DÉBORA ANTUNES NETO MORENO

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

RESUMO

A Organização Mundial da Saúde estima que a quantidade de pessoas picadas por serpentes pode atingir anualmente a cifra de milhões, justificando a busca de alternativas para minimizar a gravidade do acidente ofídico. Os objetivos deste projeto foram avaliar o potencial antimutagênico da betulina e vanilina (*Dipteryx alata* Vogel) comparativamente ao resveratrol e os efeitos da farinha do fruto do baru sobre o bloqueio neuromuscular e a miotoxicidade induzidos pelo veneno da *Lachesis muta muta.* A eficácia da farinha contra o veneno foi avaliada por eletroforese e dosagem de proteínas. O delineamento do estudo foi *in vitro* e *ex vivo* com uso de animais, aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais. A antimutagenicidade foi realizada através do ensaio *Salmonella*/microssoma em cepas TA97a, TA98, TA100 e TA102, com (+S9) e sem (-S9) ativação metabólica. Os ensaios *ex vivo* foram realizados em preparações nervo frênico-diafragma (NFD) de camundongos, através de técnica miográfica convencional, em modelos de pré incubação, pré veneno e pós veneno. As preparações resultantes do melhor desfecho farmacológico foram analisadas por microscopia de luz. Os resultados (média ± E.P.M.) foram analisados utilizando-se Anova-One way seguido de teste de Tukey e valores com $p<0,05$ considerados significativos. A eletroforese de proteínas foi realizada em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) e a dosagem de proteínas através do método de Bradford. O resveratrol inibiu fortemente todos os mutágenos nas condições testadas (-S9 e +S9). A vanilina inibiu moderadamente o mutágeno de TA97a (-S9) e fortemente em todas as cepas sob +S9. A betulina inibiu moderadamente o mutágeno de TA97a (-S9), fortemente TA100 e TA102 (-S9) e todas as cepas sob +S9. Os resultados obtidos foram todos dependentes da concentração. Em preparações NFD, selecionou-se a concentração de 1000 µg/mL de farinha de baru para os ensaios posteriores com o veneno (100 µg/mL, n=6). Os modelos pré e pós falharam na proteção contra o bloqueio induzido pelo veneno. O veneno inibiu 62,1% (n=6), enquanto a pré incubação inibiu apenas 30,6% da resposta contrátil (n=6). O veneno lesionou significativamente 35,3 ± 1,72% das fibras musculares em relação aos demais tratamentos, como a farinha 21,6 ± 1,71%, o controle Tyrode, 13,8 ± 3,56% e pré incubação 19,3 ± 1,98%. A eletroforese permitiu a visualização das bandas proteicas do veneno de *L. m. muta*, cuja intensidade diminuiu quando em mistura com a farinha de baru, confirmada pela quantificação de proteínas (de 6,84 µg ± 1,7 para 1,42 µg ± 0,003). Conclui-se que a *Dipteryx alata* é uma planta promissora cujos compostos devem ser explorados medicinalmente como pela propriedade antimutagênica demonstradas pela betulina e vanilina, além da farinha comestível do fruto do baru que atenuou os efeitos tóxicos do veneno de *L. m. muta*, por mecanismo a ser esclarecido.

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

ABSTRACT
The World Health Organization estimates that the number of people bitten by snakes could reach the number of millions annually, justifying the search for alternatives to minimize the severity of snakebites. The objectives of this project were to evaluate the antimutagenic potential of betulin and vanillin (*Dipteryx alata* Vogel) compared to resveratrol and the effects of baru flour on neuromuscular blockade and myotoxicity induced by *Lachesis muta muta* venom. The effectiveness of the flour against the poison was evaluated by electrophoresis and protein measurement. The study design was *in vitro* and *ex vivo* using animals, approved by the Ethics Committee on the Use of Animals. Antimutagenicity was performed using the *Salmonella*/microsome assay in strains TA97a, TA98, TA100 and TA102, with (+S9) and without (-S9) metabolic activation. The *ex vivo* assays were performed on mice phrenic nerve-diaphragm (PND) preparations, using a conventional myographic technique, in pre incubation, pre venom and post venom models. The preparations from the best pharmacological outcomes were analyzed by light microscopy. The results (mean ± S.E.M.) were analyzed by Anova-One way test followed by the Tukey test, and values with $p<0.05$ considered significant. Protein electrophoresis was performed in a polyacrylamide gel containing sodium dodecyl sulfate (SDS-PAGE), and the protein measurement by the Bradford method. Resveratrol strongly inhibited all mutagens under assayed conditions (-S9 and +S9). Vanillin moderately inhibited the TA97a mutagen (-S9) and strongly in all strains under +S9. Betulin moderately inhibited the TA97a (-S9) mutagen, strongly for TA100 and TA102 (-S9) and all strains under +S9. The obtained results were all concentration dependent. In PND preparations, the concentration of 1000 µg/mL baru flour was selected for furthering assays with the venom (100 µg/mL, n=6). The pre and post models failed against the blockade induced by the venom. The venom inhibited 62.1% (n=6), while the pre incubation inhibited only 30.6% of the contractile response (n=6). The venom significantly injured 35.3 ± 1.72% of muscle fibers in relation to other treatments, such as flour 21.6 ± 1.71%, Tyrode control, 13.8 ± 3.56% and pre-incubation 19.3 ± 1.98%. Electrophoresis allowed the visualization of protein bands from the venom of *L. m. muta*, whose intensity decreased when mixed with baru flour, confirmed by protein quantification (from 6.84 µg ± 1.7 to 1.42 µg ± 0.003). In conclusion *Dipteryx alata* is a promising plant whose compounds should be explored medicinally, such as the antimutagenic properties demonstrated by betulin and vanillin, in addition to the edible flour of the baru fruit, which attenuated the toxic effects of the *L. m. muta*, by a mechanism to be clarified.

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