

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

**Jaqueline de Cássia Proença Assunção**

**NANOPARTÍCULAS DE PRATA (AgNPs) – MUTAGENICIDADE E**  
**INFLUÊNCIA SOBRE OS EFEITOS TÓXICOS DO VENENO DA SERPENTE**  
*Philodryas olfersii* (COLUBRIDAE)

**SOROCABA/SP**

**2021**

**Jaqueline de Cássia Proença Assunção**

**NANOPARTÍCULAS DE PRATA (AgNPs) – MUTAGENICIDADE E  
INFLUÊNCIA SOBRE OS EFEITOS TÓXICOS DO VENENO DA SERPENTE  
*Philodryas olfersii* (COLUBRIDAE)**

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

**Orientador (a):** Prof. (a) Dr.(a). Yoko Oshima Franco

**SOROCABA/SP**

**2021**

## Ficha Catalográfica

A873n Assunção, Jaqueline de Cássia Proença  
Nanopartículas de prata (AgNPs) : mutagenicidade e influência  
sobre os efeitos tóxicos do veneno da serpente *Philodryas olfersii*  
(Colubridae) / Jaqueline de Cássia Proença Assunção. – 2021.  
87 f. : il.

Orientadora: Profa. Dra. Yoko Oshima Franco.  
Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) –  
Universidade de Sorocaba, Sorocaba, SP, 2021.

1. Nanopartículas. 2. Nanotecnologia. 3. Prata. 4. Cobra  
venenosa - Veneno. I. Franco, Yoko Oshima, orient. II. Universidade  
de Sorocaba. III. Título.

JAQUELINE DE CÁSSIA PROENÇA ASSUNÇÃO

NANOPARTÍCULAS DE PRATA (AgNPs) – MUTAGENICIDADE E  
INFLUÊNCIA SOBRE OS EFEITOS TÓXICOS DO VENENO DA SERPENTE  
*PHILODRYAS OLFERSII* (COLUBRIDAE)

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

Aprovado em: 29/01/2021

BANCA EXAMINADORA:



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



---

Prof. (a) Dr. (a) Edson Hideaki Yoshida  
Centro Universitário Sudoeste Paulista – Itapetininga



---

Prof. (a) Dr. (a) Rita de Cássia de Oliveira Collaço  
Departamento de Farmacologia - Unicamp

## DEDICATÓRIA

Ao *Carlos Augusto Santos Assunção*, meu companheiro, incentivador e Amor da minha vida, sua garra e vontade de vencer sempre me inspiraram. Eu nunca chegaria até aqui sem você ao meu lado, Dedico-lhe esta pesquisa e todo meu Amor.

À *Idalina Rodrigues de Proença* minha mãe e *João Rodrigues de Proença* (*in memoriam*) meu pai, que me ensinaram a lutar e perseverar. Com exemplos práticos me ensinaram a honestidade, a honrar meu caráter e a cumprir com minha palavra independente das circunstâncias.

Dedico essa conquista a vocês.

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, por me conceder vida, saúde e força de vontade para chegar até aqui, me doando resiliência, para ser capaz de me levantar depois de cada dificuldade.

Agradeço a amada Professora Doutora Yoko Oshima Franco, que com muito respeito, profissionalismo e amor à profissão aceitou o desafio de orientar uma aluna que não era da área da Saúde com muita paciência, ensinamentos que levarei não só para a vida acadêmica, mas para a vida toda com muito carinho.

Aos colegas do laboratório, Doutoranda Natália Tribuiani, amiga, que me ensinou a fazer cirurgias, a usar os equipamentos com muita paciência e dedicação.

Professor Mestrando Ederson Constantino, amigo, que renunciou a uma semana de seus afazeres para me ensinar o Teste de Ames com todo cuidado e dedicação durante uma pandemia, e sempre parceiro em todas as horas e agora amigo para toda a vida.

Doutor Edson Hideaki Yoshida, sempre amável e dando conselhos primordiais.

Mestre Valéria de Campos Orsi, uma profissional de competência inigualável, sempre contribuiu prontamente quando precisei.

À Mestranda e Médica Veterinária Isadora Caruso Fontana Oliveira, muito organizada e disposta a colaborar mesmo nossos trabalhos sendo de áreas diferentes, sua colaboração foi muito importante.

À Doutoranda Débora Antunes Neto Moreno, sempre doce e amável, Mestrando Jocimar de Sousa, Fani Ribeiro da Silva, Júlio César de Almeida, Henrique Trombini Garcia, Rosenéia Aparecida Leite Tagliaferro, Márcia Regina das Mercedes e Laura Lumi Hanai.

Aos alunos da Iniciação Científica, Anna Paula Farias de França, que começou sua Iniciação Científica ao mesmo tempo que eu, iniciei no mestrado. Tive o privilégio de conhecer alguém tão jovem e tão inteligente, tenho um carinho imensurável, melhor aluna do Curso de Farmácia da Uniso, sempre Top, me ajudou e foi além, fez todo o trabalho experimental e teórico junto comigo, lado a lado, me levantou quando ficava triste, orou por mim e pelo nosso projeto e Deus a ouviu, te admiro muito!

Eduardo Matheus Ricciardi Suzuki, amigo para qualquer hora, pronto para ajudar.

Caroline Malavasi Barros, com sua delicadeza e simpatia sempre ajudou no que

fosse necessário e Ana Laura de Andrade Rodrigues, muito dedicada e pronta para ajudar e aprender.

Todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas que tive o privilégio de ser aluna. Muito obrigada!

Cláudia Neres de Meira Andrade da coordenação, colaboradores da manutenção, profissionais da higiene, portaria e recepção, sempre muito prontos e com muita educação me atenderam, muito obrigada por fazerem as coisas acontecerem.

Ao casal Breno Zupo e Elaine Cunha, que me cederam gentilmente algumas fotos da *P. offersii* encontrada em seu jardim no bairro Wanel Ville Sorocaba.

À BioClin®, por ter me enviado gentilmente Kits para análise da creatinoquinase (CK) mostrando o interesse e incentivando a pesquisa.

Ao professor Sandro Rostelato Ferreira, que participou da Banca Examinadora como suplente.

À Doutora Miriele Cristina Ferraz que gentilmente colaborou com suas considerações importantíssimas sendo membro da Banca Examinadora da Qualificação deste trabalho.

À Professora Doutora Carolina Alves dos Santos, que nos doou as Nanopartículas de Prata sintetizadas com curcumina, pois sem elas não seria possível o estudo.

À Professora Doutora Priscila Randazzo de Moura que nos doou o veneno da *P. offersii* e Doutora Rita de Cassia de Oliveira Collaço, que nos auxiliaram com o experimento paralelo ao projeto no Laboratório da PUC- Sorocaba para o estudo do edema de pele em ratos para melhor avaliação do veneno.

Ao caríssimo Doutor José Carlos Cogo, o qual extraiu o veneno e repassou à Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Priscila Randazzo Moura, sua contribuição foi muito além, nos ajudando analisar criticamente com seu imenso conhecimento sobre o veneno da *P. offersii*.

A PROBIEN/Uniso: pelo incentivo de bolsa de 50% em todo o curso.

“Não tenho nenhum talento especial, apenas sou curiosamente apaixonado”.

Albert Einstein

## RESUMO

**Introdução:** As nanopartículas de prata (AgNPs) despertam interesse principalmente pela sua propriedade antibacteriana e são produzidas pela ação de agentes redutores sobre íons prata. Em plena era da química verde que busca eliminar o uso e geração de substâncias nocivas à saúde humana e ao ambiente, a curcumina proveniente da *Curcuma longa* tem sido utilizada como um precursor para a obtenção de AgNPs promissoras nos estudos em venenos ofídicos. A serpente *Philodryas offersii* é conhecida como não peçonhenta devido à sua dentição opistóglifa, entretanto, seu veneno produz edema, eritema, hemorragia e muita dor quando ocorrem acidentes em humanos. Tendo em vista que o tratamento convencional para acidentes ofídicos (soro antiofídico) não se mostra eficaz contra efeitos locais, que são os principais efeitos do veneno de *P. offersii*, é importante a busca por novos compostos com potencial ação antiofídica. **Objetivos:** Os objetivos deste estudo foram avaliar a toxicidade de AgNPs sintetizadas com curcumina por meio do ensaio de mutagenicidade e, farmacologicamente, avaliar a sua influência contra os efeitos neurotóxico e miotóxico *ex vivo* do veneno da serpente *P. offersii* (Colubridae). **Metodologia:** O delineamento do estudo foi *in vitro* e com animais (CEUA/Uniso 159/2019). Definida a toxicidade preliminar das AgNPs sintetizadas com curcumina (0,081 mg/mL-130 nm), a mutagenicidade foi avaliada pelo parâmetro *Salmonella*/microssoma (Teste de Ames) utilizando-se as linhagens de *Salmonella typhimurium* TA97a, TA98, TA100 e TA102, com e sem ativação metabólica, em triplicata e na presença de controles positivo, negativo e espontâneo. O estudo farmacológico foi realizado em preparações *Biventer cervicis* de pintainhos, por meio de técnica miográfica convencional e adições exógenas de acetilcolina (ACh) e cloreto de potássio (KCl). Para avaliar a miotoxicidade, alíquotas foram retiradas do banho para a dosagem da enzima creatinoquinase (CK). Os resultados foram analisados estatisticamente e considerados significativos os valores com  $p < 0,05$ . **Resultados:** As AgNPs sintetizadas com curcumina foram eficientes com apenas 0,0162 ng/mL, quando pré- incubada por 30 minutos com 50 µg/mL do veneno de *P. offersii*. Esta mistura protegeu contra o bloqueio das contrações e contraturas (ACh e KCl) na preparação *Biventer cervicis* de pintainho. Sua eficiência também foi importante na preservação pós-sináptica, pois o veneno afeta os receptores pós-sinápticos e a

membrana do sarcoplasma, demonstrados pelas respostas contraturantes de ACh e KCl. A dosagem de CK liberada no banho contendo a preparação neuromuscular, frente aos diferentes protocolos experimentais, não foi estatisticamente diferente do controle de Krebs. **Conclusão:** As AgNPs foram eficazes contra o bloqueio neuromuscular em *B. cervicis* contra as injúrias causadas pelo veneno da *P. offersii* e não mostraram-se seguras pelo parâmetro do teste de Ames. Nos ensaios em bactérias, as AgNPs mostraram-se não mutagênicas na ausência do sistema microssomal, porém, mutagênicas na presença de ativação microssomal. A dosagem de creatinoquinase não se mostrou um bom biomarcador quando realizadas em amostras coletadas do banho contendo a preparação neuromuscular.

**Palavras-chave:** AgNPs. Miotoxicidade. Neurotoxicidade. *Philodryas offersii*. Teste de Ames.

## ABSTRACT

**Introduction:** Silver nanoparticles (AgNPs) are of particular interest for their antibacterial properties and are produced by the action of reducing agents on silver ions. In the midst of green chemistry that seeks to eliminate the use and generation of substances harmful to human health and the environment, curcumin from *Curcuma longa* has been used as a precursor to obtain promising AgNPs in studies on snake venoms. The *Philodryas olfersii* snake is known as non-venomous due to its opisthoglyphic dentition, however, its venom produces edema, erythema, hemorrhage and a lot of pain when accidents occur in humans. Bearing in mind that the conventional treatment for snakebites (anti-ophidic serum) is not effective against local effects, which are the main effects of the *P. olfersii* venom, it is important to search for new compounds with potential anti-ophidic action. **Objectives:** The objectives of this study were to evaluate the toxicity of AgNPs synthesized with curcumin through the mutagenicity assay and, pharmacologically, to evaluate its influence against the ex vivo neurotoxic and myotoxic effects of the snake venom *P. olfersii* (Colubridae). **Methodology:** The study design was in vitro and with animals (CEUA / Uniso 159/2019). After defining the preliminary toxicity of AgNPs synthesized with curcumin (0.081 mg / mL-130 nm), mutagenicity was assessed by the parameter *Salmonella*/microsome (Ames test) using the *Salmonella typhimurium* strains TA97a, TA98, TA100 and TA102, with and without metabolic activation, in triplicate and in the presence of positive, negative and spontaneous controls. The pharmacological study was carried out on *Biventer cervicis* preparations of chicks, using a conventional myographic technique and exogenous additions of acetylcholine (ACh) and potassium chloride (KCl). To assess myotoxicity, aliquots were removed from the bath to measure the creatine kinase (CK) enzyme. The results were statistically analyzed and values with  $p < 0.05$  were considered significant. **Results:** AgNPs synthesized with curcumin were efficient with only 0.0162 ng/mL, when pre-incubated for 30 minutes with 50  $\mu$ g / ml of *P. olfersii* venom. This mixture protected against the blocking of contractions and contractures (ACh and KCl) in the preparation *Biventer cervicis* of chick. Its efficiency was also important in the post-synaptic preservation, since the poison affects the postsynaptic receptors and the sarcoplasm membrane, demonstrated by the contracting responses of ACh and KCl. The dosage of CK released in the bath containing the neuromuscular preparation, compared to the different experimental

protocols, was not statistically different from the Krebs control. **Conclusion:** AgNPs were effective against neuromuscular block in *B. cervicis* against injuries caused by the *P. offersii* venom and were not shown to be safe by the Ames test parameter. In bacterial assays, AgNPs proved to be non-mutagenic in the absence of the microsomal system, however, mutagenic in the presence of microsomal activation. The measurement of creatine kinase was not shown to be a good biomarker when performed on samples collected from the bath containing the neuromuscular preparation.

**Keywords:** AgNPs, myotoxicity, neurotoxicity, *Philodryas offersii*, Ames Test.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACh	Acetilcolina
Ag <sup>+</sup>	Prata catiônica
AgNO <sub>3</sub>	Nitrato de prata
AgNPs	Nanopartículas de prata
ATP	Adenosina trifosfato
<i>B. jararaca.</i>	<i>Bothrops jararaca</i>
BC	<i>Biventer cervicis</i>
CEUA	Comissão de Ética na Utilização de Animais
CK	Creatinoquinase
his	Histidina
IM	Índice mutagênico
KCl	Cloreto de Potássio
LaPeNM	Laboratório de Pesquisa em Neurofarmacologia e Multidisciplinar
MgCl <sub>2</sub>	Cloreto de Magnésio
min	Minutos
NaCl	Cloreto de sódio
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Fosfato dihidrogenado de sódio
NaHCO <sub>3</sub>	Bicarbonato de sódio
NPD	4-Nitrofenilenodiamina
<i>P. olfersii</i>	<i>Philodryas olfersii</i>
<i>P. patagoniensis</i>	<i>Philodryas patagoniensis</i>
<i>S. typhimurium</i>	<i>Salmonella typhimurium</i>
UV	Ultravioleta

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Características Genótipas e Fenótipas para ensaios do Teste de Ames .....	51
Tabela 2	Taxa de reversão espontânea por placa .....	52
Tabela 3	Resultados Toxicidade Preliminar AgNPS 0,081 mg/mL. TA 98.....	60
Tabela 4	Resultados Toxicidade Preliminar AgNPS 0,081 mg/mL.TA 100.....	61
Tabela 5	Resultados do Teste de Ames sem ativação metabólica (-S9) – AgNPs 0,081mg/mL (TA97a; TA98; TA100; TA102) .....	62
Tabela 6	Resultados de Teste Ames com ativação metabólica (+S9) AgNPs 0,081mg/mL (TA97a; TA98; TA100; TA102) .....	63

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Representação fotográfica serpente <i>Philodryas olfersii</i> .....	24
Figura 2	Tipos de dentição das serpentes .....	27
Figura 3a	Glândula de Duvernoy .....	28
Figura 3b	Extração do veneno de serpente com dentição opistóglifa .....	29
Figura 4a	<i>Biventer cervicis</i> (BC) de pintainho <i>ex vivo</i> .....	30
Figura 4b	Isolamento da preparação (BC) .....	30
Figura 5a	Preparação <i>Biventer cervicis</i> de pintainho .....	35
Figura 5b	Preparação <i>Biventer cervicis</i> de pintainho .....	35
Figura 6	Equipamento miográfico .....	35
Figura 7	Representação gráfica da resposta contraturante .....	36
Figura 8a	Representação gráfica da preparação (BC), estímulo indireto...	39
Figura 8b	Representação gráfica da preparação (BC), estímulo indireto ..	39
Figura 9	Curva concentração-resposta de AgNPs (0,081 mg/mL) .....	40
Figura 10	Resposta contraturante - adição exógena de ACh 88,1 nM/mL.	41
Figura 11	Resposta contraturante - adição exógena de KCl 27 mM .....	42
Figura 12a	Cálculo concentração final das AgNPs .....	42
Figura 12b	Cálculo das concentrações de AgNPs .....	43
Figura 13	Comparação entre a resposta contrátil de Krebs (controle), pré-incubação e veneno .....	43
Figura 14a	Respostas contraturantes obtidas frente à adição exógena de KCl .....	44
Figura 14b	Respostas contraturantes obtidas frente à adição exógena de ACh .....	44
Figura 15	Resultados dos testes de creatinoquinase (CK) .....	45
Figura 16	Registros miográficos em temperatura 23° C (não adequados) ..	46
Figura 17	Representação Gráfica do Teste de Ames sem ativação metabólica e com ativação Metabólica .....	56
Figura 18	Organização do fluxo laminar para a realização do ensaio .....	57
Figura 19	Organização e Enumeração das Placas .....	57
Figura 20	Crescimento de Colônias <i>Salmonella typhimurium</i> .....	58

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>19</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO DA LITERATURA .....</b>	<b>21</b>
<b>2.1</b>	<b>Nanopartículas de Prata (AgNPs) .....</b>	<b>21</b>
<b>2.2</b>	<b>Teste de Ames (<i>Salmonella</i>/Microsoma .....</b>	<b>23</b>
2.2.1	Solução S9 .....	23
<b>2.3</b>	<b>Serpente <i>Philodryas olfersii</i> (Lichtenstein, 1823) .....</b>	<b>24</b>
2.3.1	Ação do Veneno .....	25
2.3.2	Glândula de Duvernoy .....	27
<b>2.4</b>	<b>Junção Neuromuscular <i>Biventer cervicis</i> de Pintainho (BC) ex vivo .....</b>	<b>29</b>
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>31</b>
<b>3.1</b>	<b>Objetivo Geral .....</b>	<b>31</b>
<b>3.2</b>	<b>Objetivos Específicos .....</b>	<b>31</b>
<b>4</b>	<b>CAPÍTULO 1 .....</b>	<b>32</b>
<b>4.1</b>	<b>INFLUÊNCIA DAS AgNPs SOBRE OS EFEITOS TÓXICOS DO VENENO DA SERPENTE <i>Philodryas olfersii</i> .....</b>	<b>32</b>
4.1.2	Material e Métodos .....	32
4.1.2.1	Nanopartículas de Prata (AgNPs) .....	32
4.1.2.2	Veneno de <i>Philodryas olfersii</i> .....	33
4.1.2.3	Animais .....	33
<b>4.2</b>	<b>Preparação de Ensaios Farmacológicos em (BC) de Pintainhos .</b>	<b>33</b>
<b>4.3</b>	<b>Protocolos Farmacológicos .....</b>	<b>36</b>
4.3.1	Miotoxicidade do Veneno de <i>P. olfersii</i> .....	37
<b>5</b>	<b>FORMA DE ANÁLISE DE RESULTADOS FARMACOLÓGICOS .....</b>	<b>38</b>
<b>6</b>	<b>RESULTADOS .....</b>	<b>39</b>
<b>6.1</b>	<b>Protocolos Comparativos entre Controle e Veneno 50 µg/mL em Junção Neuromuscular (BC) .....</b>	<b>39</b>
<b>6.2</b>	<b>Curva Concentração-resposta AgNPs na Junção Neuromuscular (BC) .....</b>	<b>40</b>
<b>6.3</b>	<b>Respostas Contraturantes com adição Exógena de ACh em BC ..</b>	<b>41</b>
<b>6.4</b>	<b>Respostas Contraturantes com Adição Exógena de KCl em BC ..</b>	<b>42</b>

6.5	Ensaio de Neutralização (AgNPs+Veneno) na preparação BC ....	43
6.6	Contraturas em Resposta à Adição Exógena KCl e ACh .....	44
6.7	Avaliação da Miotoxicidade pelo Parâmetro da Atividade Enzimática de CK .....	45
6.8	Influência da Temperatura na Ação do Veneno .....	46
7	<b>DISCUSSÃO</b> .....	47
8	<b>CAPÍTULO 2</b> .....	50
8.1	Avaliação de Mutagenicidade de AgNPs pelo Parâmetro <i>Salmonella</i> /Microsoma (TESTE DE AMES) .....	50
8.1.1	Material e Métodos .....	50
8.2	<b>Teste Preliminar de Toxicidade</b> .....	50
8.3	<b>Realização do Teste de Ames</b> .....	51
8.4	<b>Preparo dos Inóculos de <i>S. Typhimurium</i></b> .....	52
8.4.1	Meios de Cultura e Soluções .....	52
8.4.2	Caldo Nutriente .....	52
8.4.3	Top Agar .....	53
8.4.4	Solução de Biotina/Histidina (0,5 mM) .....	53
8.4.5	Agar Mínimo Nutriente.....	53
8.4.6	Solução de Sais de Vogel Bonner (VB) .....	53
8.4.7	Soluções de Glicose a 8% e 40% .....	54
8.5	<b>Tampão de fosfato de sódio 0,2 M pH 7,4</b> .....	54
8.5.1	$\beta$ -Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato ( $\beta$ -NADP) 0,1 M .....	54
8.5.2	Glicose-6-fosfato (G6P) 1 M .....	55
8.5.3	Solução de Cloreto de potássio (KCl) 1,65 M .....	55
8.5.4	Solução de Cloreto de Magnésio (MgCl <sub>2</sub> ) 0,4 M .....	55
8.6	<b>Fração Microsomal S9</b> .....	55
8.7	<b>Controles Negativos e Positivos</b> .....	56
9	<b>FORMA DE ANÁLISE DOS RESULTADOS DO TESTE DE AMES....</b>	59
10	<b>RESULTADOS</b> .....	60
10.1	Teste Preliminar nas Cepas TA 98 e TA 100 .....	60
10.2	Teste de Ames sem Ativação Metabólica.....	61
10.3	Teste de Ames com Ativação Metabólica .....	63
11	<b>DISCUSSÃO</b> .....	65

12	CONCLUSÃO .....	71
	REFERÊNCIAS .....	72
	ANEXO I .....	87

## 1 INTRODUÇÃO

Modernas tecnologias como a nanotecnologia vem sendo pensadas para impedir a propagação de veneno em caso de acidentes ofídicos, doença negligenciada no mundo todo, cujo tratamento oficial é a soroterapia. Isso atende à estratégia global da Organização Mundial da Saúde para prevenção e controle do ambiente de acidentes por serpentes (WILLIAMS *et al.*, 2019).

