 (3.4%) *	45.6 ± 5,5 (53.3%) *
	C2	1.33 ± 1.1 (0.9%) *	76,66 ± 10,40 (89.4%)
	C3	166 ± 14 (121.4%)	102.3 ± 6.8 (119.4%)

Legenda: C-, controle negativo. Cs, controle espontâneo. C1=0,005 (ou $5x10^{-3}$); C2=0.0005 (ou $5x10^{-4}$); C3=0.00005 (ou $5x10^{-5}$). *, valores tóxicos.

FONTE: Elaboração própria.

Observando os resultados de TA98 e TA100, nota-se que valores > 80% ocorreram na diluição 0,00005 ($5x10^{-5}$) (C3), selecionada para experimentos posteriores. A cepa TA100 mostrou-se mais sensível que a TA98 aos compostos testados.

Após o teste de viabilidade realizou-se o teste de antimutagenicidade sem ativação metabólica (-S9) (tabela 3). As concentrações estudadas da vanilina e da betulina foram de 0,00005 a 0,005 mg/placa (3 concentrações), enquanto a de resveratrol de 0,00005 a 0,005 mg/placa (3 concentrações).

Tabela 3. Ensaio de antimutagenicidade na ausência de ativação metabólica (-S9), em $5x10^{-5}$

Cepas	Controles			Inibição da mutagenicidade (%)		
	C+	C-	Ce	**Resveratrol + Mutágeno**	**Vanilina + Mutágeno**	**Betulina + Mutágeno**
TA 97a	712.6 ± 43.9	82 ± 14	99.3 ± 36.3	368 ± 60.5 (48.3 %)	449.3 ± 0 (37.0 %)	515.6 ± 42.1 (27.6 %)
TA 98	719.3 ± 47.0	29.3 ± 10.2	22 ± 5.3	242.6 ± 23.7 (66.2 %)	605.3 ± 0 (16.0 %)	682.6 ± 44.0 (5.0 %)
TA 100	1240 ± 27.7	131.6 ± 23.4	139.6 ± 46.4	450.6 ± 67.3 (63.6 %)	930.6 ± 0 (25.0 %)	518.6 ± 8.3 (58.1 %)
TA 102	1204.6 ± 9.4	266.6 ± 90.1	213.3 ± 26.5	260 ± 27.2 (78.4 %)	1059 ± 0 (13.0 %)	553.3 ± 63.0 (54.0 %)

Legenda. C+: mutágenos na ausência de ativação metabólica (-S9) como NPD, 10 µg/placa para TA98 e TA97a; Azida de Sódio, 1,25 µg/placa para TA100; Mitomicina C, 0,5 µg/placa para TA102. Todos os mutagênicos estão na diluição de 10^{-5}.

FONTE: Elaboração própria.

Conforme descrito em Material e Métodos, verifica-se a ausência de efeito antimutagênico quando o percentual de inibição é inferior a 25%, conforme mostra a tabela 2 para vanilina e betulina contra NPD (TA98), e para vanilina para azida sódica (TA100) e mitomicina C (TA102). O efeito é moderado quando a porcentagem de inibição está entre 25 – 40%, como visto para vanilina usando TA97a e betulina usando TA97a. O efeito é um forte antimutagênico quando a porcentagem de inibição é maior que 40%, o que pode ser observado com betulina usando TA100 e TA102. O resveratrol de referência mostrou-se um forte antimutagênico na ausência de ativação metabólica.

A antimutagenicidade na presença de ativação metabólica é mostrada na tabela 4. Neste conjunto de experimentos, o 2-aminoantraceno foi usado como mutagênico para todas as cepas. Observe que a vanilina é um antimutagênico moderado apenas contra o TA102, enquanto a betulina é um antimutagênico forte, como o resveratrol.

Tabela 4. Ensaio de antimutagenicidade na presença de ativação metabólica (-S9), a $5x10^{-5}$

Cepas	Controles			Inibição da mutagenicidade (%)		
	C+	C-	Ce	**Resveratrol + Mutágeno**	**Vanilina + Mutágeno**	**Betulina + Mutágeno**
TA 97a	629.3 ± 74.3	82 ± 14	99.3 ± 36.3	130 ± 6.4 (79.3 %)	64 ± 7.2 (89.8 %)	78.0 ± 6.0 (87.6 %)
TA 98	810.6 ± 40.2	29.3 ± 10.2	22 ± 5.3	274.6 ± 21.8 (66.1 %)	14.6 ± 4.1 (98.1 %)	11.3 ± 5.0 (98.6 %)
TA 100	1024 ± 54.9	131.6 ± 23.4	139.6 ± 46.4	189.3 ± 5.2 (81.5 %)	230 ± 120 (77.5 %)	66 ± 12 (93.5 %)
TA 102	217.6 ± 18.7	266.6 ± 90.1	213.3 ± 26.5	88 ± 5.5 (59.5 %)	146 ± 6 (32.9 %)	98 ± 15 (54.9 %)

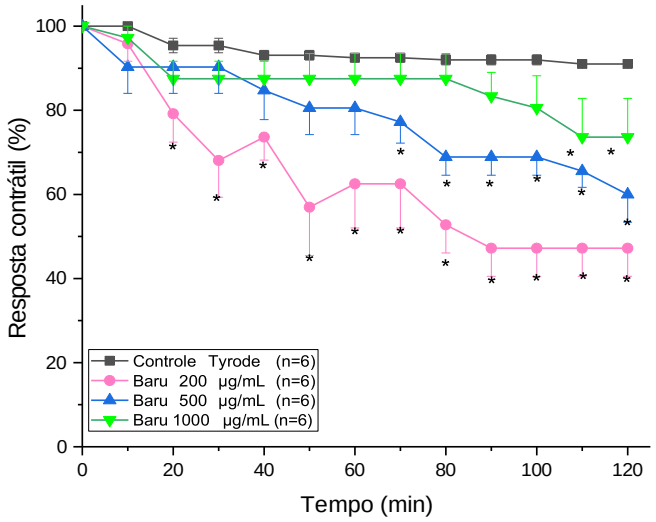
Legenda. C+: 2-antramina na presença de ativação metabólica (+S9) (1,25 µg/placa para todas as cepas, seguindo a mesma diluição seriada, 10^{-5}).

FONTE: Elaboração própria.

Finalizado o estudo com componentes da *Dipteryx alata*, outro objetivo do estudo foi verificar o potencial farmacológico da farinha do fruto do Baru, numa abordagem antiofídica, contra os efeitos bloqueador e miotóxico do veneno de *L. muta muta*.

A farinha de Baru em concentrações de 200, 500 e 1000 µg/mL e solubilizada em Tyrode (5 mL) foram adicionadas à cuba contendo a preparação (n=6, cada). A Figura 11 ilustra os resultados obtidos em média ± erro padrão da média, a cada 10 minutos, em um período de 2 h de experimento.

Figura 11. Curva concentração-resposta de farinha de Baru.



Legenda. **Preparação nervo frênico-diafragma sob estímulo indireto**. Curva concentração-resposta da farinha de Baru. Note que a concentração de 1000 **µg/mL foi a que menos afetou**

a preparação neuromuscular. O número de experimentos (n) foi expresso na legenda da figura. Cada ponto representa a média ± erro padrão da média. *, p<0,05 em relação ao controle Tyrode.
FONTE: Elaboração própria.

Note que a concentração de 1000 µg/mL decaiu nos primeiros 20 minutos, logo após houve uma estabilização dessa resposta e se manteve até 80 minutos, após isso a resposta contrátil foi decaindo até atingir os 120 minutos. Esta concentração foi a que melhor manteve a resposta contrátil, onde nos primeiros 20 minutos houve uma queda para próximo a 90% da resposta contrátil, onde ela se manteve por mais uma hora com a mesma resposta, nos 90 minutos a resposta decaiu para próximo a 80%, finalizando aos 120 minutos, próximo a 75% da resposta contrátil, havendo diferença significativa com o controle Tyrode, nesses tempos. Porém, houve diferença significativa entre a concentrações de 200 µg/mL e 500 µg/mL, que também apresentaram diferença significativa em relação ao controle (*p<0,05).

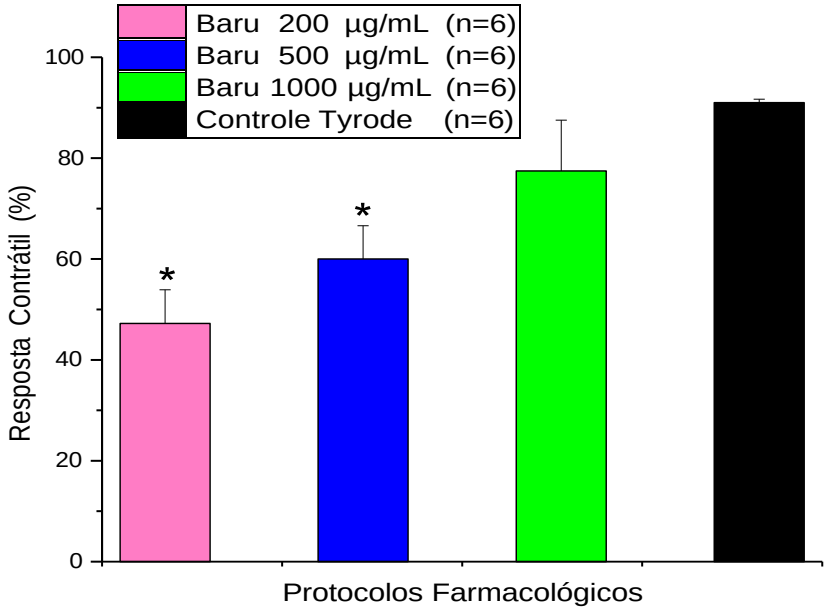
Na concentração de 500 µg/mL houve uma queda na resposta contrátil nos primeiros 10 minutos e essa resposta se manteve até os 30 minutos, decaindo nos 40 minutos e 50 minutos, mantendo-se até os 60 minutos. Com 70 e 80 minutos decaiu mais um pouco, mantendo-se até os 100 minutos. Com 110 minutos e 120 minutos novamente houve uma queda.

Na concentração de 200 µg/mL houve uma queda brusca com 30 minutos, havendo uma subida no ponto de 40 minutos, com 50 minutos houve mais uma queda, aumentando nos 60 e 70 minutos, decaindo nos 80 minutos e mantendo-se até o final dos 120 minutos.

Esses dados mostram que dentre as concentrações estudadas, a concentração de 1000 µg/mL foi a que provocou menor declínio da resposta contrátil aos 120 minutos e, portanto, selecionada para os estudos seguintes de neutralização.

A Figura 12, abaixo, ilustra as respostas aos 120 minutos.

Figura 12. Respostas obtidas das diferentes concentrações de farinha de Baru aos 120 minutos.



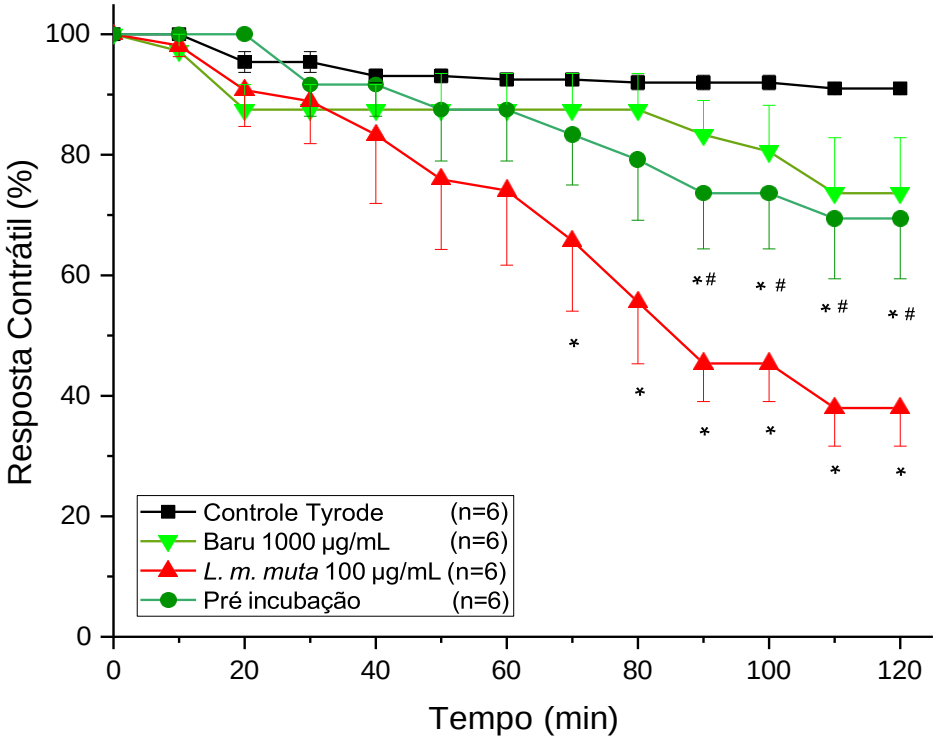
Legenda. **Preparação nervo frênico-diafragma sob estímulo indireto**. Resposta contrátil aos 120 min. das concentrações-resposta da farinha de Baru. Note que a concentração de 1000 µg/mL foi a que menos afetou a preparação neuromuscular ($p>0,05$ comparado ao controle Tyrode). O número de experimentos (n) foi expresso na legenda da figura. Cada ponto representa a média ± erro padrão da média. *, $p<0,05$ comparado ao controle Tyrode.

FONTE: Elaboração própria.

Como a melhor resposta contrátil após o Tyrode foi a concentração de 1000 µg/mL de farinha de Baru, esta concentração foi selecionada para os ensaios seguintes de pré incubação, pré veneno e pós veneno.

A Figura 13 ilustra os protocolos de pré incubação, comparativamente ao controle Tyrode com a farinha de Baru e veneno. Após o tempo de estabilização, a solução contendo o veneno de *L. m. muta* na concentração de 100 µg/mL e a farinha de 1000 µg/mL pré incubadas por 30 minutos foi adicionada à cuba contendo preparação biológica.

Figura 13. Ensaios farmacológicos de pré incubação.



Legenda. **Preparação nervo frênico diafragma de camundongos, estímulo indireto**. Cada ponto representa o erro ± erro padrão da média. O número de experimentos (n) é mostrado na legenda da figura. *, p<0,05 comparado com controle Tyrode. #, p<0,05 comparado ao veneno.

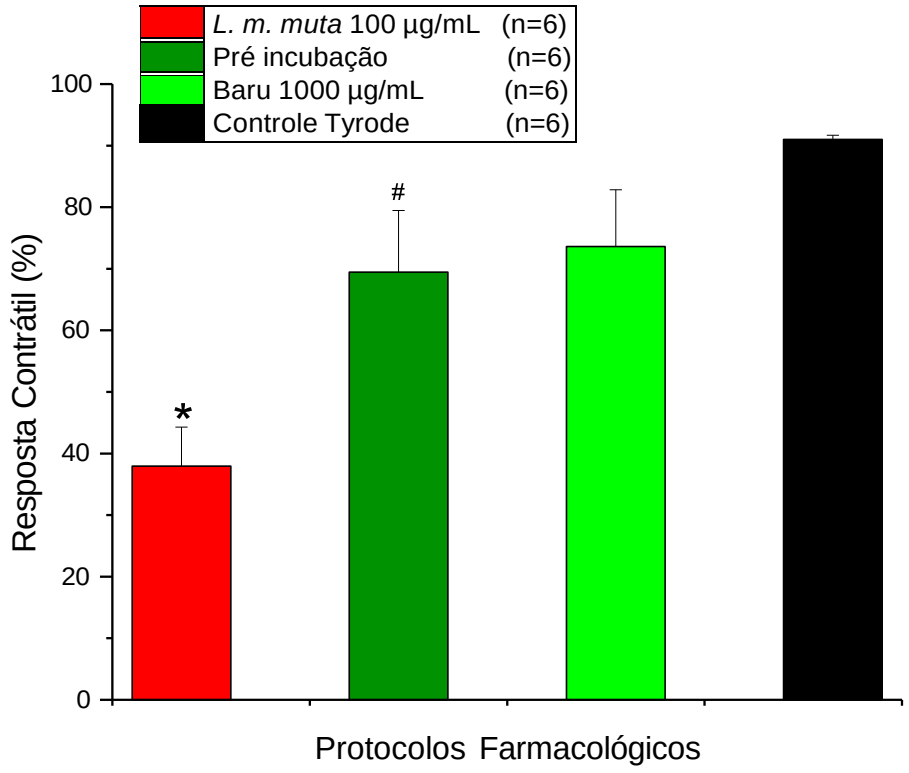
FONTE: Elaboração própria.

