



TATIANE SILVA DE ABREU

**Avaliação do potencial antígeno-tóxico e anticito-tóxico de
compostos fenólicos utilizando peçonhas de serpentes como
ferramentas indutoras de danos**

LAVRAS - MG

2017

TATIANE SILVA DE ABREU

**Potencial antigenotóxico e anticitotóxico de compostos
fenólicos utilizando peçonhas de serpentes como ferramentas
indutoras de danos**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agroquímica, área de concentração em Química e Bioquímica de Produtos Naturais e Sintéticos, para a obtenção do título de Mestre.

ORIENTADORA

Profa. Dra. SILVANA MARCUSSI

COORIENTADOR

Dr. ANDERSON ASSAID SIMÃO

LAVRAS – MG

2017

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

Abreu, Tatiane Silva de.

Potencial antigenotóxico e anticitotóxico decompostos
fenólicos utilizando peçonhas de serpentes como ferramentas
indutoras de danos / Tatiane Silva de Abreu. - 2017.

102 p. : il.

Orientador(a): Silvana Marcussi.

Coorientador(a): Anderson Assaid Simão.

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de
Lavras, 2017.

Bibliografia.

1. Inibidores Enzimáticos. 2. Ácidos Fenólicos. 3. Peçonhas de
Serpentes. I. Marcussi, Silvana . II. Simão, Anderson Assaid. III.
Título.

**Potencial antigenotóxico e anticitotóxico de compostos
fenólicos utilizando peçonhas de serpentes como ferramentas
indutoras de danos**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agroquímica, área de concentração em Química e Bioquímica de Produtos Naturais e Sintéticos, para a obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 10 de fevereiro de 2017.

Dra. Luciana Lopes Silva Pereira UFLA

Dra. Elaine Fontes Ferreira da Cunha UFLA

Dr. Norival Alves Santos Filho UNESP - Araraquara

Orientadora

Profa. Dra. SILVANA MARCUSSI

Coorientador

Dr. ANDERSON ASSAID SIMÃO

LAVRAS – MG

2017

A Deus, por fazer o impossível acontecer.

Ao meu pai Murilo Carneiro de Abreu Filho pelo incentivo, desde minha infância, para seguir os estudos até a Pós-Graduação.

À minha mãezinha Maria Eunice da Silva por me ensinar o poder da fé e do perdão, pelo amor e apoio incondicional em todas as minhas decisões, nas diferentes etapas da minha vida.

Aos meus irmãos Carol e Fabrício pela forma com que me impulsionam a buscar o sucesso profissional e por compartilharem dos sonhos, loucuras e lutas.

Aos meus tios, primos e afilhadinha Victória Manuella por terem orgulho do meu trabalho em uma das melhores universidades do país.

Aos meus colegas e ex-alunos, em especial a minha ex-chefe Stela Melo, da Faculdade Atenas de Paracatu, quanta saudade e gratidão.

Às minhas amigas Ana Paula Bernardes, Rívia Dornelas e Andréia Borges por mesmo distantes, me darem força.

Ao Luiz Paulo Fernandes de Barros pelo companheirismo, amor, apoio em todos os momentos e singular torcida e aos nossos filhotes Giovanna e Heitor.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Lavras, especialmente ao Departamento de Química, pela oportunidade e ao CNPq, pela concessão da bolsa de mestrado.

À professora Silvana Marcussi, pela orientação, paciência e disposição para ajudar. Grande profissional na qual me inspiro.

À professora Elaine Fontes Ferreira da Cunha pela generosidade em compartilhar suas experiências no acompanhamento das análises computacionais e à Luciana Lopes Silva Pereira por ajudar a desvendar os mistérios das enzimas.

Ao técnico do laboratório de Genética Molecular, Lamartine de Nóbrega Filho, DBI/UFLA, pela servidão e sorriso estampado no rosto.

Ao Anderson pelo auxílio nas correções.

Aos colegas do laboratório de bioquímica do DQI, pois se tornaram minha família lavrense.

Aos membros de nossa Confraria de Toxinologia em especial à Mariana, que dividiu a bancada, situações de estresse, cansaço e boas risadas.

Muito obrigada!

RESUMO

Os compostos fenólicos têm atividades farmacológicas que contemplam mecanismos de inibição ou indução da degradação de moléculas de DNA. Danos genotóxicos podem ocorrer naturalmente ou ser induzidos por peçonhas. Compostos naturais podem atuar como inibidores enzimáticos através de ligação a sítios hidrofóbicos presentes nas estruturas de algumas enzimas ou a sítios catalíticos, neutralização de espécies reativas ou supressão de sua geração, sequestro de íons que correspondem a cofatores enzimáticos, ou ainda competição pela água de solvatação de enzimas desencadeando a precipitação e inativação destas. Visando prospectar a ação protetora dos compostos fenólicos, ácido cafeico (AC), ácido gálico (AG), ácido sirínico (AS) e ácido vanílico (AV) sobre danos citogenéticos induzidos por enzimas, foram utilizadas como ferramentas indutoras de danos peçonhas de serpentes das espécies *Bothrops atrox*, *B. jararacussu* e *Lachesis muta muta*. O perfil eletroforético (SDS-PAGE) de incubados contendo peçonhas e compostos fenólicos sugere a presença de interações moleculares destes com toxinas presentes nas peçonhas. Eletroforeses em gel de agarose permitiram avaliar a fragmentação de DNA de leucócitos humanos induzida pelas peçonhas de serpentes assim como a ação antigênica exercida pelos ácidos fenólicos, quando previamente incubados com as peçonhas. O teste cometa realizado com leucócitos humanos mostrou que os compostos fenólicos avaliados, em altas doses, podem induzir fragmentação do DNA potencializando a ação genotóxica exercida pelas toxinas presentes nas peçonhas. No ensaio de inibição da succinato desidrogenase, o AC e AG potencializaram a inibição exercida pelo ácido malônico em algumas doses, enquanto que para o AS e AV não foram observadas diferenças significativas na potencialização ou reversão da inibição causada pelo inibidor (malonato) sobre a succinato desidrogenase. A caracterização parcial destes compostos, realizada no presente trabalho, complementa estudos prévios sobre estas moléculas que possuem alto potencial para futuras aplicações terapêuticas, sendo necessário ainda prospectar formulações e formas de administração seguras para consumo humano, uma vez que valores seguros de consumo diário por meio de alimentos, bebidas ou produtos nutracêuticos já foram previamente definidos pela ANVISA. As atividades avaliadas (citotoxicidade e genotoxicidade) no presente trabalho sugerem possíveis aplicações destes compostos, isoladamente ou de extratos vegetais que apresentem estas moléculas em sua composição, na complementação da soroterapia antiofídica tradicional ou em sua substituição, assim como na prevenção e tratamento de doenças inflamatórias, digestivas, neurodegenerativas e diversas outras que estejam associadas à ação de proteases, fosfolípases e oxidases em geral de grande valia no âmbito médico-científico.

Palavras-chave: Inibidores enzimáticos. Compostos naturais. Ácidos fenólicos. Peçonhas de serpentes. Succinato Desidrogenase.

ABSTRACT

Phenolic compounds have pharmacological activities that contemplate mechanisms of inhibition or inductions of DNA molecules degradation. Genotoxic damages can be induced by venom or occur naturally. Natural compounds can act as enzymatic inhibitors through a connection to hydrophobic sites present in the structures of some enzymes or to catalytic sites, neutralization of reactive species or suppression of their generation, sequestration of ions corresponding to enzymatic cofactors, or competition for solvation water of enzymes triggering the precipitation and inactivation of these enzymes. Aiming to investigate the protective action of phenolic compounds, caffeic acid (AC), gallic acid (GA), syringic acid (AS) and vanillic acid (AV) on enzyme induced cytogenetic damage were used as tools to induce venom *Bothrops atrox*, *B. jararacussu* and *Lachesis muta muta*. The electrophoretic profile (SDS-PAGE) of incubations containing venoms and phenolic compounds suggests the presence of molecular interactions of these, with toxins present in venoms. Agarose gel electrophoresis allowed to evaluate the human leukocyte DNA fragmentation induced by snake venoms as well as the antigenotoxic action of phenolic acids when previously incubated with venoms. The comet test performed with human leukocytes showed that the phenolic compounds evaluated, in high doses, can induce DNA fragmentation as well as potentiate the genotoxic action exerted by the toxins present in the venoms. In the Krebs cycle succinate dehydrogenase inhibition assay, CA and GA acted to potentiate inhibition the action of malic acid in some at doses, whereas for AS and AV, there were no significant differences in potentiation or reversal of inhibition caused by the inhibitor (malonate) on a succinate dehydrogenase. The partial characterization of these compounds, carried out in the present work, complements previous studies on these molecules that have high potential for future therapeutic applications, and it is also necessary to prospect formulations and safe administration forms for human consumption, since safe daily consumption values have already been previously defined by ANVISA. The activities evaluated in the present study suggest possible applications of these compounds alone, or plant extracts that present these molecules in their composition, in the complementation of traditional antiophidic serum therapy or in its substitution, as well as in the prevention and treatment of inflammatory, digestive, neurodegenerative and several others that are associated to the action of proteases, phospholipases and oxidases in general of great value in the medical-scientific scope.

Keywords: Enzyme inhibitors. Natural compounds. Phenolic acid. Snake venoms. Succinate Dehydrogenase

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Rota metabólica de biossíntese dos compostos fenólicos	18
Figura 2 Estrutura química dos ácidos fenólicos (C6-C1) e hidroxicinâmicos (C6-C3).19	
Figura 3 Estrutura de Antioxidantes Sintéticos	21
Figura 4 Mecanismo de ação da L- aminoácido oxidase na conversão de L-aminoácido em α -cetoácido.....	22
Figura 5 Representação dos resíduos 27-33 e resíduo 49, que compreendem a alça de ligação do cálcio das PLA ₂ s Asp49 de <i>Naja naja atra</i>	29
Figura 6 Ciclo de Krebs.....	30
Figura 7 Estrutura laranja: SDH humana e Estrutura verde: SDH de ave.....	31

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Ação dos checkpoints na divisão celular.....	15
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS

AC	Ácido Cafeico
AG	Ácido Gálico
AMP	Adenosina monofosfato
AS	Ácido Siríngico
ATP	Adenosina trifosfato
AV	Ácido Vanílico
DNAse	Desoxirribonuclease
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
ERO	Espécies Reativas de Oxigênio
FAD ⁺	Flavina adenina dinucleotídeo oxidada
FADH ₂	Flavina adenina dinucleotídeo reduzida
LAAO	L-Aminoácido oxidase
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i> – salina tamponada em fosfato
PLA ₂	Fosfolipase A ₂
<i>SDS-PAGE</i>	<i>Sodium dodecyl sulfate – Polyacrilamide gel electrophoresis</i> (Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de dodecil sulfato de sódio)
SDH	Succinato Desidrogenase

SUMÁRIO

PRIMEIRA PARTE	11
1 INTRODUÇÃO	12
2 REFERENCIAL TEÓRICO	17
2.1 Compostos fenólicos	17
2.2 Potencial antioxidante dos ácidos fenólicos	19
2.3 Ação de toxinas de peçonhas de serpentes sobre o material genético de células animais	22
2.4 Compostos fenólicos: ação antigênóxica	27
2.5 Succinato Desidrogenase (SDH).....	30
2.6 Farmacocinética de compostos fenólicos e nutrição epigenética	31
REFERÊNCIAS	34
ANEXO	43
Parecer do Comitê de Ética para Pesquisa com Seres Humanos	43
SEGUNDA PARTE	44
ARTIGO 1.....	45
CAFFEIC AND SYRINGIC ACIDS: PROSPECTION OF PROTECTIVE EFFECT ON DNA FROM HUMAN LEUKOCYTES	45
ARTIGO 2.....	73
GALLIC ACID AND VANILIC ACID: SPECIFIC INTERACTIONS WITH CYTOGENOTOXIC MOLECULES.....	7

PRIMEIRA PARTE

Introdução Geral

1 INTRODUÇÃO

Os compostos fenólicos são moléculas geradas pelo metabolismo secundário das plantas derivados do chiquimato/fenilpropanoide ou da via da Acetil-CoA. Estes compostos desempenham papéis importantes na planta como defesa contra parasitas, proteção contra desidratação, entre outras. Estes compostos fenólicos podem ser naturais ou sintéticos e semi-sintéticos quando produzidos pela indústria química e farmacêutica através de melhoramentos moleculares com vistas a elaboração de novos medicamentos (SIMÕES et al., 2004).

A dose máxima de compostos fenólicos sugerida para seres humanos é de aproximadamente 1 g/dia (SCALBERT; JOHNSON; SALTMARSH, 2005). Existe um banco de dados denominado Phenol Explorer 2.0 que contém um grande volume de dados atualizados que integra o metabolismo de polifenóis e a farmacocinética destes em humanos e animais experimentais bem como a concentração de compostos fenólicos nos alimentos (ROTHWELL et al, 2013).

Entre as propriedades farmacológicas dos compostos fenólicos destacam-se o potencial antioxidante, antitumoral (ANANTHARAJU et al., 2016), ação citoprotetora (LEWANDOWSKA et al., 2016), antibacteriana, antiviral, antiprotozoária, imunorreguladora, hepatoprotetora, anti-inflamatória, hipocolesterolêmica e analgésica (SIMÕES et al., 2004). Os compostos fenólicos apresentam a capacidade de modular a sinalização celular e podem ser moduladores epigenéticos interferindo desta forma no desenvolvimento de doenças relacionadas com a expressão gênica (BUSCH et al., 2015), fatores que justificam a escolha dos ácidos fenólicos cafeico, gálico, siríngico e vanílico usados no presente trabalho.

Em meio a tantas aplicações, os ácidos fenólicos presentes em diversas espécies vegetais também podem ter propriedades antiofídicas. Em vista disto, estudos sobre o potencial biotecnológico de inibidores de enzimas que compõem as peçonhas de serpentes podem proporcionar indicações de modelos moleculares com atividade antiofídica para suplementar a terapia convencional ou para o desenvolvimento de novas terapias. Além disso, os inibidores enzimáticos, isolados de plantas medicinais, configuram um recurso de grande importância para comunidades localizadas em regiões distantes dos centros de saúde. Neste sentido, os compostos naturais são candidatos ao uso para tratamento de patologias relacionadas a processos inflamatórios, imunológicos e relacionados a alterações na hemostasia, cujas fosfolipases A₂ e proteases apresentam-se atuantes (CARVALHO et al., 2013).

Inúmeros estudos apontam a indução de genotoxicidade e citotoxicidade pelas enzimas de peçonhas de serpentes, capazes de degradar material genético em diferentes graus considerando as diversas classes de enzimas que as compõem e a porcentagem em que elas se encontram na peçonha de cada família/gênero/espécie/indivíduo (ANJOS et al., 2008; ARUN et al., 2014; CHIPPAUX, 2015; DHANANJAYA et al., 2009; DHANANJAYA; GOWDA; D'SOUZA, 2010; GIMENEZ et al., 2014; MARCUSSI et al., 2011; MARCUSSI et al., 2012; MARCUSSI et al., 2013; NASCIMENTO; COLLARES-BUZATO; HYSLOP, 2008; PEREIRA et al., 2012; VALADAO SALES; SANTORO, 2008). Há um vasto nicho científico a ser explorado considerando que os mecanismos oxidativos, descritos até então para esclarecer a ação de toxinas sobre o material genético, não contemplam a totalidade dos efeitos induzidos pelas diversas classes de toxinas, sendo necessária a elucidação das demais vias indutoras de genotoxicidade-mutagenicidade-apoptose ainda pouco exploradas.

Compostos fenólicos são antioxidantes por abstrair o elétron da espécie reativa de oxigênio (ERO), gerada durante a atividade catalítica de enzimas como a catalase, formando assim, um híbrido com estruturas de ressonância estável (SESTILI et al., 2002). A ação antioxidante deste composto pode ser um dos mecanismos propostos para o efeito protetor sobre moléculas de DNA. Por outro lado, há mecanismos que podem ser aplicados para esclarecer a atividade pró-oxidativa de alguns ácidos fenólicos, ao mobilizar o cobre endógeno (redução do Cu celular para Cu I), possivelmente ligado à cromatina, e a consequente produção de ERO levando à ruptura de DNA internucleosomal (um marcador de apoptose) (BHAT; AZMI; HADI, 2007; KAGAWA et al, 1994;).

Por isso, os ácidos fenólicos podem atuar no metabolismo pró-oxidativo, interagir com a microbiota intestinal e ligar-se a várias proteínas de sinalização celular, sendo capazes de ajustar mecanismos anticarcinogênicos e citoprotetores presentes nas células, protegendo-as contra danos ao DNA e surgimento de tumores (LEWANDOWSKA, 2016).

A importância da identificação de danos no DNA está em prevenir futuras consequências como mutagênese e geração de câncer, sendo de grande valia para a clínica e para o ambiente ocupacional de pessoas expostas a riscos físicos, químicos ou biológicos (LIN, 2016). Ao conhecer os mecanismos pelos quais se iniciam, propagam e encerram estes danos, *in vitro*, é possível estimar os danos causados *in vivo* e assim avaliar

o potencial carcinogênico/citotóxico/genotóxico dos compostos em estudo, assim como avaliar a ação preventiva/protetora de seus inibidores.

Alguns danos nas moléculas de DNA são resultantes de alterações estruturais que ocorrem ao nível das bases púricas e pirimídicas, como reações de desaminação transformando adenina em guanina e citosina em uracila; depurinação de desoxirribonucleotídeos; condensação por radiação ultravioleta; metilação de bases nitrogenadas; ou ainda, mutação gênica resultante de lesão oxidativa dos açúcares (ribose ou desoxirribose) (NELSON; COX, 2002). Além disso, também podem ocorrer falhas durante a replicação do DNA, no superespiralamento quando a ação das topoisomerases é inadequada ou ainda na ação das quinases que controlam diversos processos do metabolismo (LIN, 2016).

Os testes para identificação de danos no DNA representam genotoxicidade, mas também são indicativos de possível citotoxicidade, apoptose e mutagenicidade. Estes ensaios são amplamente difundidos na área de ecotoxicologia, na medicina oncológica e citogenética. É possível avaliar a degradação de DNA mediante exposição ocupacional inerente a algumas profissões ou comunidades, avaliar danos causados por fármacos, drogas ilícitas, defensivos agrícolas, inseticidas, assim como a carcinogênese de células tumorais. O mecanismo pelo qual estes danos ocorrem pode estar estreitamente relacionado com a cascata das caspases, apoptose, anoikis e ação de proteases (BRENES et al., 2010; COUNIS; TORRIGLIA, 2006).

Para compreender estes fenômenos é importante lembrar que o ciclo celular eucariótico envolve as fases M (Mitose), G₁ (*Gap*1, Intervalo), S (Síntese) e G₂ (*Gap* 2, Intervalo) (Tabela 1). G₀, específica de algumas células, é a fase quiescente onde nunca há divisão celular. No decorrer do ciclo celular há uma série de *check points* que monitoram o processo e a vitalidade da célula, interrompendo a manutenção celular através da apoptose quando as condições adequadas de replicação e espiralamento do material genético não são atendidas. Modelos computacionais de drogas têm sido propostos para que um único fármaco tenha múltiplas regiões ligantes capazes de inibir diferentes fases do ciclo celular atuando sobre biomoléculas tais como topoisomerases, proteínas quinases e histona desacetilases, podendo, por exemplo, exercer função inibitória sobre o ciclo de células tumorais (LIN, 2016).

Tabela 1. Ação dos checkpoints na divisão celular.