A soroterapia deve ser administrada precocemente, uma condição desfavorável para os habitantes das áreas rurais de muitos países. Assim as nanopartículas podem ajudar contra várias serpentes peçonhentas (BISWAS *et al.*, 2012), como já demonstrado com *Naja nigricollis* (Elapidae) (O'BRIEN *et al.*, 2018), *Doboia russellie* (Viperidae) (HINGANE; PANGAM; DONGRE, 2018), *Bothrops jararaca* e *Bothrops erythromelas* (Viperidae) (SOARES *et al.*, 2018), *Bothrops jararacussu* (Viperidae) (OLIVEIRA *et al.*, 2019), *Daboia russelii* (Viperidae) e *Naja kaouthia* (Elapidae) (SAHA *et al.*, 2015; CHAKRABARTTY *et al.*, 2019).

Os motivos para o uso de nanopartículas envolvem a ponte de toxinas de veneno como interface para a administração de medicamentos e terapia direcionada (BISWAS *et al.*, 2012), como demonstrado com a entrega de antígenos do veneno de *Naja naja oxiana* encapsulados em quitosana (MOHAMMAD POURDOUNIGHI *et al.*, 2015) visando células tumorais. Com nanopartículas de ouro à base de plantas *Vitex negundo*, com o objetivo de neutralizar a toxicidade aguda, estresse agudo e resposta a citocinas de *Naja kaouthia* (SAHA *et al.*, 2015). Também em casos de produção de antiveneno usando nanopartículas de quitosana carregadas com venenos de *B. jararaca* e *B. erythromelas* como imunoadjuvantes (SOARES *et al.*, 2018). Ou para atuar como um antídoto, como visto usando nanopartículas de dióxido de titânio contra a atividade letal de *Daboia russelii* e venenos de *Naja kaouthia* (CHAKRABARTTY *et al.*, 2019).

Às vezes, o objetivo é mais específico, como mitigar a progressão do dano tecidual local, como observado com uma nanopartícula abiótica de hidrogel contra uma variedade diversa de isoformas de fosfolipases A2 e 3FTX encontradas no veneno de *Naja nigricollis* (O'BRIEN *et al.*, 2018). E contra o bloqueio neuromuscular induzido por *Bothrops jararacussu* usando nanopartículas de prata (50 nm) (OLIVEIRA *et al.*, 2019) ou contra os efeitos proteolíticos de *Doboia russellie* usando

nanopartículas de prata (52 nm) (HINGANE; PANGAM; DONGRE, 2018).

Os acidentes com *P. olfersii* são semelhantes aos causados pelo gênero *Bothrops* e frequentemente tratados com antiveneno botrópico (ARAUJO; SANTOS, 1997; ROCHA; PAIXÃO-CAVALCANTE; FURTADO, 2006; ROCHA; FURTADO, 2007). No Brasil, os acidentes por animais peçonhentos são a segunda causa de envenenamento humano, ficando atrás apenas da intoxicação por uso de medicamentos (SINITOX, 2013).

Em um caso de acidente com *P. olfersii*, foi relatado dor no local da mordida, inchaço e vermelhidão, mas com tempo de coagulação normal (SILVEIRA; NISHIOKA, 1992), enquanto em outros acidentes também ocorreu eritema e equimose (RIBEIRO; PUORTO; JORGE, 1999). Tais sintomas são atribuídos às atividades hemorrágicas, fibrinogenolíticas e formadoras de edema (ASSAKURA *et al.*, 1992), miotóxicas (ACOSTA *et al.*, 2003) e neurotóxicas (RODRÍGUEZ-ACOSTA *et al.*, 2006) do veneno, devido à presença de enzimas proteolíticas.

Esta dissertação foi elaborada pensando em uma aplicabilidade de nanopartículas de prata sintetizadas com curcumina contra o bloqueio neuromuscular induzido pelo veneno da *P. olfersii*, e avaliar a sua toxicidade através de um ensaio de mutagenicidade.

## 2 REVISÃO DA LITERATURA.

### 2.1 Nanopartículas de prata (AgNPs)

A prata (Ag<sup>+</sup>) tem sido usada como um agente antimicrobiano, antifúngico e antiviral, em virtude de elevada toxicidade a esses organismos e pequena toxicidade ao homem (SILVER; PHUNG; SILVER, 2006). As nanopartículas em dimensões que variam de 1 a 130 nm (metal na valência zero, Ag<sup>0</sup>) (BUZEA; PACHECO; ROBBIE, 2007), tornam-se, portanto, uma atraente alternativa. As nanopartículas de prata (AgNPs) tem atraído muita atenção na investigação científica devido à sua versatilidade e aplicabilidade em diferentes áreas como engenharia, medicina, química e física. A seu favor tem-se, ainda, o rápido desenvolvimento de resistência dos patógenos aos antimicrobianos tradicionais e a dificuldade de inserção de novos fármacos, tornando as nanopartículas fortes candidatas à terapia antimicrobiana (SANTOS *et al.*, 2014).

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

O mecanismo de ação das AgNPs na inibição do crescimento e perda da infectividade ocorre ao impedir os processos na superfície e no interior da célula dos micro-organismos. A diminuta dimensão da nanopartícula de prata é essencial para sua melhor penetração à membrana celular, podendo assim, prejudicar o funcionamento celular do agente infeccioso, retardando a velocidade de suas atividades vitais (MORONES *et al.*, 2005). Vários estudos relatam que a carga positiva do íon Ag<sup>+</sup> (cedido pelas AgNPs após atravessarem a parede celular dos micro-organismos) é primordial para a sua atividade antimicrobiana, por meio da atração eletrostática entre a membrana celular dos microrganismos (negativamente

carregadas) e as nanopartículas (positivamente carregadas). Conseqüentemente, as AgNPs aumentam a permeabilidade seletiva da membrana e impedem a respiração da célula resultando na morte celular (MORONES *et al.*, 2005; BAER, 2008). Em um segundo momento, as nanopartículas de prata são capazes de invadir as células, interagindo com ligações dissulfeto dos conteúdos de glicoproteína / proteína de micro-organismos tais como vírus, bactérias e fungos.

Uma vez que podem ocorrer infecções bacterianas secundariamente no acidente ofídico, quando a serpente inocula a bactéria no momento da picada (RIBEIRO; JORGE; 1997), o uso da nanopartícula de prata pode ser promissora no tratamento de acidentes ofídicos, pois, a nanopartícula de prata na forma coloidal é muito mais eficiente do que o íon de prata, pois avanços em nanotecnologia permitiram a produção de prata metálica como nanopartículas, já que necessitam de menores concentrações para atuar com mais eficiência (DURAN, 2010). Suas dimensões extremamente pequenas, da ordem de 1 a 100 nanômetros, contendo cerca de 15.000– 20.000 átomos de prata (ANJUM *et al.*, 2013) e, como consequência, uma grande área superficial que eleva a velocidade de formação dos íons prata. Isso resulta em propriedades magnéticas, químicas e mecânicas diferentes das partículas de superfícies maiores (ZARBIN, 2007).

A toxicidade das nanopartículas pode ser afetada pelo seu tamanho. De maneira geral, reporta-se que nanopartículas menores apresentam uma tendência a maior habilidade de penetração celular e, conseqüentemente, efeitos de toxicidade. Apesar de haver exceções, nanopartículas menores tendem a ser mais tóxicas em função da maior superfície de contato, e interação entre a nanopartícula e a entidade biológica, como por exemplo, uma bactéria. Porém o tamanho da nanopartícula não é o único fator que caracteriza a toxicidade da mesma; recentemente, um estudo usando como modelo o mexilhão *Mytilus galloprovincialis* destacou que não só o tamanho da nanopartícula é importante para impactar sua toxicidade, como também os diferentes mecanismos de internalização das mesmas poderiam ser fatores-chaves que afetam o potencial do nanomaterial no meio para induzir a imunomodulação (DE LIMA; SEABRA; DURÁN, 2012).

## 2.2 Teste de Ames (*Salmonella*/Microsoma)

É extremamente importante realizar testes que avaliem a toxicidade de cada nanopartícula produzida, para que se garanta a segurança de seu uso. Dentre os testes de avaliação de toxicidade encontra-se o teste de mutagenicidade (*Salmonella*/microsoma) também conhecido como teste de Ames, selecionado para a realização deste projeto. Este ensaio é aceito para identificar substâncias puras, em mistura e em amostras ambientais que podem produzir danos genéticos que levam a mutações gênicas. Além disso, tem sido muito empregado em estudos para elucidação de mecanismos de mutagênese e antimutagênese e na avaliação de efeitos sinérgicos de misturas de compostos (UMBUZEIRO; VARGAS, 2003).

O teste de Ames baseia-se na indução de mutações reversas empregando-se 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 (UMBUZEIRO; VARGAS, 2003; MORTELMANS; ZEIGER, 2000).

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 esse teste é referido como ensaio de reversão. O número de revertentes é facilmente medido pela contagem de colônias que crescem em meio mínimo, após a exposição de uma população de células à substância a ser testada (UMBUZEIRO; VARGAS, 2003; MORTELMANS; ZEIGER, 2000).

### 2.2.1 Solução S9

Sabe-se que muitos compostos iniciadores do processo de carcinogênese necessitam ser metabolizados antes de interagir com o material genético. Desse modo realiza-se o teste de Ames na presença e ausência de um sistema de metabolização. O sistema

mais comumente utilizado, a fração microssomal S9, é composta por um homogenato de células de fígado de ratos previamente tratados com a mistura bifenilpoliclorinada (Aroclor 1254), que induz um aumento de enzimas P-450 neste órgão (UMBUZEIRO; VARGAS, 2003). É assim denominado pela obtenção de frações de enzimas *post* mitocondriais no sobrenadante resultante da ultracentrifugação a 9.000 g, por 10 minutos, do homogenato hepático (AMES *et al.*, 1973).

### 2.3 Serpente *Philodryas olfersii* (Lichtenstein, 1823)

O gênero *Philodryas* é constituído por aproximadamente 23 espécies, encontradas em todos os países da América do Sul (SOCIEDADE BRASILEIRA DE HERPETOLOGIA, 2018). São reconhecidas por apresentar corpos alongados, pupilas redondas e coloração verde, além da denticção opistóglifa o que dificulta a inoculação do veneno (PRADO-FRANCESCHI *et al.*, 1996; ARAÚJO; SANTOS, 1997; FRANÇA; MÁLAQUE, 2003).

A serpente *Philodryas olfersii* (Figura 1) possui uma faixa longitudinal de cor marrom no dorso, que vai da cabeça até a cauda. Conhecida popularmente como cobra cipó ou cobra verde, a espécie tem um tamanho mediano, atingindo até 1,5 m de comprimento total, e com cauda relativamente longa que corresponde entre 23 e 36% do tamanho corporal.

Figura 1 Representação fotográfica da serpente *Philodryas olfersii*



A serpente *P. offersii* possui atividade diurna e alimenta-se de pequenos mamíferos, aves, anuros e lagartos, que subjuga com envenenamento e constrição (HARTMANN; MARQUES, 2005). Embora essa serpente não seja agressiva e seu veneno é mais usado para facilitar sua alimentação e defesa, os acidentes ocorridos com humanos tem características clínicas de intoxicação, como edema (inchaço), eritema e equimoses (manchas escuras), linfadenopatia regional (dilatação de linfonodos), efeitos neurotóxicos e miotóxicos. Estes sintomas são parecidos aos do envenenamento por jararaca, isso porque o veneno da serpente *P. offersii* é composto de algumas enzimas que são biologicamente semelhantes aos do veneno botrópico. Muitas vezes, devido à não identificação da serpente e o quadro clínico apresentado, a vítima da *P. offersii* é tratada como se tivesse sido mordida por serpentes do gênero *Bothrops* (ARAÚJO; SANTOS, 1997).

### 2.3.1 Ação do veneno

Os venenos de serpentes são misturas contendo múltiplos componentes, sendo que 90% são proteínas. Segundo alguns autores, o conteúdo proteico dos venenos de colubrídeos é bastante variável podendo apresentar baixos níveis de proteínas e o material liofilizado conter altas concentrações de componentes não proteicos (VEST; MACKESSY; KARDONG, 1991; WEINSTEIN *et al.*, 1991; WEINSTEIN; KARDONG, 1994; HILL; MACKESSY, 2000; MACKESSY, 2002). Os venenos de *P. offersii* e *P. patagoniensis* apresentaram conteúdo de proteínas totais entre 75 e 90%, respectivamente (ROCHA; FURTADO, 2007).

As proeminentes atividades edematogênica e hiperalgésica, características nestes acidentes, e seus rápidos desenvolvimentos são típicos sinais do processo inflamatório agudo, decorrente da ação de substâncias endógenas que são liberadas após o estímulo lesivo (OHSAKA, 1979; CHACUR *et al.*, 2001, PRADO-FRANCESCHI; HYSLOP, 2002). Os venenos de *P. offersii* e *P. patagoniensis* apresentaram respostas em camundongos hiperalgésicas importantes, sendo que o veneno de *P. patagoniensis* foi mais ativo que o veneno de *P. offersii* (ROCHA; FURTADO, 2007).

A atividade hemorrágica dos venenos de viperídeos (SANCHEZ *et al.*, 1992, BJARNASON; FOX, 1994; GUTIÉRREZ; RUCAVADO, 2000) e colubrídeos (ASSAKURA *et al.*, 1992; ACOSTA *et al.*, 2003) é atribuída, principalmente à atuação

das metaloproteínas, enzimas proteolíticas com atividade dependente do íon zinco.

As hemorragias causadas pelos venenos podem ter um papel semelhante com relação aos processos digestivos e a presença de atividade hemorrágica tem sido largamente indicada em várias espécies de colubrídeos (KORNALIK; TÁBORKA; MEBS, 1978; VEST, 1988; NAVARRETE; LEMOINE; RODRIGUES- ACOSTA, 1999, LEMOINE; RODRÍGUEZ-ACOSTA, 2003; ROCHA; PAIXÃO-CAVALCANTE; FURTADO, 2006).

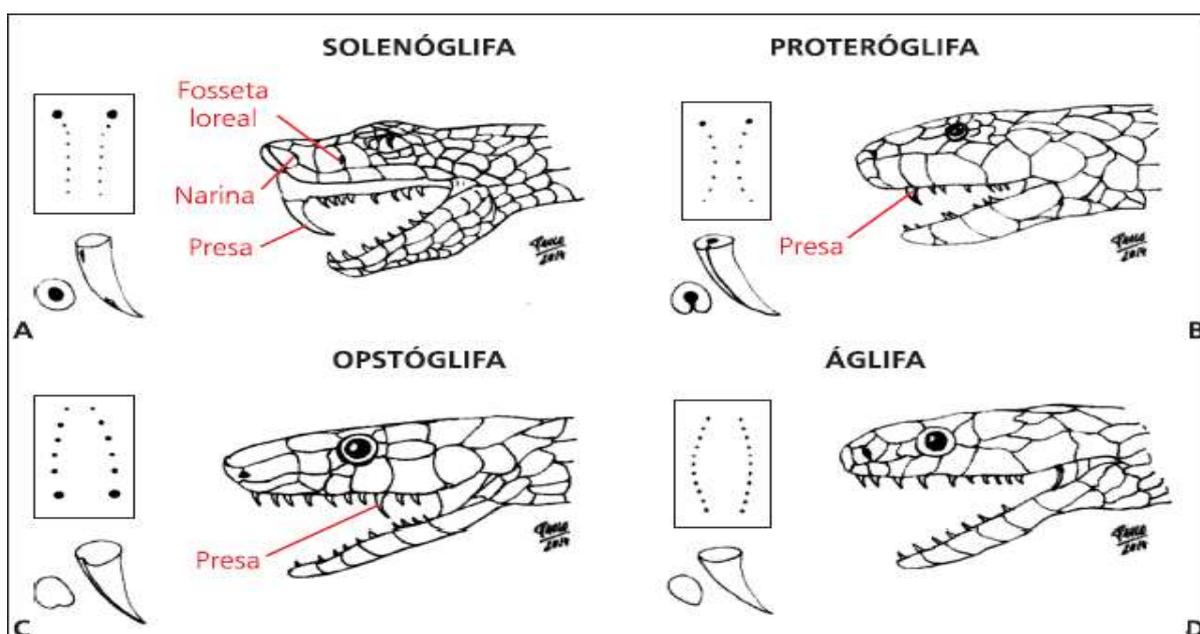
Tanjoni *et al.* (2003) utilizando um anticorpo monoclonal anti-jararagina que reconhece um epítipo presente na região c-terminal do domínio desintegrina-like, uma metaloproteínase do veneno de *Bothrops jararaca* (Wied, 1824), demonstraram pela técnica de *Dot Blot* que estes anticorpos reagiram com os venenos de *P. olfersii* e *P. patagoniensis*, sugerindo que as metaloproteínas destes venenos apresentam epítipos comuns aos de *B. jararaca*. Corroborando tais achados, Rocha; Paixão-Cavalcante; Furtado (2006) demonstraram que o soro antibotrópico comercial apresentou reatividade cruzada sendo capaz de neutralizar a ação hemorrágica, e eficientemente a atividade tóxica dos venenos de *P. olfersii* e *P. patagoniensis*, com títulos de potência similares aos obtidos com o veneno de *B. jararaca*.

Já as miotoxinas são toxinas responsáveis pelo dano muscular, podendo estar ligadas a uma ação fosfolipásica. Pouco se conhece sobre as miotoxinas dos venenos de colubrídeos e na maioria dos estudos estas toxinas têm sido parcialmente purificadas (JANSEN, 1987; PRADO-FRANCESCHI *et al.*; 1996). Segundo Assakura *et al.* (1992) o veneno de *P. olfersii* apresenta baixa atividade fosfolipásica e seus resultados mostraram baixos níveis de liberação de creatinoquinase nos vários tempos testados, com pico de ação três horas após a inoculação e retornando aos níveis basais a partir da 12ª hora. Entretanto, Acosta *et al.* (2003) e Peichoto *et al.* (2004), utilizando serpentes deste mesmo gênero do nordeste da Argentina, determinaram altos níveis desta enzima tardiamente entre 10 e 16 horas.

As atividades necrosantes decorrentes dos envenenamentos de serpentes viperídeas originam-se da ação de enzimas proteolíticas causando a destruição dos tecidos moles próximos ao local da picada (ROSENFELD, 1971); e Peichoto *et al.* (2004) determinaram esta atividade em veneno de *P. patagoniensis* em ratos, que apresentou Dose Mínima Necrosante (DMN) igual a 180,5 mg, que expressa pronunciada dermonecrose, sendo o veneno de *P. patagoniensis* mais ativo do que da *P. olfersii*.

Os relatos de acidentes causados por *P. offersii* não tem demonstrado gravidade fatal e isso se deve especialmente à anatomia de sua dentição: por serem serpentes opistóglifas, ou seja, possuem\* o dente inoculador de veneno situado na porção posterior do maxilar superior, a inoculação do veneno é dificultada (CORREIA *et al.*, 2010). Porém em 1992, após um óbito confirmado de uma criança decorrente de uma picada causada por *Philodryas offersii* no Rio Grande do Sul, evidenciou-se a necessidade de atenção médica aos acidentes causados por algumas espécies das famílias Colubridae como, por exemplo, *Philodryas nattereri*, *P. patagoniensis*, *P. viridissima*, *Boiruna sertaneja* e *P. offersii* (RIBEIRO; PUORTO; JORGE, 1994; ARAÚJO; SANTOS, 1997; DIAZ *et al.*, 2004; QUINTELA, 2010).