A curva do veneno (100 µg/mL) foi decaindo ao longo dos 120 minutos, levando a um bloqueio neuromuscular, restando apenas 37,9% ± 6,3 de fibras responsivas ao final do experimento (*p<0,05 comparado ao controle Tyrode).

Nota-se na curva de pré incubação (verde) a visível proteção exercida pela farinha do fruto de baru (1000 µg/mL), que manteve 69,4% ± 10,0 de fibras funcionantes (*p<0,05 comparado ao veneno).

A Figura 14 ilustra os resultados ao final de 120 minutos.

Figura 14. Respostas contráteis (%) dos ensaios de pré incubação aos 120 min.



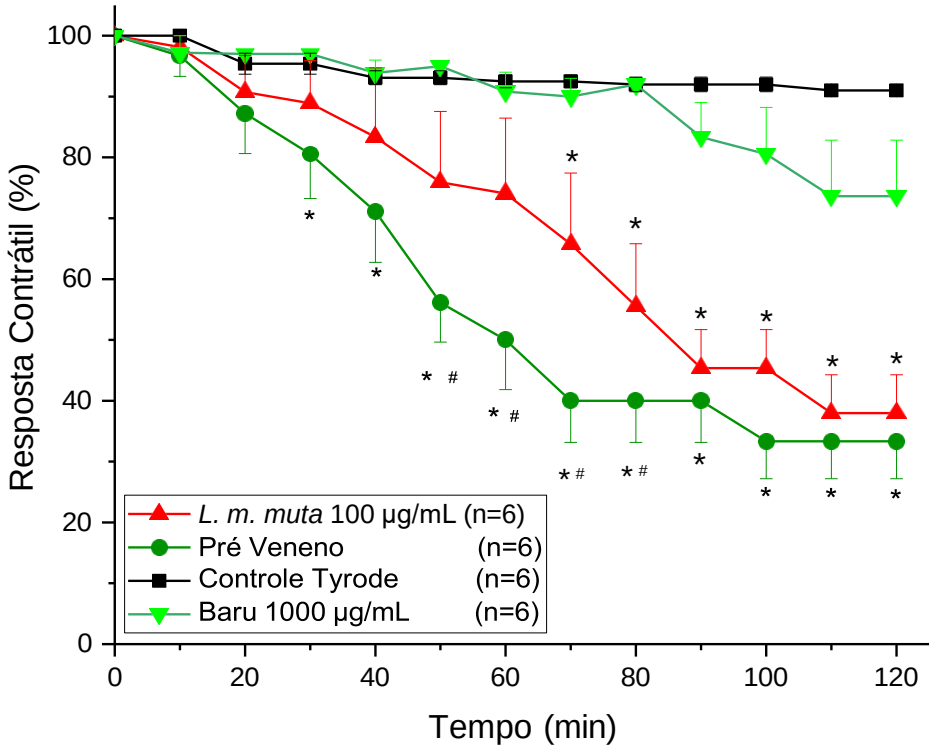
Legenda. **Preparação nervo frênico diafragma de camundongos, estímulo indireto**. Cada ponto representa o erro ± erro padrão da média. O número de experimentos (n) é mostrado na legenda da figura. Baru: Farinha de Baru. *, p<0,05 comparado ao controle Tyrode. #, p<0,05 comparado ao veneno.

FONTE: Elaboração própria.

Nota-se na Figura 14 que o ensaio de pré incubação e a farinha do Baru, estão praticamente juntas na curva, sem diferença significativa entre eles. Diferença significativa é vista apenas do veneno de *L. m. muta* em relação ao controle Tyrode.

A Figura 15 ilustra em conjunto os experimentos: controle Tyrode, controle farinha de baru 1000 µg/mL, controle de veneno de *L. m. muta* (100 µg/mL) e Pré veneno, que significa pré tratar a preparação *ex vivo* com 1000 µg/mL de farinha de Baru, deixando esta solução estabilizando por 10 minutos. Em seguida retirou-se 500 µL da solução presente na cuba para dissolver os 500 µg de veneno, que após isso, foram adicionados novamente à cuba.

Figura 15. Ensaios farmacológicos de pré veneno.



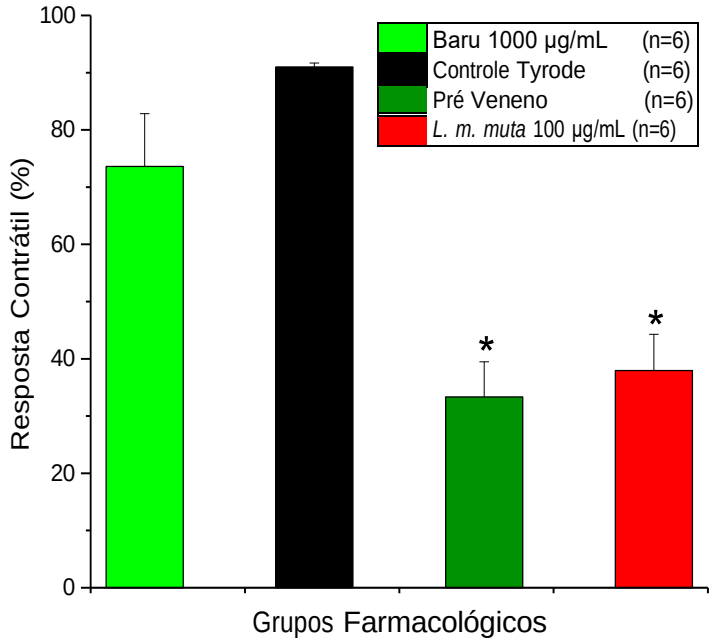
Legenda. Preparação nervo frênico-diafragma de camundongos, estímulo indireto. Ensaios farmacológicos de pré veneno comparativamente aos controles (Tyrode, Baru e veneno). Cada ponto representa o erro ± erro padrão da média. O número de experimentos (n) é mostrado na legenda da figura. *, p<0,05 comparado com controle Tyrode. #, p<0,05 comparado ao veneno, em apenas alguns tempos (50 a 80 min).

FONTE: Elaboração própria.

Nota-se na Figura 15 que a curva do pré veneno sofreu um progressivo bloqueio restando apenas 33,33 % ± 6,14 de fibras responsivas ao final do experimento ($^{\#}$, p<0,05 comparado ao controle Tyrode).

A Figura 16 representa os resultados aos 120 minutos.

Figura 16. Respostas obtidas dos ensaios de pré veneno, comparados aos 120 min.



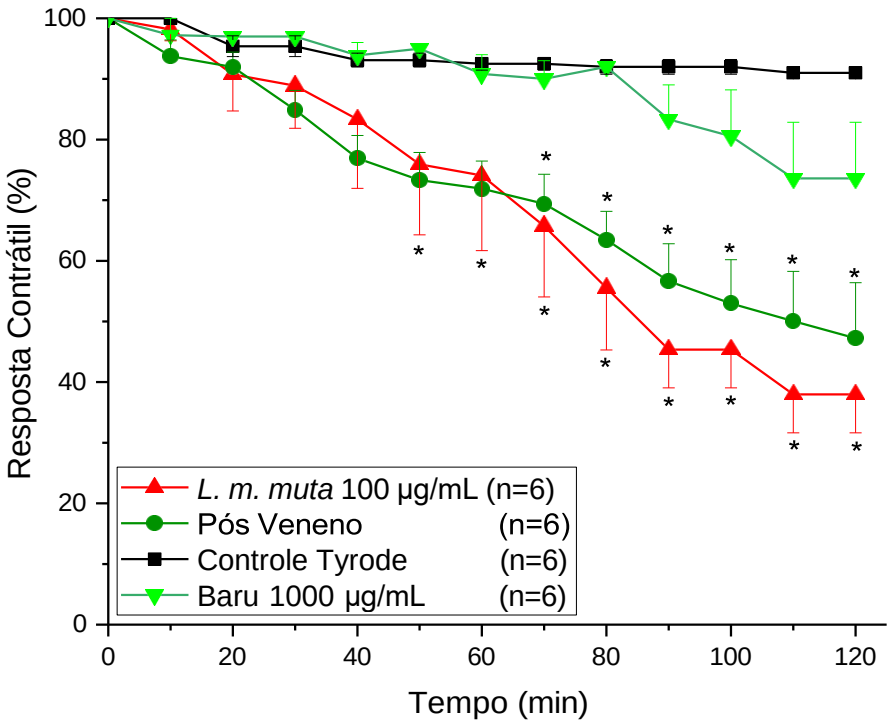
Legenda. Preparação nervo frênico-diafragma de camundongos, estímulo indireto. *, p<0,05 comparado ao controle. Note que o tratamento prévio da preparação neuromuscular com a farinha de Baru não resultou em qualquer vantagem contra a ação bloqueadora do veneno de *L. m. muta.*

FONTE: Elaboração própria.

Os ensaios seguintes, pós veneno, significam o tratamento com a farinha de Baru após a ação do veneno sozinho durante 10 min.

A Figura 17 ilustra em conjunto a resposta contrátil dos diferentes experimentos: controle de Tyrode, farinha de Baru 1000 µg/mL, veneno de *L. m. muta* (100 µg/mL) e Pós veneno.

Figura 17. Ensaios farmacológicos pós veneno.



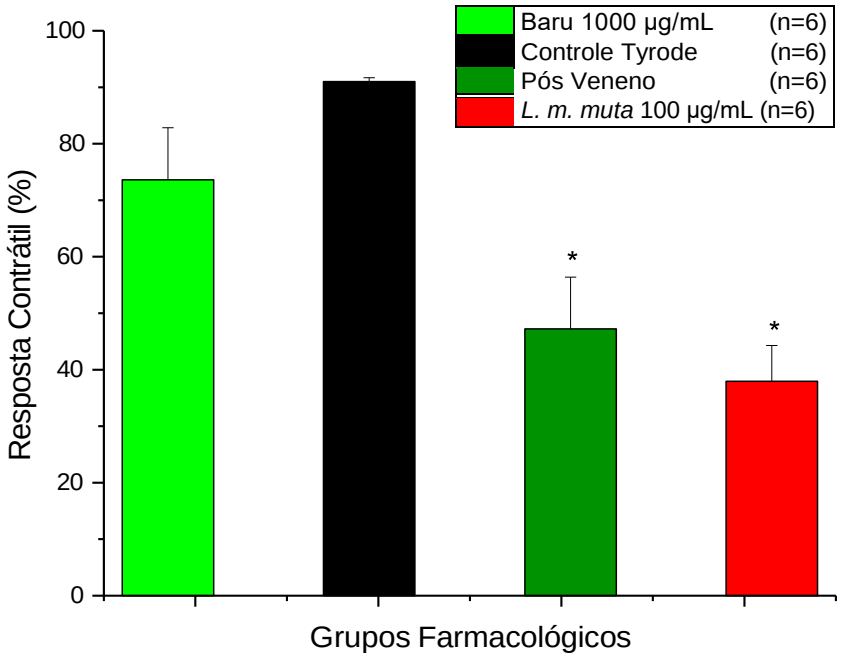
Legenda. Preparação nervo frênico-diafragma de camundongos, estímulo indireto. Cada ponto representa o erro ± erro padrão da média. O número de experimentos (n) é mostrado na legenda da figura. *, p<0,05 comparado com controle Tyrode.

FONTE: Elaboração própria.

Comparando-se a curva do veneno com a curva pós veneno, ao longo dos 120 minutos, ambos os tratamentos causam bloqueio neuromuscular; porém, se diferem aos 70 minutos, onde a curva de veneno, cai levando a um bloqueio da mesma, com apenas 37,9 % ± 6,3 de fibras responsivas ao final do experimento (*, p<0,05 comparado ao controle Tyrode). Já a curva de pós veneno leva a um bloqueio, com apenas 47,22 % ± 9,1 de fibras responsivas ao final dos 120 minutos (*, p<0,05 comparado ao controle Tyrode).

A Figura 18 mostra os resultados ao final dos 120 minutos do experimento.

Figura 18. Respostas obtidas dos ensaios pós veneno, comparados aos 120 min.



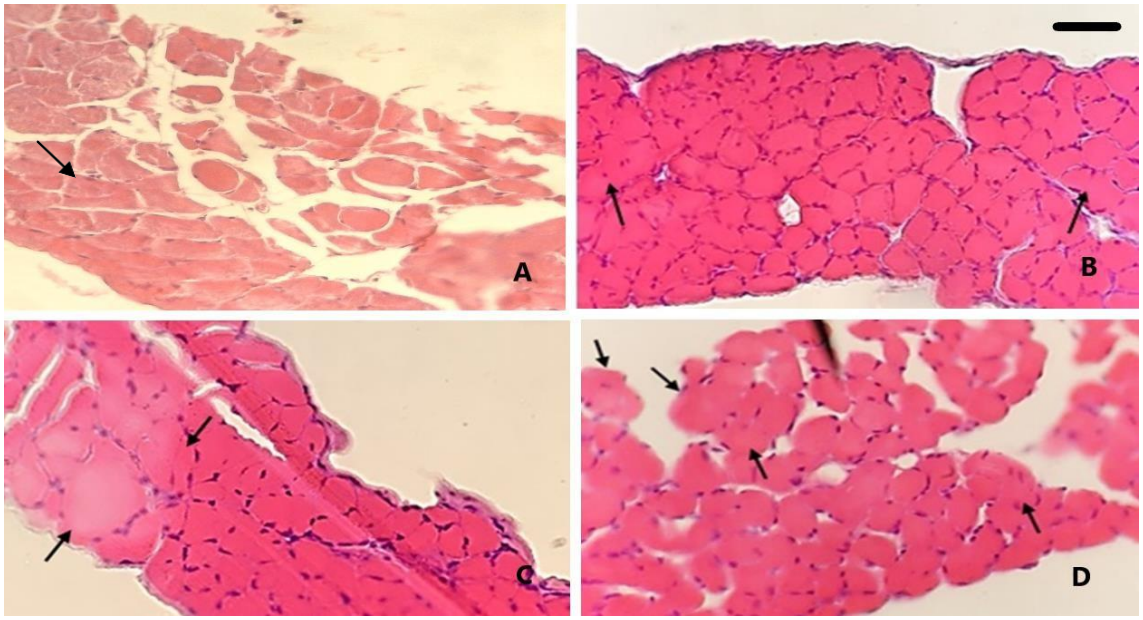
Legenda. Preparação nervo frênico-diafragma de camundongos, estímulo indireto. *, p<0,05 comparado ao controle. Note que o tratamento da preparação neuromuscular com a farinha de Baru após a deflagração da ação do veneno não resultou em qualquer vantagem contra a ação bloqueadora do veneno de *L. m. muta* (Ven).