Fase da divisão celular	Ação dos <i>checkpoints</i>
Mitose	Impedir a Mitose até que todos os cromossomos estejam ligados apropriadamente ao fuso mitótico
Gap 1	Parar a divisão celular caso o DNA esteja danificado
Síntese	Parar a divisão celular caso o DNA esteja danificado
Gap 2	Impedir o início da Mitose até que o DNA esteja todo replicado

Fonte: Adaptado (VOET; VOET; PRATT, 2008).

Com o objetivo de induzir a degradação de moléculas de DNA, as peçonhas têm um papel importante, como ferramentas laboratoriais, considerando a presença, em sua composição, de inúmeros peptídeos e proteínas com ação na digestão, na defesa e na imobilização das vítimas (NUNEZ et al., 2004). Entre os componentes proteicos das peçonhas de serpentes, destacam-se as metaloproteases, fosfolipases A₂, serinoproteases, L-aminoácido oxidases (LAAOs) e hialuronidases (CALDERÓN et al., 1993; CHIPPAUX; GOYFFON, 1998). Algumas das classes de enzimas mencionadas possuem efeito danoso sobre o material genético, como por exemplo, proteases (degradam proteínas que compõem o arcabouço proteico associado à síntese DNA ou à cromatina) e L-aminoácido oxidases (cuja ação enzimática resulta na produção de peróxido de hidrogênio com ação oxidante e conseqüentemente degenerativa sobre moléculas de DNA) (DE ROODT; LITWIN; ANGEL, 2003; MARCUSSI et al., 2013). Além disso, há relatos científicos da presença, nas peçonhas, de enzimas especializadas na degradação de ácidos nucleicos dentre elas as desoxirribonucleases (DNAse II) que hidrolisam moléculas de DNA, com efeito citotóxico e/ou apoptótico no organismo das vítimas (DHANANJAYA; D'SOUZA, 2010; NASCIMENTO; COLLARES-BUZATO; HYSLOP, 2008; VALADAO SALES; SANTORO, 2008).

Várias moléculas presentes nas peçonhas atuam no organismo das vítimas alterando a homeostasia, principalmente a cascata de coagulação e a agregação de plaquetas, e induzindo efeitos neurotóxicos, miotóxicos, cardiotóxicos, entre outros (World Health Organization, 2010). Entretanto, a ciência tem feito uso de toxinas como ferramentas para o desenvolvimento de novas terapias e métodos de diagnóstico. Sob esta perspectiva, o presente trabalho vai ao encontro deste propósito ao utilizar as peçonhas

de três espécies de serpentes para a indução de danos em moléculas de DNA e nucleoides obtidos de leucócitos sanguíneos humanos. As peçonhas, ferramentas indutoras de danos e toxicidade, serão avaliadas frente a inibidores naturais (os compostos fenólicos, ácido cafeico, gálico, siríngico e vanílico) com vistas a caracterizar o potencial de uso destes fenólicos como futuros agentes terapêuticos, preventivos-protetivos-curadores, não apenas com função antiofídica, mas também com função em doenças inflamatórias, digestivas, neurodegenerativas e diversas outras que estejam associadas à ação de proteases, fosfolipases outras classes de enzimas presentes nas peçonhas e altamente homólogas em estrutura e/ou função a enzimas humanas. CARVALHO et al, 2013).

Assim, os objetivos consistem em avaliar o possível efeito genotóxico dos ácidos fenólicos cafeico, gálico, siríngico e vanílico bem como a influência destes na degradação de DNA humano por peçonhas de serpentes das espécies *Bothrops atrox*, *B. jararacussu* e *Lachesis muta muta*. Adicionalmente, foi avaliada a ação destes fenólicos sobre a enzima succinato desidrogenase e sobre o inibidor desta, o ácido malônico. Tais análises irão colaborar para o entendimento de mecanismos de indução de danos em moléculas de DNA por diferentes classes de toxinas presentes nas peçonhas.

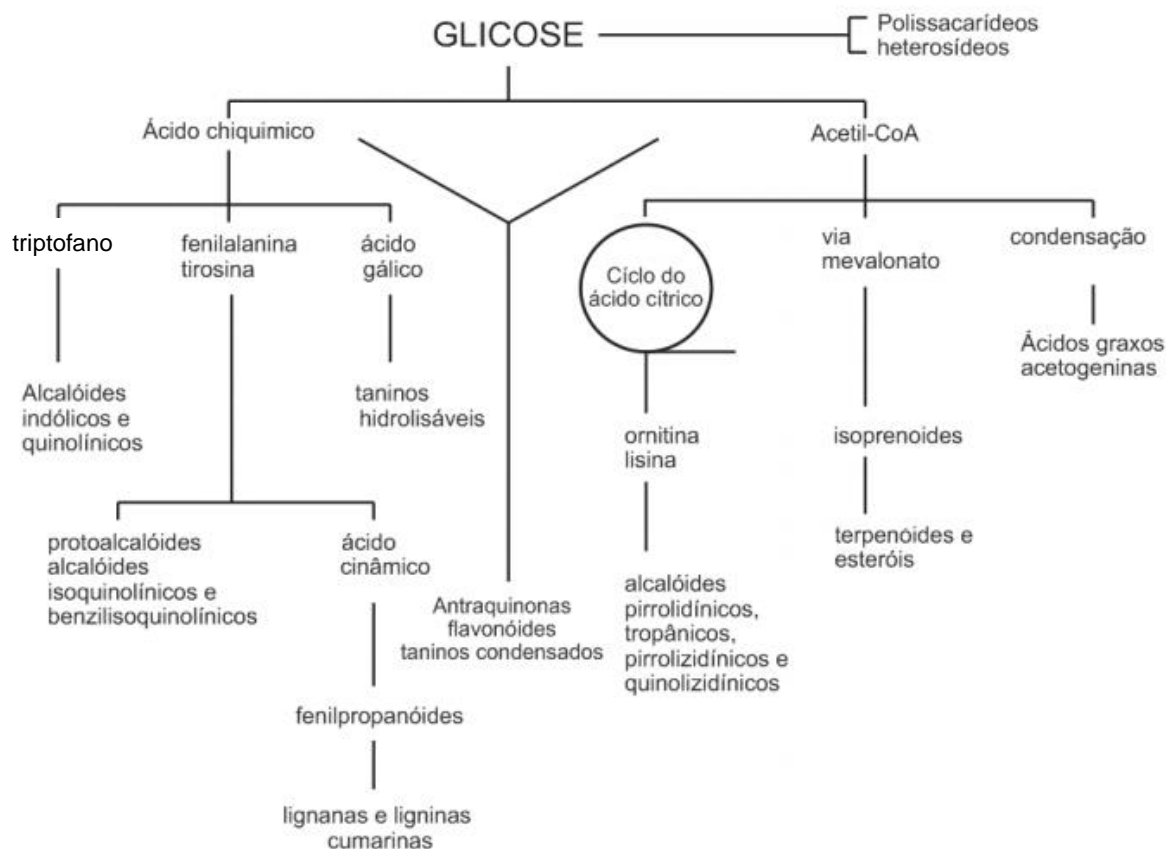
2 Referencial teórico

2.1 Compostos fenólicos

Os compostos fenólicos representam parte das substâncias do metabolismo secundário dos vegetais que apesar de não serem essenciais para o desenvolvimento do vegetal, são imprescindíveis para a sobrevivência de uma espécie dentro de um ecossistema, viabilizando a adaptação do indivíduo no ambiente, respondendo pelas relações e interações entre planta e ambiente desempenhando ações como defesa da planta contra herbivoria, ataque de patógenos, radiação solar, ou ainda atuando na competição entre plantas e atração de organismos benéficos como polinizadores, dispersores de sementes e microorganismos simbiotes e também em alelopatias (BALASUNDRAM; SUNDRAM; SAMMAN, 2006).

Em sua biossíntese, alguns compostos fenólicos são derivados do ácido chiquímico a partir da eritrose-4-fosfato e fosfoenolpiruvato que é convertido em corismato ou galato. Outra via metabólica que também leva à formação de compostos fenólicos é a rota do ácido mevalônico no qual ocorre a condensação de uma unidade de acetil-CoA com uma de acetoacetil-CoA e desta forma, este ácido é convertido em isopreno, unidade básica dos terpenos e esteroides (Figura 1) (SIMÕES et al., 2004).

Figura 1 Rota metabólica de biossíntese dos compostos fenólicos



Fonte: Simões et al. (2004)

Até o ano de 2015 cerca de 8.000 compostos fenólicos foram identificados em uma variedade de frutas, hortaliças, leguminosas, grãos, ervas e especiarias. Além de sua atividade de regulação hormonal, compostos fenólicos também possuem atividade antioxidante, anti-inflamatória, anticarcinogênica e atuam no organismo humano de forma benéfica como hepatoprotetor (PAN; LAI; HO, 2010).

Alguns vegetais apresentam propriedades anticarcinogênicas, devido à reversão de eventos epigenéticos. Além disso, compostos fenólicos naturais dietéticos têm um grande potencial, por meio de fitoestrógenos (por exemplo, isoflavonas, estilbenos, lignanas e coumestanos), para interromper terapêuticamente vias de sinalização endócrinas. Evidências recentes também demonstraram que os compostos fenólicos naturais, apigenina, luteolina, resveratrol e pterostilbeno, podem inibir diretamente PI3K (enzima fosfatidilinositol-3-cinase), p90 RSK (cinase S6 ribossomal p90), a atividade de telomerase e reduzindo a viabilidade das células do câncer de mama. Com base no exposto as descobertas destacam-se pelos efeitos preventivos exercidos por compostos

fenólicos naturais, sendo estes potentes antioxidantes e anti-inflamatórios. Entretanto, em estudos descritos recentemente, compostos fenólicos também atuam como disruptores autócrino-parácrinos, estando, portanto ligados à supressão de epigenética de tumorigênese relacionado ao câncer de mama e à metástase. Em resumo, os dados analisados nesta revisão sugerem que os compostos fenólicos naturais dietéticos são candidatos promissores para as estratégias quimiopreventivas e tratamento do câncer de mama (PAN et al., 2015).

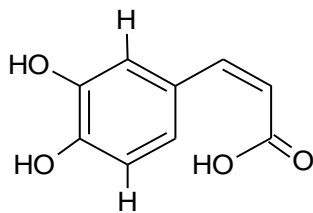
Mecanismos de inibição de efeitos tóxicos causados por peçonhas, resultantes de interações específicas entre compostos vegetais, principalmente ácidos fenólicos, e diferentes classes de enzimas que compõem as peçonhas, também têm sido descritos (CARVALHO et al., 2013), enfatizando a relevância deste estudo para futuras aplicações destes compostos de forma mais eficiente e segura.

2.2 Potencial antioxidante dos ácidos fenólicos

Devido as propriedades físico-químicas (Encontrados na forma combinada (ésteres ou heterosídeos, hidrofílicos ou anfipáticos, formam ligações de Hidrogênio/ Van der Waals (proteínas/DNA), antioxidante, pró-oxidante: Complexam com íons metálicos – Fe e Cu (sistemas biológicos), ação epigenética por inibir HAT e HDAC) os compostos fenólicos simples podem ser considerados inibidores enzimáticos das peçonhas de serpentes que induzem citotoxicidade e genotoxicidade. Os compostos fenólicos em estudo no presente trabalho são representados pelas fórmulas estruturais a seguir (Figura 2 e 3) (BHAT; AZMI; HADI, 2007, OMENE et al, 2013; RAMAWAT; MÉRIOLLON, 2013; SIMÕES, et al, 2004).

Figura 2 Estrutura química dos ácidos fenólicos (C6-C1) e hidroxicinâmicos (C6-C3)



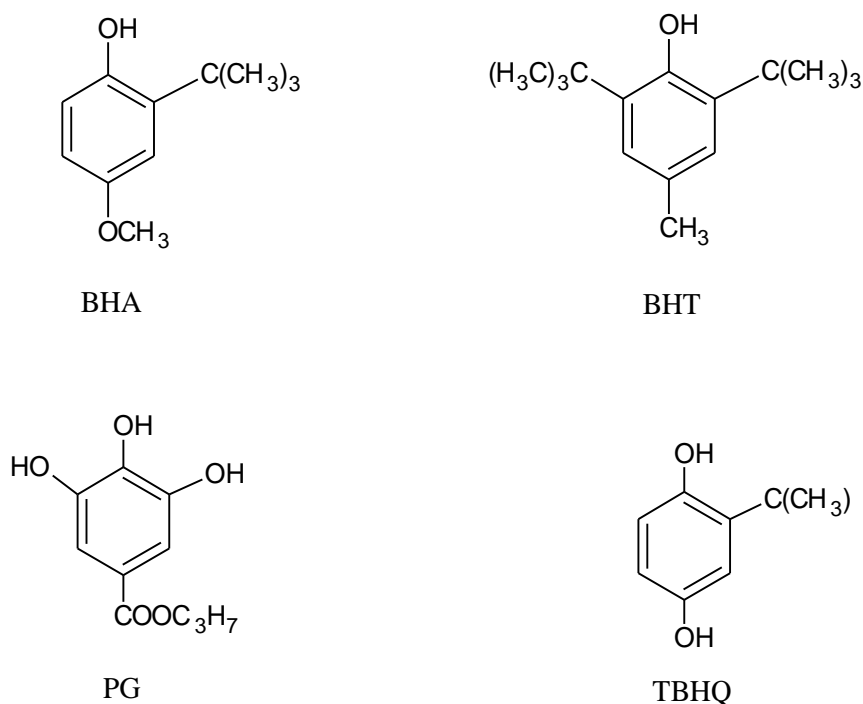


Ácido Cafeico

Fonte: Ramalho e Jorge (2006)

Os ácidos vanílico (ácido 4-hidroxi-3-metoxibenzoico) e siríngico (ácido 4-hidroxi-3,5-dimetoxibenzoico) são obtidos após hidrólise ácida das folhas de gimnospermas e angiospermas enquanto que o ácido gálico (3,4,5-trihidróxibenzoico) é constituinte de taninos hidrolisáveis, do qual são liberados por hidrólise ácida. O ácido cafeico (3-(3,4-dihidroxifenil) prop-2-enoico) é encontrado em vários tecidos vegetais e por possuir uma dupla ligação apresenta as formas isoméricas Z e E sendo esta última a mais estável (SIMÕES, 2004).

A semelhança estrutural entre compostos fenólicos (Figuras 2 e 3) e os antioxidantes sintéticos (Figura 4) contribuem para o relacionamento de sua atividade protetora contra o estresse oxidativo induzido sobre moléculas de DNA, organelas e membranas celulares ao capturar elétrons livres e estabilizando a estrutura por ressonância.

Figura 3 Estrutura de Antioxidantes Sintéticos

BHA: butilhidroxianisol, BHT: butilhidroxitolueno, PG: propil galato, TBHQ: terc-butil hidroquinona.

Fonte: Ramalho e Jorge (2006)

Ações inibidoras específicas de compostos amplamente distribuídos na natureza, sobre PLA₂s, proteases, LAAOs, dentre outras classes de enzimas presente na peçonha de serpentes, apontam para diversas perspectivas de aplicação destes compostos, como por exemplo, na suplementação da soroterapia tradicional ou em substituição a ela nos casos em que esta não for acessível; na terapia de diversas doenças humanas relacionadas a processos inflamatórios considerando a ação sobre fosfolipases; na terapia de diversas doenças humanas relacionadas à ação de proteases, como disfunções gastrointestinais, processos de descontrole nos mecanismos de apoptose e proliferação celular; na prevenção de doenças por meio de ação protetora sobre moléculas, organelas e células contra a ação oxidante de radicais livres e enzimas; dentre outras diversas aplicações que podem atender demandas de aplicação farmacêutica e cosmética (CARVALHO et al, 2013).

2.3 Ação de toxinas de peçonhas de serpentes sobre o material genético de células animais

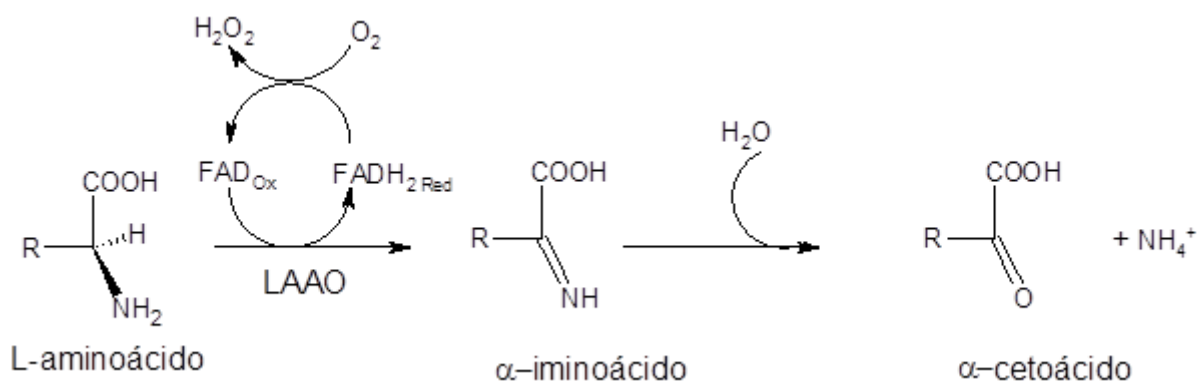
As toxinas de peçonhas de serpentes como por exemplo as dos gêneros *Bothrops* e *Lachesis* desencadeiam danos de relevância socioeconômica, pois a gravidade dos acidentes pode levar tanto à morbidade quanto à mortalidade. O quadro clínico apresenta principalmente, miotoxicidade, neurotoxicidade, hepatotoxicidade, citotoxicidade, hemorragia e necrose (IZIDORO et al, 2014; KINI, 2005). No entanto, a maioria das classes menores de proteína de veneno de cobra permanecem mal exploradas, mesmo apresentando potencial aplicação em diversas áreas

Um exemplo seria culturas de células MDCK (células normais derivadas de rim canino) incubadas com DNase da peçonha de *B. alternatus* para análise de citotoxicidade e morte celular programada. Os autores observaram ambos os efeitos sendo estes atribuídos à degradação de moléculas de DNA (NASCIMENTO; COLLARES-BUZATO; HYSLOP, 2008). Os principais tipos de danos diretos ou indiretos ao DNA podem ser induzidos por diferentes classes de moléculas presentes na peçonha de serpente: LAAO, PLA₂, proteases, DNases e nucleotidasas, hialuronidasas e peptídeos.

a) LAAOs

LAAO (LAAOs, E.C.1.4.3.2) são flavoenzimas enantioespecíficas que catalisam estereoespecificamente a desaminação oxidativa de uma vasta gama de L-aminoácidos formando ácidos α -ceto, amônia e peróxido de hidrogênio (Figura 7) (GUO et al., 2012).

Figura 4 Mecanismo de ação da L- aminoácido oxidase na conversão de L-aminoácido em α -cetoácido



Fonte: Izidoro et al. (2014)

Diversos trabalhos relatam o potencial antineoplásico das LAAO em algumas linhagens de células tumorais. O mecanismo de produção de peróxido de hidrogênio (IZIDORO et al., 2014) exercido pela LAAO da peçonha de *B. atrox* (ALVES et al., 2008) em linhagens de células PC12 (feocromocitoma de rato), B16F10 (melanoma metastático de murino), HL-60 (leucemia promielocítica humana) e Jurkat (leucemia linfoblástica humana) resultou em citotoxicidade nas concentrações de 5–50µg/mL após incubação por período de 4 horas. Bregge-Silva et al. (2012) também observaram ação citotóxica induzida por LAAO de *L. muta*, quando avaliada nas concentrações entre 1,17 e 75µg/mL com período de incubação de 24 horas, sobre as linhagens LL-24 (fibroblasto de pulmão), AGS (adenocarcinoma gástrico), MCF-7 (adenocarcinoma de mama) e HUTU (carcinoma duodenal).