Figura 2 Tipos de dentição das serpentes



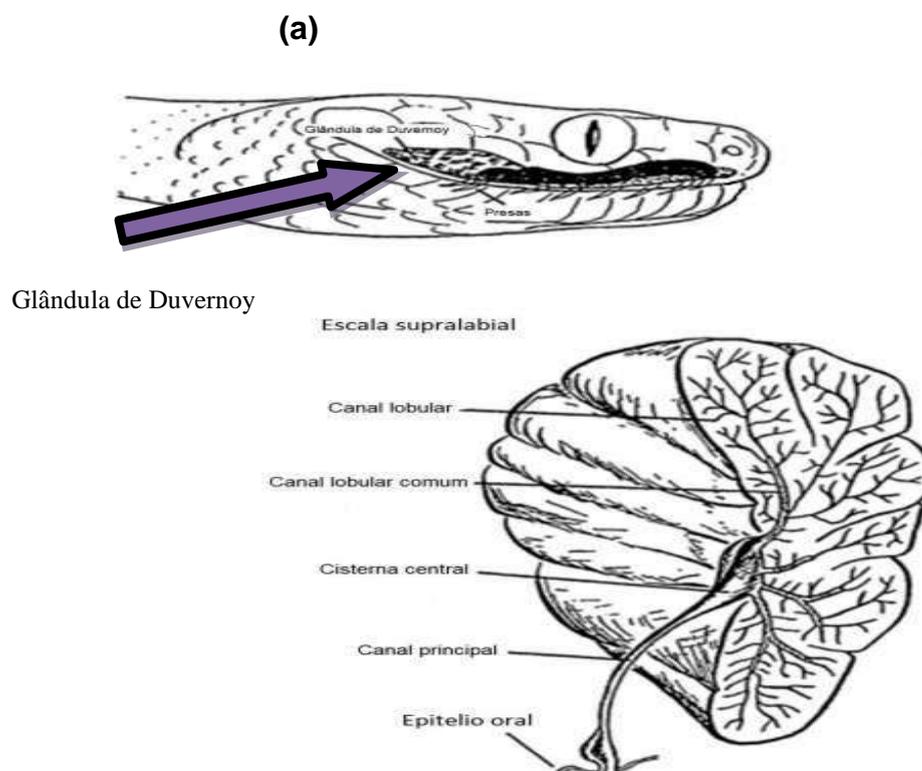
Legenda: A: dentição Solenóglifa; B: dentição proteróglifa; C: dentição opistóglifa; D: dentição áglifa.  
 Fonte da Imagem: Weiss, Marcelo Barros. Acidentes com Animais Peçonhentos/ Marcelo Barros e Jorge Wilson Souza Paiva- 1 Ed.- Rio de Janeiro – RJ. p. 27. (Thieme Reventer Publicações LTDA, 2017).

### 2.3.2 Glândula de Duvernoy

A secreção evidenciada nos túbulos secretores da glândula de Duvernoy (Figura 3a) de *Philodryas offersii*, *Phimophis guerini* e *Thamnodynastes strigatus* tem uma

presença acentuada de proteínas nos túbulos secretores e está relacionada ao hábito alimentar de cada espécie, como também ao modo como subjugam as suas presas (SERAPICOS; MERUSSE, 2006). As secreções produzidas pelas glândulas de Duvernoy são um coquetel altamente variável de componentes químicos, principalmente proteínas, onde muitos desses componentes apresentam toxicidade (KARDONG, 2002). Seu esvaziamento se dá por um fluxo de baixa pressão e a secreção é liberada em aberturas próximas à base das presas (Figura 3b) diferentemente do que ocorre com os viperídeos, em que o fluxo de secreção se dá por alta pressão via canal das presas (KARDONG, 2002). As pesquisas futuras de secreções e venenos das glândulas de Duvernoy de colubrídeos prometem descobertas relevantes para a medicina clínica e laboratorial, bioquímica, imunológica, fisiopatológica e farmacológica (KARDONG, 2002).

Figura 3 Glândula de Duvernoy.



Legenda: Posição da glândula de Duvernoy, e ampliação.

Fonte: Adapado de Kardong, K. V. Toxin Reviews. 2002

Figura 3b Extração do veneno de serpente com dentição opistóglifa



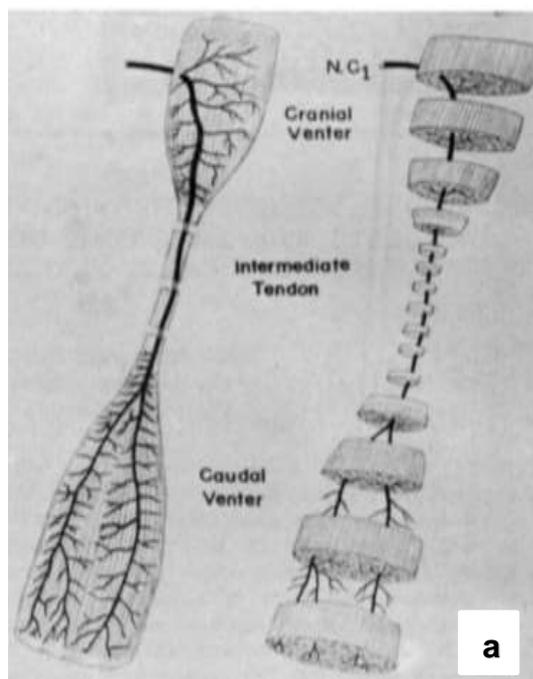
Legenda: Figura 3b representação fotográfica demonstra a extração do veneno de uma serpente com a dentição opistóglifa.

Fonte: Ferlan,1983.

#### **2.4 Junção neuromuscular *Biventer cervicis* de pintainho (BC) ex vivo**

O músculo *Biventer cervicis* do pintinho (Figura 4a) é innervado por um ramo dorsal a partir do qual um único tronco nervoso penetra no músculo, através de sua superfície profunda, no terço superior do crânio. O tronco do nervo corre distalmente emitindo inervações colaterais para unidades motoras da barriga, atravessa o tendão intermediário e atinge o músculo distal da barriga. O tronco do nervo fica completamente incluído no tendão, acompanhado por uma artéria e uma veia. No ventre distal, o tronco de um único nervo bifurca-se no terço superior da barriga e depois trifurcado nos troncos principais, as inervações se espalham para as unidades motoras da barriga (ERHART; REZZE; BIAZOTTO, 1968). Na Figura 4b demonstra-se como é feito o isolamento do BC.

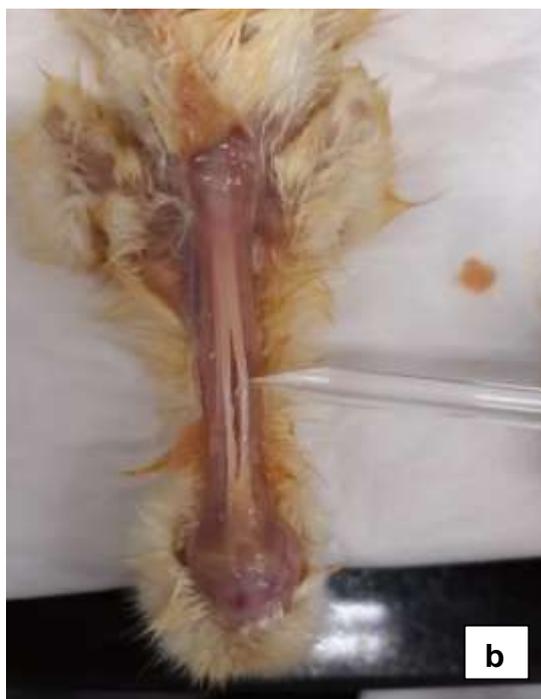
Figura 4 - *Biventer cervicis* (BC) de Pintainho *ex vivo*



Legenda: Inervação de *Biventer cervicis* de pintainho.

Fonte da imagem: ERHART; REZZE; BIAZOTTO (1968). Arq. Neuro-Psiquiat. (São Paulo) vol. 26, nº 3, Setembro, 1968.

Figura 4b Isolamento da preparação (BC)



Legenda: Isolamento da preparação.

Fonte da imagem: 4 (b): Elaboração Própria. Legenda: Isolamento da preparação.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo Geral

Avaliar farmacologicamente a capacidade de nanopartículas de prata (AgNPs) em inibir os efeitos neurotóxicos e miotóxicos *ex vivo* do veneno da *Philodryas olfersii* e avaliar a toxicidade da AgNPs pelo parâmetro *Salmonella*/microsossoma (teste de AMES), com e sem ativação metabólica.

#### 3.2 Objetivos Específicos

- Avaliar farmacologicamente as AgNPs e a mistura de AgNPs com o veneno de *P. olfersii* sobre preparações *Biventer cervicis* de pintainho.
- Determinar a miotoxidade do veneno de *P. olfersii* por meio da atividade de creatinoquinase (CK) e a influência de AgNPs contra este efeito do veneno.
- Realizar o teste de Toxicidade Preliminar das AgNPs
- Realizar o Teste de Ames com as AgNPs, com e sem ativação metabólica.

## CAPÍTULO 1

### 4.1 INFLUÊNCIA DE AgNPs SOBRE OS EFEITOS TÓXICOS DO VENENO DA SERPENTE *Philodryas olfersii* (COLUBRIDAE)

#### 4.1.2 Material e Métodos

##### 4.1.2.1 Nanopartículas de prata (AgNPs)

AgNPs foram obtidas, certificadas e doadas para este estudo pela profa. Dra. Carolina Alves dos Santos, por ocasião de seu pós-doutoramento junto ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Uniso/Capes. As nanopartículas constituídas de metais foram obtidas através da redução de sais ( $\text{AgNO}_3$ ) com dispersão sólida de curcumina estabilizadas com diferentes polímeros. Nesse mecanismo acredita-se que tanto o composto polimérico como a curcumina tenham influência na redução destes sais e posterior conversão a nanopartículas metálicas. Utilizou-se um reator com béquer encamisado de vidro (250 mL) que foi acoplado ao banho a uma temperatura de 80-90 °C e mantido sob agitação em agitador orbital, no qual foram adicionados 45 mg de  $\text{AgNO}_3$  e 135 mg de dispersão sólida de curcumina com diferentes constituições. Após 40 minutos a solução obtida foi removida do sistema e deixada em temperatura ambiente para resfriar. Todos os reagentes foram adquiridos da Sigma-Aldrich® (Saint Louis, MO, USA). Os detalhes do método de redução através da dispersão sólida de curcumina e da caracterização das AgNPs através de medidas de Dynamic Light Scattering (Brook Haven-Nano Brook-90 Plus, New York, USA) (DLS) foram descritos por Alves *et al.* (2018) e resultaram em AgNPs de tamanho médio de 130 nm.

Neste trabalho foi avaliado o potencial terapêutico de AgNPs sintetizadas com a curcumina que é um polifenol de ocorrência natural que é isolado do rizoma da *Curcuma longa* (açafraão) (MENDONÇA, 2012; ASHRAFIZADEH, 2020). A curcumina foi utilizada como agente redutor na síntese da AgNPS usada neste estudo e foram testadas nas concentrações em ng/mL de: 0,0162 (n= 6); 0,0405 (n= 6); 0,081 (n= 6) e 0,405 (n=5).

#### 4.1.2.2 Veneno de *Philodryas olfersii*

O veneno de *P. olfersii* proveniente de espécimes adultos do serpentário do Centro de Estudos da Natureza da Universidade do Vale do Paraíba (CEN/UNIVAP, SMA 15.380/2012) foi coletado, liofilizado e certificado pelo Prof. Dr. José Carlos Cogo (Universidade Brasil, SP, Brasil) e doado à Prof. Dra. Priscila Randazzo-Moura (Pontifícia Universidade Católica de SP, Sorocaba, SP, Brasil) que, por sua vez, o cedeu para a realização desse estudo. Os ensaios foram realizados usando 50 µg/mL com (n=4).

#### 4.1.2.3 Animais

Pintainhos machos da linhagem HY-line W36 com 4 a 8 dias foram adquiridos da Avicultura Santa Bárbara, Sorocaba, SP, e ambientados no LaPeNM (Laboratório de Pesquisa em Neurofarmacologia e Multidisciplinar) por 2 h antes do uso e receberam ração e água *ad libitum*. O projeto foi submetido à Comissão de Ética em Uso de Animais – CEUA da Universidade de Sorocaba – SP e aprovado sob protocolo 159/2019 (Anexo1).

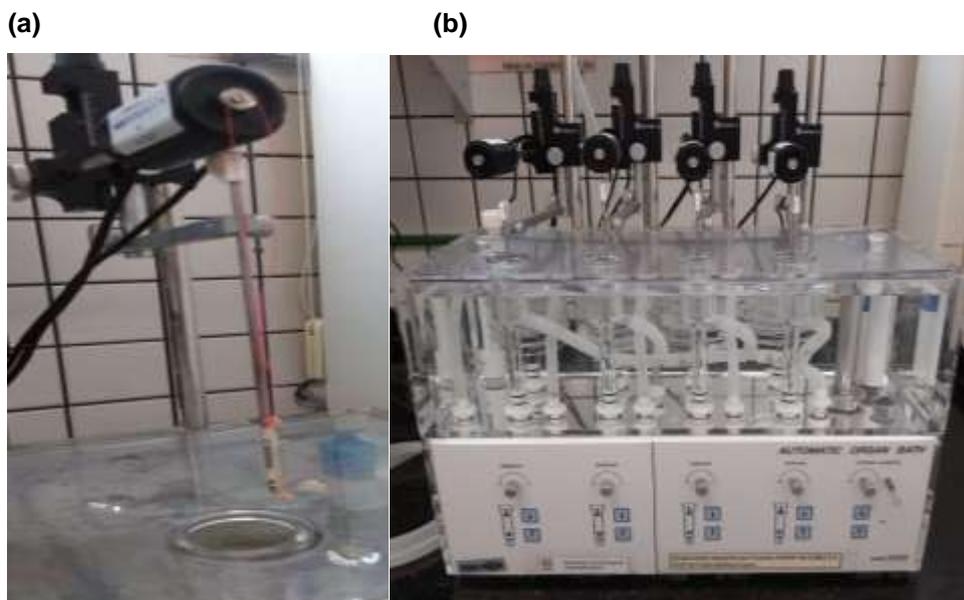
## 4.2 Preparação de Ensaios Farmacológicos em Pintainho *Biventer cervicis* (BC)

Os pintainhos foram eutanasiados com Isoflurano<sup>®</sup> medicamento genérico da marca BioChimico<sup>®</sup>, anestésico inalatório e os músculos *Biventer cervicis* foram removidos de acordo com Ginsborg & Warriner (1960). A preparação foi montada sob uma tensão de 1 g por 0,5 cm em um banho de órgão de 5 mL (Panlab<sup>®</sup> Four Chamber Organ Bath) mantido a 37°C, aerado com carbogênio com cilindro modelo 040NW200T 40.219 ISSONGT-3/4 col-cap. (95% O<sub>2</sub> e 5% CO<sub>2</sub>), gás abastecido pela White Martins<sup>®</sup> e mantido em solução Krebs com a seguinte composição (mM, pH 7,5): NaCl (Sigma<sup>®</sup>), 118,1; KCl (Sigma<sup>®</sup>), 4,8; CaCl<sub>2</sub> (Sigma<sup>®</sup>), 2,5; MgSO<sub>4</sub> (Sigma<sup>®</sup>), 1,2; NaHCO<sub>3</sub> (Sigma<sup>®</sup>), 25; e glicose (Sigma<sup>®</sup>), 11,1. Um eletrodo de anel de platina bipolar foi inserido ao redor do tendão, dentro do qual corre o tronco nervoso que fornece o músculo. A estimulação de campo foi feita usando um gerador de pulso para até 4 unidades (LE12406TC, Panlab<sup>®</sup>) estimulador (0,1 Hz, 0,2 ms, 5-12 V).

Contrações musculares liberadas por receptores "intrínsecos", que respondem ao neurotransmissor liberado do terminal nervoso, e contraturas liberadas por receptores "extrínsecos", que respondem à acetilcolina adicionada exogenamente (GINSBORG; WARRINER, 1960; CHANG; TANG, 1974) foram registradas isometricamente por meio de um transdutor de deslocamento de força (MLT0201, ADInstruments®) acoplado a um grupo de 4 amplificadores transdutores de ponte DC controlados por software (FE224, ADInstruments®). A aquisição dos dados foi feita em um sistema PowerLab 4/35 incluindo os softwares Lab Chart e Lab Chart Pro Modules (PL3504 / P, ADInstruments®) conectado a uma Unidade de Energia (LE124060M, ADInstruments®). As preparações de BC foram estabilizadas por pelo menos 5 min antes da adição de 88,1 mM de acetilcolina (ACh) por 60 segundos, neste momento ocorre a resposta contraturante, lavou-se a preparação 5 vezes com solução de Krebs e aguarda a estabilização do BC por mais 5 min. Em seguida adicionou-se o cloreto de potássio (KCl) 27 mM por 60 segundos e lavado por 5 vezes para total retirada do KCl. A partir daí realizou-se o experimento de acordo com cada substância a ser testada por 120 minutos de registro. Ao final desse tempo, repetiu-se a adição exógena dos agonistas começando pelo KCl e em seguida o ACh. As contraturas para ACh ou KCl exógeno foram registradas na ausência de estimulação de campo antes ou após o término do experimento como um teste para avaliar a ação pré ou pós-sináptica e, ao mesmo tempo, a integridade do sarcolema. Foram feitos protocolos de solução de Krebs como controle (n=7), veneno de *Philodryas olfersii puro* (n=4), pré-incubação de (AgNPs +veneno) (n=6), AgNPs 0,0162 ng/mL (n=6), 0,0405 ng/mL (n=6), 0,081 ng/mL (n=6) e 0,405 ng/mL (n=5).

As figuras 5 (a, b) mostram a preparação amarrada no equipamento, o banho onde as preparações são mantidas durante o experimento. Já na figura 6, podemos ver a composição de todos os compartimentos que formam o equipamento para avaliação e estudo do BC.

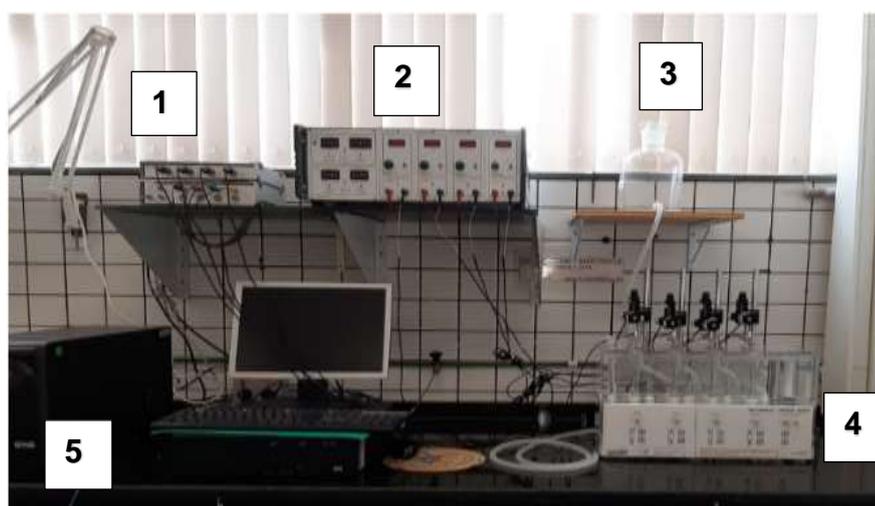
Figura 5 Preparação *Biventer cervicis* de pintainho.



Legenda: (a) *Biventer cervicis* amarrado em equipamento para registros miográficos. (b) Banho contendo cubas com capacidade 5 mL para mergulhar BC em solução de Krebs e aerado com Carbogênio.

Fonte: Elaboração Própria.

Figura 6 Equipamento miográfico

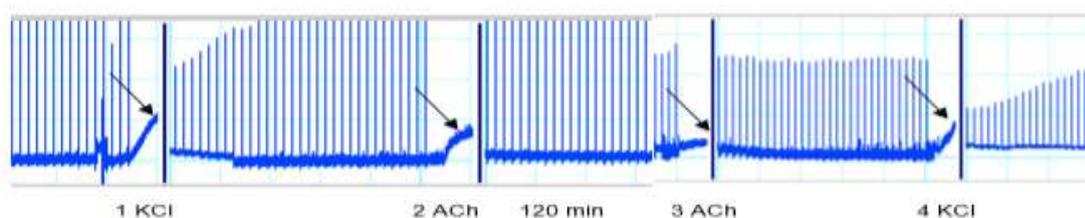


Legenda: 1: Sistema digital de captura de dados, 2: Estimulador elétrico, 3: barrilete (Solução de Krebs), 4: Banho contendo quatro cubas de 5 mL cada para alocar os BC e aeração automática e 5: armazenamento de dados.

Fonte: Elaboração Própria. LaPeNM (Laboratório de Pesquisa em Neurofarmacologia e Multidisciplinar).

Para observar a resposta contraturante do músculo e na ausência de estimulação elétrica, adicionou-se 100  $\mu\text{L}$  de KCl 10% (27 mM) da marca Sigma® ao banho contendo a preparação e 5mL da Solução de Krebs. Após se atingir o platô a preparação foi lavada com solução de Krebs (5 vezes) para garantir a retirada total da substância e estabilização das contrações. Após a estabilização, o procedimento foi repetido com 40  $\mu\text{L}$  de ACh 2% (88,1 mM) para se observar novamente a resposta contraturante (Figura 7). A adição exógena tanto da ACh como do KCl, foram repetidos ao final de cada experimento, obtendo-se então as respostas contraturantes (antes e depois) desses dois agonistas.

Figura 7 Representação gráfica da Resposta Contraturante



Legenda: 1: Adição exógena antes dos 120 min de KCl; 2: adição exógena de ACh; intervalo de 120 min adaptado reduzido para demonstração, 3 adição exógena após 120 min de ACh; 4 adição exógena de KCl. Todos os estímulos elétricos desligados. As setas indicam as amplitudes das respostas contraturantes com a adição exógena dos agonistas.

Fonte: Elaboração própria.