FONTE: Elaboração própria.

Baseado nos resultados obtidos e já ilustrado anteriormente, nota-se que o tratamento com farinha de Baru adicionado após o veneno não protegeu contra o bloqueio causado pelo veneno de *L. m. muta.*

Analisando os três modelos farmacológicos, o melhor desfecho foi o método de pré incubação, cujos músculos foram analisados por microscopia de luz, após processamento de rotina histológica. A análise histológica qualitativa das preparações neuromusculares resultantes dos tratamentos farmacológicos é apresentada na Figura 19.

Figura 19. Corte histológico de músculo diafragma exposto a diferentes tratamentos.



Legenda. Corte histológico de músculo diafragma exposto à solução nutritiva de Tyrode (A, controle), Farinha do Baru (B, 1000 µg/mL), veneno de *L. m. muta* (C, 100 µg/ mL), e pré incubação (D, Baru 1000 µg/ mL + veneno de *L. m. muta* 100 µg/ mL). Coloração H/E. (barra: 1 cm=50 µm, extensivo às demais fotografias), cortes: transversal e longitudinal.

FONTE: Elaboração própria.

Na Figura 19 (A), visualiza-se fotografia representativa de preparações expostas à solução nutritiva de Tyrode. Note células em seu estado normal (seta preta), ou seja, apresentam conformação poligonal com presença de núcleos periféricos.

Em (B), visualiza-se fotografia em corte transversal, representativa de preparações expostas à farinha de Baru (1000 µg/mL), onde há indícios de alterações celulares, principalmente constituídas por edemas (setas).

Em (C), visualiza-se fotografia representativa de preparações expostas ao veneno de *L. m. muta* (100 µg/mL), onde o corte transversal mostra indícios de alterações celulares, como a presença de edemas deixando uma aparência amorfa (setas pretas).

Em (D), visualiza-se fotografia de preparações expostas à mistura pre incubada (farinha de baru + veneno de *L. m. muta)*, onde há indícios de alterações celulares, principalmente constituídas por edemas (setas pretas).

A tabela 5 expressa quantitativamente a média obtida pelos 3 analistas a triplo cego. Nota-se que houve uma progressão para a mionecrose, que incluem lesão delta, edema, desestruturação da arquitetura do músculo esquelético resultando em condensação de miofribrilas, que predomina no conjunto de fibras musculares visto em todos os tratamentos, lise de membrana, necrose, células *ghost* em alusão a uma célula fantasma, onde não se encontra mais a célula (aspecto hialino) e apenas os núcleos dispersos.

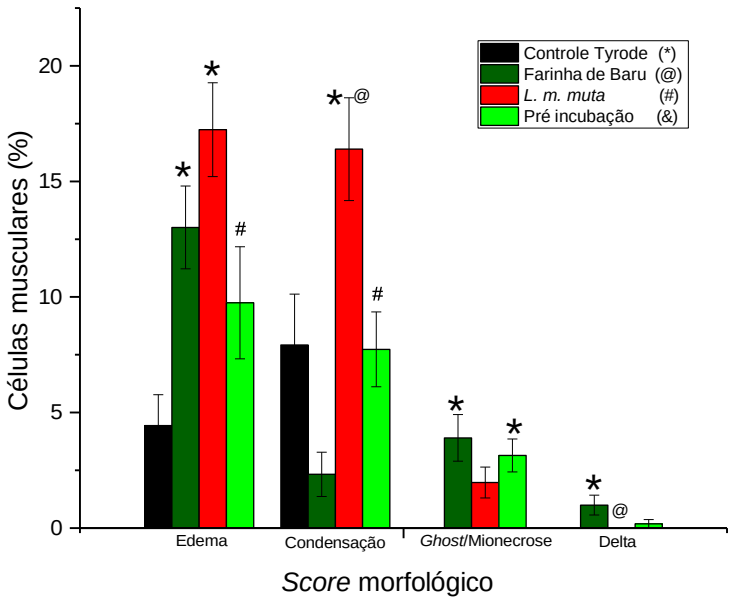
Tabela 5. Análise quantitativa de dano celular. (*) p<0,05 comparado aos outros tratamentos.

	Edema	**Condensação de Miofibrilas**	**Células *ghost* *mionecrose***	**Lesão Delta**	**Total de Danos**
Controle Tyrode	42	26	3	0	13,8 ± 3,56%
Farinha de Baru	64	12	18	5	21,6 ± 1,71%
Veneno	88	80	10	0	35,3 ± 1,72% (*)
Pré incubação	46	39	18	1	19,3 ± 1,98%

FONTE: Elaboração própria.

A Figura 20 ilustra a condição de dano classificado pelo *score* (transformados em porcentagem) utilizado no estudo.

Figura 20. Análise histológica quantitativa de músculos expostos a diferentes tratamentos.



Legenda: Score utilizados no estudo. p<0,05, símbolos representam a comparação com: * Controle Tyrode; @ Farinha de Baru; # Veneno de *Lachesis muta muta*; & Pré incubação (Veneno + Farinha de Baru).

FONTE: Elaboração própria.

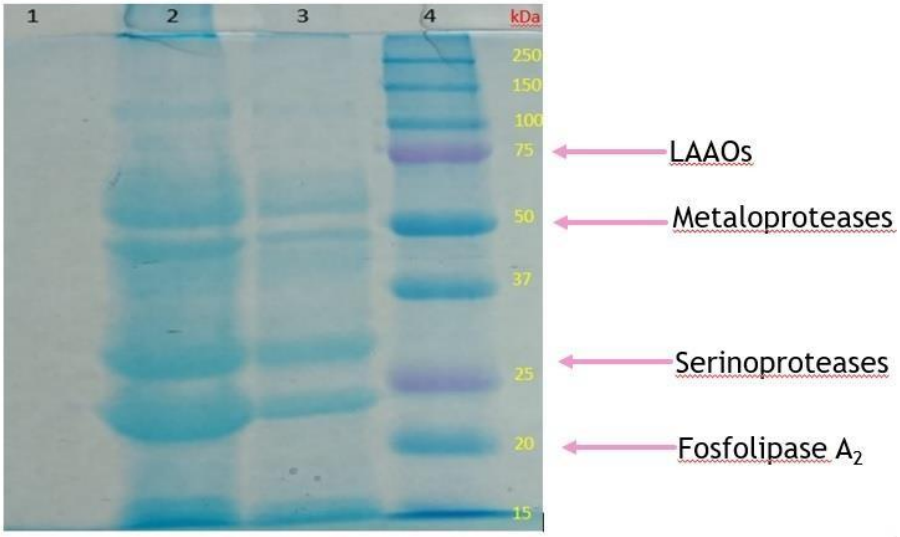
Note que houve diferença significativa quando se trata do *score* morfológico. A maior proteção da farinha de Baru, no modelo da pré incubação, foi reduzir o edema e a condensação de miofibrilas (#, $p<0,05$).

Observando o *score* de células *ghost*/mionecrose houve diferença significativa da farinha de baru e da pré incubação comparando com o controle Tyrode (*, $p<0,05$).

Já nas células delta houve diferença significativa da farinha de baru comparado com o controle Tyrode e do veneno comparado com a farinha do baru (@, $p<0,05$).

Uma forma proposta para confirmar esses resultados de proteção no modelo pré incubação foi através da eletroforese de proteínas. O perfil eletroforético das proteínas do veneno de *L. m. muta*, farinha do Baru e a pré incubação (Veneno + Farinha) são apresentados na Figura 21. Para a farinha não se identificou nenhuma banda de proteína, talvez pela concentração utilizada. Já para o veneno identificaram-se bandas que variaram de 15 a 250 kDa. No ensaio de pré incubação, as bandas se mantiveram, porém, ficaram mais limpas, com visível diminuição na intensidade.

Figura 21. Eletroforese de Proteínas (ensaio 1).

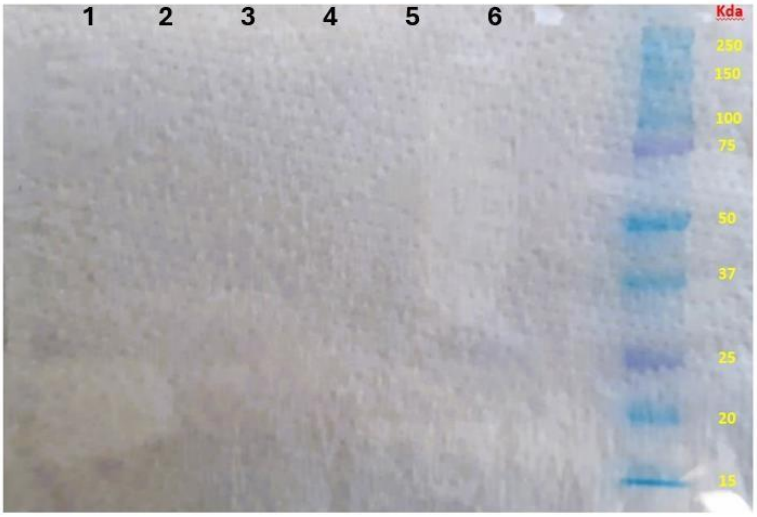


Legenda. 1. Aplicação feita com a farinha de baru; 2. Aplicação feita com o veneno de *Lachesis muta muta*; 3. Aplicação feita com a neutralização (veneno + farinha); 4. Aplicação feita com o padrão (massa molecular em kDa).

FONTE: Elaboração própria.

Foi realizado um segundo protocolo de eletroforese, aumentando-se as concentrações da farinha do Baru para tentar detectar as bandas proteícas da mesma (Figura 22). Para a farinha não se identificou nenhuma banda de proteína, em nenhuma das concentrações testadas (1,5; 1,0; 0,5; 0,1; 0,001; 0,0001 mg/mL).

Figura 22. Eletroforese de Proteínas (ensaio 2).



Legenda. Aplicação feita com várias concentrações da farinha de baru (em mg), sendo 1,5; 1,0 0,5; 0,1, 0,01 e 0,001 para as marcações 1, 2, 3, 4, 5, e 6, respectivamente.

FONTE: Elaboração própria.

Note que não houve a aparição de nenhuma banda proteíca nas concentrações testadas da farinha de Baru, mesmo tendo sido aplicadas concentrações muito mais altas (1,5; 1,0; 0,5; 0,1; 0,001; 0,0001 mg/mL) comparadas à eletroforese anterior (10 µg/mL).

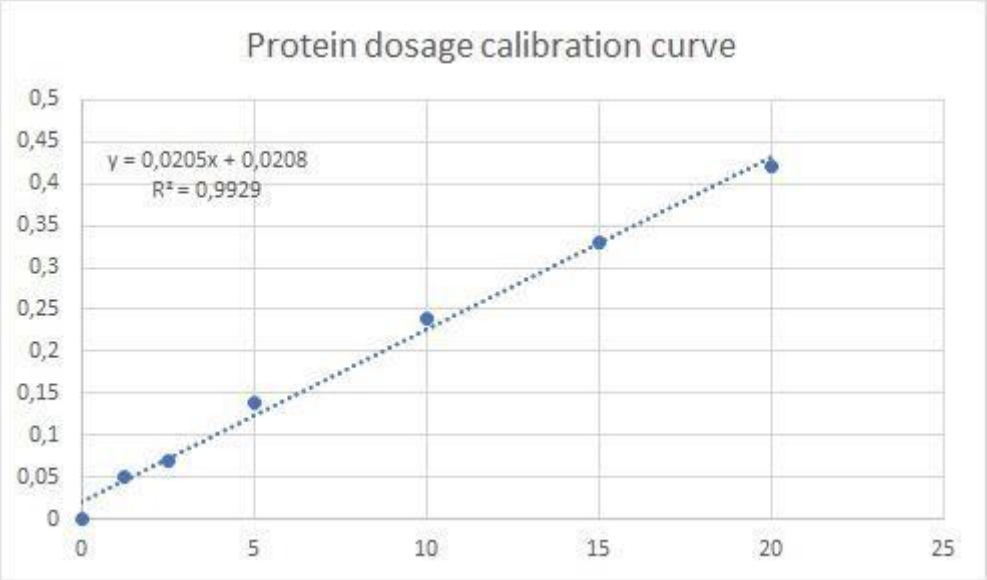
Embora a eletroforese explicite as bandas proteicas, também se optou pela dosagem de proteínas para evidenciar que a farinha de Baru de alguma forma diminuiu o conteúdo proteico. A tabela 6 ilustra as absorbâncias obtidas para a realização da curva de calibração, enquanto a Figura 23 ilustra a equação da reta, para se obter a concentração em amostras desconhecidas.

Tabela 6. Absorbâncias do padrão medidas após 5 minutos de incubação em temperatura ambiente e suas respectivas médias e volumes/concentrações correspondentes.

Reagente Bradford	Volume (mL)	Teste	Proteína	ABS 1	ABS 2	ABS 3	Média
1 mL	20	1	20	0.396	0.432	0.44	0.42
1 mL	15	2	15	0.329	0.311	0.365	0.33
1 mL	10	3	10	0.257	0.243	0.234	0.24
1 mL	5	4	5	0.154	0.1494	0.14	0.14
1 mL	2.5	5	2.5	0.065	0.072	0.08	0.07
1 mL	1.25	6	1.25	0.051	0.039	0.069	0.05
1 mL	0	7	0	0	0	0	0

FONTE: Elaboração própria.

Figura 23. Curva padrão de soro albumina bovina (BSA) (Ensaio 1)



FONTE: Elaboração própria.

A partir da curva de calibração foi realizada a dosagem proteica do veneno de *Lachesis muta muta*, farinha de Baru e mistura, conforme tabela 7.

Tabela 7. Absorbâncias medidas após 5 minutos de incubação de 1mL do veneno *de Lachesis muta muta*, farinha de Baru e mistura na concentração de 10 µg/mL e sua massa específica em proteínas.

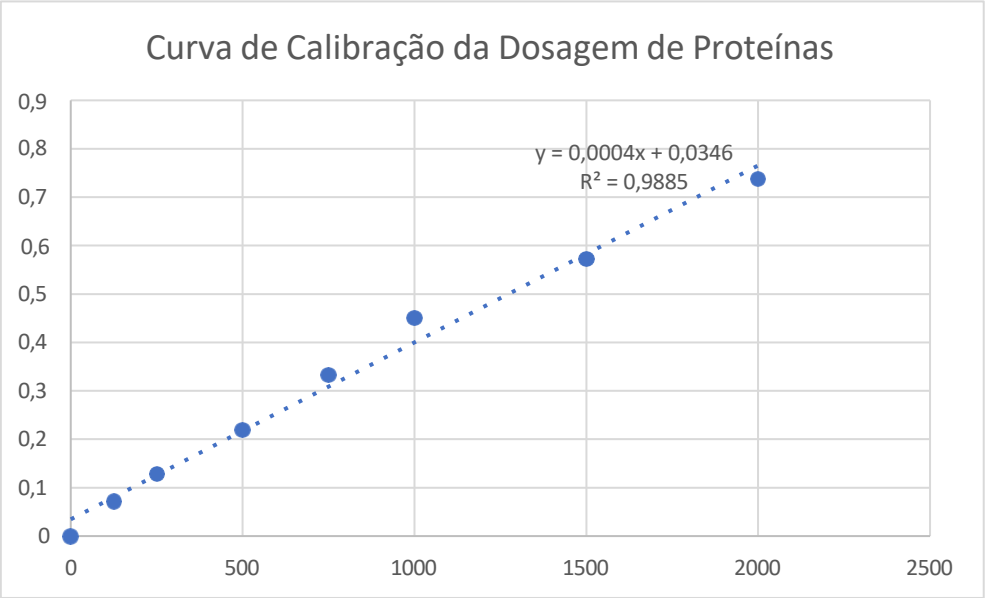
Proteínas	ABS 1	ABS 2	ABS 3	Média	Concentração Proteínas
Lachesis muta muta	0.159	0.161	0.165	0.161	6,84 µg ± 1,7
Farinha Baru	0.024	0.022	0.024	0.023	0,1 µg ± 0,6
Pré incubação	0.05	0.06	0.05	0.05	1,42 µg ± 0,003

FONTE: Elaboração própria.