Os danos causados ou induzidos por LAAO se dão provavelmente pela formação de peróxidos, principalmente a partir da oxidação de metionina ou leucina e de outros substratos que geram espécies reativas de oxigênio (ERO) que se propagam ocasionando apoptose e citotoxicidade. A apoptose é induzida pela condensação da cromatina, ativação da caspase-9 e em seguida caspase-3, a qual cliva diversos substratos, resultando em fragmentação do DNA cromossômico. A ação pode ocorrer ainda pela ativação da caspase-8 (ALVES et al., 2008; CISCOTTO et al., 2009; GUO et al., 2012; IZIDORO et al., 2014; NAUMANN et al., 2011). As LAAOs têm afinidade específica por aminoácidos hidrofóbicos como fenilalanina, leucina, isoleucina e o aminoácido sulfurado metionina, pois estes podem se inserir no interior de cavidades hidrofóbicas presentes nos sítios catalíticos das enzimas (GUO et al., 2012). A LAAO apresenta alguns mecanismos genotóxicos que podem ser atribuídos parcialmente à ação do peróxido de hidrogênio formado ou pela catalase pois, na ausência do peróxido de hidrogênio há genotoxicidade, ou seja, sugere-se que há outros sítios catalíticos responsáveis pela genotoxicidade (IZIDORO et al., 2014).

LAAOs causam apoptose ao degradar a cromatina, fragmentar o DNA e ativar a via das caspases. A LAAO da peçonha de *B. atrox* causa morte celular em células Jurkat, LAAO de *B. pirajai* induz citotoxicidade em células tumorais das linhagens S180 (sarcoma ou tumor de Crocker), SKBR-3 (câncer de mama humano), Jurkat e EAT (tumor ascítico de Erlich) e LAAO de *Agkistrodon contortix laticinctus* causa fragmentação em DNA de células HL-60 (ALVES et al., 2008). LAAO de *B. leucurus* apresentou atividade citotóxica dose-dependente sobre células humanas das linhagens MKN (carcinoma

gástrico) e RKO (carcinoma de cólon retal) em ensaios com incubação por período de 24 horas (NAUMANN et al., 2011).

b) PLA₂

As PLA₂s representam uma família de proteínas, encontradas em diversos tecidos de mamíferos, abelhas, peçonha de serpentes e outros animais, capazes de hidrolisar os glicerofosfolipídeos de membrana celular, liberando ácido araquidônico, substrato para biossíntese de mediadores envolvidos na inflamação, tais como prostaglandinas, prostaciclina, tromboxanos e leucotrienos. Desta forma, ao hidrolisar a membrana, há um desarranjo que facilita o acesso ao DNA cromossômico desencadeando danos ao mesmo. Muitos desses lipídios bioativos atuam desencadeando processos inflamatórios, além de interferir na cascata de coagulação sanguínea. A inflamação crônica causada por infecções, doenças autoimunes, exposição a agentes nocivos, também pode causar danos ao DNA por gerar espécies reativas de oxigênio que aumentam o dano oxidativo e reduzem a eficiência de reparo levando ao desenvolvimento de doenças (NAKAD; SCHUMACHER, 2016).

As fosfolipases A₂ (PLA₂), quebram glicerofosfolipídeos, causando um desarranjo dos componentes de membranas celulares e de organelas, facilitando o acesso ao DNA nuclear. (BONFIM et al., 2009; DUTTA; GOGOI; MUKHERJEE, 2015; MARCUSSI et al., 2007).

A ação neurotóxica das PLA₂ é dependente de um sítio hidrofílico da enzima que se liga primeiramente a um sítio pré-sináptico específico e em seguida degradam a membrana do neurotransmissor envolvido na sinapse (KINI et al., 2005). Entre as PLA₂s citotóxicas mais estudadas está a Nigexina de *Naja nigricollis*, ao contrário de sua atividade catalítica dependente de íon bivalente, a atividade citotóxica é independente destes íons assim como da atividade catalítica. Em ensaios com incubação de células amnióticas epiteliais com 10⁻⁷ mol.L⁻¹ de Nigexina, houve redução de 70% da proliferação celular e com 10⁻⁶ mol.L⁻¹ a proliferação foi totalmente inibida (CHWETZOFF et al., 1989).

PLA₂s neurotóxicas, interferem em canais iônicos e conseqüentemente no transporte de íons que podem ser cofatores para atividade de enzimas, metabólitos para a manutenção celular, comunicação entre as células vizinhas, movimentação de líquido, logo, afetam o metabolismo interno da célula sem induzir sua morte de forma direta (MARCUSI et al, 2007).

c) Metaloproteases

As metaloproteases são proteases, com atividade catalítica dependente de íons metálicos, que podem conter diferentes domínios que permitem sua classificação: apresentam apenas o domínio metaloprotease (classe P-Ia); metaloprotease + desintegrina (P-IIa), (P-IIb), (P-IIc), (P-IIId), (P-IIe); metaloprotease + desintegrina + domínio rico em cisteína (P-IIIa), (P-IIIb), (P-IIIc) e metaloprotease + desintegrina + domínio rico em cisteína + domínio lectina símile (P-IIId) (FOX; SERRANO, 2008). Pesquisas sugerem sua importância no destacamento celular induzindo a apoptose em células endoteliais e apontam ainda que a ação catalítica é apenas parcialmente responsável pelos efeitos biológicos induzidos por estas enzimas em organismos animais, como apoptose por exemplo. (FOX; SERRANO, 2008; MATSUI; FUFIMURA; TITANI, 2000).

A membrana basal dos vasos constitui uma estrutura complexa de matriz extracelular, composta principalmente por colágeno IV, laminina e proteoglicano, que fornece suporte a células e desempenha vários papéis na comunicação entre ambientes intracelulares e extracelulares. As metaloproteases são capazes de degradar componentes proteicos da membrana basal (GUTIÉRREZ; RUCAVADO, 2000; KALLURI, 2003) podendo desta forma deixar o DNA mais exposto, danificando-o.

Estudos relatam a ação de proteases zinco dependentes, complexando-se com metais e desencadeando morte celular em células em cultura. Incubações de células epiteliais da linhagem Ea.hy.926 com BaP1 isolada da peçonha de *B. asper*, resultaram em apoptose induzida por meio da ruptura da membrana plasmática, condensação da cromatina e ativação da caspase-8 podendo resultar em alguns casos, em fragmentação do DNA (BRENES et al., 2010; DIAZ et al., 2005; GABRIEL et al., 2012). Esta mesma cultura de células, sofreu fragmentação do DNA desde a primeira hora de incubação com a mesma metaloprotease, detectada por TUNEL e ELISA. No decorrer do ensaio, fragmentos de DNA foram predominantemente localizados fora das células, evidenciando ruptura da membrana plasmática. Ao adicionar um inibidor de metaloproteases o DNA manteve-se íntegro (DIAZ et al., 2005).

A BaP1 foi também responsável por desencadear apoptose em células endoteliais na primeira hora de incubação (BRENES et al., 2010). A apoptose é associada com a ativação da caspase-8 sendo independente de Bcl-xL e Bax. O mecanismo de ação desta proteinase pode ser embasado pelo mecanismo de destacamento da matriz

extracelular (anoikis), composta por proteínas, levando a apoptose celular, ou por outros mecanismos independentes da atividade catalítica (ALVES, 2008).

d) Nucleotidasas, DNAses e RNAses

A nucleotidasas além de hidrolisarem ATP para produzir a adenosina, comportam-se como sequestrantes de ADP. Podem hidrolisar também GTP, UTP, CTP ou ainda nucleotídeos que compõem moléculas de DNA resultando em efeitos como por exemplo carcinotoxicidade ou genotoxicidade (BAQI, 2015).

Nas peçonhas de serpentes já foram encontradas DNase II que hidrolisam o DNA (NASCIMENTO; COLLARES-BUZATO; HYSLOP, 2008) e nucleotidasas ricas em 5'-nucleotidasas que liberam purinas e pirimidinas de nucleotídeos, danificando estruturalmente o DNA (ARUN et al., 2014; CACCIN et al., 2013; DHANANJAYA et al., 2006; DHANANJAYA et al., 2009; DHANANJAYA; GOWDA; D'SOUZA, 2010; TEIXEIRA-FERREIRA; VALADAO SALES; SANTORO, 2008).

Considerando a ação de nucleotidasas e nucleosidades presentes nas peçonhas, a liberação de adenosinas pode contribuir para a difusão de toxinas nos tecidos das vítimas por induzir aumento da permeabilidade vascular por meio de vasodilatação e/ou inibição da agregação plaquetária (DHANANJAYA; D'SOUZA, 2010). Assim, a adenosina poderia atuar como potente agente de espalhamento, participando na indução de edema, hipertensão, hemólise, miólise e atividade cardiotoxicidade (AIRD, 2002; RALEVIC; BURNSTOCK, 1998). Em adição, a adenosina também é conhecida por causar paralisia por inibir a liberação de neurotransmissores, com ação a nível central e em terminações de nervo periférico (RALEVIC; BURNSTOCK, 1998), potencializando, assim, a paralisia induzida pelas peçonhas.

Neste contexto, a inibição de toxinas com ação nucleosidásica/nucleotidásica por compostos fenólicos corresponde mais um vasto campo a ser explorado uma vez que confere a eles ação protetora sobre células e moléculas contra o estresse oxidativo.

e) Hialuronidase:

É uma enzima hidrolítica que degrada o ácido hialurônico, glicosaminoglicano sintetizado na membrana plasmática e incorporado ao glicocálice endotelial, é encontrado em locais de intensiva proliferação e movimentação celular. O ácido hialurônico é

responsável pela integridade do endotélio vascular e por interagir com algumas proteínas. A hialuronidase hidrolisa este ácido, alterando o trânsito de líquido, íons e moléculas nos tecidos, podendo levar a danos no DNA. Em adição, facilitam o acesso de outras toxinas às células potencializando sua distribuição e efeitos. A comunicação celular é prejudicada uma vez que os canais iônicos presentes nas membranas não se apresentam funcionais e íntegros para fazer o transporte de íons e conseqüentemente suprir as reações com cofatores enzimáticos (LENNON; SINGLETON, 2011).

2.4 Compostos fenólicos: ação antígeno-tóxica

Alguns compostos fenólicos, da classe dos flavonoides inibem hidrolases, oxidorreduções, cinases, isomerases, transferases, ligases e liases (HAVSTEEN, 2002). Entre os ácidos fenólicos, há quatro principais mecanismos de ação que reportam o efeito protetor e/ou inibidor de compostos fenólicos sobre os danos no DNA induzidos por proteases, oxidases, hialuronidases e nucleotidases que são descritos a seguir.

a) Ação antioxidante inibindo radicais livres

A atividade oxidativa exercida por LAAOs, proteases e nucleotidases, presentes nas peçonhas, pode ser inibida por antioxidantes, principalmente a catalase e compostos fenólicos, resultando em inibição da citotoxicidade induzida por radicais livres e peróxidos, originados de produtos da atividade catalítica exercida por estas enzimas, uma vez que estes promovem aumento nos níveis de caspase-3 e degradação de moléculas de DNA (DHANANJAYA et al., 2006; DHANANJAYA et al., 2009; DHANANJAYA; GOWDA; D'SOUZA, 2010; IJIMA; KISUGI; YAMAZAKI, 2003).

O mecanismo antioxidante proposto para o ácido cafeico, por exemplo, sugere que este abstrai a espécie reativa de oxigênio, gerada durante a atividade catalítica de catalases por exemplo, forma um híbrido com estruturas de ressonância até converter-se em uma estrutura estável.

Foi demonstrado o entalhe de compostos fenólicos em moléculas de DNA superespiraladas, sendo que os níveis de entalhe foram 100% para 1,2,4-benzenotriol > ácido gálico > ácido cafeico > gossipol com 20% de entalhamento. O acréscimo de íons metálicos acelerou o entalhamento de DNA. Em um ensaio para induzir a quebra de DNA com ascorbato mais ferro, os dois catecóis (ácido cafeico e gossipol) mostraram-se protetores, enquanto que os dois trióis (1,2,4-benzenotriol e ácido gálico) exacerbaram os danos,

evidenciando que os compostos fenólicos podem ter atividade antioxidante ou pró-oxidante em relação à indução de danos à moléculas de DNA (LI et al., 2000).

b) Interação específica com o sítio hidrofóbico da enzima

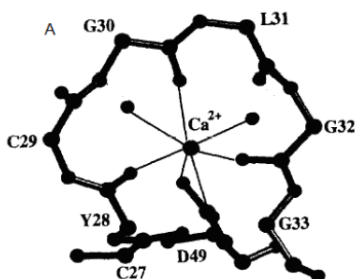
Compostos fenólicos podem interagir com regiões hidrofóbicas presentes nas estruturas de proteases, LAAO e PLA₂. Estas regiões hidrofóbicas são responsáveis por interações das enzimas com estruturas celulares (ALVES et al., 2008; CISCOTTO et al., 2009; GUO et al., 2012; IZIDORO et al., 2014; NAUMANN et al., 2011), embora estas enzimas também possam realizar interações hidrofílicas com células neurais gerando interações anfífilas que desestabilizam a membrana celular (KINI, 2005) e resultam em apoptose.

Assim os fenólicos podem atuar na inibição deste efeito uma vez que bloqueiam os sítios hidrofóbicos destas enzimas.

c) Sequestro de íons

Compostos fenólicos podem atuar como agentes quelantes, tornando os íons bivalentes indisponíveis para efetuar ligação com as enzimas para as quais atuam como cofatores ativando PLA₂s e metaloproteases, diminuindo, em alguns casos, a genotoxicidade induzida por estas enzimas (DIAZ et al., 2005; BRENES et al., 2010), uma vez que a atividade catalítica é parcialmente responsável pelos efeitos biológicos induzidos por estas enzimas. As PLA₂s Asp49 utilizam íons cálcio como cofatores e apresentam um sítio ligante destes íons constituído pelo grupo β-carboxílico do Asp49 e os grupos C=O carbonílicos da Tyr28, Gly30 e Gly32 (FLEER; VERHEIJ; DE HAAS, 1981; VERHEIJ et al., 1980). A presença de duas moléculas de água estruturalmente conservadas completa a esfera de coordenação do Ca²⁺ formando uma pirâmide pentagonal (SCOTT et al., 1990) (Figura 5).

Figura 5 Representação dos resíduos 27-33 e resíduo 49, que compreendem a alça de ligação do cálcio das PLA2s Asp49 de *Naja naja atra*.



Ilustrando a coordenação pentagonal bipiramidal do Ca^{2+} sendo realizada por interações dos átomos de oxigênio carbanil da alça, átomos de oxigênio carbanil da cadeia principal de Asp49 e duas moléculas de água.

Fonte: SCOTT et al. (1990)

d) Interações específicas com o sítio catalítico da enzima

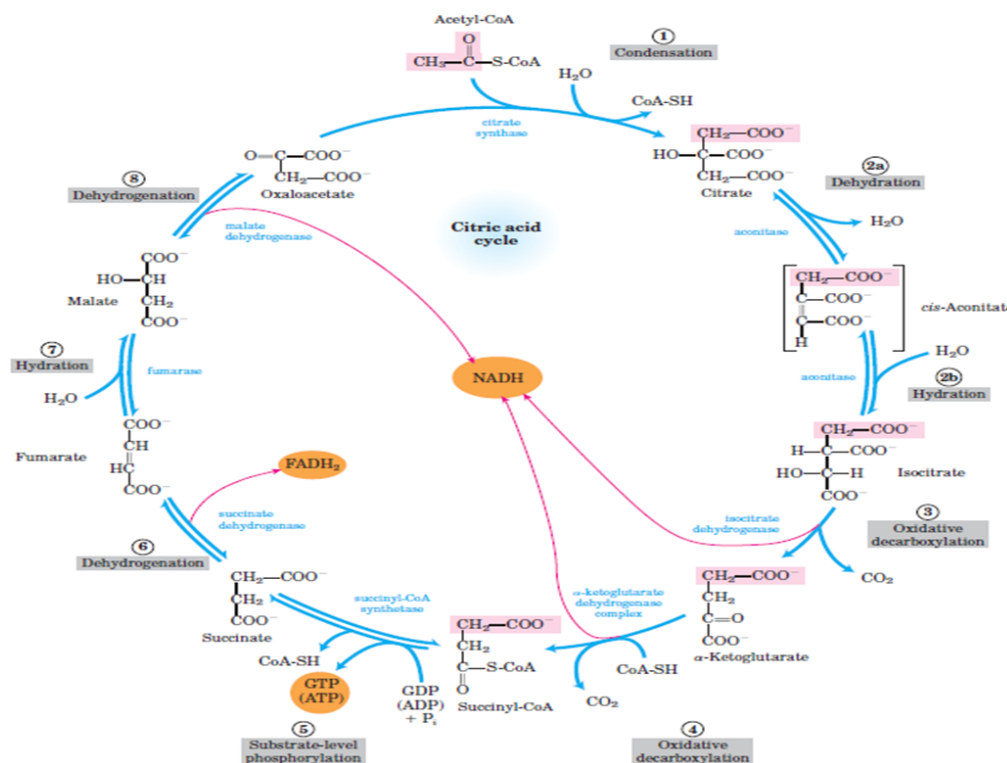
Alguns autores relataram a possibilidade de uso do ácido vanílico como uma ferramenta farmacológica para avaliar o papel das 5'-nucleotidases presentes nas peçonhas de serpentes das espécies *Naja naja*, *Daboia russellii* e *Trimeresurus malabaricus*, na indução de toxicidade. Estas enzimas usam como substrato o 5-AMP (molécula que desempenha um papel de moduladora na homeostase de energia celular), indicando que a adenosina pode apresentar papel importante no envenenamento. Foram observadas inibições próximas a 50% utilizando as concentrações de 84, 98 e 65 μmol de ácido vanílico contra as respectivas peçonhas. O inibidor mostrou-se competitivo, logo, o V_m será constante e o K_m será aumentado, uma vez que a inibição reduziu em proporção ao aumento na concentração do substrato. O grupo carboxílico do ácido vanílico foi determinante para a inibição, logo, este composto fenólico apresenta alto potencial de uso para complementar à soroterapia antiofídica tradicional (DHANANJAYA et al., 2009; DHANANJAYA; D'SOUZA, 2010). Outros autores sugerem uma possível aplicação farmacológica do ácido vanílico considerando que sua ação poderia diminuir a liberação endógena de purinas (ARUN et al., 2014).

Em complementação aos estudos genotóxicos e antígenotóxicos, a utilização da enzima succinato desidrogenase, extraída de fígado de frango, como ferramenta permite análises da atividade citotóxica/anticitotóxica.

2.5 Succinato Desidrogenase (SDH)

A ação da mitocôndria vai da morte à proliferação celular. Por isso, as suas enzimas desempenham papel central no metabolismo celular. A succinato desidrogenase (SDH), também denominada desidrogenase succínica, succinato enzima Q redutase ou Complexo II é uma enzima ligada à membrana interna da mitocôndria e apresenta 4 subunidades sendo duas proteínas hidrofílicas de frente à matriz (SDH1 e SDH2) e duas proteínas em grande parte hidrofóbicas (SDH3 e SDH4) ancorando o complexo na membrana. Ela relaciona-se com o ciclo de Krebs ao reduzir o succinato à fumarato (Figura 6) e com a cadeia de transporte de elétrons ao reduzir a ubiquinona em ubiquinol. Seu bloqueio por inibidores acarreta a parada da respiração celular e morte celular. Um inibidor reversível e competitivo é o ácido malônico também denominado de ácido propanodioico (COOH-CH₂-COOH). Ele combina-se não covalentemente com a enzima SDH no mesmo sítio que o substrato e deve ser, portanto, relacionado estruturalmente com o substrato succinato (DERVARTANIAN; VEEGER,1964; HUANG; MILLAR, 2013).