### 4.3 Protocolos Farmacológicos

A concentração selecionada de AgNPs para posterior ensaio de neutralização foi obtida após a realização da curva concentração-resposta e foi de 0,0162 ng/mL, enquanto a concentração eleita do veneno puro de *P. oifersii* foi de 50  $\mu\text{g/mL}$ , de acordo com Collaço *et al.* (2012). A quantidade de experimentos com o veneno puro de *P. oifersii* foi n=4; os ensaios de neutralização consistiram em pré-incubação da (AgNPs+veneno) por 30 min a 37°C antes de serem adicionados a mistura ao banho contendo a preparação biológica (n=6).

#### 4.3.1 Miotoxicidade do veneno de *P. olfersii*

A contração de células musculares esqueléticas depende de adenosina trifosfato (ATP) como fonte de energia, porém, o suplemento de ATP não é suficiente para sustentar a contração por um longo período. Então, para a célula estar ativa e manter a contração, o ATP precisa ser continuamente abastecido. Isto acontece através da metabolização da glicólise e da ação do ciclo do ácido tricarboxílico. Enquanto o oxigênio está disponível, a célula muscular mantém uma elevada reserva de fosfato, na forma de fosfato de creatina, composto rico em energia. A enzima que age sobre o fosfato de creatina é a creatinoquinase (CK), presente no citoplasma da célula muscular. Sua determinação é importante em alguns diagnósticos clínicos, em casos de danos tissulares, como nas distrofias musculares e infarto do miocárdio (NAKADA *et al.*, 1984).

Alíquotas de 200  $\mu\text{L}$ , de cada protocolo experimental, foram retiradas do banho contendo as preparações biológicas (e repostas em igual volume com solução de Krebs), nos tempos zero (imediatamente antes do experimento) e tempo 120 minutos (imediatamente após o término de cada experimento e antes da lavagem e adição exógena de ACh e KCl finais). As alíquotas foram imediatamente congeladas a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  e suas atividades enzimáticas foram determinadas de acordo com as orientações do fabricante do kit comercial (BioClin® CK NAC UV, referência K010-1, Belo Horizonte, MG, Brasil).

Foram determinados os CK dos seguintes protocolos farmacológicos: Solução de Krebs (controle) (n= 16), neutralização contendo 0,0162 ng AgNPs + veneno 50  $\mu\text{L}/\text{mL}$  (n= 8), AgNPs 0,0162 ng (n=8) e Veneno 50  $\mu\text{L}/\text{mL}$  (n=6).

Para a determinação de CK foi utilizado o espectrofotômetro Lab Center Bel Photonics®, onde foram obtidos os valores de absorbância em tempo 0, 1, 2 e 3 minutos. Como indicado no kit de CK, com esses valores de absorbância foi feito o seguinte cálculo: a média das diferenças da absorbância por minuto e utilizar esse valor multiplicado por 8095 conforme bula referenciada.

## 5 FORMA DE ANÁLISE DOS RESULTADOS

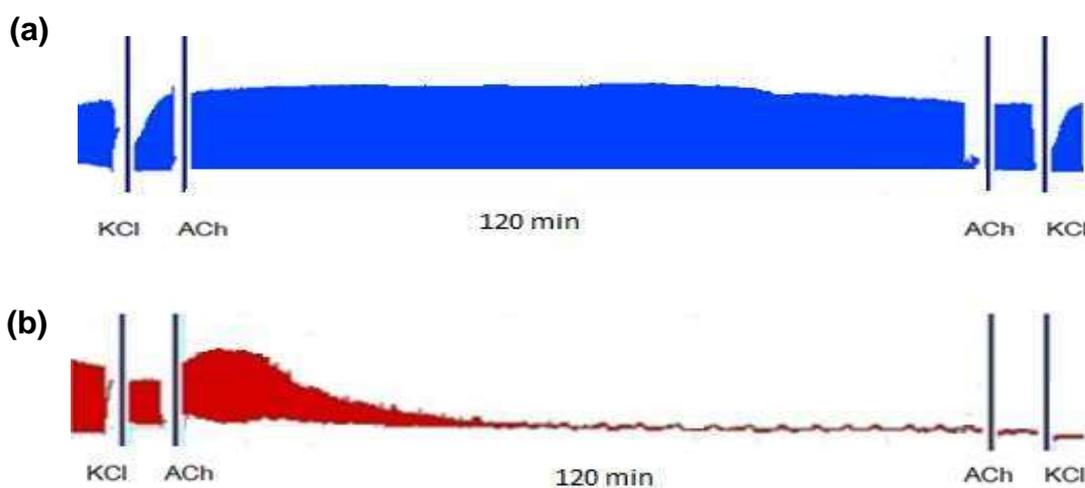
Todos os resultados provenientes dos ensaios farmacológicos (neurotoxicidade e miotoxicidade) foram mostrados como a média  $\pm$  EPM e estatisticamente analisados usando o teste *t-Student* do Programa OriginV 8.5<sup>®</sup> e o teste ANOVA do mesmo programa. O nível de significância foi de 5% para todos os experimentos.

## 6 RESULTADOS

### 6.1 Protocolos comparativos entre controle e Veneno 50 µg/mL em Junção Neuromuscular (BC)

Ao longo dos 120 min de experimento foram registrados e armazenados os dados das contrações e contraturas no Programa Lab Chart Pro®, assim todos os registros dos resultados foram posteriormente calculados e analisados estatisticamente. A Figura 8 (a e b) ilustram um experimento de controle Krebs (a) e um experimento com 50 µg/mL de veneno de *P. olfersii* (b). Note em ambos a adição dos agonistas KCl e ACh. O bloqueio neuromuscular causado pelo veneno não permitiu o recobro da resposta contrátil e, tampouco, das respostas contraturantes causadas pelos agonistas KCl e ACh ao final do experimento. Os experimentos sob estímulo indireto resultam na liberação de ACh dos terminais na região da placa terminal. Observe a rápida paralisia neuromuscular induzida pelo veneno da serpente *P. olfersii*. A pré-incubação de AgNPs 0,0162 ng/mL com 50 µg/mL de veneno durante 30 min antes da adição ao banho protegeu significativamente a preparação contra o bloqueio neuromuscular induzido apenas pelo veneno, mantendo em torno de  $46,7 \pm 10,9\%$  das fibras funcionantes ao final de o experimento, sob estimulação indireta.

Figura 8 Representação gráfica da preparação (BC), estímulo indireto.

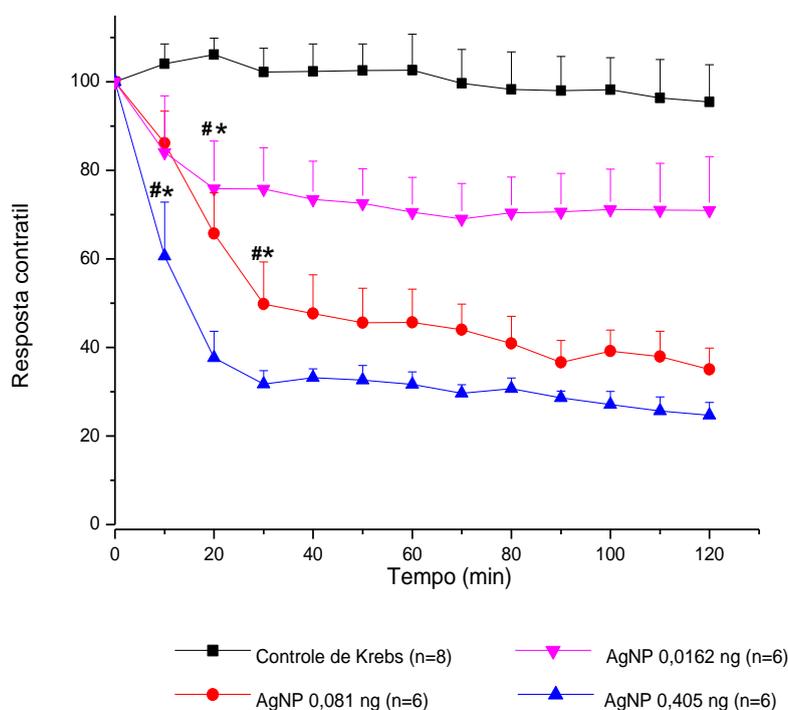


Legenda: (a) ilustra os ensaios miográficos realizados com controle de Krebs e adição exógena de KCl e ACh, antes e depois do experimento. (b) Ilustração de um experimento com 50 µg/mL de veneno de *P. olfersii* e adição exógena de KCl e ACh, antes e depois do experimento sem recobro das contrações e contraturas. Fonte: Elaboração própria.

## 6.2 Curva Concentração-Resposta AgNPs na Junção Neuromuscular (BC)

A figura 9 ilustra os ensaios miográficos da curva concentração-resposta realizados com as AgNPs, nas concentrações (em ng/mL) de 0,0162, 0,081, 0,405, comparativamente à solução de Krebs (controle). Verificou-se que a menor concentração de AgNPs é a que provocou menor alteração na resposta contrátil em relação ao controle. O número de experimentos (n) está expresso na legenda da Figura 9.

Figura 9 Curva concentração-resposta de AgNPs (0,081 mg/mL).



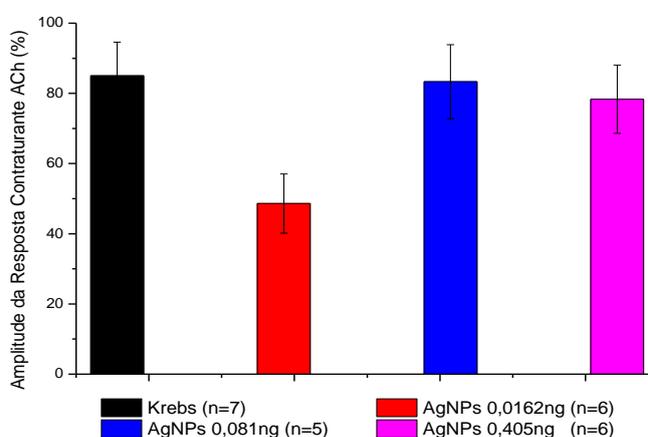
Legenda: Curva concentração-resposta de AgNPs. Note a relação de dose-dependência entre 0,0162 ng/mL a 0,405 ng/mL (\* $p < 0,05$  para todas as concentrações em relação ao controle, incluindo os tempos subsequentes e #,  $p < 0,05$  para as concentrações de 0,081 ng/mL e 0,405 ng/mL em relação a 0,0162 ng/mL incluindo os tempos subsequentes). Os dados foram analisados estatisticamente por ANOVA, com  $p > 0,05$ .

Fonte : Elaboração própria.

### 6.3 Respostas Contraturantes da Adição Exógena de ACh na Preparação BC

A preparação BC de pintainho permite a obtenção de dados adicionais, pela resposta contraturante frente à adição exógena de ACh e KCl. A Figura 10 ilustra as respostas obtidas com a adição de ACh. Note que as concentrações de 0,0162 ng/mL e 0,081 ng/mL AgNPs não provocam significativamente alteração na resposta contraturante de receptores extrínsecos de ACh. As preparações de BC permitem interpretar tanto os estímulos evocados indiretos como mostrado na Figura 9 como as contraturas induzidas por ACh exógeno (Figura 10) e KCl (Figura 11) na ausência de estímulos elétricos. Isso é possível porque a preparação de ave, ao contrário da preparação de mamífero, possui fibras inervadas múltiplas com um maior número de placas terminais distribuídas ao longo de seu comprimento. As AgNPs sozinhas afetaram apenas virtualmente a amplitude das contraturas de ACh ou KCl, uma vez que os resultados não foram estatisticamente diferentes do controle de Krebs.

Figura 10 Resposta contraturante frente à adição exógena de ACh 88,1 mM



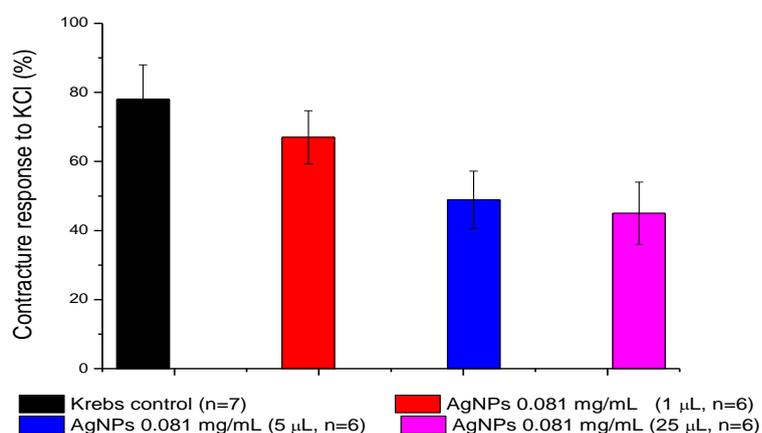
Legenda: Resposta contraturante frente à adição exógena de 40  $\mu$ L ACh (88,1 mM) antes (representa o controle) e ao final de cada experimento (mostrado nas colunas da figura). Os dados foram analisados estatisticamente por ANOVA, com  $p > 0,05$ .

Fonte: Elaboração própria.

## 6.4 Respostas Contraturantes da Adição Exógena de KCl na Preparação BC

Pela análise do efeito do KCl nas preparações, somente a concentração de 0,405 ng/mL de AgNPs utilizada afetou significativamente a membrana da fibra muscular ou sarcoplasma em relação ao controle. Os resultados mostraram que a melhor concentração de trabalho com as nanopartículas para posterior ensaio com o veneno de *P. olfersii* foi a de 0,0162 ng conforme figura 11, pois apresentou menor efeito de inibição da resposta contraturante em relação ao controle, o número de experimentos está expresso na legenda da figura 11.

Figura 11 Resposta contraturante frente à adição exógena de KCl 27 mM



Legenda: Resposta contraturante frente à adição exógena de 100 µL KCl 10% antes (representa o controle) e ao final de cada experimento (mostrado nas colunas da figura). Os dados foram analisados estatisticamente por ANOVA, com  $p > 0,05$ .

Fonte: Elaboração própria.

Para saber a concentração final das AgNPs foram realizados os cálculos a seguir demonstrados na Figura 12 a:

Figura 12 a: Cálculo concentração final das AgNPs

$$\begin{array}{r}
 \text{AgNPs } 0,081 \text{ mg} \\
 0,081 \text{ mg} \\
 0,000081 \text{ mg} \leftarrow 1 \mu\text{L} \\
 0,081 \mu\text{g} \leftarrow 1 \mu\text{L} \\
 81 \text{ ng} \leftarrow 1 \mu\text{L}
 \end{array}
 \quad
 \begin{array}{r}
 1 \text{ mL} \\
 1000 \mu\text{L}
 \end{array}$$

Então, significa que adicionar 81 ng (ou 1 µL) de AgNPs em uma cuba contendo 5 mL (= 5.000 µL) de solução nutritiva resultará na concentração final de 0,0162 ng de

AgNPs, conforme abaixo demonstrado. Parte-se do princípio que, neste caso, a massa do analito em 1  $\mu\text{L}$  é a mesma de quando está em 5 mL mas a sua concentração ficará menor, conforme demonstrado a seguir na Figura 12 b.

Figura 12 b Cálculo das concentrações de AgNPs

$$C_1 = \frac{m_1}{V_1} \qquad C_2 = \frac{m_1}{V_2}$$

$$\rightarrow m_1 = C_1 \cdot V_1 \qquad \rightarrow m_1 = C_2 \cdot V_2$$

Partindo do princípio que as massas são iguais

$$C_1 \cdot V_1 = C_2 \cdot V_2$$

$$81 \text{ ng} \cdot 1 \mu\text{L} = C_2 \cdot 5000 \mu\text{L}$$

$$C_2 = 0,0162 \text{ ng}$$

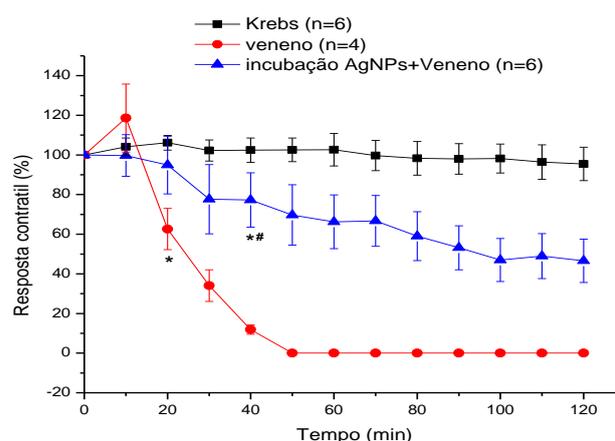
Legenda: Cálculo da concentração de AgNPs, onde C: concentração, m: massa e v: volume.

Fonte: Elaboração própria.

## 6.5 Ensaios de Neutralização (AgNPs + Veneno) na Preparação BC

Os ensaios de neutralização da mistura preincubada de 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  do veneno de *P. oifersii* com 0,0162 ng/mL de AgNPs, são mostrados na Figura 13.

Figura 13 Comparação entre a resposta contrátil de Krebs (controle), pré-incubação e veneno.



Legenda: Curva resposta contrátil de veneno 50  $\mu\text{g}$  ; incubação AgNPs 0,0162 ng + veneno 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  comparado ao Krebs (controle). Onde \*,  $p < 0,05$ , para neutralização e veneno comparado ao controle, incluindo os pontos seguintes, analisados por ANOVA.

Fonte: Elaboração própria.

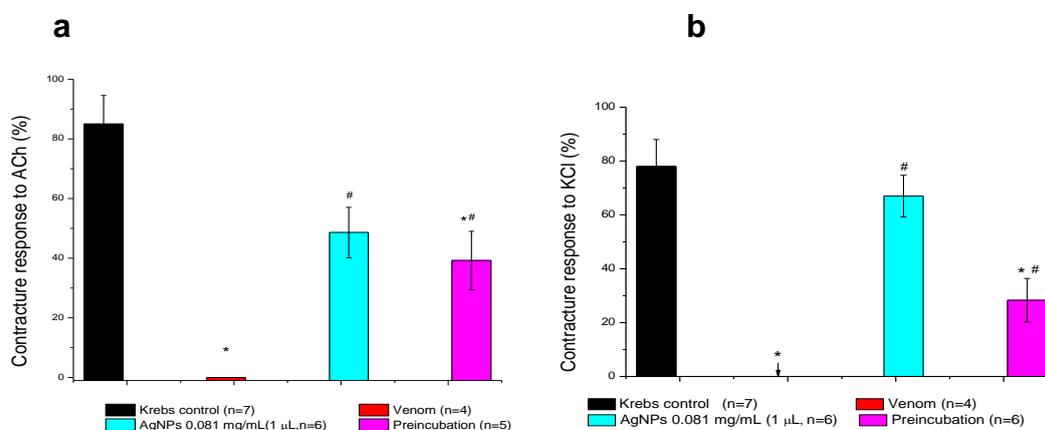
Nota-se a significativa proteção das AgNPs ao se comparar com a resposta do veneno de *P. offersii*, que, por sua vez, causou um bloqueio neuromuscular irreversível.

## 6.6 Contraturas em Resposta à Adição Exógena KCl e ACh

Resposta contraturante frente à adição exógena de 88,1 mM ACh (a) antes e ao final de cada experimento, evidenciando as diferenças entre AgNPs 0,0162 ng/mL, veneno 50 µg/mL e a incubação (AgNPs+veneno) (mostrado nas colunas da Figura 14). O número de experimentos (n) está expresso na legenda da figura.

A resposta contraturante frente à adição exógena de 27 mM KCl (b), antes e ao final de cada experimento, evidenciando as diferenças entre AgNPs 0,0162 ng/mL, veneno 50 µg/mL (indicação na seta) e a incubação (AgNPs+veneno) (mostrado nas colunas da Figura 14).

Figura 14 Respostas contraturantes obtidas frente à adição exógena de ACh (a) KCl (b).



Legenda: (a) Resposta contraturante frente à adição exógena de 40 µL ACh (81,1 mM) antes representado pelo Krebs (controle) e ao final de cada experimento, evidenciando as diferenças entre AgNPs 0,0162 ng/mL, veneno 50 µg/mL e a incubação (AgNPs+veneno) (mostrado nas colunas da figura). (b) Resposta contraturante frente à adição exógena de 100 µL KCl (27 mM), antes representado pelo Krebs (controle) e ao final de cada experimento, evidenciando as diferenças entre AgNPs 0,0162 ng/mL, veneno 50 µg/mL (indicação na seta) e a incubação (AgNPs+veneno) (mostrado nas colunas da figura). Onde \* $p < 0,05$ , para AgNPs, neutralização, veneno comparado ao controle e # $< 0,05$  para neutralização e AgNPs em relação ao veneno, analisados por *t-Student*.

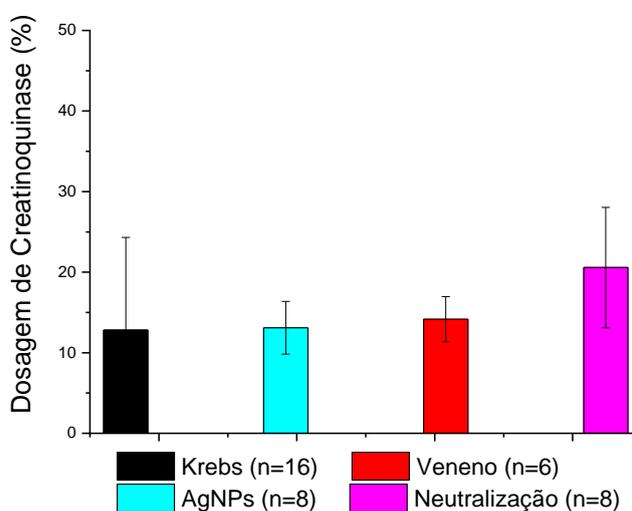
Fonte: Elaboração própria.