Note a redução da quantidade de proteínas do veneno, de 6,84 µg para 1,42 µg quando pré incubado com a farinha de Baru.

Foi realizado um segundo protocolo no qual as concentrações foram aumentadas, para a dosagem de proteínas da farinha do Baru (Figura 24).

Figura 24. Curva padrão de soro albumina bovina (BSA) (Ensaio 2)



FONTE: Elaboração própria.

A partir da curva de calibração foi realizada a dosagem proteica do veneno de *Lachesis muta muta*, farinha de Baru e mistura, conforme tabela 8.

Tabela 8. Absorbâncias medidas após 5 minutos de incubação do veneno *de Lachesis muta muta*, farinha de Baru e mistura na concentração de de 500 e 1500 mg/mL e sua massa específica em proteínas.

Proteínas	ABS 1	ABS 2	ABS 3	Média	Concentração Proteínas (µg)
***Lachesis muta muta* 500 mg/mL**	0,081	0,184	0,027	0,097	329 ± 0,04
***Lachesis muta muta* 1500 mg/mL**	0,274	0,323	0,286	0,294	822,33 ± 0,01
Farinha Baru 500 mg/mL	0,043	0,017	0,045	0,035	174 ± 0,01
Farinha Baru 1500 mg/mL	0,043	0,049	0,046	0,046	201,5 ± 0,003
Pré incubação 500 mg/mL	0,022	0,057	0,024	0,03	172,33 ± 0,01

Pré incubação 500 mg/mL	0,085	0,114	0,058	0,085	300,66 ± 0,01

FONTE: Elaboração própria.

Note que houve uma redução da quantidade de proteínas do veneno na concentração de 500 mg/mL, que foi de 329 µg para 172,33 µg quando pré incubado com a farinha, já na concentração de 1500 mg/mL, ela foi de 822,33 µg para 300,66 µg quando pré incubado com a farinha, evidenciando que a farinha diminuiu a concentração das proteínas do veneno.

6 DISCUSSÃO

Em estudos prévios a vanilina e betulina mostraram-se desprovidas de mutagenicidade tanto na presença (+S9) quanto na ausência (-S9) de ativação metabólica (YOSHIDA *et al*., 2015; YOSHIDA *et al*., 2016), tornando-se fortes candidatas ao teste de antimutagenicidade. Por outro lado, o resveratrol já fora testado no mesmo ensaio de mutagenicidade em bactérias *Salmonella*/microssoma (LANGOVÁ *et al*., 2005; UENOBE; NAKAMURA; MIYAZAWA, 1997), ensaio do cometa e aberração cromossômica não mostrando genotoxicidade em nenhum desses ensaios (BOTTI; IRAZUSTA, 2018; JEONG *et al*., 2014; KARTHIKA *et al*., 2022), corroborado por outros ensaios como o ensaio *Allium cepa* (BOTTI; IRAZUSTA, 2018). O teste de viabilidade deve demonstrar percentual de sobrevida maior que 80% na maioria das concentrações e cepas (TA98 e TA100) (ESPANHA, 2014), o que foi demonstrado neste trabalho.

O resveratrol é um agente antioxidante comprovado que “sequestra” os radicais peroxil (BOYCE; DOEHMER; GOODERHAM, 2004; KARTHIKA *et al*., 2022; SATO *et al*., 2000; UENOBE; NAKAMURA; MIYAZAWA, 1997) e pode prevenir danos oxidativos ao DNA, que desempenha um papel importante na atividade de muitas substâncias genotóxicas (DAMIANAKI *et al*., 2000; ESPANHA, 2014; LANGOVÁ *et al*., 2005; SGAMBATO *et al*., 2001). O resveratrol participa da prevenção da carcinogênese pela inibição da enzima P450, uma enzima de fase I (CHANG; CHEN; LEE, 2001; GUSMAN; MALONNE; ATASSI, 2001; RIMANDO, 2002; SATO *et al*., 2000), e pela indução de enzimas

metabolizadoras de xenobióticos de fase II (BOYCE; DOEHMER; GOODERHAM, 2004; DAMIANAKI *et al*., 2000; KUNDU; SURH, 2004; SAVOURET; QUESNE, 2002).

Em relação ao teste de Ames, Uenobe *et al*. (1997) mostraram a atividade antimutagênica do composto 3,4',5-trihidroxiestilbeno (THS) ou resveratrol usando *Salmonella* Typhimurium TA1535/pSK1002 contra mutágenos como N-Metil-N-nitro-N-nitrosoguanidina (50,3% de inibição, -S9), 2-Aminoantraceno (91,1% de inibição, +S9) e 3-amino-1,4-dimetil-5H-pirido 4,3-bi indol (Trp-P-1) (82,8% de inibição, +S9). Langová *et al*. (2005) mostraram que o resveratrol foi antimutagênico contra mutágenos indiretos aflatoxina B1(AFB1) e 2-amino-3-metilimidazo [4,5-f]quino-lina (IQ), mas não contra o mutágeno direto N-nitroso-N-metilureia (MNU).

Neste estudo, o resveratrol cumpriu o seu papel como referência mostrando-se um bom marcador de antimutagenicidade (-S9 e +S9), pois inibiu todos os mutágenos testados. Isso significa que o resveratrol atua diretamente contra 4-nitro-O-fenilenodiamina ou NPD, azida sódica, mitomicina C (na ausência de ativação metabólica, -S9) e indiretamente contra 2-antramina (na presença de ativação, +S9).

O composto 4-nitro-O-fenilenodiamina é um poderoso mutágeno de ação direta que aumenta o risco de neoplasias em humanos ou animais, e afeta diretamente o DNA. É utilizado como corante em produtos de coloração capilar semipermanentes e permanentes, como reagente colorimétrico para determinação de ácidos ascórbico e dehidroascórbico em alimentos, como reagente para alfa-cetoácidos, como agente quelante para determinação de selênio por cromatografia gasosa em materiais biológicos (PUBCHEM, 2004a).

A azida sódica não é classificada como um carcinógeno humano (A4), mas sim como um mutágeno. Ela reverte efetivamente cepa TA1530 *S.* Typhimurium, indicando que é um mutágeno que promove substituição de base. É ineficaz em cepas que promovem mutação do tipo *frameshift.* É altamente mutagênico em cevada, arroz, ervilha, levedura e células V79 de hamster chinês. No entanto, a azida aparentemente não produz quebras cromossômicas em cevada ou ervilha. A azida sódica é um potente mutágeno do DNA do esperma de salmão em um ambiente ácido. Promove translocação hereditária observada em insetos após dose de mutação oral de 100 mg/L. A azida sódica induziu uma

alta frequência de mutações em sementes de cevada, mas não induziu cruzamento somático e quebras cromossômicas em soja. É usado em síntese orgânica e na preparação de ácido hidrazóico, azida de chumbo e sódio puro. Outros usos incluem a seleção diferencial de bactérias, em contadores automáticos de sangue e como conservante para reagentes de laboratório. Também é um propulsor para inflar sacos de segurança automotivos. Usos agrícolas incluindo nematocida, herbicida e controle de podridão de frutas (PUBCHEM, 2004b).

A mitomicina C é usada como um agente alquilante na quimioterapia do câncer. O Grupo de Avaliação de Saúde Humana no Escritório de Avaliação Ambiental e de Saúde da Agência de Proteção Ambiental classificou a carcinogenicidade da mitomicina C, como grupo B2, que é baseado em evidências suficientes em animais. Não há dados disponíveis em humanos. Como um produto químico do grupo B2, a mitomicina C é considerada provavelmente cancerígena em humanos (PUBCHEM, 2004c).

O mutágeno 2-antramina é produzido a partir da combustão incompleta de substâncias orgânicas, é encontrado em combustível sintético e usado para pesquisa bioquímica e síntese orgânica. As evidências de carcinogenicidade são provenientes de estudos em animais. Em camundongos, injeções subcutâneas (sc) induziram tumores no fígado; em ratos, a administração tópica induziu tumores locais e tumor na mama, injeções sc induziram tumores cutâneos; em hamster, a administração tópica induziu tumores locais. Essas vias de administração apresentam a 2-antramina como um composto mutagênico indireto que requer a presença de enzimas microssomais (PUBCHEM, 2004d).

Como esses mutágenos têm usos em diversas atividades humanas, a exposição a eles não impossibilita a ocorrência de um evento. Os antimutágenos dietéticos de ocorrência natural, como os encontrados em alimentos como frutas e vegetais, podem neutralizar os efeitos deletérios desses mutágenos (BODE; DONG, 2009). O mecanismo pelo qual o resveratrol atua como antimutagênico precisa ser esclarecido. Entre os mecanismos comuns (antimutágenos com potência antioxidante, interação com mutágenos, antimutágenos como agentes bloqueadores, antimutágenos de ação multifuncional, desmutagênese e bioantimutagênese) (ABDELHAKEM; ABDELHAFEZ EL-S, 2021), a antimutagenicidade do resveratrol estaria relacionada à potência antioxidante,

uma vez que a remoção de moléculas reativas é considerada uma estratégia importante no processo de antimutagênese, antes que essas moléculas reajam com o DNA (TIAN, 2012). Outro mecanismo que o resveratrol mostrou ser capaz está relacionado à interação química direta entre um mutágeno e um antimutágeno (ABDELHAKEM; ABDELHAFEZ EL-S, 2021) antes de induzir dano ao DNA, como mostrado contra a 4-nitro-O-fenilenodiamina, principalmente.

Na ausência de ativação metabólica (-S9), a vanilina, um composto fenólico, foi capaz de inibir moderadamente NPD usando TA97a (37% de inibição), mas não contra NPD usando TA98 (16% de inibição). Ambas as cepas bacterianas mostraram dependência de histidina com a presença de mutação *rfa*, deleção *uvr*B e plasmídeo pKM101. A mutação *uvr* causa deficiência no sistema de reparo por excisão do DNA. A mutação *rfa* causa perda parcial da barreira lipopolissacarídica que reveste a superfície das bactérias, aumentando assim sua permeabilidade a moléculas grandes. Além disso, as cepas testadoras do Ames com *S.* Typhimurium contêm deleções *uvr*B-bio-gal isoladas de forma independente e mutações *rfa*, portanto, provavelmente são diferentes (JURADO; ALEJANDRE-DURÁN; PUEYO, 1993). Essas duas mutações aumentaram muito a sensibilidade mutagênica do teste *Salmonella* Ames (MARON; AMES, 1983). Outra diferença entre TA97a e TA98 está relacionada ao alvo de DNA hisD6610 e hisD3052 para TA97a e para TA98 (DeMARINI *et al*., 1992; HARTMAN *et al*., 1986), respectivamente. Embora a mutação seja *frameshift* para ambas as cepas, o mecanismo pelo qual a mutação ocorre também é diferente, ou seja, para TA97a ocorre uma adição de +1 citosina resultando em uma corrida de 6 citosinas (-C-C-C-C-C-C-), enquanto em TA98 ocorre uma exclusão de GC ou CG dentro de um *hotspot* CGCGCGCG comum (DeMARINI *et al*., 1992; MORTELMANS; ZEIGER, 2000; HARTMAN *et al*., 1986; ISONO; YOURNO, 1974; LEVIN; YAMASAKI; AMES, 1982; YOSHIDA *et al*., 2016).

A mesma atividade antimutagênica é mostrada para o triterpeno betulina, que inibiu moderadamente o mutágeno NPD de TA97a, mas não usando TA98. Acredita-se que a base da discussão seja a mesma da vanilina. Entretanto, a betulina inibiu fortemente os mutágenos de TA100 (azida sódica) e TA102 (mitomicina C). A sequência suscetível a mutágeno (*hotspot*) de TA100 é o par de base G.C, enquanto de TA102 é o par de base A.T, causando a maioria das

substituições de pares de bases (DeMARINI *et al*., 1992; HARTMAN *et al*., 1986; ISONO; YOURNO, 1974; JURADO; ALEJANDRE-DURÁN; PUEYO, 1993; LEVIN; YAMASAKI; AMES, 1982; LEVIN *et al*., 1982; MARON; AMES, 1983; MORTELMANS; ZEIGER, 2000).

Pode-se verificar que no caso da vanilina, a linhagem TA97a nas maiores concentrações tem um forte efeito antimutagênico e quanto mais diluída ela vai apresentando de moderada a ausência de efeito antimutagênico. Já na cepa TA98 foi de moderado até forte nas maiores concentrações e apenas na última concentração houve ausência de efeito antimutagênico. Na cepa TA100 houve de moderado a forte efeito antimutagênico em todas as cepas. E na cepa TA102 houve de moderado a ausência de efeito antimutagênico.

A curva concentração-resposta tem o intuito de representar o efeito ou resposta biológica desencadeada por uma substância frente a uma dose pré-determinada, a fim de obter um perfil farmacodinâmico do composto utilizado (TAVARES, 2004). Constatou-se que houve diferença significativa entre as concentrações de 200 µg/mL e 500 µg/mL comparativamente ao controle Tyrode; porém, a concentração de 1000 µg/mL não apresentou diferença significativa em relação ao controle, tendo sido eleita para os ensaios posteriores. Esta condição em que concentrações menores provocam maior bloqueio que as maiores não ocorre pela primeira vez. Pode-se citar o extrato hidroalcóolico de *Vellozia flavicans*, planta popularmente conhecida como canela-de-ema, que apresentou resultados semelhantes, ou seja, as menores concentrações causaram maior bloqueio da resposta contrátil (TRIBUIANI *et al*., 2014). Os autores sugeriram uma regulação paralela sobre a excitabilidade do músculo esquelético, com mecanismo a ser ainda esclarecido, uma vez que vias de sinalização endógena são capazes de compensar o controle colinérgico do movimento. Como exemplo, o glutamato foi citado por agir como co-transmissor de acetilcolina em motoneurônios da junção neuromuscular de mamíferos (MALOMOUZH *et al*., 2003; RUBEM-MAURO *et al.*, 2009).

No ensaio de pré incubação, a farinha de fruto de Baru protegeu significativamente contra o efeito bloqueador do veneno *L. m. muta* (#, $p<0,05$), o que não aconteceu nos outros modelos empregados, ou seja, quando o tratamento com a farinha de Baru ocorreu antes (pré veneno) ou depois de iniciada a ação do veneno (pós veneno). O modelo de pré incubação é

importante pois mostra que componentes da farinha de baru interagiram com componentes do veneno de *L. m. muta* no tempo de 30 min em que ficaram pré incubados. O modelo de pré incubação em preparações isoladas é um modelo validado como *screening* no estudo de plantas medicinais com potencial antiofídico, como o extrato aquoso da casca do caule de *Coutarea hexandra* (Ch-E), associado a um antiveneno comercial ou como terapia isolada, no envenenamento sistêmico agudo induzido por *L. m. muta* em ratos (LEÃO-TORRES *et al.,* 2021). As folhas de *Galatia glaucescens* são popularmente utilizadas contra picadas de serpentes no Brasil. O extrato hidroetanólico das partes aéreas de *G. glaucescens* (HEGg) foi testado quanto à neurotoxicidade e miotoxicidade induzida pelo veneno de *Bothrops jararacussu*. HEGg previne totalmente os efeitos de neurotoxicidade e miotoxicidade causados por *B. jararacussu*. HEGg foi capaz de neutralizar os efeitos tóxicos do veneno e confirmaram o potencial antiofídico, de *G. glaucescens* como alternativa para neutralização do veneno de *B. jararacussu* (DOS SANTOS *et al*., 2017).