Figura 6 Ciclo de Krebs

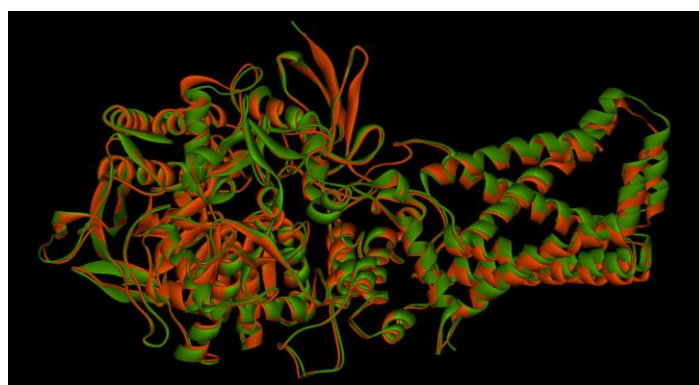


Fonte: NELSON, D.L.; COX, 2002

Uma análise deste conjunto mostra que a regulação desta enzima na produção de seu substrato pode estar relacionada a inúmeras doenças e seus tratamentos. Sendo assim, um ensaio com a SDH permite discutir as principais direções para explorar suas funções em animais e humanos (RUSTIN, 2002; HUANG; MILLAR, 2013) pensando no controle mitocondrial como alvo terapêutico.

Em estudos sobre a estrutura tridimensional da succinato desidrogenase humana e de ave, o sequenciamento primário das bases mostrou uma homologia de 91,8% entre elas (Figura 7).

Figura 7 Estrutura tridimensional da Succinato Desidrogenase (E.C. 1.3.5.1)



Estrutura laranja: SDH humana e Estrutura verde: SDH de ave.
Fonte: Imagem obtida do software Molegro.

A ação de inibidores seletivos ou competitivos pode direcionar para a identificação de diferentes mecanismos envolvidos na inibição da succinato desidrogenase ou na reversão da inibição desencadeada pelo ácido malônico, logo nas diferentes formas de indução de morte celular.

Desta forma, a aplicação da inibição enzimática pode fornecer informações sobre: a) o mecanismo pelo qual a enzima promove a atividade catalítica; b) possíveis mecanismos de regulação de atividades metabólicas *in vitro* e *in vivo* e c) permite a síntese de inibidores específicos para serem utilizadas como agentes terapêuticos bloqueando vias metabólicas chaves envolvidas em condições clínicas.

2.6 Farmacocinética de compostos fenólicos e nutrição epigenética

Entende-se por epigenética a mudança na expressão gênica sem que ocorra alterações estruturais na sequência de DNA. A hipermetilação da citosina ou a modificação (acetilação) da estrutura das histonas, importantes na compactação da

cromatina, são alterações relevantes para o silenciamento e modulação de genes e para tanto as moléculas vegetais devem apresentar propriedades apolares que permitam que elas atravessem as membranas celular e nuclear. Estudos no âmbito da nutrição epigenética mostram que os fenólicos apresentam atividades que beneficiam a alimentação saudável classificando-os como nutracêuticos ou ingredientes de alimentos funcionais (BUSCH et al., 2015; CALEJA et al., 2016).

A modulação epigenética pode ocorrer por ativação ou inibição de enzimas celulares, pelo fornecimento de doadores e aceptores bioquímicos ou ainda por cofatores para enzimas celulares bioquímicos. A modulação e a interação entre mecanismos epigenéticos dependem de uma interação complexa entre modificações histonais pós-traducionais e metilação do DNA. A atividade epigenética em geral é influenciada por vários fatores exógenos e endógenos tais como medicação, toxinas, estresse, estilo de vida, etnia, doenças, meio ambiente, fatores genéticos, idade, gênero, atividade física e nutrição (BUSCH et al., 2015).

A farmacocinética é o percurso que os compostos fazem no organismo humano desde a absorção, distribuição, metabolismo até sua excreção (MORAIS, 1984). Há levantamentos que descrevem que, uma vez ingeridos, os flavonoides são biotransformados e seus metabólitos são transportados para a veia porta a fim de continuar o metabolismo. Os metabólitos do fígado (metilados, sulfatados ou glicuronatados) podem ser transportados para células e tecidos alvo, excretados para a bile e submetidos à recirculação entero-hepática ou eliminados via urina e / ou fezes. As agliconas ou metabólitos flavonoides (ácidos fenólicos) que atingem o cólon podem sofrer degradação microbiana e reabsorção (THILAKARATHNA; RUPASINGHE, 2013).

A maioria dos polifenóis que circulam no sangue são glicuronidados e/ou sulfatados, ou seja, não se encontram agliconas livres no plasma (LEWANDOWSKA et al., 2016).

A forte relação entre uma dieta rica em compostos fenólicos e a reversão de alterações epigenéticas que atuam modulando vias de carcinogênese (iniciação, promoção e progressão) sugere o potencial destas moléculas para a prevenção do câncer e de outras doenças (PAN et al., 2015).

A dificuldade está na baixa biodisponibilidade destes fenólicos no organismo, característica importante na sua bioatividade *in vivo* (THILAKARATHNA; RUPASINGHE, 2013). Desta forma, estudos extensivos destes

compostos fenólicos podem trazer informações sobre as ações benéficas que eles desempenham na saúde humana através da dieta ou incorporados na forma de fármacos.

Por meio do melhor entendimento do contexto dos envenenamentos ofídicos é possível prospectar aplicações clínico/farmacológicas relacionadas à ação de diferentes classes de enzimas sobre moléculas de DNA, assim como de inibidores destas, visto que apoptose celular, cânceres, doenças neurodegenerativas, dentre outras disfunções do organismo humano estão direta ou indiretamente relacionadas a danos no material genético de diferentes tipos celulares.

Referências

AIRD, S. D. Ophidian envenomation strategies and the role of purines. **Review Toxicol**, Fortaleza, v. 40, n. 4, p.335-393, 2002.

ALVES, R. M. et al. Evidence of caspase-mediated apoptosis induced by L-amino acid oxidase isolated from *Bothrops atrox* snake venom. **Comparative Biochemistry and Physiology a-Molecular & Integrative Physiology**, Ribeirão Preto, v. 151, n. 4, p. 542-550, Dec 2008.

ANANTHARAJU, P. G. et al. An overview on the role of dietary phenolics for the treatment of cancers. **Nutrition Journal**, Mysore, v. 15, n. 1, p. 99. Review, Dec. 2016.

ANJOS, E. F. et al. Cytotoxicity of *Bothrops jararacussu* snake venom fractions in fibroblasts and keratinocytes. **Febs Journal**, Campinas, v. 275, p. 388-388, Jun. 2008.

ARUN, R. et al. Vanillin Analog - Vanillyl Mandelic Acid, a Novel Specific Inhibitor of Snake Venom 5'-Nucleotidase. **Archiv Der Pharmazie**, Thirumalaisamudram, v. 347, n. 9, p. 616-623, Sep. 2014.

BALASUNDRAM, N.; SUNDRAM, K, SAMMAN, S. Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. **Food Chemistry**, Sydney, v. 99, n. 1, p.191-203, 2006.

BAQI, Y. Ecto-Nucleotidase Inhibitors: Recent Developments in Drug Discovery. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, Muscat, v. 15, p. 21-33, 2015.

BHAT, S. H.; AZMI, A. S.; HADI, S. M. Prooxidant DNA breakage induced by caffeic acid in human peripheral lymphocytes: involvement of endogenous copper and a putative mechanism for anticancer properties. **Toxicology and Applied Pharmacology**, Aligarh, v. 218, n. 3, p. 249-55, Feb. 2007.

BONFIM, V. L. et al. Toxicity of phospholipases A(2) D49 (6-1 and 6-2) and K49 (Bj-VII) from *Bothrops jararacussu* venom. **Cell Biology and Toxicology**, Campinas, v. 25, n. 6, p. 523-532, Dec. 2009.

BREGGE-SILVA, C. et al. Isolation and biochemical, functional and structural characterization of a novel L-amino acid oxidase from *Lachesis muta* snake venom. **Toxicon**, Ribeirão Preto, v. 60, n. 7, p. 1263-76, 2012.

BRENES, O. et al. Cell death induced by *Bothrops asper* snake venom metalloproteinase on endothelial and other cell lines. **Experimental and Molecular Pathology**, San José, v. 88, n. 3, p. 424-432, Jun. 2010.

BUSCH, C., et al. Epigenetic activities of flavonoids in the prevention and treatment of cancer. **Clinical Epigenetics**, Tuebingen, v. 10, n. 7, p. 64, Jul. 2015.

CACCIN, P. et al. Why myotoxin-containing snake venoms possess powerful nucleotidases? **Biochemical and Biophysical Research Communications**, Padova, v. 430, n. 4, p. 1289-1293, Jan. 2013.

CALDERÓN, L. et al. Biological and biochemical activities of *Vipera berus* (European viper) venom. **Toxicon**, San José, v. 31, n. 6, p. 743-753, 1993.

CALEJA, C. et al. Phenolic compounds as nutraceuticals or functional food ingredients. **Current Pharmaceutical Design**, Bragança, v. 22, Dec. 2016.

CARVALHO, et al. Snake Venom PLA₂s Inhibitors Isolated from Brazilian Plants: Synthetic and Natural Molecules. **BioMed Research International**, Ouro Branco, 8p. 2013.

CHIPPAUX, J. P. Epidemiology of envenomations by terrestrial venomous animals in Brazil based on case reporting: from obvious facts to contingencies. **Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases**, Paris, v. 21, n. 13, 17p, May. 2015.

CHIPPAUX, J. P.; GOYFFON, M. Venoms, antivenoms and immunotherapy. **Toxicon**, Niamey, v. 36, n. 6, p. 823-846, 1998.

CHWETZOFF, S. et al. Nigexine, a phospholipase A2 from cobra venom with cytotoxic properties not related to esterase activity. Purification, amino acid sequence, and biological properties. **The journal of biological chemistry**, Gif-sur-Yvette, v. 264, n. 22, p. 13289-97, 1989.

CISCOTTO, P. et al. Antigenic, microbicidal and antiparasitic properties of an L-amino acid oxidase isolated from *Bothrops jararaca* snake venom. **Toxicon**, Belo Horizonte, v. 53, n. 3, p. 330-341, Mar. 2009.

COUNIS, M.-F.; TORRIGLIA, A. Acid DNases and their interest among apoptotic endonucleases. **Biochimie**, Paris, v. 88, n. 12, p. 1851-1858, 2006.

DE ROODT, A. R.; LITWIN, S.; ANGEL, S. O. Hydrolysis of DNA by 17 snake venoms. **Comparative Biochemistry and Physiology C-Toxicology & Pharmacology**, Buenos Aires, v. 135, n. 4, p. 469-479, Aug. 2003.

DERVARTANIAN, D. V.; VEEGER, C. Studies on succinate dehydrogenase: I. Spectral properties of the purified enzyme and formation of enzyme-competitive inhibitor complexes. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Specialized Section on Enzymological Subjects**, Amsterdam, v. 92, n. 2, p. 233-247, Nov. 1964.

DHANANJAYA, B. L.; D'SOUZA, C. J. M. An Overview on Nucleases (DNase, RNase, and Phosphodiesterase) in Snake Venoms. **Biochemistry-Moscow**, Manasagangothri, v. 75, n. 1, p. 1-6, Jan. 2010.

DHANANJAYA, B. L.; GOWDA, T. V.; D'SOUZA, C. J. M. Evidence for existence of venom 5' nucleotidase in multiple forms through inhibition of concanavalin A. **Cell Biochemistry and Function**, Manasagangothri, v. 28, n. 7, p. 620-622, Oct. 2010.

DHANANJAYA, B. L. et al. Vanillic acid as a novel specific inhibitor of snake venom 5'-nucleotidase: A pharmacological tool in evaluating the role of the enzyme in snake envenomation. **Biochemistry-Moscow**, Manasagangothri, v. 74, n. 12, p. 1315-1319, Dec. 2009.

DHANANJAYA, B. L. et al. Anticoagulant effect of *Naja naja* venom 5' nucleotidase: Demonstration through the use of novel specific inhibitor, vanillic acid. **Toxicon**, Manasagangothri, v. 48, n. 4, p. 411-421, Sep. 2006.

DIAZ, C. et al. Characterization of events associated with Apoptosis/Anoikis induced by snake venom metalloproteinase BaP1 on human endothelial cells. **Journal of Cellular Biochemistry**, San José, v. 94, n. 3, p. 520-528, Feb. 2005.

DUTTA, S.; GOGOI, D.; MUKHERJEE, A. K. Anticoagulant mechanism and platelet deaggregation property of a non-cytotoxic, acidic phospholipase A(2) purified from Indian cobra (*Naja naja*) venom: Inhibition of anticoagulant activity by low molecular weight heparin. **Biochimie**, Tezpur, v. 110, p. 93-106, Mar. 2015.

ESTRADA, G., VILLEGAS, E., CORZO, G. Spider venoms: a rich source of acylpolyamines and peptides as new leads for CNS drugs. **Natural Product Reports**, Cuernavaca, v. 24, p. 145-161, 2007.

FLEER, E. A. M.; VERHEIJ, H.M.; DE HAAS, G. H. Modification of carboxylate groups in bovine pancreatic phospholipase A₂. **European Journal of Biochemistry**, Utrecht, v. 113, p. 283-288, 1981.

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

GABRIEL, L. M. et al. Tumor cytotoxicity of leucurolysin-B, a P-III snake venom metalloproteinase from *Bothrops leucurus*. **Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases**, Belo Horizonte, v. 18, n. 1, p. 24-33, 2012.

GIMENEZ, G. S. et al. Biochemical and Functional Characterization of *Parawixia bistriata* Spider Venom with Potential Proteolytic and Larvicidal Activities. **Biomed Research International**, Porto Velho, 13p, 2014.

GUO, C. et al. Past decade study of snake venom L-amino acid oxidase. **Toxicon**, Dalian, v. 60, n. 3, p. 302-311, Sep. 2012.

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

HAVSTEEN, B.H. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. **Pharmacology and Therapeutics**, Keil, v. 96, n. 2-3, p. 67-202, Nov-Dec. 2002.

HUANG, S.; MILLAR, H. Succinate dehydrogenase: the complex roles of a simple enzyme. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 16, n. 3, p. 344–349, 2013.

IJIMA, R.; KISUGI, J.; YAMAZAKI, M. L-Amino acid oxidase activity of an antineoplastic factor of a marine mollusk and its relationship to cytotoxicity. **Developmental and Comparative Immunology**, Sagamiko, v. 27, n. 6-7, p. 505-512, Jun-Jul. 2003.

IZIDORO, L. F. M. et al. Snake Venom L-Amino Acid Oxidases: Trends in Pharmacology and Biochemistry. **Biomed Research International**, Uberlândia, v. 2014, 19p, 2014.

KAGAWA, T.F.; et al. Covalent modification of guanine bases in double-stranded DNA: the 1:2-AZ-DNA structure of dC(cacacg) in the presence of CuCl₂. **The Journal of Biological Chemistry**, West Lafayette, v. 266, p. 20175–20184, 1994.

KALLURI, R. Basement Membranes: Structure, Assembly and Role in Tumor Angiogenesis. **Nature Reviews**, Boston, v. 3, p. 422-433, 2003.

KINI, R. M. Structure-function relationships and mechanism of anticoagulant phospholipase A(2) enzymes from snake venoms. **Toxicon**, Singapore, v. 45, n. 8, p. 1147-1161, Jun. 2005.

LENNON, F.E.; SINGLETON, P.A. Hyaluronan regulation of vascular integrity. *American Journal of Cardiovascular Disease*, Chicago, v. 1, n. 3, p. 200-13, Sep. 2011.

LEWANDOWSKA, H. et al. The role of natural polyphenols in cell signaling and cytoprotection against cancer development. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, Warsaw, v. 32, p. 1-19, Jun. 2016.

LI, A. S. H. et al. DNA-Breaking versus DNA-protecting activity of four phenolic compounds *in vitro*. **Free Radical Research**, Burnaby, v. 33, n. 5, p. 551-566, 2000.

LIN, J. H. Review structure- and dynamics-based computational design of anticancer drugs. **Biopolymers**, Taipei, v. 105, n. 1, p. 2-9, Jan. 2016.

MARCUSSI, S. et al. Snake venom phospholipase A(2) inhibitors: Medicinal chemistry and therapeutic potential. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, Ribeirão Preto, v. 7, n. 8, p. 743-756, 2007.

MARCUSSI, S. et al. Evaluation of the genotoxicity of *Crotalus durissus terrificus* snake venom and its isolated toxins on human lymphocytes. **Mutation Research-Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, Ribeirão Preto, v. 724, n. 1-2, p. 59-63, Sep. 2011.

MARCUSSI, S. et al. Genotoxic effect of *Bothrops* snake venoms and isolated toxins on human lymphocyte DNA. **Toxicon**, Ribeirão Preto, v. 65, p. 9-14, Apr. 2013.

MARCUSSI, S. et al. Comet Assay and Micronucleus Tests to Assess Damage to the DNA of Human Lymphocytes Induced by the *Bothrops jararaca* Venom. **Toxicon**, Lavras, v. 60, n. 2, p. 101-101, Aug. 2012.

MATSUI, T.; FUJIMURA, Y.; TITANI, K. Snake venom proteases affecting hemostasis and thrombosis. **Biochimica et Biophysica Acta**, Toyoake, v. 1477, p. 146-156, 2000.

MORAIS, J. G. O medicamento e o seu comportamento no organismo. Libertação, absorção, distribuição, metabolismo, excreção (LADEME). Farmacocinética. **Farmácia Portuguesa**, Lisboa, n. 27, p. 13-29, 1984.

NAKAD, R.; SCHUMACHER, B. DNA Damage Response and Immune Defense: Links and Mechanisms. **Frontiers in Genetics**, Cologne, v. 7, 10p, 2016.

NASCIMENTO, J.; COLLARES-BUZATO, C.; HYSLOP, S. Apoptosis induced by an acidic deoxyribonuclease (DNase II) from *Bothrops alternatus* snake venom in MDCK cells. **Febs Journal**, v. 275, p. 265-265, Jun. 2008.

NAUMANN, G. B. et al. Cytotoxicity and inhibition of platelet aggregation caused by an L-amino acid oxidase from *Bothrops leucurus* venom. **Biochimica Et Biophysica Acta-General Subjects**, Belo Horizonte, v. 1810, n. 7, p. 683-694, Jul. 2011.

NELSON, D.L.; COX, M.M. **Lenhinger princípios de bioquímica**. 3ed. SP: Sarvier, 2002

NUNEZ, V. et al. Inhibition of the toxic effects of *Lachesis muta*, *Crotalus durissus cumanensis* and *Micrurus mipartitus* snake venoms by plant extracts. **Pharmaceutical Biology**, Medellín, v. 42, n. 1, p. 49-54, Feb. 2004.

PAN, M. H, et al. Breast cancer chemoprevention by dietary natural phenolic compounds: Specific epigenetic related dietary natural phenolic compounds: Specific epigenetic related molecular targets. **Molecular Nutrition and Food Research**, Taichung, v. 59, n. 1, p. 21-35, Jan. 2015.

PAN, M. H., LAI, C. S., HO, C. T. Anti-inflammatory activity of natural dietary flavonoids. **Food and Function**, Kaohsiung, 2010, v. 1, p. 15-31, 2010.

PEREIRA, L. L. S. et al. Application of Comet assay to assess the effects of white bean meal on DNA of human lymphocytes. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, Lavras, v. 48, n. 1, p. 103-108, Jan-Mar. 2012.

RALEVIC, V.; BURNSTOCK, G. Receptors for purines and pyrimidines. **Pharmacological Reviews**, Nottingham, v. 50, p. 413-492, 1998.