Note que a incubação do veneno sozinho resultou em bloqueio de receptores extrínsecos da ACh, o que na neutralização com AgNPs houve considerável proteção desses receptores (~40%). O veneno também afetou a membrana da fibra muscular ou sarcoplasma indicando miotoxicidade e as AgNPs não foram eficientes em impedir completamente a amplitude da resposta contraturante, embora significativamente produzam um aumento de ~20% na adição exógena de KCl.

## 6.7 Avaliação da miotoxicidade pelo parâmetro da atividade enzimática de CK

A dosagem de CK frente à adição de veneno (50 µg/mL), AgNPs 0,0162 ng/mL) e neutralização (veneno 50 µg+ AgNPs 0,0162 ng/mL) antes, representado pelo Krebs (controle) e ao final de cada experimento, evidencia as diferenças entre AgNPs 0,0162 ng/mL, veneno 50 µg/mL e a incubação (AgNPs+veneno) (mostrado nas colunas da figura). O número de experimentos é mostrado na legenda da Figura 15.

Figura 15 Resultados dos testes de creatinoquinase (CK)



Legenda: Dosagem de creatinoquinase (CK) frente à adição de veneno (50 µg/mL), AgNPs (0,0162 ng/mL) e neutralização (AgNPs+veneno): antes, representado pelo Krebs (controle) e ao final de cada experimento, evidenciando que não houve diferenças significativas entre AgNPs 0,0162 ng/mL, veneno 50 µg/mL e a incubação (AgNPs+veneno), analisados por *t-Student*.

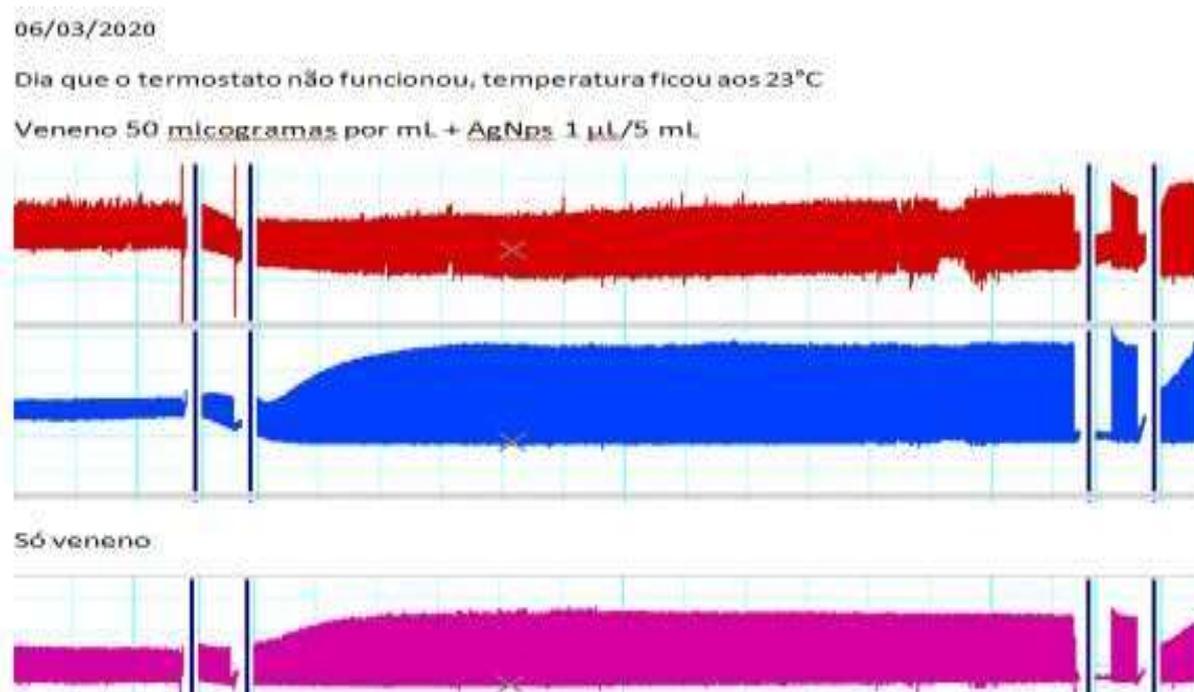
Fonte: Elaboração própria.

## 6.8 Influência da Temperatura na Ação do Veneno

Não intencionalmente, observou-se que a atividade neurobloqueadora do veneno de *P. offersii* depende da temperatura, como mostra a Figura 16. Neste contexto de temperatura, os registros evidenciaram que o tanto o veneno puro como a neutralização contendo veneno+AgNPs nas concentrações citadas na legenda da figura, não apresentaram redução da amplitude da resposta contrátil e contraturante.

A eficácia dos experimentos aqui propostos só se garante na temperatura já descrita na literatura de 37°C. Além disso, pode-se ir além dizendo que a eficácia do veneno da *P. offersii* parece ser maior em animais de sangue quente, supondo sua preferência alimentar por aves e roedores.

Figura 16 Registros miográficos em temperatura 23° C (não adequado )



Legenda: Observam-se 3 registros miográficos do dia 06/03/2020, nos registros vermelho e azul foram adicionados a mistura pré-incubada por 30 minutos contendo veneno 50 µg/mL+ 0,0162 ng/mL de AgNPs. Já no registro cor Pink, apenas a concentração de 50 µg/mL de veneno de *P. offersii*.

Fonte: Elaboração própria.

## 7 DISCUSSÃO

Como pontos para discussão deve-se reconhecer a importância das curvas concentração-resposta que permitem selecionar a concentração a ser utilizada, de acordo com a finalidade de cada estudo, como ocorreu com as AgNPs. Selecionou-se uma quantidade de 1  $\mu$ L (0,0162 ng/mL) de AgNPs, para posterior ensaios de pré-incubação com veneno de *P. olfersii*. Por outro lado, o veneno de *P. olfersii* (50  $\mu$ g/mL) já havia sido utilizado no mesmo modelo experimental por Collaço *et al.* (2012) e, nesse caso, bastou conferir a atividade do veneno, o que foi confirmado neste estudo e evitando o uso de animais para esta finalidade. Não houve recuperação da resposta contrátil e contraturante mesmo após a lavagem assim como nos estudos de Prado-Franceschi *et al.* (1996).

Porém, com a pré-incubação do veneno 50  $\mu$ g/mL com 0,0162 ng/mL de AgNPs, a 37 °C por 30 minutos em banho-maria, as AgNPs mostraram que impediram a completa inibição que o veneno causa, produzindo um aumento de 10% do KCl e 25% da ACh evidenciando uma parcial proteção na membrana e receptores pós sinápticos, respectivamente após a lavagem do banho e dos estímulos no período de duas horas.

O uso de técnica miográfica e preparações *Biventer cervicis* remetem a autores (GINSBORG, 1960; WARRINER, 1960; CHANG; TANG, 1974; TRIBUIANI *et al.*, 2017) que trouxeram grande contribuição na área da fisiologia desta espécie e também na toxilogia, como Harvey (1994) que declaram que “As neurotoxinas de venenos de serpentes que causam paralisia neuromuscular agem tanto pré-sinápticamente, bloqueando a liberação de acetilcolina, quanto pós-sinápticamente, bloqueando o receptor de ACh”. Isso pode ser notado usando a preparação de *Biventer cervicis* de pintainho que permite a análise da resposta do músculo resultante da estimulação indireta e adicionalmente da resposta contraturante da ACh e KCl exógena, em ausência de estímulo elétrico.

Segundo Harvey (1994), uma neurotoxina puramente pré-sináptica aboliria as contrações evocadas pelos nervos, sem afetar as respostas aos agonistas do colinoceptor (ACh) ou as respostas à estimulação muscular direta pela despolarização induzida por KCl; o que não aconteceu com o veneno de *P. olfersii*. Ainda segundo os autores, as neurotoxinas pós-sinápticas bloqueariam as respostas ao agonista colinoceptor, bem como à estimulação indireta (HARVEY, 1994), o que foi visto com o veneno aqui estudado. Ainda, os autores declaram que miotoxicidade é difícil de

definir na ausência de um estudo formal de patologia muscular, porém, com a presença de componentes miotóxicos em um veneno de serpente espera-se a redução da resposta de um músculo esquelético a estímulos elétricos e/ ou para iniciar contraturas no músculo, além de que se os venenos afetam a integridade das fibras musculares ou bloqueiam a contratilidade muscular, pode se observar que induzem contraturas lentas e também reduzem a capacidade das preparações para contrair quando despolarizado por KCl. Danos diretos aos músculos bloqueariam também as respostas à estimulação indireta e aos agonistas do colinoceptor ACh, o que também foi observado com o veneno de *P. olfersii* neste estudo. Estabelecer curvas de dose-resposta para venenos em diferentes formas de estimulação (estimulação indireta, mais agonistas colinoceptores para neurotoxinas e KCl para contraturas musculares induzidas diretamente), na preparação *Biventer cervicis* também leva à testagem e comparação da potência neutralizante de diferentes e possíveis substâncias e antivenenos, além de uma série de vantagens como ensaio de rotina: é barato em termos de animais, aparato e é fácil de dissecar e configurar; é robusto, sensível e dá resultados rápidos (HARVEY *et al.*, 1994).

À luz do embasamento teórico acima é que a avaliação da influência das nanopartículas contra o bloqueio neuromuscular induzido pelo veneno de *P. olfersii* foi realizada. Experimentos realizados sob estímulo indireto e na ausência de estímulos mostraram a proteção das nanopartículas, que mantiveram funcionando  $46,7\% \pm 10,9$  das fibras e  $48,6\% \pm 8,4$  de receptores nicotínicos extrínsecos, respectivamente.

Já a adição exógena de KCl, que despolariza o músculo e o nervo diretamente, é amplamente utilizada nesta preparação para evidenciar compostos que levam a uma redução do potencial de membrana induzida pela despolarização da membrana muscular (SHIEH; PEZZEMENTI; SCHMIDT, 1983), indicativo de dano miotóxico ao tecido (FERNANDES *et al.*; 2014 ), o que foi observado neste estudo com o veneno de *P. olfersii*. Esses resultados são consistentes com os achados de miotoxinas na secreção da glândula de Duvernoy (PRADO- FRANCESCHI *et al.*, 1998) e efeitos miotóxicos observados em modelos experimentais (ACOSTA DE PÉREZ *et al.*, 2003; OLIVEIRA *et al.*, 2017), inclusive em acidentes humanos (edema, eritema, equimoses, linfadenopatia regional, efeitos neurotóxicos e miotóxicos, mas sem distúrbios coagulativos) (CORREIA *et al.*, 2010). Os resultados obtidos neste estudo as AgNPs sintetizadas com curcumina mostraram uma boa resposta frente ao veneno da *P. olfersii*. A concentração obtida após a escolha da curva concentração-resposta, de

0,0162 ng/mL (1  $\mu$ L/5 mL) de AgNPs, foi a que provocou a menor alteração pelo parâmetro miográfico.

Já na análise da miotoxicidade pelo parâmetro da creatinoquinase (CK), essa metodologia não se mostrou adequada possivelmente pelo tempo de duração do experimento, de 2 h. A determinação de CK para esse veneno mostrou-se um biomarcador tardio, como já demonstrado para o veneno de *Philodryas patagoniensis* (PEICHOTO *et al.*, 2005), cuja liberação ocorreu cerca de 3 h após o envenenamento.

Não havia na Literatura um estudo feito com Kit comercial de CK em alíquota do banho para veneno de *P. olfersii*, por esse motivo foi interessante testar essa técnica aprovada em outros estudos com outras serpentes. No entanto, os resultados sobre a atividade da creatinoquinase em alíquotas coletadas após 2 h do banho não confirmaram o efeito do potássio exógeno, mas foram consistentes com os níveis plasmáticos de CK encontrados por Rocha e Furtado (2007), em camundongos, injetados com 30  $\mu$ g/animal, veneno de *P. olfersii* e sangue coletado após 3 horas após a injeção, tempo mínimo para liberação de CK no sangue.

## CAPÍTULO 2

### 8.1 Avaliação de Mutagenicidade de AgNPs pelo parâmetro *Salmonella*/Microsoma (TESTE DE AMES)

#### 8.1.1 Material e Métodos

As linhagens de *Salmonella typhimurium* TA98, TA100, TA102 e TA97a foram gentilmente cedidas pelo Dr. Bruce Ames da Universidade de Berkeley (Califórnia, EUA) à Profa. Dra. Flávia Aparecida Resende da UNIARA, Araraquara SP, que por sua vez, gentilmente doou à Uniso os meios de cultura e reagentes para a realização do teste de Ames.

Nanopartículas de prata (AgNPs)

Descrito no capítulo 1 (ver seção 4.1.2.1).

#### 8.2 Teste Preliminar de Toxicidade

Antes de realizar o teste de Ames, deve-se conhecer as concentrações das amostras que causam toxicidade às linhagens de *S. typhimurium*. Toxicidade é evidenciada pela ausência completa de crescimento, redução no número de revertentes His<sup>+</sup> ou como um crescimento de fundo (*background*) nas placas teste de ágar glicose mínimo em comparação com as placas de controle negativo e controle espontâneo. Uma diminuição no crescimento de colônias com mutação reversa abaixo do controle espontâneo pode indicar toxicidade parcial, neste caso as bactérias sobreviventes formam ainda micro colônias. A ausência de crescimento de colônias e de crescimento de fundo indica um elevado grau de toxicidade que impede o crescimento da bactéria e a formação do crescimento de fundo (VARGAS; MOTTA; HENRIQUES, 1993; MORTELMANS; ZEIGER, 2000). Inicialmente foram testadas concentrações preliminares de AgNPs dissolvidas em DMSO e ensaiados com a linhagem TA98 e TA100, sem ativação metabólica. A partir dos resultados dos testes de toxicidade e observando-se a curva concentração-resposta foram selecionadas as concentrações adequadas para o estudo.

### 8.3 Realização do Teste de Ames

As linhagens de *S. typhimurium* são estocadas em vias criogênicas (2,0 mL) e mantidas no freezer vertical de ultrabaixa temperatura (Coldlab®) do LaPeNM (Laboratório de Pesquisa em Neurofarmacologia e Multidisciplinar) a -80 °C para que se mantenham inalteradas todas as suas características genéticas (tabela 1). Para cada 0,9 mL de cultura foi adicionada 0,1 mL de dimetilsufóxido (DMSO – Sigma-Aldrich) que é um crioprotetor (UMBUZEIRO; VARGAS, 2003).

**Tabela 1.** Características genotípicas e fenotípicas para o ensaio de Teste de Ames

Cepa	Mutação em <i>His</i>	Plasmídeos	LPS	Deficiência de reparo em <i>uvrB</i>	Tipo de mutação detectável	
TA97a	<i>hisD6610</i> <i>hisO1242</i>	pKM101	<i>Rfa</i>	$\Delta$ ( <i>uvrB</i> chi bio)	Frameshift	Adição de um par GC
TA98	<i>hisD3052</i>	pKM101	<i>Rfa</i>	$\Delta$ ( <i>uvrB</i> chi bio)	Frameshift	Deleção de um par GC
TA100	<i>hisG46</i>	pKM101	<i>Rfa</i>	$\Delta$ ( <i>uvrB</i> chi bio)	Substituição	GC para AT
TA102	<i>hisG428</i>	pKM101 pAQ1	<i>Rfa</i>	-	Substituição	AT para GC

Nota: A deleção ( $\Delta$ ) em *uvrB* também inclui os genes nitrato redutase (chi) e biotina (bio).

*Frameshift*, deslocamento do quadro de leitura.

Fonte: MORTELMANS; ZEIGER (2000).

Neste estudo foi utilizada a taxa de reversão espontânea para cada linhagem, testada em condições de ausência e presença da mistura S9, de acordo com a Tabela 2, seguindo o preconizado por Mortelmans e Zeiger (2000).

Tabela 2 Taxa de reversão espontânea por placa

Linhagem	Revertentes sem S9*	Revertentes com S9
TA 97 <sub>a</sub>	75 – 200	100 - 200
TA 98	20 – 50	20 - 50
TA 100	75 – 200	75 - 200
TA 102	100 – 300	200 - 400

Legenda: \*Número de colônias de crescimento espontâneo por placa no Controle espontâneo.

Fonte: Adaptação de: MORTELMANS; ZEIGER, 2000.

#### 8.4 Preparo dos inóculos de *S. typhimurium*

Com auxílio de alça de inoculação, pequena quantidade da cultura estoque congelada foi semeada em 30 mL de caldo nutriente (Oxoid nº 2), incubada a 37 °C, por 11-14 h em *shaker* incubador (37 °C a 100 rpm), de modo a obter uma densidade de  $1-2 \times 10^9$  bactérias/mL. Após o tempo, as culturas são removidas e mantidas refrigeradas em geladeira até o momento de uso (UMBUZEIRO; VARGAS, 2003).

##### 8.4.1 Meios de cultura e soluções

Os meios de cultura e soluções necessários para os ensaios de mutação reversa foram preparados de acordo com as especificações de (MARON; AMES, 1983), descritos abaixo

##### 8.4.2 Caldo nutriente

O meio Nutrient Broth nº 2 (CM 0067 OXOID®) foi dissolvido em água purificada por osmose reversa na proporção de 0,75 g/30 mL. O meio foi autoclavado a 121 °C, por 20 min e após o arrefecimento foi mantido refrigerado entre 2 a 8 °C. Este caldo será utilizado para o crescimento de culturas bacterianas de *Salmonella typhimurium*.

#### 8.4.3 Top Agar

O Bacto Agar purificado (BD<sup>®</sup> Ref 214010) 0,6 % (m/v) e o Cloreto de sódio (Sigma<sup>®</sup>) 0,5 % (m/v) foram dissolvidos em 100 mL de água purificada por osmose reversa Tecnal<sup>®</sup> TE- 4007-10. O meio foi autoclavado a 121 °C, por 20 minutos e após o arrefecimento foi mantido refrigerado entre 2 a 8 °C. O Top Agar é utilizado para crescimento das colônias revertentes. No momento do uso, o Top Agar foi fundido em forno de microondas e adicionado de 10 mL de solução de biotina/histidina e homogeneizado.

#### 8.4.4 Solução de Biotina/Histidina (0,5 mM)

A D-Biotina (Sigma<sup>®</sup>) 0,00124 g e a L-Histidina (Sigma<sup>®</sup>) 0,00096 g foram dissolvidas em 10 mL de água purificada por osmose reversa aquecida a 45 °C. A solução passou por autoclavagem a 121 °C por 20 minutos e após o arrefecimento foi mantida refrigerada entre 2 a 8°C. Esta solução é utilizada para suplementar o Top Agar quanto à biotina e traços de histidina.

#### 8.4.5 Agar mínimo nutriente

O Bacto Agar purificado (BD<sup>®</sup> Ref. 214010) foi pesado 7,5 g e dissolvido em 465 mL de água purificada por osmose reversa e agitado até a dissolução. O Agar mínimo nutriente foi autoclavado a 121 °C por 20 min. Aguardou-se o esfriamento até aproximadamente 60 °C e dentro da Capela de Fluxo Laminar, ao erlenmeyer contendo o Agar mínimo foi adicionado 10 mL de solução de sais de Vogel Bonner (VB) e 25 mL de solução de glicose 40 % e agitado vigorosamente. Para a linhagem TA97a será utilizada a solução de glicose 8 %. Será vertida a solução de meio em placas de Petri esterilizadas e descartáveis, verificou-se a formação de bolhas que serão retiradas com a chama do bico de *Bunsen*. As placas foram incubadas invertidas em estufa a 37 °C por 48 h.

#### 8.4.6 Solução de sais de Vogel Bonner (VB)

Para a preparação de 100 mL da solução de sais de Vogel Bonner foram pesados Sulfato de magnésio (Reagen<sup>®</sup>) 1,0 g Ácido cítrico (Sigma<sup>®</sup>) 10,0 g, Fosfato de potássio dibásico (Merck<sup>®</sup> 50,0 g), Fosfato de sódio e amônio (Merck<sup>®</sup>) 17,5 g e dissolvidos seguindo a sequência em 67 mL de água purificada por osmose reversa mantendo-se a temperatura de aproximadamente 45 °C. A solução foi autoclavada a 121 °C por 20 min.

#### 8.4.7 Soluções de glicose a 8% e 40%

Para a preparação de 100 mL e 50 mL da solução de Glicose a 8 % e 40 % foram pesados respectivamente 40 g e 4 g de D-Glucose (Sigma<sup>®</sup>) e dissolvidos, respectivamente, em 90 mL e 50 mL de água purificada por osmose reversa. As soluções foram autoclavadas a 121 °C por 20 min. A solução de Glicose a 40 % é usada para o preparo do Agar mínimo glicosado para as linhagens TA98, TA100 e TA102. A solução de Glicose 8 % é usada para o preparo do Agar mínimo glicosado para a cepa TA97a.