A interação carboidratos da farinha com proteínas do veneno é uma hipótese que pode ser sugerida, uma vez que é o componente majoritário (65%) na composição da farinha. Além disso, autores tem demonstrado a existência dessa interação por espectroscopia de ressonância magnética nuclear (*NMR spectroscopy*) (PÉREZ; TVAROŠKA, 2014); por modelos computacionais de *docking* que utilizam *scores* como efeitos de solvatação, pontes de hidrogênio, forças de van der Waals e eletrostática; por eletroforese como a capilar, PACE (*Polysaccharide analysis using carbohydrate gel electrophoresis*) (GOUBET; DUPREE; JOHANSEN, 2011) ou FACE (*fluorescence-assisted carbohydrate electrophoresis*) (ROBB *et al.,* 2017).

Utilizando recursos disponíveis e padronizado para venenos de serpentes em nosso laboratório (OLIVEIRA *et al*., 2020; 2021) a eletroforese realizada mostrou, claramente, que houve uma diminuição na quantidade de proteínas resultante da interação.

O veneno de serpentes contém uma infinidade de substâncias com estruturas simples e complexas, cuja proporção e características individuais variam com a espécie (VARANDA; GIANNINI, 1994). As peçonhas das serpentes são constituídas por três grupos de compostos: proteínas, compostos orgânicos de baixo peso molecular e compostos inorgânicos.

O veneno laquético, é constituído principalmente por componentes de natureza proteica que são agrupados em poucas famílias de proteínas. Sendo assim, as proteínas encontradas no veneno da *L. m. muta* são distribuídas em 8 famílias diferentes: Peptídeos Potenciadores de Bradicinina (BPPs), fatores de crescimento do nervo, Fosfolipase A_2 (PLA_2), serinoproteases, proteínas secretórias ricas em cisteína (CRISP), lectinas-*simile* do tipo-C, L-aminoácido oxidase (LAAO) e metaloproteinases dependente de Zn^{2+} (SANZ *et al*., 2008).

A composição proteica do veneno da *L. m. muta* é de 31,9% de metaloproteinases que são responsáveis pela síndrome hemorrágica observada nos envenenamentos por serpentes (GUTIÉRREZ *et al*., 2017).

No veneno laquético há pelo menos duas metaloproteinases bem conhecidas: o LHF-I (fator hemorrágico I), que é uma proteína ácida, de alto peso molecular (100 kDa), com alta atividade hemorrágica (RUCAVADO *et al*., 1999) e o LHF-II (fator hemorrágico II), proteína de 22 kDa e com fraca atividade hemorrágica. Estas metaloproteinases são chamadas de hemorraginas. A combinação de desfibrinação e lesão direta da parede do vaso podem levar a hemorragias maciças e potencialmente fatais. Algumas metaloproteinases inibem a coagulação do sangue. A maioria das metaloproinases são fibrinogenases e elas clivam peptídeos da região C terminal do fibrinogênio. São classificadas em “a” e “b”- fibrinogenases. A a-fibrogenase inibe a coagulação do sangue porque o fibrinogênio “truncado” não forma um coágulo de fibrina tão forte como o fibrinogênio nativo. Desta forma, uma sutil destruição física do fibrinogênio leva à ação anticoagulante das metaloproteinases (SANZ *et al.,* 2008).

As serinoproteases também estão em grande quantidade no veneno da *L. m. muta*, mais precisamente elas contribuem com 31,2% da sua composição total (SANZ *et al*., 2008).

As PLA_2s, juntamente com outras toxinas, são responsáveis pela ação inflamatória do veneno laquético. Elas compõem em 8,7% do veneno laquético. Além da miotoxicidade, as PLA_2s têm se mostrado capazes de desencadear diferentes eventos inflamatórios em modelos experimentais (DAMICO *et al*., 2006).

A toxina monomérica LmTX-I é um exemplo da chamada Asp49 fosfolipase A_2 tipo II (diferente da Lys49 PLA_2s que são muito mais baixas em atividade apesar de sua semelhança estrutural com seu Asp49). A LmTX-I causa um bloqueio irreversível dependente da concentração da contração induzida indiretamente das respostas do Biventer cervicis em concentração tão baixa quanto 1 mg/mL, que se manteve mesmo após a lavagem da preparação mais de três vezes. Nessa concentração, não houve evidência de miotoxicidade significativa (DAMICO *et al*., 2006). O bloqueio completo da contração do músculo não foi acompanhado por qualquer inibição das respostas à ACh. Então, o bloqueio neuromuscular produzido pelo LmTX-I pode ser atribuído à atividade pré-sináptica, seja pelo bloqueio axonal condução ou afetando a liberação do transmissor no motor terminal nervoso. Várias fosfolipases neurotóxicas monoméricas Asp49 tipo II foram bem estudadas, como a caudoxina (VILJOEN *et al.*, 1982), agkistrodotoxina (KONDO *et al*., 1989), amoditoxina (RITONJA; GUBENSEK, 1985), e notexina (HALPERT; EAKER, 1975).

Estes são todos exemplos típicos de PLA_2s do tipo II, um grande grupo de polipeptídeos homólogos muitos dos quais são neurotoxinas, causando paralisia por depleção do terminal nervoso motor do transmissor (HARRIS, 2003; KINI, 2003). Parece provável, portanto, que a LmTX-I atue de maneira semelhante. Em concentrações de 30 mg/mL ou mais, LmTX-I causou uma redução na resposta ao KCl de cerca de 30%, e danos nas fibras de aproximadamente 15%, e um aumento significativo na liberação de CK na cuba do banho.

Ainda segundo Damico *et al*. (2006), as altas concentrações LmTX-I são miotóxicas e em conjunto, a morfologia na análise quantitativa e medidas de creatina quinase (CK) indicam que LmTX-I é fracamente miotóxica, ou seja, não induz mionecrose.

Quanto aos resultados da análise histológica houve 35,3 ± 1,72% de lesão das fibras musculares provocadas pelo veneno, ao final dos 120 minutos, enquanto a farinha houve 21,6 ± 1,71% e o controle de Tyrode 13,8 ± 3,56%. Já na pré incubação houve 19,3 ± 1,98% de lesão das fibras musculares. Todos os controles (Tyrode e farinha de Baru) e a pré incubação foram estatisticamente diferentes do veneno sozinho (*$p<0,05$), mostrando grau de proteção, também sob este parâmetro. Por mecanismo desconhecido a farinha de Baru atenuou

componentes presentes no veneno responsáveis pelo efeito neurobloqueador do veneno de *L. m. muta.*

A revisão de Gutiérrez *et al*. (2018) pormenoriza a progressão de dano que leva à mionecrose, a seguir transcrito. “O dano à membrana plasmática é seguido por um rápido influxo de íons cálcio do líquido extracelular, seguindo um gradiente acentuado que ocorre através dessa membrana. Como consequência uma série de eventos degenerativos intracelulares é deflagrada, como hipercontração miofibrilar, dano mitocondrial e ativação de proteinases intracelulares dependentes de cálcio (calpaínas) e PLA_2s, que rapidamente levam a célula além do “ponto sem retorno”, causando danos celulares irreversíveis (GUTIÉRREZ; OWNBY, 2003; MONTECUCCO; GUTIÉRREZ; LOMONTE, 2008). Além das PLA_2s, outros componentes do veneno contribuem para o dano muscular agudo, como as citotoxinas elapídicas (cardiotoxinas) da família 3FTx, que também atuam perturbando a integridade da membrana plasmática (OWNBY; FLETCHER; COLBERG, 1993) e pequenas miotoxinas presentes nos venenos de cascavel (OWNBY; CAMERON; TU, 1976).

Os venenos dos viperídeos contêm *snake venom metalloproteinases* (SVMPs) hemorrágicas que contribuem para a patogênese da necrose muscular por gerar isquemia no tecido como consequência do extravasamento abundante que ocorre secundariamente ao dano dos vasos sanguíneos capilares pela ação das metaloproteinases do veneno (GUTIÉRREZ; RUCAVADO, 2000). Por outro lado, o aumento da pressão intersticial dentro dos compartimentos musculares, em decorrência do profuso extravasamento de plasma causado pelos venenos dos viperídeos, pode contribuir para o comprometimento da perfusão e isquemia no tecido muscular. Assim, no caso dos venenos de viperídeos que contêm toxinas miotóxicas, hemorrágicas e formadoras de edema, a mionecrose ocorre pela combinação da ação direta das miotoxinas sobre as fibras musculares, bem como indiretamente, pela isquemia decorrente das alterações vasculares induzidas pelo veneno” (GUTIÉRREZ *et al*., 2018).

A ação citotóxica do veneno de *L. m. muta* seria pela capacidade que as proteínas desse veneno têm para ocasionar uma hemorragia severa, causando danos celulares que podem levar à morte tecidual (DAMICO *et al.*, 2006).

Outro ponto observado seriam as quantidades dessas PLA_2s presentes na sua composição. As PLA_2s são compostas por 8,7%, frente a 31,9% e 31,2% das metaloproteinases e serinoproteinases, respectivamente (ALVES, 2010).

Foi observada baixa ação miotóxica para a Farinha de Baru. A avaliação da farinha de baru contra os efeitos tóxicos do veneno de *L. m. muta* (neurotoxicidade *in vitro* e miotoxicidade) permitiu constatar um evento de mitigação positiva entre neurotoxicidade e miotoxicidade, tendo em vista o efeito neurotóxico ser maior que o miotóxico para este veneno, na concentração estudada.

A busca por moléculas farmacologicamente úteis para a população evidenciou a riqueza da flora e fauna como verdadeiras fontes naturais para o desenvolvimento de novos medicamentos. Dentre os recursos da biodiversidade, os venenos de serpentes mostram-se propícios à descoberta de compostos ou atividades biológicas com potencial terapêutico, pela variedade de proteínas, enzimas e peptídeos (SOUZA, 2018).

O veneno laquético apresenta atividades fisiopatológicas semelhantes às do veneno botrópico, ou seja, atividade coagulante, proteolítica, hemorrágica e inflamatória aguda. É relatada ainda, uma atividade de cininogenase no veneno de *Lachesis muta*, que poderia explicar em parte, algumas alterações clínicas denominadas de “neurotóxicas” (DINIZ; OLIVEIRA, 1992).

Baseado em análises feitas por Ripa (2007) de peçonhas neonatas e juvenis de outras espécies/subespécies do gênero *Lachesis*, podem-se considerar bandas proteicas de peçonha como: acima de 97 kDa igual uma metaloprotease, a que varia de 33 a 53 kDa igual a uma serinoprotease, a que varia de 26 a 29 kDa igual a uma metaloprotease e a que varia de 15 a 17 kDa igual a uma fosfolipase A2. Isto permite concluir que as bandas proteicas do veneno de *L. m. muta* foram expressas no gel de eletroforese e essas bandas ficaram menos intensas quando em mistura com a farinha de baru, que pode ser um resultado de neutralização ou apenas de diluição pela mistura. Outros ensaios deverão ser realizados para esclarecer o real efeito da farinha de baru sobre o veneno de *L. m. muta.*

A interação entre carboidratos da farinha e proteínas do veneno é uma hipótese que pode ser sugerida, visto que é o componente majoritário (65%) na composição da farinha. Além disso, os autores demonstraram a existência desta interação por espectroscopia de ressonância magnética nuclear (espectroscopia de RMN) (PEREZ; TVAROŠKA, 2014); por modelos computacionais de acoplamento que usam pontuações como efeitos de solvatação, ligações de hidrogênio, forças de van der Waals e eletrostática; por eletroforese como capilar, PACE (Análise de polissacarídeos usando eletroforese em gel de carboidratos) (GOUBET, DUPREE, JOHANSEN, 2011) ou FACE (eletroforese de carboidratos assistida por fluorescência) (ROBB *et al.*, 2017).

Utilizando recursos disponíveis e garantidos para venenos de serpentes em nosso laboratório (OLIVEIRA *et al.*, 2020; DAMICO *et al.*, 2006), a eletroforese realizada mostrou claramente que houve diminuição na quantidade de proteínas resultantes da interação. A dosagem molecular das proteínas do veneno e do sobrenadante resultante da pré incubação é sugerida para esclarecer esta questão.

Quanto aos resultados da dosagem proteica, houve diferença entre os resultados, onde a farinha de Baru sozinha obteve valor de 0,1 ± 0,6 µg de proteínas, em comparação com 6,84 ± 1,7 µg de proteínas do veneno de *Lachesis muta muta*, quando foi feita na mistura. do veneno com a farinha, notamos uma deficiência dessas proteínas, que foi de 1,42 ± 0,003 µg. A repetição do protocolo com aumento dos componentes manteve a evidência de redução de proteínas do veneno pela farinha de baru, confirmando o primeiro achado.

7 CONCLUSÃO

Conclui-se que na ausência de ativação metabólica (-S9) a vanilina e a betulina são antimutagênicos moderados contra o controle positivo de TA97a (NPD), mas a betulina inibiu fortemente os mutagênicos de TA100 (azida sódica) e TA102 (mitomicina C). Na presença de ativação metabólica (+S9) todos os compostos testados inibiram a mutagenicidade da 2-antramina. Em adição, a farinha de Baru protegeu significantemente contra o efeito bloqueador do veneno de *Lachesis muta muta*, no modelo de pré incubação. Sugere-se que houve uma interação entre a farinha de baru e o veneno, na qual os carboidratos da farinha absorveram as proteínas do veneno, que se apresentaram diminuídas na eletroforese de proteínas e na dosagem de proteínas.

REFERÊNCIAS

A PLANTA DA VEZ. Disponível em: https://www.aplantadavez.com.br/2015/11/baru-dipteryx-alata-vog.html. Acesso em: 10 de julho de 2022.

ABDELHAKEM, A. M.; ABDELHAFEZ EL-S, M. N. Current trends and future perspectives of antimutagenic agents. **Genotoxicity and Mutagenicity - Mechanisms and Test Methods, IntechOpen**, 2021. p. 1-20. Crossref, doi:10.5772/intechopen.91689.

ABRAHAM, M. R. *et al*. Understandings and misunderstandings of eighth graders of five chemistry concepts found in textbooks. **Journal of Research in Science Teaching**, North Carolina, EUA, v. 29, n. 2, p. 105-120, 1992.

ABU-AMERO, K. K.; KONDKAR, A. A.; CHALAM, K. V. Resveratrol and ophthalmic diseases. **Nutrients**, Switzerland, v. 8, n. 4, p. 200, 2006.

AGGARWAL, B. B. *et al*. Role of resveratrol in prevention and therapy of cancer: preclinical and clinical studies. **Anticancer Research**, Canada, v. 24, n. 5, p. 2783-2840, 2004.

ALMEIDA, S. P. *et al*. **Cerrado, espécies vegetais úteis**. Planaltina – DF: Embrapa - CPAC, 1998.