RAMALHO, V. C.; JORGE, N. Antioxidants used in oils, fats and fatty foods. **Química Nova**, São José do Rio Preto, v. 29, n. 4, p. 755-760, Jul-Aug. 2006.

RAMAWAT, K. G.; MÉRILLON, J-M. **Natural Products – Phytochemistry, Botany and Metabolism of Alkaloids, Phenolics and Terpens**, v. 3, Springer reference. v. 3, p.1951-1969, 2013.

ROTHWELL, J. A. et al Phenol-Explorer 3.0: a major update of the Phenol-Explorer database to incorporate data on the effects of food processing on polyphenol content. **Oxford Journals**, Lyon, v. 2013, 8p, 2013.

RUSTIN, P. Mitochondria, from cell death to proliferation. **Nature genetics**, Paris, v. 30, p. 352-353, Apr. 2002.

SCALBERT, A.; JOHNSON I. T.; SALTMARSH M. Polyphenols: antioxidants and beyond. **American Journal of Clinical Nutrition**, Saint-Genes-Champanelle, v. 81, n. 1, p. 215-217, 2005.

SCOTT DL, WHITE SP, OTWINOWSKI Z, YUAN W, GELB MH, SIGLER PB. Interfacial catalysis: the mechanism of phospholipase A2. **Science**, New Haven, v. 250, n. 4987, p. 1541-6, Dec. 1990.

SESTILI, P. et al. Plant-derived phenolic compounds prevent the DNA single-strand breakage and cytotoxicity induced by tert-butylhydroperoxide via an iron-chelating mechanism. **The Biochemical Journal**, Urbino, v. 364, n.(Pt 1), p.121-8, May. 2002.

SIMÕES, C.M.O. et al. **Farmacognosia – da planta ao medicamento**. 5ed. Porto Alegre/Florianópolis. Editora da UFRS, 2004.

THILAKARATHNA, S.H.; RUPASINGHE, H.P.V. Flavonoid Bioavailability and Attempts for Bioavailability Enhancement. **Nutrients**, Truro, v. 5, p. 3367-3387, 2013.

TEIXEIRA-FERREIRA, A.; WALTER ALVES, E. Characterization of a novel ADPase in *Bothrops jararaca* snake venom involved in nucleotide hydrolysis. **Protein and Peptide Letters**, Campos dos Goytacazes, v. 14, n. 4, p. 395-402, 2007.

VALADAO SALES, P. B.; SANTORO, M. L. Nucleotidase and DNase activities in Brazilian snake venoms. **Comparative Biochemistry and Physiology C-Toxicology & Pharmacology**, São Paulo, v. 147, n. 1, p. 85-95, Jan. 2008.

VERHEIJ, H.M. et al. Correlation of enzymatic activity and anticoagulant properties of phospholipase A₂. **European Journal of Biochemistry**, Uppsala, v. 112, p. 25-32, 1980.

VOET, D; VOET, J.G.; PRATT, C.W. **Fundamentos da Bioquímica: a vida em nível molecular**. 2ed, Porto Alegre: Artmed, 2008.

World Health Organization (2010) Guidelines for the prevention and clinical management of snakebite in Africa. Available at: <http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/204458/1/9789290231684>

ANEXO

Parecer do Comitê de Ética para Pesquisa com Seres Humanos

Sr. (a) Pesquisador (a),

O projeto Avaliação do potencial antigenotóxico e anticitotóxico de compostos fenólicos utilizando peçonhas de serpentes como ferramentas indutoras de danos com número CAAE 56618616.9.0000.5148, tem data de início prevista para 05/09/2016. Esta mensagem é meramente informativa e baseada na data da primeira etapa descrita no cronograma aprovado. Por favor, ignore-a se não fizer sentido para a corrente situação do projeto de pesquisa.

Atenciosamente,

Plataforma Brasil

www.saude.gov.br/plataformabrasil

plataformabrasil@saude.gov.br

The screenshot displays the 'DETALHAR PROJETO DE PESQUISA' page on the Plataforma Brasil website. The header includes the 'Saúde' logo and navigation buttons for 'Público', 'Pesquisador', and 'Alterar Meus Dados'. The main content area is divided into two sections:

DADOS DA VERSÃO DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Avaliação do potencial antigenotóxico e anticitotóxico de compostos fenólicos utilizando peçonhas de serpentes como ferramentas indutoras de danos
 Pesquisador Responsável: Silvana Marcussi
 Área Temática:
 Versão: 2
 CAAE: 56618616.9.0000.5148
 Submetido em: 19/07/2016
 Instituição Proponente: Universidade Federal de Lavras
 Situação da Versão do Projeto: Aprovado
 Localização atual da Versão do Projeto: Pesquisador Responsável
 Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

A circular stamp with the text 'COORDENADOR' is visible on the right side of this section. Below the details, a 'Comprovante de Recepção' is shown with the file name 'PB_COMPROVANTE_RECEPCAO_724531'.

DOCUMENTOS DO PROJETO DE PESQUISA

A tree view on the left lists the following documents:

- Versão Atual Aprovada (PO) - Versão 2
 - Pendência de Parecer (PO) - Versão 2
 - Documentos do Projeto
 - Comprovante de Recepção - Submissão
 - Declaração de Instituição e Infraestrutura
 - Declaração de Pesquisadores - Submis
 - Folha de Rosto - Submissão 3
 - Informações Básicas do Projeto - Submi
 - Outros - Submissão 3
 - Projeto Detalhado / Brochura Investigad
 - TCLE / Termos de Assentimento / Justifi
 - Apreciação 3 - Universidade Federal de Lavras
 - Projeto Completo

On the right, a table header is visible with columns: Tipo de Documento, Situação, Arquivo, Postagem, and Ações.

SEGUNDA PARTE

Artigos

Artigo 1**CAFFEIC AND SYRINGIC ACIDS: PROSPECTION OF PROTECTIVE EFFECT ON
DNA FROM HUMAN LEUKOCYTES**

Tatiane Silva de Abreu¹, Anderson Assaid Simão¹, Mariana Aparecida Braga¹, Marcus Vinícius Cardoso Trento¹, Mateus Willian de Faria Eleutério¹, Luciana Lopes Silva Pereira, Elaine Fontes Ferreira da Cunha², Silvana Marcussi^{1*}

¹Chemistry Department, Biochemistry Laboratory, Universidade Federal de Lavras (UFLA), Campus UFLA, Lavras, Minas Gerais, 37200-000, Brazil.

²Chemistry Department, Computacional Chemistry Laboratory, Universidade Federal de Lavras (UFLA), Campus UFLA, Lavras, Minas Gerais, 37200-000, Brazil.

* Author for corresponding: Dra. Silvana Marcussi, Biochemistry Laboratory, Department of Chemistry, Federal University of Lavras, University Campus, CP: 3037, Lavras 37200-000, Brazil (telefax number: +55(35)3829-1271, e-mail: marcussi@dqi.ufla.br).

Artigo formatado segundo as normas da revista *International Journal of Biological Macromolecules*.

RESUMO

Os ácidos fenólicos constituem metabólitos secundários produzidos por plantas com propriedades importantes para a saúde humana, devido às características antioxidantes e pró-oxidantes que podem ser moduladas para proteger células saudáveis ou causar danos ao DNA de células tumorais. No presente estudo o ácido cafeico (CA) e ácido siríngico (SA) foram avaliados quanto ao seu potencial anti-geotóxico, frente à fragmentação de moléculas de DNA induzida pelas peçonhas de *Bothrops atrox*, *B. jararacussu* e *Lachesis muta muta*. Nos testes de eletroforese em gel de agarose e cometa o CA protegeu as moléculas de DNA de leucócitos fragmentações espontâneas resultantes da manipulação do material genético durante os testes, mas não conseguiu inibir a ação genotóxica induzida pelas peçonhas de *B. atrox* e *L. muta muta*. Contudo, o SA, no ensaio de eletroforese em gel de agarose protegeu parcialmente a degradação induzida pelas peçonhas de *B. atrox* e *L. muta muta*. Provavelmente, estes fenólicos se ligam aos grupos fosfato do DNA reduzindo o acesso das toxinas de peçonhas e conseqüentemente impedindo a ação genotóxica. Todavia, no teste cometa, o SA potencializou a fragmentação induzida por *B. atrox* nas proporções menores (1:0,05 e 1:0,1) e exerceu ação antigenotóxica na proporção maior (1:0,25). A ação inibitória do SA foi significativa sobre a fragmentação induzida por peçonha de *L. muta muta*, em todas as proporções avaliadas. Os diversos efeitos observados relacionam-se as diferentes estruturas dos compostos fenólicos assim como às diversas composições proteômicas das peçonhas avaliadas, sendo metaloproteases e PLA₂s presentes em maior proporção na peçonha de *B. atrox* e para a peçonha de *L. muta muta* as proteínas encontradas em maior abundância são metaloproteases e serinoproteases. Por fim, análises computacionais evidenciaram que a succinato desidrogenase hepática de frango é altamente homóloga à enzima humana e que há presença de energias favoráveis à ligação dos compostos tanto ao ácido malônico (inibidor) quanto à enzima. Os ensaios de atividade da enzima mitocondrial demonstraram que o SA inibiu, significativamente, a succinato desidrogenase e o CA potencializou a inibição do ácido malônico sobre a atividade da mesma. Conclui-se que o equilíbrio entre a proteção do DNA contra os danos oxidativos e efeitos pró-oxidativos foi dependente da concentração dos ácidos fenólicos, e das toxinas indutoras dos danos. Os resultados da SDS-PAGE sugerem interações fracas entre toxinas presentes nas peçonhas e os ácidos fenólicos, pois não houve alteração no perfil de migração das proteínas, embora os resultados obtidos nos demais ensaios sugiram a presença de interações entre fenólicos e moléculas proteicas. Por isso, mais estudos devem ser realizados com o objetivo de entender a ligação destes fenólicos com o DNA, com a succinato desidrogenase e enzimas presentes nas peçonhas, a fim de explorar melhor os potenciais, nutricional epigenético, antigenotóxico, pró-oxidativo e mitocôndriotrópico destes fenólicos para prevenção e tratamento de doenças.

Palavras-chave: Compostos fenólicos; Peçonha de serpente; Inibidor enzimático; Succinato desidrogenase; Genotoxicidade; Teste do Cometa

ABSTRACT

Phenolic acids are secondary metabolites produced by plants with properties important for human health due to antioxidant and pro-oxidant characteristics that can be modulated to protect healthy cells or cause damage to the DNA of tumor cells. (CA) and syringic acid (SA) were evaluated for their anti-genotoxic potential, against the fragmentation of DNA molecules induced by the venoms of *Bothrops atrox*, *B. jararacussu* and *Lachesis muta muta*. Assay of electrophoresis in agarose gel and comet CA protected as leukocyte DNA molecules from spontaneous fragmentation resulting from the manipulation made the genetic material from during the testis, but failed to inhibit the genotoxic action induced by the venoms of *B. atrox* and *L. muta muta*. However, the SA, not agarose gel electrophoresis assay protected by a degradation induced by *B. atrox* and *L. muta muta*. Probably, these phenolics bind to the phosphate groups of the DNA reducing the access to the toxins of venoms and consequently preventing the genotoxic action. (1: 0.00 and 1: 0.1) and exerted antigenotoxic action in the highest ratio (1: 0.25). The inhibitory action of SA was significant on the fragmentation induced by *L. muta muta* venom, in all proportions evaluated. The different effects observed are related to the different structures of the phenolic compounds as well as to the various proteomic compositions of the evaluated venoms, being metalloproteases and PLA2s present in a higher proportion in the *B. atrox* venom and for the *L. muta muta* venom the proteins found in higher abundance are metalloproteases and serine proteases. Finally, computational analysis showed that hepatic chicken succinate dehydrogenase is highly homologous to the human enzyme and that there is presence of energies favorable to the binding of the compounds to both the malonic acid (inhibitor) and the enzyme. The mitochondrial enzyme activity assays demonstrated that SA significantly inhibited succinate dehydrogenase and the CA potentiated the inhibition of malonic acid on its activity. It was concluded that the balance between DNA protection against oxidative damage and pro-oxidative effects was dependent on the concentration of the phenolic acids and the toxins inducing the damage. The results of the SDS-PAGE suggest weak interactions between the toxins present in the venoms and the phenolic acids, since there was no change in the protein migration profile, although the results obtained in the other experiments suggest the presence of interactions between phenolics and protein molecules. Therefore, further studies should be carried out to understand the linkage of these phenolics with DNA, succinate dehydrogenase and enzymes present in venoms, in order to better explore the nutritional, epigenetic, antigenotoxic, pro-oxidative and mitochondriotropic potentials of these phenolics for prevention and treatment of diseases.

Keywords: Phenolic compounds; Snake venom; Enzymatic inhibitor; Succinate dehydrogenase; Genotoxicity; Comet assay.

1 INTRODUÇÃO

Os compostos fenólicos estão presentes nos alimentos de origem vegetal, como folhas, cereais, leguminosas, cacau, frutas em geral, bebidas como chás, café e vinho tinto, além de plantas medicinais (RAMAWAT; MÉRILLON, 2013). Eles apresentam propriedades antioxidantes e pró-oxidantes na presença de íons ferro e cobre o que corrobora com o trabalho de no qual mostra que o cobre é um íon metálico importante presente na cromatina e intimamente associado às bases nitrogenadas que compõem moléculas de DNA, particularmente guanina (BHAT; AZMI; HADI, 2007).

O ácido cafeico (ácido (E)-3-(3,4-dihidroxifenil)prop-2-enoico) é um ácido hidroxicinâmico derivado do ácido p-cumárico e o ácido siríngico (ácido 4-hidroxi-3,5-dimetoxibenzoico) é um ácido hidroxibenzoico formado naturalmente em plantas a partir da via do chiquimato ou fenilalanina/hidroxicinamato. Por apresentarem propriedades antibacteriana, anti-inflamatória e anti-tumoral, são relevantes os estudos que promovam ampla caracterização destes metabólitos secundários visando sua aplicação em áreas como médica e cosmética (RAMAWAT; MÉRILLON, 2013).

Há estudos que apontam a interação destes ácidos fenólicos com DNA, durante a extração de DNA vegetal. Pesquisadores observaram o aumento da viscosidade e formação de aglomerados insolúveis, impossibilitando a migração das moléculas de DNA em gel de agarose durante eletroforese. Foi sugerido que o ácido cafeico se liga às bases de DNA por ligação de hidrogênio e interações de Van der Waals (SARWAR et al., 2017). O ácido siríngico conhecido como inibidor da atividade proteosoma, liga-se ao sdDNA (double - stranded DNA) (CHEEMANAPALLI et al, 2016).

Contudo, um estudo relata que a moreloflavona, extraída de *Garcinia brasiliensis*, e seus derivados semi-sintéticos mostraram-se como potentes inibidores de cisteíno e serinoproteases (VANESSA et al. 2015). Desta forma, pode-se também relacionar os compostos fenólicos usados neste trabalho a possíveis interações com moléculas presentes nas peçonhas das serpentes, como mecanismo parcialmente responsável pelos resultados observados.

As peçonhas de serpentes apresentam uma diversidade de enzimas como proteases que podem clivar enzimas envolvidas na síntese de DNA e na cromatina e fosfolípases que quebram glicerofosfolípídeos. Estas moléculas são ferramentas indutoras de danos usadas a fim de complementar a caracterização das atividades dos fenólicos trazendo mais informações para possibilitar a aplicação com eficácia e segurança (ARUN et al., 2014; DHANANJAYA et al., 2009; MARCUSSI et al., 2012; MARCUSSI et al., 2013)

Hipóteses relevantes sobre a atividade genotóxica e citotóxica de toxinas de serpentes mostram que as LAAOs desencadeiam a produção de radicais livres e causam apoptose ao degradar a cromatina, fragmentar o DNA e ativar a via das caspases (NAUMANN et al., 2011). As PLA₂s geram lipídeos bioativos que além de reduzir o pH por causa da liberação de ácidos graxos são também mediadores da inflamação,

logo, causam estresse oxidativo ou desestabilizam a membrana plasmática prejudicando as trocas iônicas, íons estes que podem ser cofatores para várias reações enzimáticas interferindo assim em todo o metabolismo celular (NAKAD; SCHUMACHER, 2016). As metaloproteases são capazes de degradar componentes proteicos da membrana basal (GUTIÉRREZ; RUCAVADO, 2000) podendo, desta forma, alcançar o DNA ou ainda o deixá-lo exposto a agentes genotóxicos. Nas peçonhas de serpentes também já foram encontradas DNase II que hidrolisam o DNA (NASCIMENTO; COLLARES-BUZATO; HYSLOP, 2008) e nucleotidases ricas em 5'-nucleotidases que liberam purinas e pirimidinas de nucleotídeos, danificando estruturalmente o DNA (DHANANJAYA; GOWDA; D'SOUZA, 2010). A hialuronidase hidrolisa o ácido hialurônico, alterando o trânsito de líquido, íons e moléculas nos tecidos, podendo levar a danos no material genético das células. Em adição, facilitam o acesso de outras toxinas às células potencializando sua distribuição e efeitos (LENNON; SINGLETON, 2011).

Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi analisar os efeitos dos ácidos cafeico e sirínico sobre DNA extraído de leucócitos humanos recém coletados e de forma complementar a estes ensaios genotóxicos, a succinato desidrogenase que atua no complexo II da cadeia mitocondrial transportadora de elétrons e no ciclo de Krebs; O ácido malônico também chamado de ácido propanodioico é um inibidor reversível competitivo da succinato desidrogenase (DERVARTANIAN; VEEGER, 1964) em vista disso, foi avaliado o potencial dos compostos fenólicos em inibir a SDH e em reverter a inibição induzida pelo ácido malônico para avaliar a genotoxicidade e citotoxicidade.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos conduzidos estão de acordo com as normas do Comitê de Ética em Pesquisa Humana (COEP) da Universidade Federal de Lavras, Brasil e aprovado por este comitê (Nº CAAE 56618616.9.0000.5148).

O sangue usado foi obtido de voluntários do sexo masculino e feminino, entre 20 e 35 anos, saudáveis, que não fizeram uso de drogas, álcool ou medicamentos nos dias que antecederam os experimentos.

As peçonhas brutas e liofilizadas de *Lachesis muta muta*, *Bothrops atrox*, *B. jararacussu* foram obtidas comercialmente no serpentário Bioagents (Batatais, São Paulo). Os ácidos fenólicos cafeico e sirínico foram adquiridos da Sigma Aldrich TM. As peçonhas de serpente e ácidos fenólicos foram dissolvidos em solução salina tamponada com fosfato (PBS) para uso e armazenados ao abrigo da luz e sob refrigeração (- 12° C). Os outros reagentes utilizados foram de qualidade analítica e pertenciam às marcas Merck, Synth e Uniscience.

A extração da enzima hepática de frango, succinato desidrogenase, ocorreu por dissolução em solução de sacarose e tampão fosfato, sendo armazenada em freezer à - 20° C.

2.1 Eletroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes (SDS-PAGE)

Amostras de peçonha da espécie *Bothrops atrox*, *B. jararacussu* e *Lachesis muta muta* na concentração de 80µg/µL foram previamente incubadas com 20µg e 40µg de ácidos cafeico e siríngico (1:0,5 e 1:25; m/m), por 30 minutos a 37° C, assim como controles contendo peçonhas ou fenólicos isoladamente foram submetidas ao mesmo tempo e temperatura. Em seguida, os incubados foram submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de agentes desnaturantes, conforme metodologia descrita por Laemmli (1970). A corrida foi realizada por aproximadamente 3 horas, programada a 110V e 300mA.