### 8.5 Tampão de fosfato de sódio 0,2 M pH 7,4

Para a preparação da Solução A foi pesada uma massa de 2,76 g de Fosfato de sódio monobásico  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  Reagen<sup>®</sup> e dissolvido em 100 mL de água purificada por osmose reversa. Para a preparação da Solução B foi pesado 2,84 g de Fosfato de sódio dibásico  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (Merck<sup>®</sup>) e dissolvido em 100 mL de água purificada por osmose reversa Tecnal<sup>®</sup> TE- 4007-10. As soluções A e B foram preparadas em dois béqueres separados. Após a calibração do pHmetro HANNA Instruments<sup>®</sup> HI 9904, foi colocado o eletrodo na solução A e adicionado aos poucos a solução B até que o pH atingiu valor de 7,4. A solução tampão final foi autoclavada a 121 °C por 20 minutos e após o arrefecimento foi mantida refrigerado entre 2 a 8 °C.

#### 8.5.1 $\beta$ -Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato ( $\beta$ -NADP) 0,1 M

Para a preparação de solução 0,1 M foi pesada uma massa de 0,15308 g de  $\beta$ -NADP (Sigma<sup>®</sup>) e dissolvida em 2mL de água purificada por osmose reversa Tecnal<sup>®</sup> TE- 4007-10 estéril. A solução foi preparada no momento do uso em frasco

esterilizado.

#### 8.5.2 Glicose-6-fosfato (G6P) 1 M

Para a preparação de solução 1M será pesada uma massa de 0,084 g de G6P (Sigma®) e dissolvida em 300 µL de água purificada por osmose reversa Tecnal® TE- 4007-10 estéril. A solução foi preparada no momento do uso em frasco esterilizado.

#### 8.5.3 Solução de Cloreto de potássio (KCl) 1,65 M

Para a preparação de solução 1,65 M foi pesada uma massa de 1,23 g de KCl (Sigma®) e dissolvida em 10 mL de água purificada por osmose reversa Tecnal® TE- 4007-10. A solução foi autoclavada a 121 °C por 20 min. e armazenado em freezer a -20 °C.

#### 8.5.4 Solução de Cloreto de Magnésio (MgCl<sub>2</sub>) 0,4 M

Para a preparação de solução 0,4 M foi pesada uma massa de 0,81 g de MgCl (Sigma®) e dissolvida em 10 mL de água purificada por osmose reversa. A solução foi autoclavada a 121 °C por 20 min e armazenado em freezer a -20 °C.

### 8.6 Fração Microssomal S9

A Fração S9 (11'01L RAT LIVER LS-9 / Aroclor 1254-induced male SD ratliver) utilizada no sistema de ativação metabólica foi adquirida liofilizada por Molecular Toxicology, Inc. Boone NC2860, armazenado a -20 °C e reconstituído com 2,0 mL de água purificada por osmose reversa Tecnal® TE- 4007-10 estéril no momento do uso. O S9 utilizado foi Importado e Distribuído por: Interlab Distribuidora de Produtos científicos LTDA. Lyophilized Aroclorn 1254- Induced Male SD in KCl- Ref: 11-01L.2

Foi usada a fração microssomal S9 homogeneizada de fígado de rato *Sprague Dawley* (fração pós-mitocondrial, suplementada com um cofator, preparada a partir de fígado de roedores tratados com agentes indutores de enzimas, Aroclor 1254 –

500 mg/kg), o qual induz um conjunto de enzimas do sistema microsomal hepático.

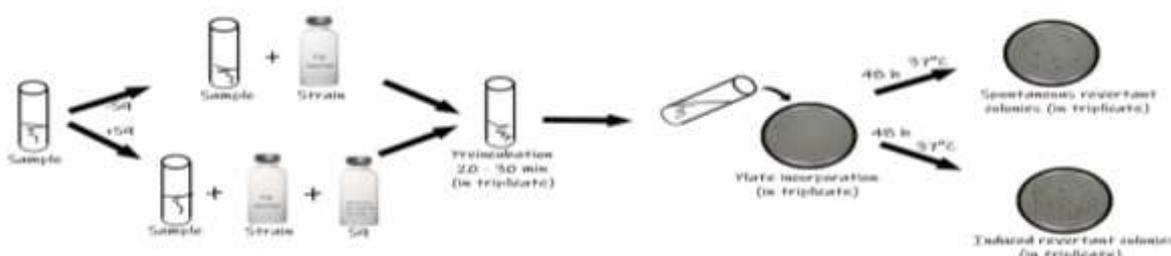
A fração S9 revela se a substância ou amostra é mutagênica em sua forma original ou necessita ser metabolizada ou ativada para se tornar mutagênica. O sistema de ativação metabólica consiste de 4 % de fração S9, 1 % de 0,4 M de cloreto de magnésio (Sigma<sup>®</sup>), 1 % de 1,65 M de cloreto de potássio (Sigma<sup>®</sup>), 0,5 % de 1 M de glicose-6-fosfato (Sigma<sup>®</sup>) e 4 % de 0,1 M de b-nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (Sigma<sup>®</sup>), além de 50 % de 0,2 M de tampão fosfato pH 7,4 e 39,5 % de água deionizada por osmose reversa Tecnal<sup>®</sup> TE-4007-10 estéril (MARON; AMES, 1983). Essa mistura foi mantida resfriada em banho de gelo durante todo o ensaio. Esta solução de trabalho foi preparada sempre a fresco e utilizada num período máximo de 3 h.

## 8.7 Controles Negativos e Positivos

Os ensaios foram realizados sempre em presença de controles negativos e positivos para assegurar a capacidade de resposta da linhagem e a eficácia do sistema de ativação metabólica. O controle negativo foi o solvente DMSO (dimetilsulfóxido) utilizado para dissolver as amostras e o volume por placa foi o mesmo utilizado para as amostras (100 µL).

Como controles positivos foram usados produtos químicos reconhecidamente mutagênicos, específicos para cada linhagem de *S. typhimurium*, em concentrações definidas (UMBUZEIRO; VARGAS, 2003). As Figuras 17 ilustra o esquema operacional para a realização do ensaio.

Figura 17 Representação Gráfica do Teste de Ames sem ativação metabólica e com ativação Metabólica.



Legenda: Representação ilustrada do procedimento do Teste de Ames com e sem a ativação Metabólica com substância teste AgNPs nas concentrações.

Fonte: Elaboração Própria.

A Figura 18 ilustra a organização do fluxo laminar para a realização do ensaio, há necessidade de se organizar tudo antes para evitar possíveis contaminações.

Figura 18 Organização do fluxo laminar para a realização do ensaio.



Legenda: Representação fotográfica do Fluxo Laminar sendo preparado para realizar o Teste de Ames, com Tubos de ensaio identificados, ponteiras de vários volumes, pipetadores, soluções, vortex e descartes.

Fonte: Elaboração própria.

A Figura 19 ilustra a organização das placas e forma de enumeração das triplicatas para a contagem das colônias revertentes.

Figura 19 Organização e Enumeração das Placas.

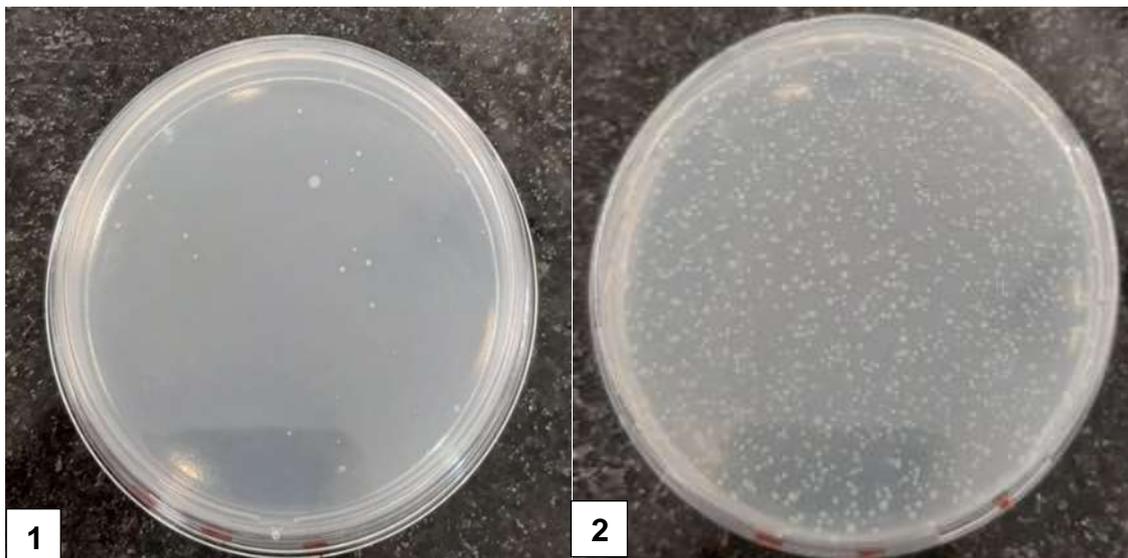


Legenda da Imagem: Representação fotográfica das placas prontas para leitura de colônias revertentes em triplicata.

Fonte: Elaboração própria.

Figura 20 ilustra a formação de colônias usando como exemplos algumas placas ensaiadas com AgNPs e com controle positivo.

Figura 20 Crescimento de Colônias *Salmonella typhimurium*



Legenda das Imagens: Representação fotográfica das placas com número de revertentes que variam de acordo com o a Cepa e com a concentração de AgNPs, placa 1 demonstra as colônias que cresceram com uso da AgNPs, bem menor o crescimento em relação a placa 2 que é o controle positivo.  
Fonte: Elaboração própria.

## 9 FORMA DE ANÁLISE DOS RESULTADOS

Para o teste de Ames, os resultados foram analisados utilizando o programa estatístico Salanal (U.S. Environmental Protection Agency, Monitoring Systems Laboratory, Las Vegas, NV, versão 1.0, do Research Triangle Institute, RTP, Carolina do Norte, EUA). Os dados (revertentes/placa) serão avaliados pela análise de variância seguido de uma regressão linear.

Para a análise da Toxicidade Preliminar e para o Teste de Ames, a amostra é considerada mutagênica quando houver uma relação dose/resposta entre as concentrações testadas e o número de revertentes induzidos e/ou quando o IM foi maior ou igual a dois (2) em pelo menos uma das doses testadas (MORTELMANS; ZEIGER, 2000).

O índice de mutagenicidade (IM) também foi calculado para cada concentração testada, de acordo com a fórmula a seguir.

$$IM = \frac{\text{número de revertente placa com a amostra (revertentes induzidas)}}{\text{número de revertentes placa do controle negativo}}$$

## 10 RESULTADOS

### 10.1 Teste preliminar nas cepas TA 98 e TA 100

Os ensaios de toxicidade preliminar foram realizados com as cepas TA98 e TA100, pois estas duas linhagens demonstram qual tipo de mutação ocorreu, onde na TA98 ocorre o *frameshift* (deslocamento do quando de leitura), fazendo a deleção de um par de GC do DNA da *Salmonella typhimurium*. Já na TA100 ocorre uma substituição de GC por AT (MARON; AMES, 1983; MORTELMANS; ZEIGER, 2000).

Nestes testes pode-se verificar que AgNPs 0,0081 mg/mL, não induziram mutagenicidade  $IM \geq 0$  e nem citotoxicidade  $IM < 0,6$ , ou seja, que a toxicidade seja capaz de impedir o crescimento de 60% das colônias. Não houve em nenhuma das duas cepas e concentrações testadas IM que apontassem mutagenicidade ou citotoxicidade. Os resultados são mostrados nas tabelas 3 e 4.

Tabela 3 RESULTADOS TOXICIDADE PRELIMINAR AgNPS 0,081 mg/mL

TA 98		mg/placa	Nº revertentes	DP
AgNPs (0,081 mg/mL)	<b>Controle +</b>	-	1324	± 154
	<b>Controle -</b>	-	18,67	± 3
	<b>Controle Esp.</b>	-	18	± 4
	<b>100 µL</b>	0,0081	24 (1,3)	± 2
	<b>75 µL</b>	0,0060	22 (1,2)	± 1
	<b>50 µL</b>	0,0040	18 (0,9)	± 10
	<b>25 µL</b>	0,0020	20 (1,0)	± 2
	<b>12,5 µL</b>	0,0010	24 (1,3)	± 3

**Legenda da Tabela:** Controle +: 4-nitro-*o*-fenilenodiamina (NPD - 50 µL/placa); Controle-: dimetilsulfóxido (DMSO 100 µL/placa); nº revertentes: número médio das triplicatas; IM: Índice de mutagenicidade representados entre parênteses. DP: desvio padrão.

Fonte: Elaboração própria.

Note na tabela 3, que o menor valor expresso nos parênteses foi 0,9, o que indica que não se atingiu o limiar de toxicidade, que poderia ser obtido para  $IM < 0,6$  (ou igual).

É sempre desejável conhecer este limiar, para não incorrer em interpretações de falso negativo..

Tabela 4 RESULTADOS TOXICIDADE PRELIMINAR AgNPs 0,081 mg/mL

<i>TA 100</i>		<i>mg/placa</i>	<i>Nº revertentes</i>	<i>DP</i>
<b>AgNPs (0,081 mg/mL)</b>	<b>Controle +</b>	-	2104	± 29
	<b>Controle -</b>	-	147	±18
	<b>Controle Esp.</b>	-	171	± 44
	<b>100 µL</b>	0,0081	141 (0,9)	± 12
	<b>75 µL</b>	0,0060	138 (0,9)	± 11
	<b>50 µL</b>	0,0040	131 (0,9)	± 28
	<b>25 µL</b>	0,0020	150 (1,0)	± 18
	<b>12,5 µL</b>	0,0010	150 (1,0)	± 31

Legenda: Controle +: azida sódica; Controle -: dimetilsulfóxido (DMSO); nº revertentes: número médio das triplicatas; IM: Índice Mutagênico indicado entre parênteses. DP: desvio padrão.

Fonte: Elaboração própria.

A exemplo do que ocorreu no resultado anterior, também na tabela 4 observa-se que o menor valor indicado nos parênteses foi 0,9, quando idealmente seria esperado chegar ao valor 0,6, que representaria o limiar tóxico.

## 10.2 Teste de Ames sem ativação metabólica.

Após os ensaios da Toxicidade Preliminar foram definidas as concentrações que foram usadas para o Teste de Ames completo com e sem ativação metabólica.

Na tabela 5 é possível verificar que não houve  $IM \geq 2,0$  nas quatro cepas e nas concentrações testadas, apontando ausência de toxicidade sem ativação metabólica.

Deve-se ressaltar que embora nenhum valor de IM tenha sido maior ou igual a 2,0, pode-se facilmente reconhecer que algumas concentrações foram tóxicas para as cepas TA 97a e TA 102, que mostraram  $IM < 0,6$ . Isso pode ser facilmente compreendido pelo fato de que a toxicidade preliminar foi realizada nas cepas TA 98 e TA 100.

Tabela 5 RESULTADOS DO TESTE AMES SEM ATIVAÇÃO METABÓLICA (-S9) – AgNPs 0,081mg/mL (TA97a; TA98; TA100; TA102).

Tratamento mg/placa		Número de revertentes (M ± DP) / placa e (IM)			
		TA 97a - S9	TA98 - S9	TA 100 - S9	TA 102 - S9
AgNPs 0,081 mg/mL	<b>0.0<sup>a</sup></b>	50 ± 5	18 ± 3	147 ± 18	435 ± 129
	0,0081	0 ± 0 (0)	25 ± 3 (1,3)	141 ± 12 (0,9)	0,6 ± 1(0)
	0,0060	0 ± 0 (0)	22 ± 2 (1,1)	138 ± 11 (0,9)	17 ± 29 (0,039)
	0,0040	7 ± 6 (0,1)	18 ± 10 (0,9)	131 ± 27 (0,8)	3 ± 4 (0,006)
	0,0020	58 ± 33 (1,4)	20 ± 1 (1,0)	150 ± 18 (1,0)	64 ± 46 (0,1)
	0,0010	37 ± 2 (1,0)	24 ± 2 (1,2)	150 ± 18 (1,0)	165 ± 100 (0,3)
	<b>Controle +</b>	410 ± 83 <sup>b</sup>	1324 ± 154 <sup>b</sup>	2104 ± 295 <sup>c</sup>	1097 ± 328 <sup>d</sup>

Legenda da tabela: M ± DP = média e desvio padrão. <sup>a</sup>Controle negativo: dimetilsulfóxido (DMSO - 100 µL/placa); Controle + = Controle positivo - <sup>b</sup>4-nitro-*o*-fenilenodiamina (NPD - 50 µL / placa – TA97a, TA98); <sup>c</sup>azida sódica (50 µL/placa - TA100); <sup>d</sup>mitomicina (10 µL/placa - TA102), na ausência de S9 (-S9). IM: Índice Mutagênico indicado entre parênteses.

Fonte: Elaboração própria.

### 10.3 Teste de Ames com ativação metabólica

Na tabela 6 é possível verificar que há resultados com IM >2,0 indicando possível mutagenicidade com ativação metabólica (S9+).

Tabela 6 RESULTADOS TESTE AMES COM ATIVAÇÃO METABÓLICA (+ S9)  
AgNPs 0,081mg/mL (TA97a; TA98; TA100; TA102)

Tratamento mg/placa		Número de revertentes (M ± DP) / placa e (IM)			
		TA 97a +S9	TA98 + S9	TA 100 + S9	TA 102 + S9
AgNPs (0,081 mg/mL)	<b>0.0<sup>a</sup></b>	98 ± 5	29 ± 9	144 ± 9	144 ± 52
	0,0081	72 ± 32 (0,7)	64 ± 27 <b>(2,2)</b>	226 ± 187 (1,6)	118 ± 14 (0,3)
	0,0060	122 ± 15 (1,24)	15 ± 5 (0,53)	922 ± 217* <b>(6,4)</b>	193 ± 22 (0,5)
	0,0040	97 ± 15 (0,99)	23 ± 4 (0,81)	145 ± 20 (1,0)	445 ± 82 (1,1)
	0,0020	141 ± 2** (1,43)	20 ± 12 (0,69)	152 ± 15 (1,0)	304 ± 36 (0,76)
	0,0010	153 ± 25 (1,6)	21 ± 5 (0,72)	146 ± 18 (1,0)	416 ± 40 (1,0)
	<b>Cont +</b>	574 ± 50	19 ± 22	678 ± 52	451 ± 42

Legenda da tabela: M ± DP = média e desvio padrão; <sup>a</sup>Controle negativo: dimetilsulfóxido (DMSO - 100 µL/placa em todas as cepas); Controle +: 2- aminoantraceno (50 µL por placa em todas as cepas). IM: Índice Mutagênico indicado entre parênteses. \*\*, p<0,01. \*, p<0,05.

Fonte: Elaboração própria.

Na cepa TA98 na concentração de 0,0081 mg/mL apresentou Índice Mutagênico com IM: (2,2) e na cepa TA100 na concentração de 0,0060 mg/placa com IM: (6,4), evidenciando mutagenicidade. Em concentrações menores e em outras cepas não apresentaram IM ≥2,0.

É possível observar, também, que algumas concentrações foram tóxicas (IM

<0,6) às cepas TA 98 e TA 102. O fato de terem sido usadas as mesmas concentrações de AgNPs do teste anterior (-S9), no caso da cepa TA 98 pode-se inferir que a mutagenicidade encontrada.

Já no caso da cepa TA100 pode ter sido decorrência de toxicidade, uma vez que o mesmo ocorreu no ensaio anterior (-S9) para a integralidade das concentrações estudadas. De qualquer modo, essas variações de toxicidade para mutagenicidade entre concentrações iguais em sistemas sem e com ativação metabólica não são impedimentos para se imputar mutagenicidade a determinada substância.

O racional deste estudo de avaliação de mutagenicidade de AgNPs sintetizadas com curcumina decorre da preocupação de seu uso em sistemas biológicos, sem que se conheça a sua toxicidade. De forma paradoxal, é interessante que tenha efeitos tóxicos a organismos patogênicos, mas que preserve formas de vida que não sejam nocivas umas às outras, como a vida humana e veterinária, os reinos vegetal e mineral, e, por fim, não afete negativamente os ecossistemas (PORTO; FINAMORE, 2012).

## 11 DISCUSSÃO

O ensaio *Salmonella*/microsossoma, conhecido como Teste de Ames apresenta vantagens por ser cientificamente validado e amplamente aceito pela comunidade científica, agências reguladoras internacionais, como a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) e corporações governamentais como a Companhia Ambiental do Estado de São Paulo (Cetesb), no Brasil. É usado como um ensaio para identificar substâncias puras, em mistura e em amostras ambientais que podem produzir danos genéticos que levam a mutações gênicas. O teste permite reconhecer o tipo de mutação induzida pelo mutágeno ao DNA, fornecendo informações sobre a natureza das alterações primárias na molécula (MARON; AMES, 1983; MORTELMANS; ZEIGER, 2000; UMBUZEIRO; VARGAS, 2003; YOSHIDA *et al.*, 2014).

Além disso, dada a importância atribuída ao resultado do teste de mutação bacteriana pelas autoridades reguladoras, muitas empresas privadas analisam os compostos quanto à genotoxicidade microbiana em um estágio muito inicial do desenvolvimento (ZEIGER, 1982; HAMEL; ROY, PROUDLCK 2016). Os resultados obtidos através do teste de Ames são enviados para agências reguladoras em apoio ao registro ou aceitação de muitos produtos químicos, incluindo drogas e biocidas (AULETTA; DEARFIELD; CIMINO, 1993; FDA, 1993; KIRKLAND, 1993; SOFUNI, 1993; MORTELMANS; ZEIGER, 2000).