ALMEIDA, S. P.; SILVA, J. A.; RIBEIRO, J. F. **Aproveitamento alimentar de espécies nativas dos Cerrados**: araticum, baru, cagaita e jatobá. 2.ed. Planaltina, DF: Embrapa-CPAC, 1990.

ALMEIDA, A. P. *et al*. Os répteis ameaçados de extinção no Estado do Espírito Santo. *In*: PASSAMANI, M.; MENDES, S. L. (Orgs.). **Espécies da Fauna Ameaçadas de Extinção no Estado do Espírito Santo**. Vitória: Instituto de Pesquisas da Mata Atlântica, 2007, p. 65-74

ALVES, C. D. **Estudo dos efeitos renais do veneno da serpente *Lachesis muta muta*.** 2010. Dissertação (Pós-Graduação em Farmacologia) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2010. Disponível: https://www.repositorio.ufc.br/bitstream/riufc/2267/1/2005_dis_dnamora.pdf. Acesso em: 15 de maio de 2019.

ALVES, A. C. L. **O resveratol como uma molécula anti-envelhecimento**. 2015. Dissertação de Mestrado (Faculdade de Ciências e Tecnologias da Saúde) - Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias, Faculdade de Ciências e Tecnologias da Saúde, Lisboa, 2015. Disponível: https://recil.ensinolusofona.pt/jspui/bitstream/10437/6183/1/Disserta%C3%A7%C3%A3o%20Final.pdf. Acesso em: 15 de maio de 2019.

AMIGO, L. *et al.* Effect of technology parameters on electrophoretic detection of cow's milk in ewe's milk cheeses. **Journal of Dairy Science**, Champaign, IL, v. 74, n. 5, p. 1482-1490, 1991.

ANGELO, P. M.; JORGE, N. Compostos Fenólicos em Alimentos – Uma Breve Revisão. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, Brasil, v. 66, n. 1, p. 232 - 240, 2007.

ARAÚJO, A. C. *et al*. Phytochemical characteristics of seeds and its effects on the intestinal motility and toxicity of *Joannesia princeps*. **Journal of Medicinal Food**, Tennessee, v. 19, n. 1, p. 68-72, 2016. doi: 10.1089/jmf.2015.0071 Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26670598/. Acesso em: 20 de fevereiro de 2021.

BAQUEIRO-PENA, I.; GUERRERO-BELTRÁN, J. A. Vanilla (*Vanilla planifolia* Andr.), its residues and other industrial by-products for recovering high value flavor molecules: A review. **Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants,** Germany, v. 6, p. 1-9, 2017.

BARD, R. *et al*. Inefficacy of Bothropic antivenin in the neutralization of the coagulation activity of *Lachesis muta muta* venom. report of a case and experimental confirmation. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v. 36, n. 1, p. 77-81, 1994.

BARRAVIEIRA, B. Acidentes ofídicos. In: VERONESI, R.; FOCACCIA, R. **Tratado de infectologia.** São Paulo: Atheneu, 1997, p. 1561-1577.

BAUR, J. A.; SINCLAIR, D. A. Therapeutic potential of resveratrol: the *in vivo* evidence. **Nature Reviews Drug Discovery**, London, v. 5, n. 6, p. 493-506, 2006.

BESSA, D.T.O.; MENDONÇA, M. S. de; ARAUJO, M. G. P. Morfo-anatomia de sementes de *Dipteryx odorata* (AUBL.) WILL. (FABACEAE) como contribuição ao estudo farmacognostico de plantas da região amazônica. **Acta Amazônica**, Brasil, v.31, n.3, p.357-364, 2001.

BIBLIOTECA VIRTUAL EM SAÚDE – MINISTÉRIO DA SAÚDE. Disponível em: http://bvsms.saude.gov.br/ultimas-noticias/3034-19-9-dia-internacional-de-atencao-aos-acidentes-ofidicos-2, 2019. Acesso em: 10 de maio de 2020.

BIESKI, G. I. *et al*. Ethnopharmacology of medicinal plants of the pantanal region (Mato Grosso, Brazil). **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, China, v. 2012, p. 272749, 2012.

BIRRELL, M. A. *et al*. Resveratrol, an extract of red wine, inhibits lipopolysaccharide induced airway neutrophilia and inflammatory mediators through an NF-kappaB-independent mechanism. **The FASEB Journal**, United States of America, v. 19, n. 7, p. 840-841, 2005.

BODE, A. M.; DONG, Z. Cancer prevention research—then and now. **Nature Reviews Cancer**, London, v. 9, p. 508-516, 2009.

BOTTI, S. C.; IRAZUSTA, S. P. Efeito antimutagênico do resveratrol obtido a partir do bagaço da vinicultura. **Revinter**, United States of America, v. 11, n. 3, p. 137-149, 2018.

BOYCE, A.; DOEHMER, J.; GOODERHAM, N. J. Phytoalexin resveratrol attenuates the mutagenicity of the heterocyclic amines 2-amino-1-methyl-6-

phenylimidazo[4,5-b]pyridine and 2-amino-3,8-dimethylimidazo[4,5-f]quinoxaline. **Journal of Chromatography. B. Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, United States of America, USA, v. 802, n. 1, p. 217–223, 2004.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, United States of America, USA, v. 72, p. 248- 254, 1976.

BRASIL. **Manual de Diagnóstico e Tratamento de Acidentes por Animais Peçonhentos.** Brasília: MS/FUNASA, 1998.

BRASIL. **Manual de Diagnóstico e Tratamento de Acidentes por Animais Peçonhentos.** Brasília: MS/FUNASA, 2001.

BRASIL. **Guia de Vigilância Epidemiológica**. 6. Ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2005.

BRASIL. O que é câncer? 2019. Disponível em: https://www.inca.gov.br/o-que-e-cancer. Acesso em: 15 de maio de 2019.

BRASIL. **O Butantan e as serpentes do Brasil**, São Paulo, 1996, 1 CD-ROM.

BROINIZI, P. R. B. *et al.* Propriedades antioxidantes em subproduto do pedúnculo de caju (*Anacardium occidentale* L.): efeito sobre a lipoperoxidação e o perfil de ácidos graxos poliinsaturados em ratos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, Brasil, v. 44, n. 4, p. 773-781, 2008.

BÜLBRING, E. Observations on the isolated phrenic nerve diaphragm preparation of the rat. **British Journal of Pharmacology**, English, v. 120, n. 1, p. 3-26, 1997.

CAMPBELL, J. A; LAMAR, W. W. **The venomous reptiles of the western hemisphere**. New York: Cornell University, 2004.

CASPER, R. F. *et al*. Resveratrol has antagonist activity on the aryl hydrocarbon receptor: implications for prevention of dioxin toxicity. **Molecular Pharmacology**, United States of America, v. 56, n. 4, p. 784-790, 1999.

CATALGOL, B. *et al*. Resveratrol: French paradox revisited. **Frontiers in Pharmacology**, Switzerland, v. 3, p. 141, 2012. doi: 10.3389/fphar.2012.00141

CIOLINO, H. P.; DASCHNER, P. J.; YEH, G. C. Resveratrol inhibits transcription of CYP1A1 *in vitro* by preventing activation of the aryl hydrocarbon receptor. **Cancer Research**, United States of America, v. 58, n. 24, p. 5707-5712, 1998.

COLOMBINI, M. *et al. Lachesis muta muta* venom: immunological differences compared with *Bothrops atrox* venom and importance of specific antivenom therapy. **Toxicon**, United States of America, v. 39, n. 5, p. 711-719, 2001.

CONSIDINE, T. *et al.* Interactions of milk proteins during heat and high hydrostatic pressure treatments – A Review. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, Germany, v. 8, n. 1, p. 1-23, 2007.

CZEDER, L.P. *et al*. Baru almonds from different regions of the Brazilian savanna: implications on physical and nutricional characteristics. **Agricultural Sciences**, Canada, v. 3 n. 5 p. 745-754, 2012.

DAMIANAKI, A. *et al*. Potent inhibitory action of red wine polyphenols on human breast cancer cells. **Journal of Cellular Biochemistry**, Spain, v. 78, n. 3, p. 429–441, 2000.

DAMICO, D. C. S. *et al*. Functional characterization of a basic D49 phospholipase A_2 (LmTX-I) from the venom of the snake *Lachesis muta muta* (bushmaster). **Toxicon**, United States of America, v. 47, n. 7, p. 759-765, 2006.

DANTAS, R. A. O.; SILVA, D. R. X.; SILVA, M. G. Geographical accessibility to the supply of antiophidic sera in Brazil: Timely access possibilities. **Plos One**, Califórnia, USA, v. 17, n. 1, p. e0260326, 2022.

DAS, S.; NG, K. Y. Resveratrol - loaded calcium – pectinate beads: effects of formulation parameters on drug release and bead characteristics. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, Kansas, v. 99, n. 2, p. 840-860, 2009.

DAS, S.; NG, K. Y.; HO, P. C. Formulation and optimization of zinc-pectinate beads for the controlled delivery of resveratrol. **American Association of Pharmaceutical Scientists AAPS PharmSciTech**, United States of America, USA, v. 11, n. 2, p. 729-742, 2010. doi: 10.1208/s12249-010-9435-7. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20440587/. Acesso em: 22 de fevereiro de 2021.

DeMARINI, D. M. *et al*. Molecular analysis of mutations induced by the intercalating agent ellipticine at the hisD3052 allele of *Salmonella typhimurium* TA98. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, United States of America, v. 20, p. 12-18, 1992.

DE SOUZA, R. G. M. *et al*. A baru almond-enriched diet reduces abdominal adiposity and improves high-density lipoprotein concentrations: a randomized, placebo-controlled trial. **Nutrition**, United States of America, v. 55-56, p. 154-160, 2018.

DINH NGOC, T. *et al*. Synthesis of triterpenoid triazine derivatives from allobetulone and betulonic acid with biological activities. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, United States of America, v. 22, n. 13, p. 3292-3300, 2014.

DINIZ, M. R.; OLIVEIRA, E. B. Purification and properties of a kininogenin from the venom of *Lachesis muta* (bushmaster). **Toxicon**, United States of America, v. 30, n. 3, p. 247-258, 1992.

DOS SANTOS, M. G. *et al.* New pharmacological insights of *Galactia glaucescens.* **Natural Product Research**, London, v. 33, n. 16, p. 2389-2393, 2017.

DUMBACHER, J. P.; SPANDE, T. F.; DALY, J. W. Batrachotoxin alkaloids from passerine birds: a second toxic bird genus (*Ifrita kowaldi*) fron New Guinea. **Proceedings of the National Academy of Sciences (Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America)**, United States of America, v. 97, n. 24, p. 12970-12975, 2000.

DURANT, S.; KARRAN, P. Vanillins-a novel family of DNA-PK inhibitors. **Nucleic Acids Research**, Oxford, London, v. 31, n. 19, p. 5501-5012, 2003.

ESPANHA, LÍVIA GREGHI. **Avaliação da mutagenicidade, antimutagenicidade e estrogenicidade de *Byrsonima* spp.** 2014. Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual de São Paulo - UNESP, Araraquara, 2014. Disponível em: https://repositorio.unesp.br/server/api/core/bitstreams/bee8b224-c026-4c7b-bf90-668c46b28a86/content. Acesso em: 15 de maio de 2019.

ESTEVES-PEDRO, N. M. *et al.* Implementation of the three Rs in the human hazard assessment of Brazilian medicinal plants: an evaluation of the cytotoxic and genotoxic potentials of *Dipteryx alata* Vogel. **Alternatives to Laboratory Animals**, United States of America, v. 39, n. 2, p. 189-196, 2011.

ESTEVES-PEDRO, N. M. *et al*. *In vitro* and *in vivo* safety evaluation of *Dipteryx alata* Vogel Extract. **Complementary and Alternative Medicine**, Rockville, USA, v. 12, n. 9, 2012.

FAGLIARI, J. *et al.* Changes in plasms protein concentration in ponies with experimentally induced alimentary laminits. **American Journal of Veterinary Research**, United States of America, v. 59, n. 10, p. 1234-1237, 1998.

FEITOSA, R. F. G.; MELO, I. M. L. A.; MONTEIRO, H. S. A. Epidemiologia dos acidentes por serpentes peçonhentas no Estado do Ceará – Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Brasil, v. 30, n. 4, p. 295-301, 1997.

FELIX, R.A.Z. *et al*. Efeitos alelopáticos da *Amburana cearensis* L. (Fr.All.) AC Smith na germinação de sementes de alface (*Lactuca sativa* L.) e de rabanete (*Raphanus sativus* L.). **Revista Brasileira de Biociências**, Brasil, v. 5, p. 138-140, 2007.

FERNANDES, D. C. *et al*. Nutritional composition and protein value of the baru (*Dipteryx alata* Vog.) almond from the Brazilian savanna**. Journal of the Science of Food and Agriculture**, Spain, v. 90, n. 10, p. 1650-1655, 2010.

FERNANDES, D. S.; FRANCO, F. L.; FERNANDES, R. Systematic revision of the genus *Lachesis* Daudin, 1803 (Serpentes, Viperidae). **Herpetologica**, Glen Allen, Virginia, USA, v. 60, n. 2, p. 245-260, 2004.

FERRAZ, M. C. *et al.* The effect of lupane triterpenoids (*Dipteryx alata* Vogel) in the *in vitro* neuromuscular blockade and myotoxicity of two snake venoms. **Current Organic Chemistry**, Sharjah, United Arab Emirates, v. 16, n. 1385-2728, p. 2717-2723, 2012.

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**, Basel, Switzerland, v. 19, n. 5, p. 5790-5805, 2014.

FERRAZ, M. C. *et al.* The triterpenoid betulin protects against the neuromuscular effects of *Bothrops jararacussu* snake venom *in vivo***. Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, London, v. 2015, p. 1-10, 2015.

FIORINO, C. *et al*. Skin-spring reduction effects of thermoplastics used for patient immobilization in head and neck radiotherapy. **Radiotherapy and Oncology**, United States of America, v. 30, p. 267-270, 1994.

FLORA, S. Inhibition of the "spontaneous" mutagenicity in *Salmonella typhimurium* TA102 and TA104. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, United States of America, v. 307, n. 1, p. 157–167, 1994.

GORDON, A. H. **Electrophoresis of proteins in polyacrylamide and starch gels.** Elsevier, New York, p. 213, 1995.

GOUBET, F.; DUPREE, P.; JOHANSEN, K. S. Carbohydrate gel electrophoresis. **Methods in Molecular Biology**, United States of America, v. 715, p. 81-92, 2011.

GRANTSAU, R. **As cobras venenosas do Brasil.** São Bernardo do Campo: Bandeirantes S. A. Gráfica e Editora, 1991.

GUSMAN, J.; MALONNE, H.; ATASSI G. A reappraisal of the potential chemopreventive and chemotherapeutic properties of resveratrol. **Carcinogenesis**, Oxford, London, v. 22, n. 8, p. 1111–1117, 2001.

GUTIÉRREZ, J. M., RUCAVADO, A. Snake venom metalloproteinases: Their role in the pathogenesis of local tissue damage. **Biochimie**, United States of America, v. 82, p. 841-850, 2000.

GUTIÉRREZ, J. M., OWNBY, C. L. Skeletal muscle degeneration induced by venom phospholipases A_2: Insights into the mechanisms of local and systemic myotoxicity. **Toxicon***,* United States of America, v. 42, p. 915-931, 2003.

GUTIÉRREZ, J. M. *et al.* Snakebite envenoming. **National Review Disease Primers,** United States of America, v. 14, n. 3, p. 17063, 2017.