No tampão de amostra foram utilizados agentes quelantes (EDTA), redutor (2-mercaptoetanol), detergente aniônico (SDS-dodecil sulfato de sódio), sacarose para conferir maior densidade à mistura de moléculas e azul de bromofenol possibilitando a visualização do término da corrida. O gel de empacotamento foi elaborado a 6% de poliacrilamida e o gel de separação a 12% em poliacrilamida. As amostras também foram aquecidas em banho de ebulição, por 5 minutos. O tampão de corrida foi constituído por Tris 1,5%, glicina 9,4% e solução de SDS a 10%. Ao término da corrida o gel foi corado com uma solução de *Coomassie brilliant blue G 250*/ metanol/ ácido acético e descorado com ácido acético a 10%.

2.2 Eletroforese em gel de agarose para análise da fragmentação de DNA humano

A extração de DNA de sangue humano foi realizada conforme descrita por LAHIRI e NUMBERGER (1991). A qualidade do DNA foi verificada pelo equipamento Nanodrop e por eletroforese. O DNA foi pré-incubado com ácido cafeico ou siríngico (3, 7,5 e 15 µg diluídos em PBS) por 10 minutos e depois foi incubado com soluções de peçonha de *B. atrox*, *B. jararacussu* and *Lachesis muta muta* (30µg µL⁻¹) por mais 30 minutos. Os incubados apresentaram as concentrações de 1:0,1, 1:0,25 e 1:0,5 (m/m; peçonha: fenólico). As amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose para análise da fragmentação do DNA e coradas com Gel Red. Controles contendo apenas DNA e DNA acrescido apenas dos fenólicos, também foram avaliados.

2.3 Teste do Cometa

O teste cometa foi utilizado para a detecção de dano no DNA em células individualizadas de leucócitos de sangue periférico humano. Os tratamentos correspondem à peçonha de *L. muta muta* (50µg) com ácido cafeico e siríngico em diferentes proporções (1: 0,01, 1:0,05, 1:0,1 e 1:0,25) e peçonha de *B. atrox* (50 µg) com ácido siríngico em diferentes proporções (1:0,05, 1:0,1 e 1:0,25). Os incubados continham 300 µL de sangue, 200 µL de PBS e 100 µL de citrato de sódio, para cada tratamento, seguindo com incubações por 4 h à 37°C. Desta solução foi retirada uma alíquota de 45 µL e adicionada a 300 µL de agarose LPM (low melting point). Desta mistura, foram pipetados em triplicata 100 µL em cada lâmina e estas foram tratadas seguindo o protocolo do ensaio cometa conforme descrito por Nandhakumar et al. (2011). Após a eletroforese programada a 25V, 300mA por 35 min, os nucleoides, precipitados com etanol, foram visualizados por coloração com iodeto de propídeo, classificados e fotografados utilizando um microscópio de epifluorescência. A análise dos danos foi realizada por escore visual conforme classes previamente descritas por Collins et al. (1997) com adaptações nas classes 3, danos entre 40-85% e 4, danos > 85%.

2.4 Inibição da Succinato desidrogenase

A extração da enzima hepática de frango seguiu o protocolo descrito por Tanaka; Ishibashi; Toyomizu (1995) com adaptações. A enzima teve uma diluição 1:20 em solução de sacarose 0,25M em tampão fosfato 0,05M pH 7,4. As soluções para a reação foram preparadas com água, tampão fosfato 0,1 mol.L⁻¹, succinato de sódio 0,1 mol.L⁻¹, KCN 0,05 mol.L⁻¹ e DCPI 0,0004 mol.L⁻¹, sendo uma delas acrescida de um inibidor conhecido, da succinato desidrogenase, o ácido malônico 0,1 mol.L⁻¹. A reação foi interrompida com ácido malônico 0,3 mol.L⁻¹ em banho de gelo.

O succinato é reduzido à fumarato e FADH₂. O FADH₂ doa um par de elétrons para o DCPI formando FAD e DCPI-H₂, por isso, os cálculos para a atividade enzimática foram realizados segundo Lambert-beer ($A = \epsilon \cdot b \cdot c$), no qual o ϵ (coeficiente de absortividade molar), correspondente à absortividade do DCPI no comprimento de onda de 600nm, foi 21500 µmol.L⁻¹.cm⁻¹ (BARDAWEEL et al, 2011), b é o caminho óptico e a concentração (c) é a própria atividade da enzima em U. mL⁻¹ e a porcentagem de inibição (I %) é a diferença desta atividade.

Todas as reações foram feitas em triplicata. Para padronização do teste, foram feitos vários ensaios (não mostrados) a fim de validar a melhor concentração do inibidor (ácido malônico), do substrato e da enzima. Além disso foi avaliado o efeito dos ácidos fenólicos sobre a atividade da enzima na presença ou

ausência do inibidor competitivo bem como o efeito inibidor de compostos fenólicos sobre o possível envenenamento mitocondrial induzido por peçonhas de serpentes.

2.4.2 Simulações de ancoramento molecular e estudo mecânico quântico

Com a finalidade de se obter a conformação inicial dos ácidos cafeico e siríngico, necessários para os estudos de ancoramento molecular, suas estruturas tridimensionais foram construídas no programa *HyperChem Release 7.03* (Hyperchem, 2002). A geometria foi otimizada e as cargas parciais atômicas calculadas através do método semi-empírico AM1 (DEWAR et al., 1985).

As coordenadas da estrutura cristalográfica da enzima succinato desidrogenase aviária complexada com malonato foram obtidas a partir do banco de dados *Protein Data Bank* (PDB) (<http://www.rcsb.org/pdb>) cujo código é o 2H89, e a resolução do cristal desta proteína é de 2.4 Å.

O programa utilizado para o cálculo das energias do ancoramento molecular foi o *Molegro Virtual Docker* (MVD) (THOMSEN; CHRISTENSEN, MOLDOCK, 2006), sendo que este permite determinar a conformação mais provável de interação do ligante com uma macromolécula. As estruturas tridimensionais dos compostos previamente minimizadas foram transferidas para o programa MVD e cada inibidor foi ancorado ao sítio ativo da enzima succinato desidrogenase utilizando como referência o malonato, por possuir uma estrutura química muito similar à dos compostos estudados.

No intuito de estudar as energias de interações entre o malonato e os dois ácidos fenólicos, cálculos de orbitais moleculares (HOMO - (highest occupied molecular orbital e LUMO - lowest unoccupied molecular orbital) no nível Hartree-Fock com a função de base 6-31G, foram realizados. É importante salientar que estas propriedades medem o caráter doador/aceptor dos elétrons em um composto fornecendo o índice de reatividade química, ou seja: quanto maior a energia do HOMO, maior a capacidade elétron-doadora e, quanto menor a energia do LUMO menor será a resistência para aceitar elétrons. Além disso, uma pequena diferença de energia entre HOMO e LUMO implica em uma alta reatividade, e enquanto uma maior diferença entre HOMO e LUMO implica em uma baixa reatividade.

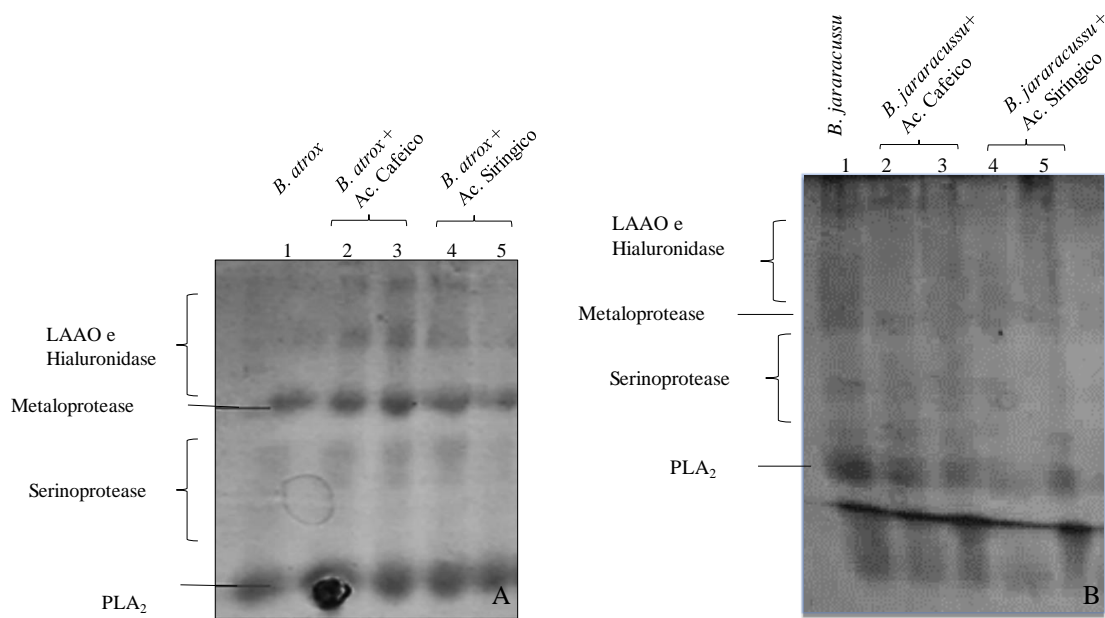
Análise estatística

Os dados foram submetidos a uma análise de variância unidirecional (ANOVA), e as médias de todos os parâmetros analisados foram comparadas utilizando o teste de Scott Knott a um nível de 5% de probabilidade. A análise estatística foi realizada utilizando o programa estatístico "R" (R Development Core Team, 2011).

3 Resultados

3.1 SDS-PAGE

Ao comparar o perfil eletroforético do controle (amostra 1) das Figuras 1A, 1B e 1C com as demais amostras conclui-se que não houve alteração no perfil de migração, logo, nas condições avaliadas não houve quebras nas estruturas das enzimas, correspondentes às principais classes de toxinas presentes nas peçonhas (Proteases e fosfolipases A₂), nem ligações covalentes, sugerindo a presença de interações fracas (interações de hidrogênio e hidrofóbicas) entre as enzimas e os compostos fenólicos. Esse resultado corrobora a ação inibidora dos ácidos fenólicos sobre a atividade genotóxica induzida por estas classes de toxinas.



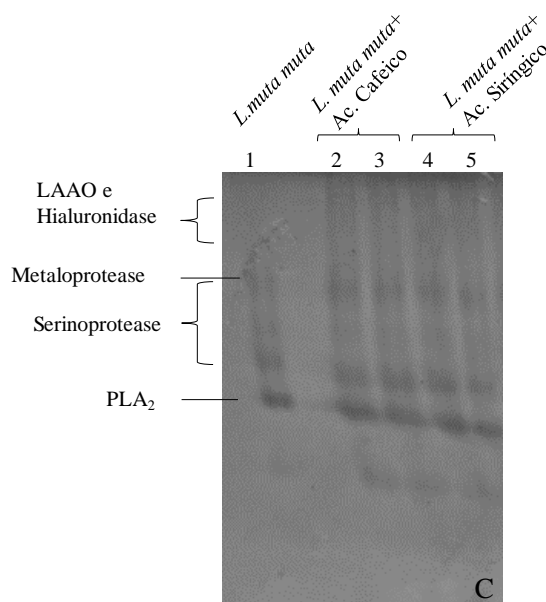


Figura 1. Perfil Eletroforético (SDS-PAGE) de peçonhas previamente incubadas com os ácidos cafeico e siríngico. **(A)** amostras: 1- *Bothrops atrox* (100µg), 2- *B. atrox* + ácido cafeico (1:0,25; m/m), 3- *B. atrox* + ácido cafeico (1:0,5; m/m), 4- *B. atrox* + ácido siríngico (1:0,25; m/m), 5- *B. atrox* + ácido siríngico (1:0,5; m/m). **(B)** amostras: 1- *Bothrops jararacussu* (100µg), 2- *B. jararacussu* + ácido cafeico (1:0,25; m/m), 3- *B. jararacussu* + ácido cafeico (1:0,5; m/m), 4- *B. jararacussu* + ácido siríngico (1:0,25; m/m), 5- *B. jararacussu* + ácido siríngico (1:0,5; m/m). **(C)** amostras: 1- *Lachesis muta muta* (100µg), 2- *L. muta muta* + ácido cafeico (1:0,25; m/m), 3- *L. muta muta* + ácido cafeico (1:0,5; m/m), 4- *L. muta muta* + ácido siríngico (1:0,25; m/m), 5- *L. muta muta* + ácido siríngico (1:0,5; m/m).

3.2 Eletroforese em gel de agarose para análise da fragmentação de DNA humano

O ácido cafeico (Figura 2, Poços 2-7) protegeu o DNA de leucócitos de forma mais eficiente que o ácido siríngico (Figura 3, Poço 3) quando pré-incubados isoladamente com o material genético. Sugere-se que haja proteção contra a fragmentação espontânea que ocorre pela exposição das moléculas de DNA à alterações de temperatura, radiação, choques mecânicos e outros agentes físicos durante a realização do teste.

O ácido cafeico quando pré-incubado com DNA não foi capaz de inibir a degradação deste, induzida pelas peçonhas de *B. atrox* e *B. jararacussu*. O ácido cafeico nas proporções 1: 0,1, 1: 0,25 e 1: 0,50 (peçonha: composto fenólico; m:m) inibiu parcialmente a fragmentação, induzida pela peçonha de *L. muta muta*. Isto pode ser observado nas bandas que correspondem a fragmentos de alto peso molecular (Número 14-19) assim como pelas moléculas de DNA integras que permaneceram retidas na parte superior do gel (Figura 2).

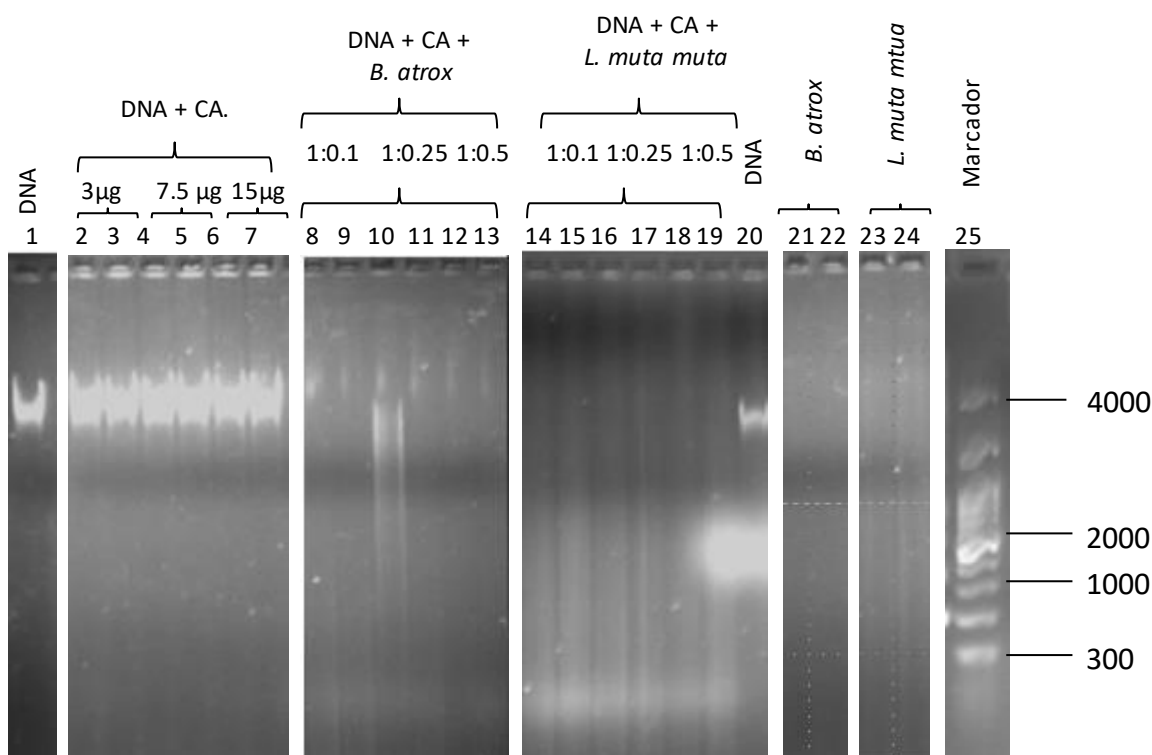


Figura 2. Perfil eletroforético para visualização dos efeitos de peçonhas ofídicas e ácido cafeico sobre a estrutura de moléculas de DNA. 1- DNA; 2-7- DNA e ácido cafeico; 8-13- diferentes concentrações de ácido cafeico pré-incubado com DNA, em seguida foi adicionado peçonha de *B. atrox* (30µg); 14-19- diferentes concentrações de ácido cafeico pré-incubado com DNA, em seguida foi adicionada peçonha de *L. muta muta* (30µg); 20- DNA; 21-22- DNA + *B. atrox*; 23-24- DNA + *L. muta muta*; 25-Marcador: marcador de peso molecular em pares de bases. Todos os tratamentos foram realizados em duplicata. CA: Caffeic acid.

Na incubação prévia de 10 µL de DNA (303,5ng/µL) com o ácido siríngico a 37°C por 10 minutos e posterior adição de peçonha de *Bothrops atrox*, seguindo com incubação por mais 30 minutos à 37 °C, as menores proporções 1: 0,1 e 1: 0,25 (peçonha: composto fenólico; m:m) houve inibição da degradação de moléculas de DNA induzida por peçonha de *B. atrox* (Poços 4-7) (Figura 3). Sugere-se que o ácido siríngico interagiu com o DNA protegendo-o contra o ataque exercido por toxinas da peçonha de *B. atrox*, então, uma nutrição epigenética que contenha ácido siríngico poderia atuar na proteção do DNA contra danos oxidativos induzidos por enzimas ou mesmo por outros agentes químicos ou físicos. Na presença de *L. muta muta* o ácido siríngico não inibiu a degradação do DNA em nenhuma das doses e em nenhum das proporções, nas condições avaliadas (resultado não mostrado).

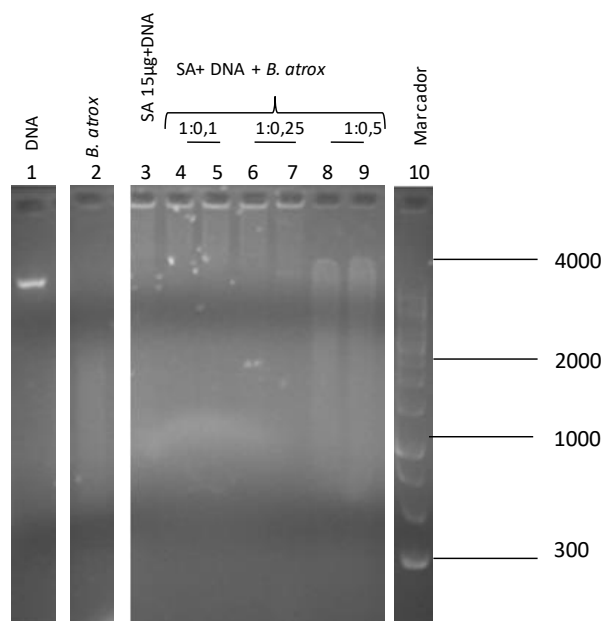


Figura 3. Perfil eletroforético para visualização dos efeitos de peçonhas ofídicas e ácido siríngico (SA) sobre a estrutura de moléculas de DNA. 1- DNA; 2- *B. atrox* (30µg) + DNA; 3- DNA + ácido siríngico; 4-9- diferentes concentrações de ácido siríngico pré-incubado com DNA, em seguida foi adicionada peçonha de *B. atrox*; 10- Marcador: marcador de peso molecular em pares de bases. Todos os tratamentos foram realizados em duplicata.

A peçonha de *B. jararacussu* não induziu fragmentação do DNA nas condições avaliadas, sendo seu uso descontinuado para este teste.