Nesta fase preliminar de testes, não é necessário executar um teste padrão completo. Laboratórios individuais podem usar versões “reduzidas” do teste de Ames, optar por testar apenas na presença de S9, usar um nível superior de dose reduzida, utilizar menos replicação de placas, reduzir o número de cepas examinadas (geralmente usando apenas TA98 e TA100) ou uma combinação dessas. A vantagem dessa abordagem é que os resultados podem ser extrapolados diretamente para o que seria esperado no teste subsequente; a desvantagem é que haverá alguma dificuldade na detecção de mutagênicos fracos ou, no caso de redução do número de cepas, que alguns mutagênicos sejam perdidos. No entanto, um resultado positivo nesse teste é suficiente para categorizar o produto químico como mutagênico (MORTELMANS; ZEIGER, 2000).

Este estudo investigativo de avaliação de toxicidade das AgNPs através do teste de Ames encerra uma complicação que são as propriedades antimicrobianas do

produto de teste. Por outro lado, essas propriedades são a principal razão para o uso disseminado de AgNPs em produtos de consumo. Em geral, parece que uma combinação das propriedades físicas, toxicidade e mecanismos de genotoxicidade de nanopartículas, em particular de AgNPs, pode resultar em resultados falsos negativos e uma subestimação de sua mutagenicidade pelo teste de Ames (LI *et al.*, 2012).

O teste preliminar de toxicidade constitui a primeira etapa do ensaio a fim de se conhecer a concentração tóxica às linhagens e o intervalo ideal de trabalho, para se evitar resultados falso-negativos. Neste trabalho foram utilizadas duas linhagens, TA98 e TA100, cujas características genotípicas são promover mutações do tipo *frameshift*, com deleção do par GC e substituição GC para AT, respectivamente. Os resultados permitiram selecionar o intervalo de trabalho com as AgNPs e mostraram ausência de mutagenicidade em meio sem ativação metabólica (-S9). Porém, verificou-se ainda, citotoxicidade (com índices de mutagenicidade  $IM < 0,6$ , indicativo de limiar tóxico (HAMEL; ROY; PROUDLCK, 2016) quando o teste de Ames foi complementado utilizando-se as cepas TA97a e TA102 (tabela 5). As referidas linhagens provocam mutações do tipo *frameshift* (deslocamento do quadro de leitura) com adição do par GC e substituição AT para GC, respectivamente (MORTELMANS; ZEIGER, 2000) notou-se que a toxicidade persistiu para a linhagem TA102, na menor concentração estudada que foi de 0,0010 mg/placa de AgNPs.

Quando o teste foi aplicado na presença de ativação metabólica e utilizando-se as mesmas concentrações, houve mutagenicidade nas concentrações de 0,0060 e 0,0081 mg/placa. Podem-se discutir esses resultados baseado na informação de que alguns mutagênicos oxidantes como aldeídos e quininos produzem radical hidroxila, radical superóxido, oxigênio *singlet*, peróxidos e peróxido de hidrogênio são positivos nas cepas de Ames TA100 e TA102 (DILLON; COMBRES; ZEIGER, 1998; KIM *et al.*, 2011; LEVIN *et al.*, 1982). Esta hipótese colocaria as AgNPs como indutoras de estresse oxidativo, por meio da ativação da NADPH oxidase ligada à membrana durante a captação de AgNP nas células, o que provocaria danos à saúde humana com desconhecidos impactos também sobre o ambiente (KIM; RYU, 2013).

Outra questão a discutir sobre os nossos resultados seria o papel da curcumina em relação à toxicidade apresentada, se haveria ou não uma interferência por parte da curcumina nos resultados, mas autores em estudos anteriores apontaram que a curcumina é um eficaz antimutágeno *in vitro* contra vários mutágenos-padrão que

requerem ativação metabólica. Os rizomas secos da cúrcuma contêm 3-5% de curcumina, enquanto o conteúdo de curcumina e de oleorresina de açafrão é de 40% (GOVINDRAJAN, 1980).

Um exemplo interessante é a população indiana, que está exposta a vários agentes mutagênicos/cancerígenos na dieta (NAGABHUSHAN; BHIDE, 1985), em fontes ocupacionais e de hábitos de tabaco (SHAH, SARODE; BHIDE, 1985). O uso generalizado de cúrcuma pode oferecer proteção contra alguns agentes mutagênicos/cancerígenos ambientais (NAGABHUSHAN; AMONKAR; BHIDE, 1987). Sendo um bom antimutágeno, hipotetizamos que não seria a curcumina a substância causadora de mutagenicidade na presença de ativação metabólica, já as AgNPs são apontadas na literatura como mutagênica em vários testes além do Ames principalmente dependendo da dose e do tamanho (KORANI *et al.*; 2015).

Indo além, no trabalho de Alves *et al.* (2018) foi desenvolvida uma formulação composta por um gel termorresponsivo - com propriedades antimicrobianas e antioxidantes devido à associação de AgNPs, que foram incorporados juntamente com a dispersão sólida de curcumina (gel termosensível). Os resultados mostraram que a associação entre o AgNPs e curcumina demonstrou boa atividade antioxidante em comparação ao composto padrão. Esta associação aumenta a atividade antimicrobiana contra *E. coli* e *P. aeruginosa* e agrega valor antioxidante nas formulações. A atividade antimicrobiana da curcumina na presença de AgNPs foi melhorada e, portanto, pode ser recomendada para uso como hidrogel antimicrobiano após extensos ensaios experimentais em animais. Supõe-se que a curcumina continua presente após a redução da prata, mas não participa como mutágeno direto por ter sido avaliada como boa antimutagênica (ALVES *et al.* 2018).

Apesar de nossos resultados apontando mutagenicidade das nanopartículas de prata através do Teste de Ames, é evidente que existe a necessidade de outros estudos para fazer tal afirmativa. A utilização de materiais de referência (certificados) e estudos toxicológicos integrados (interlaboratoriais) são de fundamental importância para o avanço do conhecimento e regulamentação envolvendo AgNPs. Ressalta-se que o mau uso das AgNPs poderia, em longo prazo, causar problemas para a saúde (DURAN *et al.*, 2019) devendo ser usada com cautela. E também realizar outros testes, pois o teste de Ames é considerado como um teste de primeira triagem para determinar o potencial mutagênico de novos produtos químicos e drogas.

Nanopartículas de prata (AgNPs) podem causar efeitos adversos associados à

exposição a elas, por este motivo Kulthong *et al.* (2012) investigaram os efeitos dos AgNPs nas enzimas metabolizadoras de drogas hepáticas das famílias 1, 2 e 3 do citocromo P450 (CYP) usando ensaios biológicos *in vitro* e *in vivo*. No estudo desses autores, as AgNPs foram administradas por via oral a ratos Sprague-Dawley em várias doses (0-1000 mg/kg de peso corporal/dia) durante 2 semanas. Nenhum efeito foi encontrado nos níveis plasmáticos de ALT, AST e ALP em todos os grupos de ratos tratados, tampouco foi observada qualquer mudança significativa nas atividades de CYP1A, CYP2C, CYP2D, CYP2E1 e CYP3A para todas as doses de AgNP testadas (KULTHONG *et al.*, 2012). Contudo, o sistema *in vitro* usando microssomas de fígado de rato demonstrou uma forte inibição das atividades CYP2C (IC<sub>50</sub>=28 µg/mL) e CYP2D (IC<sub>50</sub>=23 µg/mL), mas não das atividades CYP1A, CYP2E1 e CYP3A (IC<sub>50</sub>>100 µg/mL) em concentrações de até 100 µg/mL de AgNPs. O efeito inibitório dos AgNPs nesses CYPs indica a possibilidade da interação AgNP-fármaco quando co-administrados com alguns medicamentos e isso pode causar efeitos adversos aos pacientes (KULTHONG *et al.*, 2012). Essa informação corrobora com os resultados aqui encontrados de possível mutagenicidade com ativação metabólica.

Após a absorção, as AgNPs podem ser distribuídas no sangue e no cérebro e, subsequentemente, para outros órgãos, como coração e rins. AgNPs menores tendem a ser agregadas e estimular o sistema imunológico, portanto, seu acúmulo no baço pode ser especialmente eficaz no tratamento de doenças inflamatórias. A pesquisa sobre a toxicidade dos AgNPs é conduzida principalmente *in vitro* com partículas que variam de 1 a 100 nm. Os estudos em animais disponíveis são estudos de prazo relativamente curto e dados disponíveis sobre animais mostraram que os AgNPs causam anormalidades histopatológicas no baço, fígado, pele e músculos (KORANI; REZAYAT; ARBABI BIDGOLI, 2013).

Por outro lado, a pesquisa sobre o efeito das AgNPs na saúde humana é limitada, sendo que a exposição dérmica subcrônica pode causar um acúmulo considerável de AgNPs no fígado e no pulmão (KORANI; REZAYAT; GHAMAMI, 2012). Parece, ainda, que as AgNPs coloidais tem a capacidade de criar uma resposta tóxica dependente da dose em vários órgãos. Os estudos humanos bem limitados e bem controlados sobre as toxicidades potenciais das AgNPs são escassos e a longo prazo, doses de ampla gama, preferencialmente usando vários tamanhos de partículas, são necessárias para caracterizar melhor o risco de AgNPs na saúde humana. É altamente recomendável detectar o papel da forma e do tamanho das partículas no perfil de

toxicidade dos AgNPs por diferentes vias de administração em estudos futuros (KORANI *et al.*, 2015).

Análises complementares ao teste de Ames podem ser realizadas para aumentar as evidências de mutagenicidade *in vitro* antes de realizar testes em animais como o ensaio do Micronúcleo que é um teste de frequência de micronúcleos *in vitro* é uma das metodologias de escolha no desenvolvimento de testes de segurança toxicológica (ANVISA, 2013) Sua realização baseia-se na quantificação de quebras de duplas ligações não reparadas no DNA de células expostas em cultura a diversas concentrações de substâncias teste, ou a quantidades incrementais de agentes agressores diversos (FENECH, 2007). O teste Cometa mostra a capacidade que o DNA tem de migrar em função tanto do tamanho da molécula como da quantidade de extremidades livres (quebras, por exemplo) que, mesmo ligadas a segmentos maiores, migram numa distância pequena do corpo do cometa. O tamanho da cauda inicialmente aumenta proporcionalmente à quantidade de danos, mas a migração máxima é determinada pelas condições da eletroforese, não o tamanho dos fragmentos. A intensidade da fluorescência na cauda em relação àquela do corpo do cometa fornece informações sobre a quantidade de quebras no DNA. Assim, pode-se avaliar o dano genético tanto através da medida do comprimento da cauda do cometa, como através da quantidade de DNA presente, sendo ambos função das doses de exposição (SINGH *et al.*, 1988; FAIRBAIRN; OLIVE; O'NEILL, 1995).

Finalmente, levando em conta o lado ambiental, vários autores estudaram a interação planta - nanopartículas de metal usando *Arabidopsis thaliana* como modelo (MILEWSKA-HENDEL *et al.*, 2019; MONTES *et al.*, 2017). Esses estudos revelaram que as propriedades únicas das nanopartículas projetadas facilitam sua penetração nas células e tecidos vegetais, mobilização em órgãos da planta e interação com compostos pequenos e macromoleculares. Com base em sua origem metálica e outras propriedades, as nanopartículas podem ser fitotóxicas e afetar o crescimento das plantas, pois induzem o acúmulo de espécies reativas de oxigênio, modulam a expressão gênica e a síntese de proteínas e outros metabólitos (JASKULAK *et al.*, 2019; KHAN *et al.*, 2019; MARSLIN; SHEEBA; FRANKLIN 2017).

Por outro lado, alguns tipos de nanopartículas também podem ter um efeito positivo, como a estimulação do crescimento das plantas. Ouro, óxido de alumínio, óxido de cério e nanopartículas de ferro zero valente podem ser incluídos nesta categoria (KIM, *et al.*, 2014; KUMAR *et al.*, 2013). No entanto, os mecanismos

moleculares de ação das nanopartículas ainda não são compreendidos em detalhes (MARSLIN; SHEEBA; FRANKLIN, 2017; MATICH *et al.*, 2019). A fitotoxicidade induzida por nanopartículas de prata de 20, 40 e 80 nm inibiu o alongamento da raiz de *A. thaliana* e o acúmulo de biomassa (GEISLER-LEE *et al.*, 2013).

Estudos metabólicos anteriores em *A. thaliana* foram focados em mudanças gerais no metabolismo em resposta às nanopartículas, mas as mudanças no metabolismo secundário ainda não foram descritas (KE *et al.*, 2017; MONTES *et al.*, 2017). No entanto, análises de expressão gênica demonstraram que genes envolvidos na síntese de fenilpropanóides e recirculação de nitrogênio foram regulados positivamente após o tratamento com nanopartículas de prata (KOHAN-BAGHKHEIRATI; GEISLER-LEE, 2015). Metabólitos secundários são compostos importantes que estão envolvidos na resposta da planta a condições de estresse abiótico (seca, luz, salinidade) e biótico (patógenos) (BÖTTCHER *et al.*, 2014).

Em conclusão, as AgNPs aqui estudadas mostraram-se mutagênicas sob o parâmetro *Salmonella*/microsoma e o fato disso ter ocorrido sob presença de ativação metabólica requer cautela na administração em organismos vivos que utilizam principalmente o sistema microsomal enzimático para a sua metabolização.

## 12 CONCLUSÃO

Mediante os resultados obtidos neste estudo conclui-se que as AgNPs sintetizadas com curcumina protegeram parcialmente contra o veneno da *P. olfersii* em *Biventer cervicis* de pintainho, preservando a resposta contrátil mesmo após a lavagem, bem como as respostas contraturantes aos agonistas ACh e KCl. O biomarcador de CK quando analisado em alíquotas retiradas do banho não se mostrou um bom modelo para avaliar miotoxicidade. Também se observou que temperatura <37°C interfere na atividade bloqueadora do veneno.

As AgNPs mostraram-se mutagênicas na presença de ativação metabólica, mas não em sua ausência e, portanto, não podem ser classificadas como mutágeno direto, pelo parâmetro *Salmonella*/microssoma.

## REFERÊNCIAS

ACOSTA de P.; *et al.* Edematogenic and myotoxic activities of the Duvernoy's gland secretion of *Philodryas olfersii* from the north-east region of Argentina. **Biocell**, v. 27, n. 3, p. 363-370, 2003.

ALVES, T. F.; *et al.* Association of Silver Nanoparticles and Curcumin Solid Dispersion: antimicrobial and antioxidant properties. **American Association of Pharmaceutical Scientists**, v. 19, n. 1, p. 225-231, 2018.

AMES, B. N.; *et al.* Carcinogens are mutagens: a simple test system combining liver homogenates for activation and bacteria for detection. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 70, n. 8, p. 2281-2285, 1973.

ANJUM, N. A. *et al.* Silver nanoparticles in soil–plant systems. **Journal of Nanoparticle Research**, v.15, n. 1896, p. 1-26, 2013.

ANVISA- **Agência Nacional de Vigilância Sanitária**. Guia para a condução de estudos não clínicos de toxicologia e segurança farmacológica necessários ao desenvolvimento de medicamentos. 2013. Disponível em:  
<http://antigo.anvisa.gov.br/documents/33836/2492465/Guia+para+a+Condu%C3%A7%C3%A3o+de+Estudos+N%C3%A3o+Cl%C3%ADnicos+de+Toxicologia+e+Seguran%C3%A7a+Farmacol%C3%B3gica+Necess%C3%A1rios+ao+Desenvolvimento+de+Medicamentos+-+Vers%C3%A3o+2/a8cad67c-14c8-4722-bf0f-058a3a284f75>.

Acesso em 12/03/2021.

ARAÚJO, M. E. de; SANTOS, A. C. M. C. A. Cases of human envenoming caused by *Philodryas olfersii* and *Philodryas patagoniensis* (serpentes: Colubridae). **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 30, n. 6, p. 517-519, 1997.

ASSAKURA, M. T. *et al.* Hemorrhagic, fibrinogenolytic and edema-forming activities of the venom of the colubrid snake *Philodryas olfersii* (green snake). **Toxicon**, v.30, n. 4,

p. 427-438, 1992.

ASHRAFIZADEH, M. *et al.* Versatile role of curcumin and its derivatives in lung cancer therapy. **Journal of Cellular Physiology**, v. 235, n. 12, p. 9241-9268, 2020.

AULETTA, A. E.; DEARFIELD, K. L.; CIMINO, M.C. Mutagenicity test schemes and guidelines: U.S. EPA Office of pollution prevention and toxics and office of pesticide programs. **Environmental Mol Mutagenesis**, v. 21, n. 1, p. 46-57, 1993.

BAER, D. R. *et al.* Characterization challenges for nanomaterials. **Total Synthesis of Natural Products**, v. 40, n. 3-4, p. 529-537, 2008.

BIOCLIN® CK NAC UV referência K010-1: instruções de uso. Belo Horizonte, MG, 2018. Disponível em:  
[https://quibasa.bioclin.com.br/anexos/INSTRUCOES\\_CK\\_NAC\\_UV.pdf](https://quibasa.bioclin.com.br/anexos/INSTRUCOES_CK_NAC_UV.pdf). Acessado em: 27 nov. 2020.

BJARNASON, J.; FOX, J. W. Hemorrhagic metalloproteinases from snake venoms. **Clinical Pharmacology**, v. 62, n. 3, p. 325-372, 1994.

BISWAS, A. *et al.* Nanoparticle-conjugated animal venom-toxins and their possible therapeutic potential. **Journal of Venom Research**, v. 3, n. 3, p. 15-21, 2012.

BÖTTCHER, C. *et al.* The biosynthetic pathway of indole-3-carbaldehyde and indole-3-carboxylic acid derivatives in Arabidopsis. **Plant Physiology**, v. 165, n. 2, p. 841-853, 2014.

BUZEA, C; PACHECO, I. I.; ROBBIE, K. Nanomaterials and nanoparticles: sources and toxicity. **Biointerphases**, v.2, n. 4, p. 17-71, 2007.

CARVALHO, M. A.; NOGUEIRA, F N. Snakes from the urban area of Cuiabá, Mato Grosso: ecological aspects and associated snakebites. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 14, n. 4, p. 753-763, 1998.

CHAKRABARTTY, S. *et al.* Inhibition of snake venom induced sterile inflammation and PLA2 activity by Titanium dioxide nanoparticles in experimental animals. **Scientific Reports**, v.9, n. 1, p. 1-10, 2019.

CHACUR, M. *et al.* Pharmacological modulation of hyperalgesia induced by the serpente venom *Bothrops asper* (terciopelo). **Toxicon**, v. 39, n. 8, p. 1173-1181, 2001.

CHANG, C. C.; TANG, S. S. Differentiation between intrinsic and extrinsic acetylcholine receptors of the chick *Biventer cervicis* muscle. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v. 282, n. 4, p. 379–388, 1974.

COLLAÇO, R. C. O. *et al.* Protection by *Mikania laevigata* (guaco) extract against the toxicity of *Philodryas offersii* snake venom. **Toxicon**, v. 60, n. 4, p. 618-622, 2012.

CORREIA, J. M. *et al.* Poisoning due to *Philodryas offersii* (Lichtenstein, 1823) attended at Restauração hospital in Recife, State of Pernambuco, Brazil: case report. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 43, n. 3, p. 336- 338, 2010.

DE LIMA, R.; SEABRA, A. B.; DURÁN, N. Silver nanoparticles: a brief review of cytotoxicity and genotoxicity of chemically and biogenically synthesized nanoparticles. **Journal of Applied Toxicology**, v. 32, n. 11, p. 867- 879, 2012.

DIAZ, F. *et al.* Case report envenomation by neotropical opisthophthalmic colubrid *Thamnodynastes cf. pallidus* Linné, 1758 (Serpentes: Colubridae) in Venezuela. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 46, n. 5, p. 287-290, 2004.

DILLON, D.; COMBES, R.; ZEIGER, E. The effectiveness of Salmonella strains TA100, TA102 and TA104 for detecting mutagenicity of some aldehydes and peroxides, **Mutagenesis**, v. 13, n. 1, p. 19–26, 1998.

DURAN, N. *et al.* Potential use of silver nanoparticles on pathogenic bacteria, their

toxicity and possible mechanisms of action. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 21, n. 6, p. 949-959, 2010.

DURAN, N. *et al.* Nanotoxicology of silver nanoparticles: toxicity in animals and humans. **Química Nova**, v. 42, n. 2, p. 206-213, 2019.

ERHART, E. A.; REZZE, C. J.; BIAZOTTO, W. The ectopic newly-formed nerve fibres which repopulate the long-time denervated and atrophic chick skeletal muscle. **Arquivos de Neuro-Psiquiatria**, v.26, n. 3, p. 187-194, 1968.

FAIRBAIRN, D. W.; OLIVE, P. L.; O'NEILL, K. L. The comet assay: a comprehensive review. **Mutation Research**, v. 339, n. 1, p. 37–59, 1995.

FENECH, M. Cytokinesis-block micronucleus cytome assay. **Nature protocols**, v. 2, n. 5, p. 1084-1104, 2007.

FDA, Toxicological Principles for the Safety Assessment of Direct Food Additives and Color Additives Used in Food “Redbook II” [Draft]. FDA, Center for Food Safety and Applied Nutrition, Washington D.C., 1993.

FERLAN, A. Preliminary studies on the venom of the colubrid snake *Rhabdophis subminiatus* (red-necked keelback). **Toxicon**, v. 21, n. 4, p. 570-574, 1983.

FERNANDES, C. F. C.; *et al.* Snake venom L-amino acid oxidases: Trends in Pharmacology and Biochemistry. **BioMed Research International**, v.14, p.1- 19, 2014.