GUTIÉRREZ, J. M. *et al.* Why is skeletal muscle regeneration impaired after myonecrosis induced by Viperid snake venoms? **Toxins**, Basel, Switzerland, v.10, n. 5, p. 182, 2018.

HALPERT, J.; EAKER, D. Amino acid sequence of a presynaptic neurotoxina from the venom of *Notechis scutatus* (Australian tiger snake). **The Journal of Biological Chemistry**, Rockville, USA, v. 250, n. 17, p. 6990-6997, 1975.

HARRIS, J. B. Myotoxic phospholipases A2 and the regeneration of skeletal muscles. **Toxicon**, United States of America, v. 42, n. 8, p. 933-945, 2003.

HARTMAN, P. E. *et al*. Target sequences for mutagenesis in Salmonella histidine-requiring mutants. **Environmental Mutagenesis**, New York, USA, v. 8, p. 631-641, 1986.

HAYASHI, T.; THOMSON, R. H. Isoflavones from *Dipteryx odorata*. **Phytochemistry**, United States of America, v. 13, p. 1943, 1974.

HERNÁNDEZ, A.; HARTE, F. M. Isolation of caseins from whey proteins by microfiltration modifying the mineral balance in skim milk. **Journal of Dairy Science**, Champaign, Illinois, USA, v. 92, n. 11, p. 5357-5362, 2009.

HOLLAND, B. *et al.* Separation and quantification of caseins and casein macropeptide using ion-exchange chromatography. **Journal of Dairy Science**, Champaign, Illinois, USA, v. 93, n. 3, p. 893–900, 2010.

IBRAHIM, N. M.; EL-KADY, E. M. Antigenic cross-reactivity and species-specific identification of *Pseudocerastes persicus fieldi* snake venom. **Toxicon**, United States of America, v. 119, p. 194-202, 2016.

IMANISHI, H. *et al*. Suppression of 6-TG-resistant mutations in V79 cells and recessive spot formations in mice by vanillin. **Mutation Research Letters**, United States of America, v. 243, n. 2, p. 151–158, 1990.

ISONO, K.; YOURNO J. Chemical carcinogens as frameshift mutagens: *Salmonella* DNA sequence sensitive to mutagenesis by polycyclic carcinogens, **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, United States of America, v. 71, p. 1612–1617, 1974.

JANG, D. S. *et al*. Terpenos e ácidos graxos de *Dipteryx lacunifera* Ducke. **Journal of Natural Products**, Washington, USA, v. 66, p. 584, 2003.

JEONG, H. M. *et al*. *In vitro* genotoxicity assessment of a novel resveratrol analogue, HS-1793. **Toxicological Research**, United States of America, v. 30, n. 3, p. 211-220, 2014.

JORGE, M. T. *et al.* Snakebite by the bushmaster (*Lachesis muta*) in Brazil: case report and review of the literature. **Toxicon**, United States of America, v. 35, n. 4, p. 545-554, 1997.

JOVANOVIC, S. *et al.* SDS-PAGE analysis of soluble proteins in reconstituted milk exposed to different heat treatments. **Sensors**, Basel, Switzerland, v. 7, n. 3, p. 371–383, 2007.

JURADO, J.; ALEJANDRE-DURÁN, E.; PUEYO, C. Genetic differences between the standard Ames tester strains TA100 and TA98. **Mutagenesis**, Oxford, London, v. 8, n. 6, p. 527-532, 1993.

KADA, T.; MORITA, K.; INOUE, T. Anti-mutagenic action of vegetable factor(s) on the mutagenic principle of tryptophan pyrolysate. **Mutation Research**, Amsterdam, v.53, n.3, p.351-353, 1978.

KAPLAN, M. A. C. *et al.* A química de leguminosas brasileiras - derivados do lupeol em *Dipteryx alata*. **Anais da Academia Brasileira de Ciências e Letras,** Rio de Janeiro, Brasil, v. 38, n. 3-4, p. 420, 1966.

KARTHIKA, C. *et al.* Involvement of resveratrol against brain cancer: a combination strategy with a pharmaceutical approach. **Molecules**, Basel, Switzerland, v. 27, p. 4663, 2022.

KINI, R. M. Excitement ahead: structure, function and mechanism of snake venom phospholipase A_2 enzymes. **Toxicon**, United States of America, v. 42, n. 8, p. 827-840, 2003.

KONDO, K. *et al.* Amino acid sequence of a presynaptic neurotoxin, Agkistrodotoxin, from the venom of *Agkistrodon halys* Pallas. **The Journal of Biochemistry**, Oxford, London, v. 105, n. 2, p. 196-203, 1989.

KUNDU, J. K.; SURH, Y. J. Molecular basis of chemoprevention by resveratrol: NF-kappaB and AP-1 as potential targets. **Mutation Research**, United States of America, v. 555, n. 1-2, p. 65–80, 2004.

LAEMMELI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, United States of America, v. 277, n. 5259, p. 680-685, 1970.

LANGOVÁ, M. *et al.* Antimutagenic effect of resveratrol. **Czech Journal Food Science**, Czech Republic, v. 23, n. 5, p. 202-208, 2005.

LEÃO TORRES, A. G. *et al.* Counteracting Action of *Coutarea hexandra* (Rubiaceae) stem bark extract on the systemic toxicity induced by *Lachesis muta muta* (Viperidae: Crotalinae) venom in rats. **American Journal of Biomedical Science & Research**, United States of America, v. 14, n. 3, p. AJBSR.MS.ID.001982, 2017.

LEDSGAARD, L. *et al*. Antibody cross-reactivity in antivenom research. **Toxins**, Basel, Switzerland, v. 10, n. 10, p. 393, 2018.

LEVIN, D. E.; YAMASAKI, E.; AMES, B. N. A new *Salmonella* tester strain, TA97, for the detection of frameshift mutagens. A run of cytosines as a mutational hot spot. **Mutation Research**, United States of America, v. 94, p. 315-330, 1982.

LEVIN, D. E. *et al.* A new *Salmonella* tester strain (TA102) with A X T base pairs at the site of mutation detects oxidative mutagens. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, USA, v. 79, n. 23, p. 7445-7449, 1982.

LIMA, P. H.; HADDAD JUNIOR, V. A Snakebite caused by a bushmaster (*Lachesis muta*): report of a confirmed case in State of Pernambuco, Brazil." **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba - MG, Brasil, v. 48, n. 5, p. 636-637, 2015.

LIN, S. *et al.* Distinction of different heat-treated bovine milks by native-PAGE fingerprinting of their whey proteins. **Food Chemistry**, United States of America, v. 121, n. 3, p. 803-808, 2010.

LIRA, W. de M. *et al.* Modulatory effect *Byrsonima basiloba* extracts on the mutagenicity of certain direct and indirect-acting mutagens in *Salmonella typhimurium* assays. **Journal of Medicinal Food**, New Rochelle – NY, USA, v. 11, n. 1, p. 111-119, 2008.

LIRDPRAPAMONGKOL, K. *et al.* Vanillin suppresses *in vitro* invasion and *in vivo* metastasis of mouse breast cancer cells. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, Netherlends, v. 25, n. 1, p. 57-65, 2005.

LOH, D. S. Y.; ER, H. M.; CHEN, Y.S. Mutagenic and antimutagenic activities of aqueous and methanol extracts of *Euphorbia hirta*. **Journal of Ethnopharmacology**, United States of America, v.126, p. 406 - 414, 2009.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. Plantarum, Nova Odessa, p. 202, 1992.

LU, X. *et al.* Resveratrol – loaded polymeric micelles protect cells from Aβ-induced oxidative stress. **International Journal of Pharmaceutics**, United States of America, v. 375, n. 1-2, p. 89-96, 2009.

LUCAS-ABELLÁN, C. *et al.* Complexation of resveratrol by native and modified cyclodextrins: Determination of complexation constant by enzymatic, solubility and fluorimetric assays. **Food Chemistry**, United States of America, v. 111, n. 1, p. 262-267, 2007.

MACIEL, M. A. M. *et al.* Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Química Nova**, São Paulo, Brasil, v. 25, n. 3, p. 429-438, 2002.

MAKNI, M. *et al.* Evaluation of the antioxidant, anti-inflammatory and hepatoprotective properties of vanillin in carbon tetrachloride-treated rats. **European Journal of Pharmacology**, Netherlands, v. 668, n. 1-2, p. 133-139, 2011.

MALOMOUZH, A. I. *et al.* Glutamate regulation of non-quantal release of acetylcholine in the rat neuromuscular junction. **Journal of Neurochemistry**, United States of America, v. 85, p. 206–213, 2003.

MARON, D. M., AMES, B. N. Revised Methods for the *Salmonella* Mutagenicity Test. **Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects**, United States of America, v. 113, n. 3-4, p. 173-215, 1983.

MAZARO, S. M. *et al.* Indução de fitoalexinas em cotilédones de soja em resposta a derivados de folhas de pitangueira. **Ciência Rural**, Santa Maria – RS, Brasil, v. 38, n. 7, p. 1824-1829, 2008.

MEDEIROS, WENDY MARINA TOSCANO QUEIROZ DE. **Síntese e caracterização de complexo tetranuclear de cobre com o ligante resorcinareno**. 2014. Dissertação de Mestrado – Programa de Pós-graduação

em Química, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, Rio Grande do Norte, Brasil, 2014.

MELGAREJO, A. R. Serpentes peçonhentas do Brasil. In: CARDOSO, J. L. C. et al. (Eds.) **Animais peçonhentos no Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos acidentes.** 2. ed. São Paulo: Sarvier, p. 42-70, 2009.

MENDES, F.N.P.; SILVEIRA, E.R. Fatty acids, sesqui- and diterpenoids from seeds of *Dipteryx lacunifera*. **Phytochemistry**, United States of America, v.35, p.1499, 1994.

MENDONÇA, R. *et al.* Flora vascular do bioma Cerrado. Planaltina, DF: Embrapa-CPAC, 1998.

MONTECUCCO, C., GUTIÉRREZ, J. M., LOMONTE, B. Cellular pathology induced by snake venom phospholipase A2 myotoxins and neurotoxins: common aspects of their mechanisms of action. **Cellular and Molecular Life Sciences**, United States of America, v. 65, p. 2897–2912, 2008.

MORTELMANS, K.; ZEIGER, E. The Ames *Salmonella*/microsome mutagenicity assay. **Mutation Research**, United States of America, v. 455, p. 29–60, **2000**.

NAKATO, T. *et al*. Isoflavonoids of the bark of *Dipteryx odorata* Willd. (Aubl.). **Journal of the Chemical Society**, Cambridge, United Kingdom, v.9, p. 2107-2112, 1979.

NAKATO, T.; SUAREZ, M. Studies on the neutral constituents of the bark of *Dipteryx odorata*. **Plantas medicinais**, Botucatu – SP, Brasil, v.18, p. 79-83, 1970.

NAMIKI, M. (1990) Antioxidant Antimutagens in Food. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, Abingdon, United Kingdom, v. 29, p. 273-300, 1990.

NAZATO, V. S. *et al. In Vitro* antiophidian properties of *Dipteryx alata* Vogel bark extracts. **Molecules**, Basel, Switzerland, v. 15, n. 9, p. 5956-5970, 2010.

NEIGI, P. S., JAYAPRAKASHA, G. K., JENA, B. S. Antioxidant and antimutagenic activities of pomegranate peel extracts. **Food Chemistry**, United States of America, v. 80, n. 3, p. 393-397, 2003.

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

NEMEN, D.; LEMOS-SENNA, E. Preparation and characterization of resveratrol-loaded lipid-based nanocarriers for cutaneous administration. **Química Nova**, São Paulo, Brasil, v. 30, n. 3, p. 408-413, 2011.

NOGUEIRA, R. M. B.; SAKATE, M. Acidentes crotálicos em animais domésticos. **Revista do Conselho Federal de Medicina Veterinária**, Brasília – DF, Brasil, v. 31, p. 47-56, 2004.

NOVICK, A.; SZILASRD, L. Anti-mutagens. **Nature**, United States of America, v.170, p. 926-927, 1952.

OHTA, T. *et al.* Inhibitory effects of flavourings on mutagenesis induced by chemicals in bacteria. **Food and Chemical Toxicology**, United States of America, v. 24, n. 1, p. 51–54, 1986.

OLIVEIRA, I. C. F. *et al.* Varespladib (LY315920) inhibits neuromuscular blockade induced by *Oxyuranus scutellatus* venom in a nerve-muscle preparation. **Toxicon**, United States of America, v. 187, p. 101-104, 2020.

OLIVEIRA, I. C. F*. et al*. Evaluation of protection by caffeic acid, chlorogenic acid, quercetin and tannic acid against the *in vitro* neurotoxicity and *in vivo* lethality of *Crotalus durissus terrificus* (South American Rattlesnake) venom. **Toxins**, Basel, Switzerland, v. 13, n. 11, p. 801, 2021.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (OMS). Folha Informativa – Câncer. 2018. Disponível em: https://www.paho.org/bra.../index.php?option=com_content&view=article&id=5588:folha-informativa-cancer&Itemid=1094. Acessado: 15 de maio de 2019.

OWNBY, C. L.; CAMERON, D.; TU, A. T. Isolation of myotoxic component from rattlesnake (*Crotalus viridis viridis*) venom. Electron microscopic analysis of muscle damage. **The American Journal of Pathology***,* United States of America, v. 85, p. 149-166, 1976.

OWNBY, C. L.; FLETCHER, J. E.; COLBERG, T. R. Cardiotoxin 1 from cobra (*Naja naja atra*) venom causes necrosis of skeletal muscle in vivo. **Toxicon***,* United States of America, v. 31, p. 697-709, 1993.

PARDAL, P. P. O. *et al.* Acidente por surucucu (*Lachesis muta muta*) em Belém-Pará: relato de caso. **Revista Paraense de Medicina**, Belém – PA, Brasil, v. 21, n. 1, p. 37-42, 2007.

PATOKA, J. Biologically active pentacyclic triterpenes and their current medicine signification. **Journal of Applied Biomedicine**, United States of America, USA, v. 1, p. 7-12, 2003.

PILON, G. D.; FRANCO, Y. O. *Lachesis muta muta*: state of the art. **Journal of Life Sciences**, United States of America, v. 15, p. 1-10, 2021.

PIO CORRÊA, M. **Dicionário das plantas úteis do Brasil**. Rio de Janeiro, Brasil, v. 2, p. 707, 1984.

PINTEREST. Disponível em: https://www.pinterest.se/pin/548172585864135923/. Acesso em: 22 de fevereiro de 2021.

PÉREZ, S.; TVAROŠKA, I. Carbohydrate-protein interactions: molecular modeling insights. **Advances in Carbohydrates Chemistry and Biochemistry**, United States of America, v. 71, n. 9, p. 136, 2014.

PUBCHEM [Internet]. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US), **National Center for Biotechnology Information**; 2004a. PubChem Compound Summary for CID 5111791, **4-Nitro-o-phenylenediamine**; [cited 2023 Jan. 29]. Available from: https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/4-Nitro-o-phenylenediamine. Access: 09 de março de 2023.

PUBCHEM [Internet]. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US), **National Center for Biotechnology Information**; 2004b. PubChem Compound Summary for CID 33557, **Sodium azide**; [cited 2023 Jan. 29]. Available from: https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Sodium-azide. Access: 09 de março de 2023.

PUBCHEM [Internet]. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US), **National Center for Biotechnology Information**; 2004c. PubChem Compound Summary for CID 5746, **mitomycin C**; [cited 2023 Jan. 29]. Available from: https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/mitomycin-C. Access: 09 de março de 2023.