3.3 Teste do Cometa

A análise das classes de cometas mostrou que não houve danos ao DNA dos leucócitos quando incubados com 5 µg de ácido cafeico, assim como no controle negativo (PBS). Ainda para o ácido cafeico, houve redução de 9 vezes, na fragmentação induzida pela peçonha de *L. muta muta*, nas menores proporções (1:0,01 e 1:0,05 peçonha: composto fenólico; m:m) avaliadas e de 6 vezes na proporção 1:0,1 para cometas de classe 4, quando comparado ao controle contendo apenas peçonha. Entretanto, na maior proporção (1:0,25 peçonha: composto fenólico; m:m) o ácido cafeico não foi capaz de inibir os danos de nível 4 e aumentou em 1,7 vezes os danos de nível 3, quando comparado com os danos induzidos pela peçonha de *L. muta muta* (Tabela 1).

Com base nos valores de unidades arbitrárias, concluiu-se que nas proporções analisadas o ácido cafeico não induziu danos ao DNA e nem foi capaz de inibir os danos causados pela peçonha de *L. muta muta* (Figura 4).

Tabela 1. Distribuição das classes de cometa e suas frequências em nucleoides tratados com o ácido cafeico, com a peçonha de *Lachesis muta muta* e com pré-incubados contendo peçonha de *Lachesis muta muta* mais ácido cafeico.

Tratamentos		Nucleoides em cada Classes de Cometa (%) ¹				
		0 (< 5%)	1 (5-20%)	2 (20-40%)	3 (40-85%)	4 (>85%)
C (-)		53	43,33	3,67	0	0
Ácido Cafeico (5 µg mL ⁻¹)		57,67	32,33	10	0	0
<i>L.muta muta</i> (50 µg mL ⁻¹)		0	52,67	31	10,33	6
<i>L.muta muta</i> + ácido cafeico (m/m)	(1: 0,01)	0	51,67	46	1,67	0,67
	(1: 0,05)	0	35,67	59,33	4,33	0,67
	(1: 0,1)	9,33	38	50	1,67	1
	(1: 0,25)	0	4,33	52,67	35,66	7,33

¹Os dados representam as médias dos valores obtidos em 3 lâminas, sendo 100 nucleoides analisados em cada lâmina, e 3 lâminas/tratamento/voluntário. ² Controle negativo: PBS.

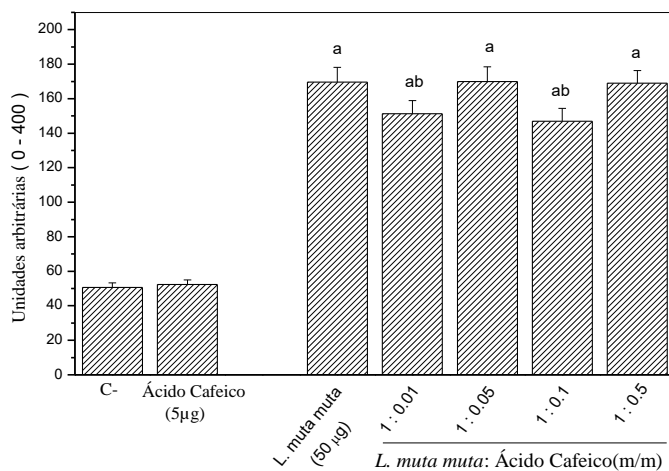


Figura 4. Teste do cometa para avaliação dos potenciais genotóxico e/ou antigenotóxico do ácido cafeico sobre nucleoides obtidos de leucócitos de sangue periférico humano. A peçonha de *Lachesis muta muta* foi utilizada como controle indutor de fragmentação nas moléculas de DNA. Controle negativo: PBS. Unidades arbitrárias calculadas conforme descrito por Collins et al. (2004): (1 x número de nucleoides em classe 1) + (2 x número de nucleoides em classe 2) + (3 x número de nucleoides em classe 3) + (4 x número de nucleoides em classe 4). a = difere estatisticamente do controle negativo. b = difere estatisticamente do controle positivo.

Na análise da frequência de danos o ácido siríngico, quando incubado isoladamente com o DNA, induziu danos de nível 4 aos nucleoides. O ácido siríngico inibiu os danos causados pela peçonha de *L. muta muta*, embora tenha potencializado o efeito genotóxico induzido pela peçonha de *B. atrox*. Para os danos induzidos pela peçonha de *B. atrox* o maior número de nucleoides classificados como 3 e 4 foram obtidos na presença das menores doses do composto fenólico, sendo o aumento de danos inversamente proporcional à dose avaliada (Tabela 2).

Diferentemente, o ácido siríngico foi eficaz em inibir a genotoxicidade induzida pela peçonha de *L. muta muta* reduzindo os nucleoides classificados como 4, quando comparados com o controle contendo apenas a peçonha, sendo o aumento de danos proporcional à dose avaliada (Tabela 3).

As unidades arbitrárias comprovam a inibição da genotoxicidade, induzida pela peçonha de *L. muta muta*, exercida pelo ácido siríngico, sendo observadas inibições estatisticamente significativas para as proporções 1:0,05, 1:0,1 e 1:0,25 (peçonha: composto fenólico; m:m). As reduções nos valores de unidades arbitrárias foram tão expressivas que os valores observados para os tratamentos foram estatisticamente iguais aos obtidos para o controle negativo (Figura 5B). Contudo, para os tratamentos de ácido siríngico

junto a peçonha e *B. atrox*, foram observados aumentos significativos da genotoxicidade nas proporções 1:0,05 e 1:0,1 (peçonha: composto fenólico; m:m), e diminuição estatisticamente significativa ($p < 0,05$) de 1,4 vezes na proporção 1:0,25 comparando-se os valores de unidades arbitrárias dos tratamentos com o valor obtido para o controle contendo apenas peçonha de *B. atrox* (Figura 5A).

Tabela 2. Distribuição das classes de cometa e suas frequências em nucleoides tratados com o ácido siríngico, com a peçonha de *Bothrops atrox* e com pré-incubados contendo peçonha de *Bothrops atrox* mais ácido siríngico.

Tratamentos		Nucleoides em cada classe de Cometa (%) ¹				
		0 (< 5%)	1 (5-20%)	2 (20-40%)	3 (40-85%)	4 (>85%)
C (-) ²		0	78,33	0	0	0
Ácido Siríngico (5 µg mL ⁻¹)		16,73	45,45	0	0,22	5,42
Ácido Siríngico (12,5 µg mL ⁻¹)		32	64,33	0	0,33	3,33
<i>B. atrox</i> (50 µg mL ⁻¹)		0	43	35,67	17	4,33
<i>B. atrox</i> + Ácido Siríngico (m/m)	(1: 0.05)	13	43,33	5,67	6,33	31,67
	(1: 0.1)	8,67	37,67	7,67	18	28
	(1: 0.25)	26,67	51	3,33	2,33	16,67

¹Os dados representam as médias dos valores obtidos em 3 lâminas, sendo 100 nucleoides analisados em cada lâmina, e 3 lâminas/tratamento/voluntário. ² Controle negativo: PBS.

Tabela 3. Distribuição das classes de cometa e suas frequências em nucleoides tratados com o ácido siríngico, com a peçonha de *Lachesis muta muta* e com pré-incubados contendo peçonha de *Lachesis muta muta* mais ácido siríngico.

Tratamentos		Nucleoides em cada classe de Cometa (%) ¹				
		0 (< 5%)	1 (5-20%)	2 (20-40%)	3 (40-85%)	4 (>85%)
C (-) ²		0	78,33	0	0	0
Ácido Siríngico (5 µg mL ⁻¹)		19,33	52,53	0	0,26	6,27
Ácido Siríngico (12.5 µg mL ⁻¹)		32	64,33	0	0,33	3,33
<i>L. muta muta</i> (50 µg mL ⁻¹)		0	47	13,67	11	28,33
<i>L. muta muta</i> + Ácido Siríngico (m/m)	(1: 0.01)	24,2	77,16	28	2	5,21
	(1: 0.05)	29,67	65	0	0	5,33
	(1: 0.1)	22,33	72,33	0	1	4,33
	(1: 0.25)	0	66	0	0	3,67

¹Os dados representam as médias dos valores obtidos em 3 lâminas. sendo 100 nucleoides analisados em cada lâmina. e 3 lâminas/tratamento/voluntário. ²Controle negativo: PBS.

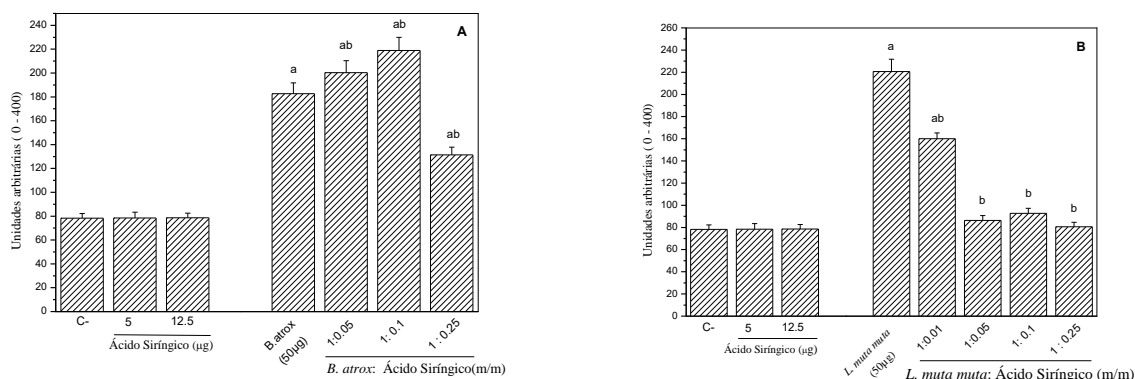


Figura 5. Teste do cometa para avaliação dos potenciais genotóxico e/ou antigenotóxico do ácido siríngico sobre nucleoides obtidos de leucócitos de sangue periférico humano. (A) peçonha de *B. atrox* foi utilizada como controle indutor de fragmentação nas moléculas de DNA. (B) peçonha de *Lachesis muta muta* foi utilizada como controle indutor de fragmentação nas moléculas de DNA. Controle negativo: PBS. Unidades arbitrárias calculadas conforme descrito por Collins et al. (2004): (1 x número de nucleoides em classe 1) + (2 x número de nucleoides em classe 2) +

(3 x número de nucleoides em classe 3) + (4 x número de nucleoides em classe 4). a = difere estatisticamente do controle negativo. b = difere estatisticamente do controle positivo.

3.4 Succinato desidrogenase

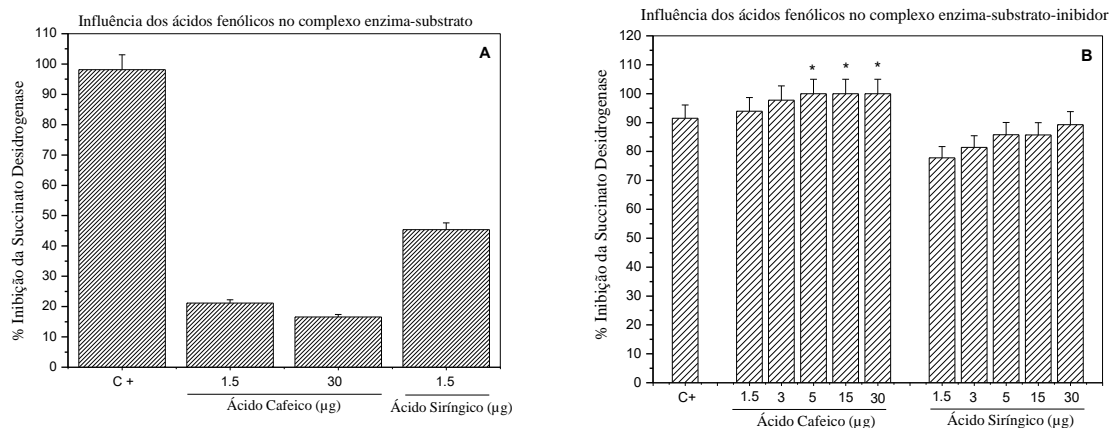


Figura 6. (A) Inibição da atividade da succinato desidrogenase pelos ácidos cafeico e siríngico isoladamente. C (+): atividade avaliada na presença do inibidor ácido malônico. (B) Inibição da atividade da succinato desidrogenase pelos ácidos cafeico e siríngico na presença do ácido malônico. C (+): atividade avaliada na presença do inibidor ácido malônico. Os ácidos fenólicos foram pré-incubados com a enzima por 30 minutos à 37°C, em seguida foi adicionado o substrato + ácido malônico (1:1). Os resultados correspondem às médias de triplicatas de dados obtidos em cada proporção. *Potencialização estatisticamente significativa da inibição da atividade da enzima.

O ácido siríngico apresentou uma inibição mais expressiva que o ácido cafeico sobre a atividade da enzima succinato desidrogenase (Figura 6A).

Ao analisar a influência do ácido cafeico na atividade da enzima, presença de enzima-substrato-inibidor, o fenólico exerceu inibições significativamente diferentes do controle (ácido malônico) nas doses de 5, 15 e 30 µg, potencializando a inibição do ácido malônico ou somando sua ação à do inibidor. Para o ácido siríngico, foram observadas reduções na porcentagem de inibição exercida pelo ácido malônico, principalmente nas doses menores (1,5 e 3 µg), embora estas não tenham sido significativamente diferentes do controle positivo (Figura 6B).

Tabela 4. Atividade da Succinato desidrogenase na presença do inibidor e de diferentes concentrações dos ácidos fenólicos

		Atividade da Succinato Desidrogenase (U.mL ⁻¹)			Atividade da Succinato Desidrogenase (U.mL ⁻¹)
Amostras			Amostras		
Ácido Cafeico (µg)	1.5	0.0009	Ácido Siríngico (µg)	1.5	0.0008
	3	0.0009		3	0.0007
	5	0.0008		5	0.0005
	15	0.0006		15	0.0005
	30	0.0006		30	0.0004
	C-	0.0043		C-	0.0035
C+	0.0011	C+	0.0004		

C(-): Enzima e substrato; C(+) Enzima, substrato: ácido malônico (1:1). Tratamentos correspondem à incubação prévia dos ácidos fenólicos com a enzima por 30 minutos à 37°C, em seguida foi adicionado o substrato + ácido malônico (1:1) e a atividade foi medida por minuto de reação. Os resultados correspondem às médias de triplicatas de dados obtidos em cada proporção.

As peçonhas não induziram inibição da succinato desidrogenase, nas condições avaliadas, sendo seu uso descontinuado para este teste.

3.5 Análise computacional

A melhor conformação de cada ligante foi selecionada de acordo com sua posição no sítio ativo da succinato desidrogenase (E.C. 1.3.5.1), sendo que a conformação escolhida para cada um (ácido cafeico e ácido siríngico) foi aquela que possuía o maior grau de similaridade espacial com o ácido malônico que se encontrava cristalizado na proteína obtida do PDB. Os resultados teóricos obtidos do ancoramento molecular foram avaliados e comparados com base nos resultados experimentais descritos anteriormente.

As conformações escolhidas foram utilizadas para a análise das interações com os resíduos de aminoácidos do sítio ativo. Para avaliar melhor os fatores mais relevantes para a potência dos compostos, os seguintes parâmetros foram calculados: (a) energia de ligação de hidrogênio entre o ligante e a proteína ($E_{Lig.H}$); (b) energia intramolecular do ligante (E_{Intra}); (c) energia intermolecular (E_{inter}); (d) energia de escore. Observando a tabela 5, a diferença entre a energia intermolecular dos compostos aumenta seguindo a tendência, ácido siríngico < ácido cafeico < ácido malônico, isto é, ácido malônico interage mais fortemente

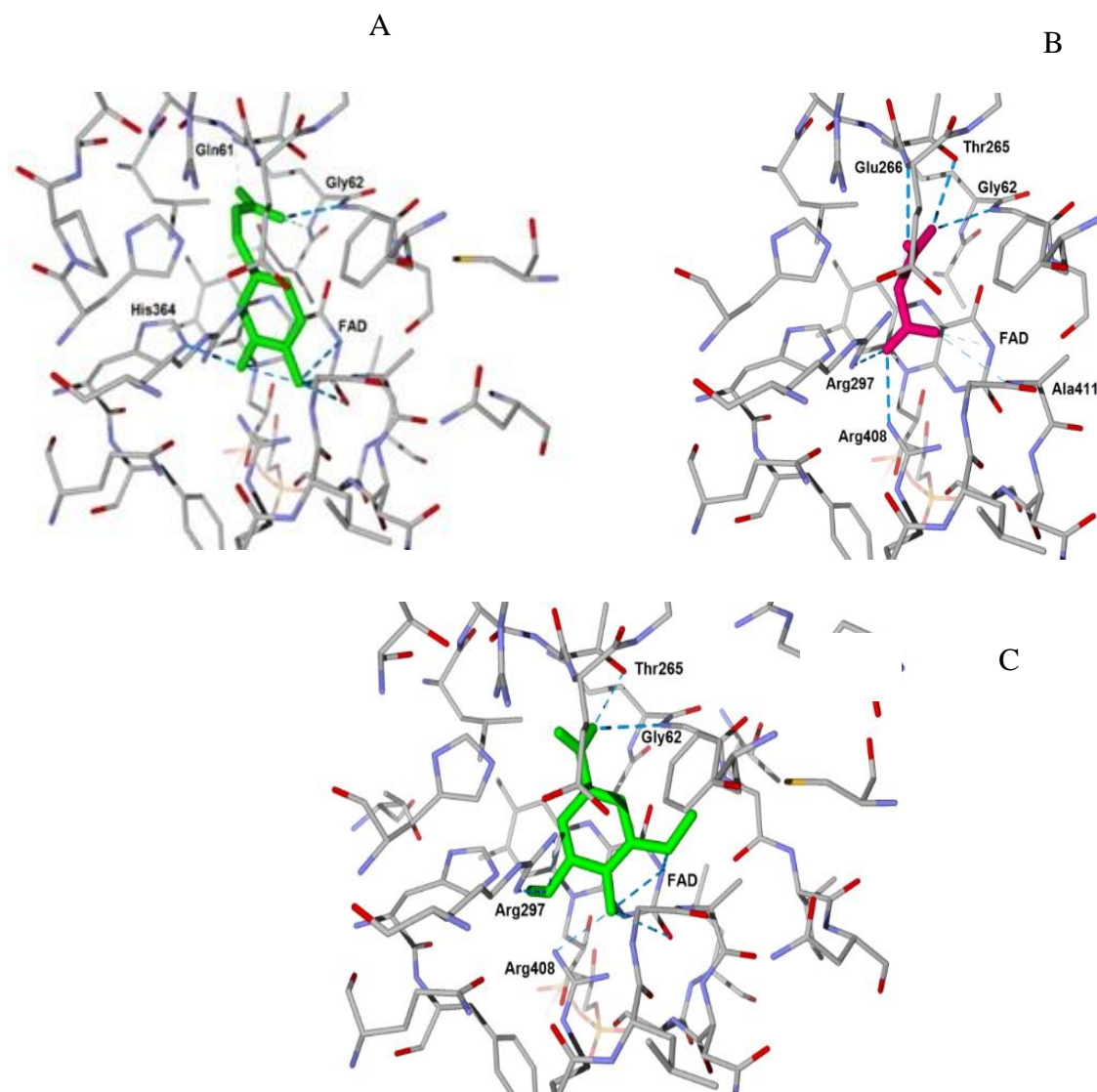
com a succinato desidrogenase que os outros compostos. Este resultado corrobora os dados da tabela 6. Analisando as ligações de hidrogênio entre os três compostos e a enzima foi observado: (i) todos os compostos interagem com FAD e Gly62; (ii) os ácidos siríngico e malônico interagem com Thr265 e Arg297; (iii) somente o ácido siríngico interage com Arg408; (iv) somente o ácido cafeico interage com His364. A figura 7 apresenta os compostos no interior do sítio ativo.