FRANÇA, F. O. de S.; MÁLAQUE, C. M. S. Acidente botrópico. In: Cardoso, J. L. C.; França, F. O. S.; Wen, F. H.; Málaque, C. M. S.; Haddad Jr, V. (Eds.). In: **Animais Peçonhentos do Brasil Biologia: Clínica e Terapêutica dos Acidentes**. São Paulo: Sarvier Ed.; 2003. p. 72–86.

GEISLER-LEE, J. *et al.* Phytotoxicity, accumulation and transport of silver nanoparticles by *Arabidopsis thaliana*. **Nanotoxicology**, v. 7, n. 3, 2013, p. 323-337,

2013.

GINSBORG, B. L. Spontaneous activity in muscle fibres of the chick. **The Journal of Physiology (Lond)**, v. 150, n. 3, p.707–717, 1960a.

GINSBORG, B. L. Some properties of avian skeletal muscle fibres with multiple neuromuscular junctions. **The Journal of Physiology (Lond)**, v. 154, n. 3, p. 581–598, 1960b.

GINSBORG, B. L.; WARRINER, J. The isolated chick *biventer cervicis* nerve- muscle preparation. **British Journal of Pharmacology**, v. 15, n. 3, p. 410, 1960.

GUTIÉRREZ, J. M.; RUCAVADO, A. Snake venom metalloproteinases: their role in the pathogenesis of local tissue damage. **Biochimie**, v. 82, n 9-10, p.841-850, 2000.

HAMEL, A.; ROY, M.; PROUDLOCK. R. **The, bacterial reverse mutation test.** In ZEIGER. E. **Genetic Toxicology Testing.** Departament of genetic toxicology, Charles River Laboratories, Montreal, ULC, Canadá. p. 79-138, cap. 4, 2016. Doi.10.1016/B978-0-12-800764-8.00004-5. Disponível em: <https://www.criver.com/sites/default/files/resources/GeneticToxTestingTheBacterialReverseMutationTest.pdf> . Acessado em 27 fev. 2021.

HARTMANN, P. A.; MARQUES, O. A. V. Diet and habitat use of two sympatric species of *Philodryas* (Colubridae), in south Brazil. **Amphibia - Reptilia**, v. 26, p. 25-31, 2005.

HARVEY, L. A. Screening of snake venoms for neurotoxic and myotoxic effects using simple in vitro preparations from rodents and chicks. **Toxicon**, v. 32, n. 3, p. 257-265, 1994.

HAUZMAN, E.; *et al.* Comparative study of photoreceptor and retinal ganglion cell topography and spatial resolving power in Dipsadidae snakes. **Brain Behavior Evolution**, v. 84, n. 3, p. 197-213, 2014.

HILL, E. R.; MACKESSY, P. S. Characterization of venom (Duvernoy's secretion) from

twelve species of colubrid snakes and partial sequence of four venom proteins. **Toxicon**, v.38, n. 12, p. 1663-1687, 2000.

HINGANE, V. C.; PANGAM, D.; DONGRE, P. M. Inhibition of crude viper venom action by silver nanoparticles: a biophysical and biochemical study. **Biophysics and Physicobiology**, v. 3, n. 15, p. 204-213, 2018.

JANSEN, D. W. The myonecrotic effect of Duvernoy's gland secretion of the *Thamnophis elegans vagrans*. **Journal of Herpetology**, v.21, p. 81-83. 1987.

JASKULAK, M. *et al.* "Bioaccumulation, antioxidative response, and metallothionein expression in *Lupinus luteus* L. exposed to heavy metals and silver nanoparticles." **Environmental science and pollution research international**, v. 26, n. 16, p. 16040-16052, 2019.

KARDONG, K. V. Colubrid snakes and Duvernoy's "venom" glands. **Journal of Toxicology**, v. 21, n. 1-2, p. 1-19, 2002.

KE, M. *et al.* Physiological and Molecular Response of *Arabidopsis thaliana* to CuO Nanoparticle (nCuO) Exposure. **Bulletin of environmental Contamination and Toxicology**, v. 99, n. 11, p. 713–718, 2017.

KHAN, M. R. *et al.* Nanoparticle–Plant interactions: Two-way traffic. **Nano-Micro Small**, v. 15, n. 37, p. n/a-n/a. 2019.

KIM, H. R. *et al.* Genotoxic effects of silver nanoparticles stimulated by oxidative stress in human normal bronchial epithelial (BEAS-2B) cells. **Mutation Research**, v. 726, n. 2, p. 205- 223, 2011.

KIM, S.; RYU, D. Y. Silver nanoparticle-induced oxidative stress, genotoxicity and apoptosis in cultured cells and animal tissues. **Journal of Applied Toxicology**, v. 33, n. 2, p. 78-89, 2013.

KIM, Y. *et al.* "Toxicity of 100 nm zinc oxide nanoparticles: a report of 90-day repeated

oral administration in Sprague Dawley rats.” **International journal of nanomedicine**, v. 9, n. 2, p. 109-126, 2014.

KIRKLAND, D. J. Genetic toxicology testing requirements: official and unofficial views from Europe, **Environmental Molecular Mutagenesis**, v. 21, n.1, p. 8–14, 1993.

KOHAN-BAGHKHEIRATI, E.; GEISLER-LEE, J. "Gene expression, protein function and pathways of *Arabidopsis thaliana* responding to silver nanoparticles in comparison to silver ions, cold, salt, drought, and heat." **Nanomaterials**, v. 5, n. 2, p. 436-467, 2015.

KORANI, M.; REZAYAT, S. M.; ARBABI BIDGOLI, S. Sub-chronic dermal toxicity of silver nanoparticles in guinea pig: special emphasis to heart, bone and kidney toxicities. **Iranian Journal of Pharmaceutical Research**, v. 12, n. 3, p. 511–519, 2013.

KORANI, M. *et al.* Effects of silver nanoparticles on human health, **European Journal of Nanomedicine**, v. 7, n. 1, p. 51-62, 2015.

KORANI, M; REZAYAT, S. M.; GHAMAMI, S. G. Silver nanoparticle induced muscle abnormalities: a sub-chronic dermal assessment in guinea pig. **Journal of Pharmaceutical & Health Sciences**, v. 1, n. 3. p. 143-151, 2012.

KORNALIK, F.; TÁBORKÁ, E.; MEBS, D. Pharmacological and biological properties of a venom gland extract from the snake *Thelotornis kirtlandi*. **Toxicon**, v. 16, n. 6, p. 535-542, 1978.

KULTHONG, K. *et al.* Effects of silver nanoparticles on rat hepatic cytochrome P450 enzyme activity. **Xenobiotica; the fate of foreign compounds in biological systems**, v. 42, n. 9, p. 854-862, 2012.

KUMAR, V. *et al.* “Gold nanoparticle exposure induces growth and yield enhancement in *Arabidopsis thaliana*.” **The Science of the total environment**, v. 461-462, n. 7, p. 462-468, 2013.

LEMOINE, K.; A. RODRÍGUEZ-ACOSTA. Haemorrhagic, proteolytic and neurotoxic activities produced by Duvernoy's gland secretion from the false coral snake (*Erythrolamprus bizona* Jan, 1863) (Serpentes: Viperidae). **Revista Científica Fcv- Iuz**, v. 13, n. 5, p. 371-377, 2003.

LEMOINE, K. *et al.*; Proteolytic, Hemorrhagic, and neurotoxic activities caused by *Leptodeira annulate ashmeadii* (Serpentes Colubridae) Duvernoy's gland secretion. **Wilderness & Environmental Medicine**, v.15, p. 82-89, 2004.

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

LI, Y. *et al.* Genotoxicity of silver nanoparticles evaluated using the Ames test and in vitro micronucleus assay. **Mutation Research**, v. 745, n. 1 - 2, p. 04 – 10, 2012.

MACKESSY, S. P. Biochemistry and pharmacology of colubrid snake venoms. **Toxin Reviews**, v.21, n. 1-2, p. 43-83, 2002.

MARON, D. M.; AMES, B.N. Revised methods for the Salmonella mutagenicity test. **Mutation Research**, v. 113, n. 3-4, p. 173-215, 1983.

MARSLIN, G.; SHEEBA, C. J.; FRANKLIN, G. Nanoparticles Alter Secondary Metabolism in Plants via ROS Burst. **Frontiers in Plant Science**, v. 19, n. 8, p. 832, 2017.

MATICH, E. K. *et al.* Applications of metabolomics in assessing ecological effects of emerging contaminants and pollutants on plants. **Journal of Hazardous Materials**, v. 373, p. 527-535, 2019.

MENDONÇA, L. M. Avaliação de uma preparação hidrossolúvel de curcumina sobre a toxicidade induzida pelo quimioterápico cisplatina: possíveis efeitos protetores in vitro e in vivo, e identificação de alterações na expressão do gene Tp53. Tese

Doutorado em Toxicologia - Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto, 2012.

MILEWSKA-HENDEL, A. *et al.* Effect of Nanoparticles Surface Charge on the *Arabidopsis thaliana* (L.) Roots Development and Their Movement into the Root Cells and Protoplasts. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 7, p. 1650, 2019.

MOHAMMAD, P. *et al.* Preparation, characterization and stability investigation of chitosan nanoparticles loaded with the *Echiscarinatus* snake venom as a novel delivery system. **Archives of Razi Institute**, v.70, n. 4, p. 269-277, 2015.

MONTES, A. *et al.* Mass spectrometry-based metabolomics to assess uptake of silver nanoparticles by *Arabidopsis thaliana*. **Environmental Science: Nano**, v. 4, n. 10, p. 1944-1953, 2017.

MORONES, J. R. *et al.* The bactericidal effect of silver nanoparticles. **Nanotechnology**, v. 16, n. 10, p. 2346–2353, 2005.

MORTELMANS, K.; ZEIGER, E. The Ames *Salmonella*/microsome mutagenicity assay. **Mutation Research**, v. 455, n.1-2, p. 29-60, 2000.

NAGABHUSHAN, M.; BHIDE, S. V. Mutagenicity of chilli extract and capsaicin, using short term tests. **Environmental Mutagenesis**, v. 7, n. 6, p. 881- 888, 1985.

NAGABHUSHAN, M.; AMONKAR, A. J.; BHIDE, S. V. In vitro antimutagenicity of curcumin against environmental mutagens. **Food and Chemical Toxicology**, v. 25, n. 7, p. 545-547, 1987.

NAKADA, K.; *et al.* Quantification of myonecrosis and comparison of necrotic activity of snake venoms by determination of creatine phosphokinase activity in mice sera. **Toxicon**, v. 22, n. 6, p. 921-30, 1984.

NAVARRETE, L. F.; LEMOINE, K.; RODRÍGUEZ-ACOSTA, A. Is the opisthopharynx *Clelia clelia* Duvernoy's Gland Secretion Hemorrhagic in Human? **Acta Biologica Venezuelica**, v. 19, n.3, p. 19-23, 1999.

O'BRIEN J. *et al.* Engineered nanoparticles bind elapid snake venom toxin and inhibit venom-induced dermonecrosis. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 23, n. 10, p. e 0006736, 2018.

OHSAKA A. Hemorrhagic, necrotizing and edema-forming effects of snake venoms. In: Lee C Y. (eds) Snake Venoms. Handbook of Experimental Pharmacology (Continuation of Handbuch der experimentellen Pharmakologie). **Springer-Verlag**, v. 52, p. 480-546, 1979.

OLIVEIRA, I. C. F. *et al.* Activity of silver nanoparticles on prokaryotic cells and *Bothrops jararacussu* snake venom. **Drug and Chemical Toxicology**, v. 42, n. 1, p. 60-64, 2019.

OLIVEIRA, J. S. *et al.* Local and hematological alterations induced by *Philodryas olfersii* snake venom in mice. **Toxicon**, v. 132, p. 9-17, 2017.

PEICHOTO, M. E. *et al.* Duvernoy's gland secretion of *Philodryas patagoniensis* from the northeast of Argentina: effects on blood coagulation. **Toxicon**, v. 45, n. 4, p. 527–534, 2005.

PEICHOTO, M. E. *et al.* Muscle and skin necrotizing and edema-forming activities of Duvernoy's gland secretion of the xenodontine colubrid snake *Philodryas patagoniensis* from the north-east of Argentina. **Toxicon**, v. 44, n. 6, p. 589- 596, 2004.

PORTO, M. F. FINAMORE, R. **Riscos, saúde e justiça ambiental: O protagonismo das populações atingidas na produção de conhecimento**. Ciência & Saúde Coletiva [online], Rio de Janeiro, v.17, n.6, p. 1493-1501, 2012. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1590/S1413-81232012000600013>. Acesso em: 02/12/2020.

PRADO-FRANCESCHI, J.; HYSLOP, S. South American colubrid envenomations. **Toxin Reviews**, v.21, n. 1-2, p.117-158, 2002.

PRADO-FRANCESCHI, J. *et al.* The effects of Duvernoy's gland secretion from the xenodontine colubrid *Philodryas olfersii* on striated muscle and the neuromuscular junction: partial characterization of a neuromuscular fraction. **Toxicon**, v. 34, n. 4, p. 459-466, 1996.

PRADO-FRANCESCHI, J. *et al.* Characterization of a myotoxin from the Duvernoy's gland secretion of the xenodontine colubrid *Philodryas olfersii* (green snake): effects on striated muscle and the neuromuscular junction. **Toxicon**, v. 36, n. 10, p. 1407-1421, 1998.

QUINTELA, F. M. *Liophis poecilogyrus sublineatus* (Serpentes: Dipsadidae) bite and symptoms of envenomation. **Herpetology Notes**, v. 3, p. 309-311, 2010.

RIBEIRO, L. A.; PUORTO, G.; JORGE, M. T. Bites by the colubrid snake *Philodryas olfersii*: a clinical and epidemiological study of 43 cases. **Toxicon**, v. 37, n. 6, p. 943 - 948, 1999.

RIBEIRO, L. A.; JORGE., M. T. Acidente por serpentes do gênero *Bothrops*: série de 3.139 casos. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 30, n. 6, p. 475-480, 1997.

RIBEIRO, L. A.; PUORTO, G.; JORGE, M. T. *Bites by the colubrid snake Philodryas olfersii*: a clinical and epidemiological study of 43 cases **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 27, n. 1, p. 87, 1994.

ROCHA, M. M. T.; FURTADO, M. F. D. Analysis of biological activities from *Philodryas olfersii* (Lichtenstein) and *P. patagoniensis* (Girard) venoms (Serpents, Colubridae). **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 24, n. 2, p. 410–418, 2007.

ROCHA, M. M. T; PAIXAO-CAVALCANTE, D.; FURTADO, M. F. D. Duvernoy's gland secretion of *Philodryas olfersii* and *Philodryas patagoniensis* (Colubridae):

neutralization of local and systemic effects by commercial bothropic antivenom (*Bothrops* genus). **Toxicon**, v. 47, n. 1, p. 95-103. 2006.

RODRÍGUEZ-ACOSTA, A. *et al.* Experimental ophitoxemia produced by the opisthoglyphous lora snake (*Philodryas olfersii*) venom. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 39, n. 2, p. 193-197, 2006.

ROSENFELD, G. Symptomatology, pathology, and treatment of snake bites in South America, p. 345-384. *In*: W. BUCHERL; E. E. BUCKLEY & V. DEULOFEU (Eds). *Venomous animals and their venoms*. New York, **Academic Press**, v. 2. p. 687. 1971.

SAHA, K. *et al.* Neutralization of *Naja kaouthia* venom induced toxicity and stress response by Vitex negundo-gold nanoparticle (VN-GNP) in experimental animal model. **Journal of Natural Toxins**, v. 2, n. 1, p. 1- 8, 2015.

SANCHEZ, E. F. *et al.* Biological activities of venoms from south american snakes. **Toxicon**, v. 30, n.1, p. 95-103,1992.

SHAH, A. S., SARODE, A. V.; BHIDE S. V. Experimental studies on mutagenic and carcinogenic effects of tobacco chewing, **Journal of Cancer Research and Clinical Oncology**, v. 109, p. 203-207, 1985.

SANTOS, C. A. *et al.* Silver nanoparticles: therapeutical uses, toxicity and safety issues. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 103, n. 7, p. 1931-1944, 2014.

SERAPICOS, E. de O.; MERUSSE, J. L. B. Morfologia e histoquímica das glândulas de Duvernoy e supralabial de seis espécies de colubrídeos opistóglifodontes (serpentes, Colubridae. **Papéis Avulsos de Zoologia (São Paulo)**, v. 46, n. 15, p. 187-195, 2006.

SHIEH, B-H; PEZZEMENTI, L.; SCHMIDT, J. Extracellular potassium and the regulation of acetylcholine receptor synthesis in embryonic chick muscle cells. **Brain Research**, v 263, n.2, p. 259-265, 1983.

SILVER, S.; PHUNG, L. E. T.; SILVER, G. Silver as biocides in burn and wound dressings and bacterial resistance to silver compounds. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 33, n. 7, p. 627-634, 2006.

SINITOX. Fundação Oswaldo Cruz. Instituto de comunicação e informação científica e tecnológica em saúde. Sistema Nacional de Informações Tóxico-Farmacológicas (Sinitox). **Casos registrados de intoxicação humana por agente tóxico e faixa etária [Internet]**. Rio de Janeiro: Sistema Nacional de Informações Tóxico-Farmacológicas; 2013 [citado 2018 out 18]. 2588 p. Disponível em <https://sinitox.iciict.fiocruz.br/dados-nacionais>). Acessado em 27/11/2020.

SINGH, N. P. *et al.* A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. **Experimental Cell Research**, v. 175, n. 1, p. 184-191, 1988.

SILVEIRA, P. V.; NISHIOKA, S. A. Non-venomous snake bite and snake bite without envenoming in a Brazilian teaching hospital. Analysis of 91 cases. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 34, n. 6, p. 499-503, 1992.

SOARES, K. S. R.; *et al.* Antivenom production against *Bothrops jararaca* and *Bothrops erythromelas* snake venoms used cross-linked chitosan nanoparticles as an immunoadjuvant. **Toxins (Basel)**, v. 10, n. 4, p.158, 2018.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE HERPETOLOGIA. Répteis do Brasil e suas unidades federativas: Lista de espécies. Disponível em: <http://public.sbherpetologia.org.br/assets/Documentos/2016/10/lista-de-repteis-2018-2.pdf>. Atualizada em 2018, acesso em 24/02/2021.

SOFUNI, T. Japanese guidelines for mutagenicity testing, **Environmental Molecular Mutagenesis**, v. 21, n. 1, p. 2-7, 1993.

TANJONI, I.; *et al.* Phylogenetic conservation of a snake venom metalloproteinase epitope recognized by monoclonal antibody that neutralizes hemorrhagic activity. **Toxicon**, v. 42, n. 7, p. 809-816, 2003.

TRIBUIANI, N. *et al.* Neutralising ability of *Terminalia fagifolia* extract (Combretaceae) against the *in vitro* neuromuscular effects of Bothrops jararacussu venom. **Natural Product Research**, v. 31, n. 23, p. 2783-2787, 2017.

UMBUZEIRO, A.; VARGAS, V. M. F. Teste de mutagenicidade com *Salmonella typhimurium* (teste de Ames) como indicador de mutagenicidade empotencial para mamíferos. *In*: Ribeiro L R, Salvadori D M F, Marques E K. **Mutagênese Ambiental**, Canoas: ULBRA, p. 81-112, 2003.

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

VEST, D. K. Some effects and properties of Duvernoy's gland secretion from *Hypsiglena torquata texana* (Texas night snake). **Toxicon**, v.26, n. 4, p. 417- 419, 1988.

VEST, D. K.; MACKESSY, S. P.; KARDONG, K V. The unique Duvernoy's secretion of the brown tree snake (*Boiga irregularis*). **Toxicon**, v. 29, n. 4/5, p. 532-535, 1991.

WEISS, M. B. Acidentes com Animais Peçonhentos / Marcelo Barros e Jorge Wilson Souza Paiva- 1 Ed.- Rio de Janeiro – RJ. p. 27. **Thieme Reventer Publicações LTDA**, 2017.

WILLIAMS, D. J. *et al.* Strategy for a globally coordinated response to a priority neglected tropical disease: snakebite envenoming. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 13, n. 2, p. e0007059, 2019.

ZARBIN, A. J. G. *et al.* Nickel nanoparticles obtained by a modified polyol process: synthesis, characterization, and magnetic properties. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 311, n. 2, p. 461-468, 2007.

WEINSTEIN, S. A. *et al.* Lethal potency and fractionation of Duvernoy's secretion from the brown tree snake, *Boiga irregularis*. **Toxicon**, v. 29, n. 4/5, p. 401-407, 1991.

WEINSTEIN, S. A.; KARDONG, K. V. Properties of Duvernoy's secretions from opisthoglyphous and aglyphous colubrid snakes. **Toxicon**, v. 32, n. 10, p. 1161- 1185, 1994.

## Anexo I

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

<b>Protocolo nº</b> 159/2019
<b>Interessado (a):</b> Yoko Osáima Franco
<b>Orientador (a):</b> o mesmo
<b>Título do Projeto:</b> Avaliação da toxicidade de nanopartículas de prata (AgNPs) e sua influência contra o bloqueio neuromuscular <i>in vitro</i> e mitotoxicidade do veneno da serpente <i>Philodryas ocellatus</i> (dipsadidae)
<b>Data de início e término da pesquisa:</b> 10/03/2019 a 10/02/2021

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

**APROVADO.**

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

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

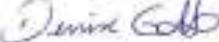
**REPROVADO**

Manifestação do Parecerista:

--

Nome: Denise Grotto

Coordenador da CEUA-Uniso

Assinatura: 

Data: 14/03/2019

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