PUBCHEM [Internet]. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US), **National Center for Biotechnology Information**; 2004d. PubChem Compound Summary for CID 11937, **2-Aminoanthracene**; [cited 2023 Jan. 29]. Available from: https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/2-Aminoanthracene. Access: 09 de março de 2023.

PUEBLA, P. *et al.* Chemical constituents of the bark of *Dipteryx alata* Vogel, an active species against *Bothrops jararacussu* venom. **Molecules**, Basel, Switzerland, v. 15, n. 11, p. 8193-8204, 2010.

RAHMAN, I.; BISWAS, S. K.; KIRKHAM, P. A. Regulation of inflammation and redox signaling by dietary polyphenols. **Biochemical Pharmacology**, United States of America, v. 72, n. 11, p. 1439-1452, 2006.

RASTIJA, V.; MEDIC-SARIC, M. QSAR sudy of antioxidant activity of Wine polyphenols. **European Journal of Medicinal Chemistry**, Netherlands, v. 44, n. 1, p. 400-408, 2009.

RECIO, M. C. *et al.* Investigations on the steroidal anti-inflammatory activity of triterpenoids from *Diospyros leucomelas*. **Planta Medica**, Uttar Pradesh, Índia, v. 61, n. 1, p. 9-12, 1995.

RENAUD, S.; LORGERIL, M. Wine, alcohol, platelets, and the French paradox for coronary heart disease. **The Lancet**, London, United Kingdom, v. 20, n. 339, p. 1523-1526, 1992.

RESEARCH GATE. Disponível em: https://www.researchgate.net/figure/Chemical-structure-of-betulin-a-and-betulinic-acid-b_fig1_353573442?. Acesso em: 22 de fevereiro de 2021.

RESEARCH GATE. Disponível em: https://www.researchgate.net/figure/Structure-of-resveratrol_fig15_221965359. Acesso em: 22 de fevereiro de 2021.

RICHARD, J. L. Les facteurs de risque coronarien: Le paradoxe francais. **Archives des Maladies du Coeur et des Vaisseaux**, France, v. 80, p. 17–21, 1987.

RIMANDO, A. M. *et al.* Cancer chemopreventive and antioxidant activities of pterostilbene, a naturally occuring analogue of resveratrol. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, USA, v. 50, n. 12, p. 3453–3457, 2002.

RIPA, D**.** Ontogeny of the shock death in human beings. In: **The bushmasters (genus *Lachesis* Daydin, 1803) morphology in evolution and behavior**. Electronic book. Cape Fear Serpentarium. Wilmington, 2007.

RITONJA, A.; GUBENSEK, F. Ammodytoxin A, a highly lethal phospholipase A2 from *Vipera ammodytes* venom. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Protein Structure and Molecular Enzymology**, United States of America, v. 828, n. 3, p. 306-312, 1985.

RIZZINI, C. T.; WORS, W. B. **Botânica econômica brasileira**. São Paulo, EPUSP, 1976, p. 207.

ROBB, C. M. *et al.* Chemically induced degradation of CDK9 by a proteolysis targeting chimera (PROTAC). **Chemical Communications**, Toronto, Canada, v. 53, n. 554, p. 7577-7580, 2017.

ROY, P. *et al.* Preliminary study of the antioxidante properties flowers and roots of *Pyrostegia* venusta (Ker Gawl) Miers. **BMC Complementary Alternative Medicine**, United States of America, v. 11, p. 69-77, 2011.

RUBEM-MAURO, L. *et al.* Phenobarbital pharmacological findings on the nerve-muscle basis. **Latin American Journal of Pharmacy**, Buenos Aires, Argentina, v. 28, n. 2, p. 211-218, 2009.

RUCAVADO, A. *et al.* Characterization of the local tissue damage induced by LHF-II, a metalloproteinase with weak hemorragic activity isolated from *Lachesis muta muta* snake venom. **Toxicon**, United States of America, v. 37, n. 9, p. 1297-1312, 1999.

RUSSEL, F. E.; DART, R. C. Toxic effects of animal toxins. In: AMDUR, M. O.; DOULL, J.; KLAASSEN, C. D. (Ed). **Casarett and Doull`s Toxicology – The Basic Science of Poison**. New York: McGraw-Hill, p. 354-382, 1991.

SABAA, M.; MOHAMED, R. R.; ORABY, E. H. Vanillin–Schiff's bases as organic thermal stabilizers and co-stabilizers for rigid poly (vinyl chloride). **European Polymer Journal**, United States of America, v. 45, n. 11, p. 3072-3080, 2009.

SAEIDNIA, S.; ABDOLLAHI, M. Antioxidants: Frieds or foe in prevention or treatment of cancer: The debate of the century. **Toxicology and Applied Pharmacology**, United States of America, v. 271, n. 1, p. 49-63, 2013.

SANJAY VEIGA. Disponível em: https://www.flickr.com/photos/sanjayveiga/2657632100/. Acesso em: 10 de maio de 2022.

SANO, S. M.; BRITO, M. A. F.; RIBEIRO, J. **Frutas Nativas da Região Centro-Oeste do Brasil**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2006.

SANO, S. M.; RIBEIRO, J. F.; BRITO, M. A. **Baru:** biologia e uso. 2004. Disponível em: https://www.embrapa.br/cerrados/publicacoes/. Acesso em: 15 de maio de 2019.

SANZ, L. *et al.* Snake venomics of the South and Central American Bushmasters. Comparison of the toxin composition of *Lachesis muta* gathered from proteomic versus transcriptomic analysis. **Journal of Proteomics**, United States of America, v. 71, n. 1, p. 46-60, 2008.

SAQUETTI, C. H. C. *et al.* Perfil eletroforético do proteinograma sérico de equinos com obstrução experimental do cólon menor. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte - MG, Brasil, v. 60, p. 794-799, 2008.

SATO, M. *et al.* Myocardial protection with red wine extract. **Journal of Cardiovascular Pharmacology**, United States of America, v. 35, n. 2, p. 263–268, 2000.

SAUTTER, C. K. *et al.* Determinação de resveratrol em sucos de uva no Brasil. **Food Science Technology**, Campinas – SP, Brasil, v. 25, n. 3, 2005.

SAVOURET, J. F.; QUESNE, M. Resveratrol and cancer: a review. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, United States of America, v. 56, n. 2, p. 84–87, 2002.

SCHEFFER, M. C.; MING, L. C.; ARAUJO, A. J. Conservação de recursos genéticos de plantas medicinais. *In*: QUEIROZ, M. A.; GOEDERT, C. O.; RAMOS, S. R. R. **Recursos Genéticos e melhoramento de plantas para o nordeste brasileiro.** Brasíia – DF, EMBRAPA: Recursos Genéticos e Biotecnologia. 2002. Disponível em: http://www.cpatsa.embrapa.br/catalogo/livrorg/ Acesso em 10/09/2020.

SECRETARIA DA SAÚDE. Paraná, 2021. Disponivel em: https://www.saude.pr.gov.br/Pagina/Acidentes-por-Serpentes. Acesso em: 09 de março de 2023.

SGAMBATO, A. *et al.* Resveratrol, a natural phenolic compound, inhibits cell proliferation and prevents oxidative DNA damage. **Mutation Research**, United States of America, v. 496, p. 171–180, 2001.

SHAUGHNESSY, D. T.; SETZER, R. W.; DEMARINI, D. M. The antimutagenic effect of vanillin and cinnamaldehyde on spontaneous mutation in *Salmonella* TA104 is due to a reduction in mutations at GC but not AT sites. **Mutation Research**, United States of America, v. 1, p. 480-481, 2001.

SILVA JUNIOR, J. G. **Eletroforese de proteínas: guia teórico prático**. Editora Interciência, 2001.

SILVA, V. A. *et al.* Eficácia antifúngica dos extratos da *Lippia sidoides* Cham. e *Matricaria recutita* Linn. Sobre leveduras do gênero *Candida*. **BioFarm**, Paraíba, Brasil, v. 5, p. 18-23, 2011.

SINAN - Sistema de Informação de Agravos de Notificação. Brasília, 2017. Disponível em: http://www.portalsinan.saude.gov.br/#:~:text=O%20Sistema%20de%20Informa%C3%A7%C3%A3o%20de,%C3%A9%20facultado%20a%20estados%20e Acesso em: 22 dezembro de 2021.

SOARES, A. Use of snake venom for biomedical researchers and drug development. **Open Journal of Biochemistry and Biotechnology**, United States of America, v. 1, n. 2012, p. 1-3, 2012.

SOUZA, R. C. G. Aspectos clínicos do acidente laquético. In: CARDOSO, J. L. C. *et al.* (Eds.) **Animais peçonhentos no Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos acidentes**. 2. ed. São Paulo: Sarvier, p. 96-107, 2009.

SOUZA, R. D. **Caracterização bioquímica e funcional de uma fosfolipase A2 homóloga e peptídeos sintéticos do veneno de *Lachesis muta muta* com atividade antibacteriana**. 2018. Tese de Doutorado – Universidade de Rondônia, Rondônia, 2018. Disponível em: https://ri.unir.br/jspui/bitstream/123456789/2450/1/TESE_%20Rafaela%20Diniz%20Sousa%20_%202018.pdf. Acesso em: 09 de abril de 2022.

SOLEAS, G. J.; DIAMANDIS, E. P.; GOLDBERG, D. M. Resveratrol: a molecule whose time has come? And gone? **Clinical Biochemistry**, United States of America, v. 30, n. 2, p. 91-113, 1997.

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

STRANSKY S. *et al. In vitro* assessment of cytotoxic activities of *Lachesis muta muta* snake venom. **PLOS Medicine**. San Francisco, California, USA, v. 2, 2018.

TACHINO, N. *et al.* Mechanisms of the in vitro antimutagenic action of chlorophyllin against benzo[a]pyrene: Studies of enzyme inhibition, molecular complex formation and degradation of the ultimate carcinogem. **Mutation Research**, United States of America, v. 308, n.2, p.191–203, 1994.

TAI, A. *et al.* Evaluation of antioxidant activity of vanillin by using multiple antioxidant assays. **Biochimica et Biophysica Acta**, United States of America, USA, v.1810, n. 2, p.170– 177, 2011.

TAKEMOTO, E. *et al.* Composição química da semente e do óleo de baru (*Dipteryx alata* Vog.) nativo do Município de Pirenópolis, Estado de Goiás. R**evista do Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, Brasil, v.60, n.2, p.113-117, 2001.

TAVARES, L.C. QSAR: A abordagem de Hansch. **Quimíca Nova**, São Paulo, Brasil, v. 27, n. 4, p. 631-639, 2004.

TIAN, Y. F. *et al.* α-Lipoic acid prevents mild portal endotoxaemia induced hepatic inflammation and β cell dysfunction. **European Journal of Clinical Investigation**, London, v. 42, n. 6, p. 637-648, 2012.

TIMMERS, S. *et al.* Calorie restriction-like effects of 30 days of resveratrol supplementation on energy metabolism and metabolic profile in obese humans. **Cell Metabolism**, Cambridge, USA, v. 14, n. 5, p. 612-622, 2011.

TOGASHI, Marie. **Composição e caracterização química e nutricional do fruto do baru (*Dipteryx alata* Vog.)**. 1993. Dissertação de Mestrado – Universidade de Campinas, Campinas, 1993. Disponível em: https://repositorio.unicamp.br/Acervo/Detalhe/65210. Acesso em: 10 de abril de 2022.
TOGASHI, M.; SGARBIERI, V. C. Avaliação nutricional e da proteína e do óleo de semente de baru (*Dipteryx alata* Vog.). **Ciência Tecnologia de Alimentos**, Brasil, v. 15, n. 1, p. 66-69, 1995.

TRIBUIANI, N. *et al*. *Vellozia flavicans* Mart. Ex Shult. hydrooalcoholic extract inhibits the neuromuscular blockade induced by *Bothrops jararacussu* venom. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, United States of America, USA, v. 14, n. 1, p. 48, 2014.

UENOBE, F.; NAKAMURA, S.; MIYAZAWA M. Antimutagenic effect of resveratrol against Trp-P-1. **Mutation Research**, United States of America, USA, v. 373, n. 2, p. 197-200, 1997.

UKIYA, M. *et al.* Constituents of Compositae plants: III. Anti-tumor promoting effects and cytotoxic activity against human cancer cell lines of triterpene diols and triols from edible chrysanthemum flowers. **Cancer Letters**, United States of America, USA, v. 177, n. 1, p. 7-12, 2002.

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.

VALLILO, M. I.; TAVARES, M.; AUED, S. Composição química da polpa e da semente do fruto do cumbaru (*Dipteryx alata* Vog.) - Caracterização do óleo da semente. **Revista do Instituto Florestal**, São Paulo, Brasil, v.2, n.2, p.115-125, 1990.

VARANDA, E. A.; GIANNINI, M. J. S. M. Bioquímica de veneno de serpentes. *In*: BARRAVIEIRA, B. **Venenos animais: uma visão integrada**. Rio de Janeiro: Científica, cap. 14, p. 205-223, 1994.

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

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

VERA, R. *et al*. Características Químicas de Amêndoas de Barueiros (*Dipteryx alata* vog.) de Ocorrência Natural no Cerrado do Estado de Goiás, Brasil. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Brasil, v. 31, n. 1, p. 112-118, 2009.

VILJOEN, C. C. *et al.* Isolation and amino acid sequence of caudoxin, a presynaptic acting toxic phospholipase A_2 from the venom of the horned puff adder (*Bitis caudalis*). **Toxicon**, United States of America, v. 20, n. 4, p. 715-737, 1982.

YOSHIDA, E. H. *et al.* Evaluation of the safety of three phenolic compounds from *Dipteryx alata* Vogel with antiophidian potential. **Chinese Medicine**, China, v. 6, n. 1, p. 1-12, 2015.

YOSHIDA, E. H. *et al.* Evaluation of betulin mutagenicity by *Salmonella/*Microsome Test. **Advanced Pharmaceutical Bulletin**, Tabriz, Iran, v. 6, n. 3, p. 443-447, 2016.

WANG, S. *et al.* Tissue distribution of trans-resveratrol and its metabolites after oral administration in human eyes. **Journal Ophthalmology**, United States of America, v. 2017, p. 12, 2017.

WATERS, A. P.; MCCUTHAN T. F. Ribosomal RNA: Nature`s own polymerase – amplified target for diagnosis. **Parasitology Today**, United States of America, v. 6, p. 56-59, 1990.

WESTERMEIER, R. **Electrophoresis in practice: A guide to methods and applications of DNA and protein separations**. Weinheim: John Wiley & Sons, p. 406, 2005.

WU, S.-L. *et al.* Vanillin improves and prevents trinitrobenzene sulfonic acid-induced colitis in mice. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, Bethesda, USA, v.330, n.2, p.370–376, 2009.

ZDZISINSKA, B. *et al.* Differential effect of betulin and betulinic acid on cytokine production in human whole blood cell cultures. **Polish Journal of Pharmacological**, Kraków, Poland, v. 55, n. 2, p. 235-238, 2003.

ZHANG, Y.; WANG, X.; DING, L. Interaction between tryptophan-vanillin Schiff base and herring sperm DNA. **Journal of the Serbian Chemical Society**, Belgrade, Serbia, v. 75, n. 9, p. 1191-1201, 2010.

ZUCO, V. *et al.* Selective cytotoxicity of betulinic acid on tumor cell lines, but not on normal cells. **Cancer Letters**, United States of America, v. 175, n. 1, p. 17-25, 2002.