Tabela 5. Valores de energia obtidas do ancoramento entre a enzima succinato desidrogenase e os inibidores.

Compostos	$E_{Lig.H}(kcal\ mol^{-1})$	$E_{Intra}(kcal\ mol^{-1})$	$E_{inter}(kcal\ mol^{-1})$	$E_{score}(kcal\ mol^{-1})$
Ácido malônico	-11,74	3,42	-81,25	-78,59
Ácido cafeico	-2,3	3,85	-31,84	-27,99
Ácido siríngico	-4,76	9,95	-29,75	-19,79

Fonte: Molegro Virtual Docker

Figura 7. Resultado do ancoramento molecular entre a enzima succinato desidrogenase e os ácidos fenólicos



Ácido Cafeico (A), ácido malônico (B) e ácido siríngico (C). Os tracejados azuis representam as interações tipo ligação de hidrogênio.

Fonte: Imagens geradas pelo software Molegro Virtual Docker

As energias dos orbitais sem fronteira HOMO e LUMO foram calculadas no intuito de observar qual dos dois fenólicos interage melhor com o ácido malônico (Tabela 6). Calculando-se a diferença de energia entre o HOMO do ácido malônico, observa-se um alto valor de energia, demonstrando uma alta

capacidade doadora deste orbital. A energia do LUMO também é elevada e revela que o ácido malônico não tem grande capacidade de receber elétrons. Desta forma, pode-se concluir que o HOMO do ácido malônico será um dos orbitais mais importantes para racionalizar o mecanismo de interação. A partir da Tabela 6, pode-se concluir que a diferença de energia HOMO (ácido malônico)-LUMO (demais compostos) não é significativa comparada a diferença LUMO (ácido malônico)-HOMO (demais compostos). Assim, estes compostos podem interagir fora ou no interior do sítio ativo da enzima. Finalmente, a diferença de energia entre o LUMO do ácido siríngico e cafeico é muito pequena, o que corrobora os dados experimentais (Tabela 6).

Tabela 6. Energias do HOMO e LUMO (eV).

Composto	HOMO	LUMO
Ácido malônico	$2,26.10^{24}$	$3,83.10^{25}$
Ácido cafeico	$-9,98.10^{24}$	$1,61.10^{25}$
Ácido siríngico	$-9,29.10^{24}$	$1,85.10^{25}$

Fonte: Software HyperChem Release 7.03

4. Discussão

Os ácidos cafeico e siríngico foram previamente estudados quanto à genotoxicidade e citotoxicidade, sendo sua ação avaliada sobre diferentes linhagens de células normais e cancerosas, considerando sua atividade antioxidante ou pró-oxidante (LI et al., 2000).

Estes compostos são antioxidantes por abstrair o elétron da espécie reativa de oxigênio (ERO), gerada durante a atividade catalítica de enzimas como a catalase, formando assim, um híbrido com estruturas de ressonância estável. O ácido cafeico pode ser mais estável pois o elétron pode envolver-se numa ressonância entre o anel benzênico e a ligação dupla dos carbonos adjacentes até converter-se em uma molécula menos reativa. Este fenólico mostrou-se capaz de prevenir a ruptura de fitas simples de DNA e a citotoxicidade (SESTILI et al., 2002). A ação antioxidante deste composto pode ser um dos mecanismos propostos para o efeito protetor exercido pelo ácido cafeico sobre moléculas de DNA (Figura 2).

Por outro lado, há mecanismos que podem ser aplicados para esclarecer a atividade pró-oxidativa do ácido cafeico, ao mobilizar o cobre endógeno (redução do Cu celular para Cu I), possivelmente ligado à

cromatina, e a consequente produção de ERO. Tal mecanismo leva à ruptura de DNA internucleosomal (um marcador de apoptose). O ácido cafeico é melhor pró-oxidante que o ácido siríngico por possuir um grupo catecol (anel diidroxibenzênico), grupo essencial para a clivagem do DNA. Desta forma é uma propriedade interessante para ser explorada em estudos que buscam caracterizar compostos anti-tumorais (KAGAWA et al, 1994; BHAT; AZMI; HADI, 2007). Assim, a caracterização de diferentes proporções moleculares resultam em informações relevantes sobre as doses adequadas de cada fenólico para obtenção de ação anti-oxidante ou pró-oxidante, considerando os alvos que se pretende atingir com o uso destes compostos.

No estudo da eletroforese em gel de agarose, o ácido cafeico protegeu as moléculas de DNA de leucócitos (Figura 2) o que corrobora os dados de Bhat, Azmi e Hadi (2007) que avaliaram a ação do ácido cafeico nas concentrações de 50 e 100 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ e observaram que não houve fragmentação do DNA de linfócitos. Contudo, os mesmos autores relataram a presença de fragmentação do DNA nas doses de 200 e 400 $\mu\text{mol.L}^{-1}$, sugerindo um mecanismo de redução de íons cobre presentes na cromatina e consequente geração de radicais hidroxila e outras espécies reativas de oxigênio *in situ* (BHAT; AZMI; HADI, 2007).

Em outro estudo, os ácidos cafeico e siríngico (0,002, 0,004, 0,008, 0,016 e 0,032 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) são descritos como protetores da fragmentação de DNA de plasmídeo pBR contra danos induzidos por H_2O_2 e radiação UV. O perfil de migração eletroforética em gel de agarose, revelou uma proteção menos efetiva na menor dose avaliada (SEVGI; TEPE; SARIKURKCU, 2015) estes resultados são condizentes com os obtidos no presente trabalho (Figura 2 e 3), embora tenham sido avaliadas doses maiores (7,5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, 15 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) e moléculas de DNA de origem diferente (leucócitos sanguíneos humanos).

A genotoxicidade das peçonhas de serpente pode ser atribuída a inúmeras enzimas, proteínas e peptídeos que a compõem. Pesquisas sobre proteômica permitem a comparação da composição proteica de peçonhas de diferentes espécies de serpentes. A peçonha de *B. atrox* é rica em metaloproteases das classes PI e P-III (58-74%) seguida por fosfolipases A_2 (6,4-14%), desintegrinas (3,2-9%) e serinoproteases (7-11%) (KOHLHOFF et al, 2012), a peçonha de *B. jararacussu* contém fosfolipases A_2 (35%), House Keeping – requeridos para a manutenção da função celular básica, expressos de todos os tipos celulares de um organismo (25%), seguido de metaloproteases (16%) (CORREA-NETTO, et al, 2010, KASHIMA et al, 2004). A peçonha de *L. muta muta* (SANZ et al, 2008) é abundante em metaloproteases (31,9%) e serinoproteases (31,2%). Essas relevantes diferenças na composição das peçonhas podem explicar parcialmente a diferença entre os resultados do cometa, nos ensaios com ácido siríngico, na tentativa de inibir os danos induzidos pelas peçonhas de *B. atrox* e *L. muta muta* (Figura 5A e 5B).

Embora as LAAOs representem uma pequena porcentagem do conteúdo proteico das peçonhas, sua ação na geração de espécies reativas também deve ser considerada, atribuindo a elas importante papel na indução de danos às moléculas de DNA. Por outro lado é importante salientar que mesmo na ausência

de peróxido de hidrogênio a genotoxicidade da LAAO persiste. Em ensaios com diversas peçonhas, dentre elas *B. jararacussu*, foi detectada atividade anti-*Leishmania amazonenses* atribuída principalmente à ação de LAAO (CISCOTTO et al., 2009). Diversas outras investigações científicas atribuem a toxicidade das LAAOs à atividade enzimática geradora de ERO (altamente reativa e danosa em sua atuação sobre estruturas celulares e moléculas livres), contudo, outros mecanismos têm sido propostos uma vez que estas enzimas exercem efeitos biológicos e farmacológicos (incluindo indução de agregação plaquetária, apoptose, hemorragia, citotoxicidade, além de atividade antimicrobiana, antifúngica, antitumoral e antiprotozoários) que, em muitos estudos, se mostraram apenas parcialmente dependentes da geração de espécies reativas de oxigênio (IZIDORO et al., 2014).

Em adição, a toxina BatxLAAO, isolada de peçonha de *B. atrox* e as toxinas BjussuMP-II, BthTX-I e BthTX-II isoladas de *B. jararacussu* demonstraram potencial genotóxico quando analisadas sobre linfócitos humanos através dos testes do cometa e micronúcleo (MARCUSSEI et al., 2011; 2013). Sendo importante ressaltar que após a atuação do sistema dos checkpoints celulares, as células conseguiram corrigir parte dos danos induzidos pela BjussuMP-II sobre as moléculas de DNA.

Em testes cometa com células de hepatoma de ratos, as quais foram tratadas por 24 horas, com o ácido cafeico nas doses de 50, 500 e 1500µg, diluído em DMSO 1%, não foi observada ação genotóxica (MAISTRO et al. 2011), entretanto em ensaios de pré-tratamento de linfócitos de sangue com este ácido fenólico (1,5 e 10 µg / mL) foi observada redução nos comprimentos das caudas dos nucleoides, comparado aos nucleoides do controle indutor de danos (exposição por 30 minutos à radiação UVB, 280-320nm), havendo ação protetora do ácido cafeico sobre a ação da radiação (PRASAD; JEYANTHIMALA; RAMACHANDRAN, 2009). Estes dados corroboram os observados no presente trabalho (Figura 4 e 5) e apontam a necessidade de avaliação dos ácidos fenólicos em doses ainda menores.

Outras propriedades descritas apontam o éster fenético do ácido cafeico (CAPE) como principal componente ativo presente na própolis, apresentando potencial antibacteriano, antiviral, antifúngico, antioxidante, anti-inflamatório e anticarcinogênico. Em adição, CAPE atua como um inibidor da histona desacetilase (HDAC), uma classe de fármacos designada como agente epigenético que modula a atividades de oncogenes e genes supressores de tumores. Por se tratar de uma molécula que pode inibir HDAC, direta ou indiretamente, nos diferentes subtipos de câncer da mama (OMENE et al, 2013), apresenta-se promissora no âmbito médico-científico. De acordo com estas observações, sugere-se que este mecanismo possa também ser considerado para explicar parcialmente os resultados obtidos no presente trabalho (Figuras 2 e 3).

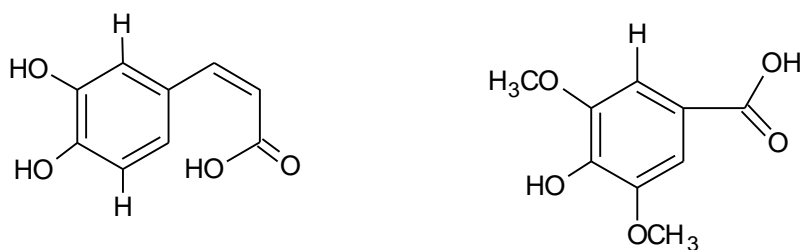
Compostos fenólicos apresentam propriedades mitocondriótropas, isto é, atuam na modulação da atividade enzimática dos componentes do sistema de fosforilação oxidativa e do ciclo de Krebs, logo, por

estar envolvida nestes processos, a succinato desidrogenase foi escolhida para os ensaios por ser a única enzima que reduz o FAD no ciclo de Krebs (NEUZIL et al., 2013).

Desta forma, o envenenamento mitocondrial, resultando em ação citotóxica, pode ser avaliado ao inibir a succinato desidrogenase (SDH) hepática de frango. Há uma interação da SDH com malonato através dos resíduos: ALA 74B, CYS 73B, SER 72B, ARG 62B, PRO 113B, LEU 11B, PHE 61B, VAL 112B, LEU 102B, MET 75B. Componentes presentes na resina obtida de *Gardenia lucida*, rica em polimetoxiflavonas, e o malonato, ligam-se, na mesma enzima, a resíduos de aminoácidos diferentes, logo, estes flavonoides, realizam interação não específica com a SDH (MAURYA et al., 2017). De forma similar, as interações dos ácidos cafeico e siríngico com os resíduos de aminoácidos da succinato desidrogenase mostram-se transientes e fracas (interações iônicas), considerando as alterações induzidas na atividade da enzima na presença e ausência do inibidor (malonato) e as forças de interações obtidas nas análises computacionais.

Ao observar as estruturas dos ácidos fenólicos (Figura 8) o ácido cafeico faz mais interações de hidrogênio com a SDH pois apresenta mais grupos hidroxilas. Já o ácido siríngico apresenta grupos metoxi que são mais volumosos e deixam a hidroxila mais impedida para fazer a ligação de hidrogênio dados que corroboram com a Tabela 5. A Figura 6 mostra que o ácido siríngico inibe de forma mais significativa a atividade catalítica da succinato desidrogenase (SDH) em relação ao ácido cafeico. Apesar disso, os resultados apontam que a interação do ácido cafeico com a enzima SDH apesar de ser mais forte não é capaz de interferir na atividade enzimática de forma significativa.

Figura 8: Ácido cafeico e Ácido Siríngico



Fonte: ChemSketch

5. Conclusão

Neste contexto, os ácidos fenólicos podem ser antioxidantes ao sequestrar elétrons de ROS ou pró-oxidantes ao formar ROS em moléculas de DNA de leucócitos, dependente das doses utilizadas que permeiam diferentes ações como, por exemplo, a interação com o cobre intracelular, presente na cromatina, e sua redução para Cu (I) (BHAT; AZMI; HADI, 2007; KAGAWA et al, 1994). Os compostos fenólicos avaliados foram capazes de inibir a ação genotóxica induzida por moléculas presente em peçonhas de serpentes, principalmente, proteases, fosfolipases A₂ e L-aminoácido oxidases. Os fenólicos foram capazes de interagir com o a succinato desidrogenase sendo potenciais inibidores do ciclo de Krebs e da cadeia transportadora de elétrons, podendo ser explorados como agentes citotóxicos e/ou apoptóticos contra células cancerosas. Ainda, os fenólicos alteraram a ação do inibidor ácido malônico, produzido endogenamente em grandes quantidades em algumas patologias, podendo sua ação ser modulada com doses e formas de administração adequadas dos fenólicos.

Além disso, as proteínas de peçonhas de serpentes atuaram como ferramentas valiosas na indução de genotoxicidade e resultados promissores, da ação inibidora exercida pelos compostos fenólicos, foram obtidos. Novos estudos poderão contribuir para o entendimento dos mecanismos de ação dos ácidos fenólicos, assim como dos fatores que afetam sua atividade, sabendo de antemão que estes compostos são capazes de interagir com enzimas (proteínas), substratos e inibidores, com íons, espécies reativas, e em adição com moléculas de DNA (LU; CLEMETSON; CLEMETSON, 2005; MAURYA et al., 2017).

Referências

BHAT, S. H.; AZMI, A. S.; HADI, S. M. Prooxidant DNA breakage induced by caffeic acid in human peripheral lymphocytes: involvement of endogenous copper and a putative mechanism for anticancer properties. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 218, n. 3, p.249-55, Feb. 2007.

BARDAWEEL, S. et al. 2011. E. Coli Histidine Triad Nucleotide Binding Protein 1 (Echint) Is a Catalytic Regulator of D-Alanine Dehydrogenase (Dada) Activity *in Vivo*. **PLoS ONE**, v. 6, n. 7, p.1–9, 2011.

CHEEMANAPALLI, et al. Exploring the Binding Affinity of Novel Syringic Acid Analogues and Critical Determinants of Selectivity as Potent Proteasome Inhibitors. **Anticancer Agents in Medicinal Chemistry**, v. 16, n. 11, p. 1496-1510, 2016.

CISCOTTO, P. et al. Antigenic, microbicidal and antiparasitic properties of an L-amino acid oxidase isolated from *Bothrops jararaca* snake venom. **Toxicon**, Belo Horizonte, v. 53, n. 3, p. 330-341, Mar. 2009.

COLLINS, A. Comet assay in human biomonitoring studies: reliability, validation, and applications. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, v. 30, p. 139-4630, jun. 1997.

COLLINS, A. R. The Comet Assay for DNA Damage and Repair: Principles, Applications, and Limitations. *Molecular Biotechnology*, v. 26, p. 249-261, Mar. 2004.

CORREA-NETTO, et al. Immunome and venom of *Bothrops jararacussu*: A proteomic approach to study the molecular immunology of snake toxins. *Toxicon*, v. 55, p. 1222–1235, 2010.

DERVARTANIAN, D. V.; VEEGER, C. Studies on succinate dehydrogenase: I. Spectral properties of the purified enzyme and formation of enzyme-competitive inhibitor complexes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Specialized Section on Enzymological Subjects*. v. 92, n. 2, p. 233-247, 22 Nov. 1964.

DEWAR, M.J.S. et al. The development and use of quantum-mechanical molecular-models.76. AM1-A new general-purpose quantum-mechanical molecular-model. *Journal of the American Chemical Society*. v.107, p.3902–3909, 1985.

DHANANJAYA, B. L.; GOWDA, T. V.; D'SOUZA, C. J. M. Evidence for existence of venom 5' nucleotidase in multiple forms through inhibition of concanavalin A. *Cell Biochemistry and Function*, v. 28, n. 7, p. 620-622, Oct 2010.

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

IZIDORO, L. F. M. et al. Snake Venom L-Amino Acid Oxidases: Trends in Pharmacology and Biochemistry. *Biomed Research International*, Uberlândia, v. 2014, 19p, 2014.

KAGAWA, T.F.; et al. Covalent modification of guanine bases in double-stranded DNA: the 1:2-AZ-DNA structure of dC(cacacg) in the presence of CuCl₂. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 266, p. 20175–20184, 1994.

KASHIMA S. et al. Analysis of *Bothrops jararacussu* venomous gland transcriptome focusing on structural and functional aspects : I—gene expression profile of highly expressed phospholipases A₂, *Biochimie*. v. 86, n. 3, p. 211–219, March 2004.

KOHLHOFF, M. et al. Exploring the proteomes of the venoms of the Peruvian pit vipers *Bothrops atrox*, *B. barnetti* and *B. pictus*. *Journal of Proteomics*, v. 75, n. 7, p.2181-95, Apr. 2012.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, v. 227, p. 680-685, aug. 1970.

LAHIRI, D. K.; NURNBERGER, J. I. JR. A Rapid Non-Enzymatic Method for the Preparation of HMW DNA from Blood for RFLP Studies. *Nucleic Acids Research*, v. 19, n. 19, p. 5444, oct. 1991.

LENNON, F.E.; SINGLETON, P.A. Hyaluronan regulation of vascular integrity. **American Journal of Cardiovascular Disease**, v. 1, n. 3, p. 200-13, Sep. 2011

LI, A. S. H. et al. DNA-Breaking versus DNA-protecting activity of four phenolic compounds *in vitro*. **Free Radical Research**, v. 33, n. 5, p. 551-566, 2000.

LU, Q.; CLEMETSON, J. M.; CLEMETSON, K. J. Snake venoms and hemostasis. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, v. 3, n. 8, p. 1791-9, Aug. 2005.

MAISTRO, E. L. et al. *In vitro* genotoxicity assessment of caffeic, cinnamic and ferulic acids. **Genetics and Mocular Research**, v. 10, n. 2, p. 1130-40, jun. 2011.

MARCUSSI, S. et al. Evaluation of the genotoxicity of *Crotalus durissus terrificus* snake venom and its isolated toxins on human lymphocytes. **Mutation Research-Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 724, n. 1-2, p. 59-63, Sep. 2011.

MARCUSSI, S. et al. Genotoxic effect of *Bothrops* snake venoms and isolated toxins on human lymphocyte DNA. **Toxicon**, v. 65, p. 9-14, Apr. 2013.

MAURYA, P. et al. Characterization of Bioactive Constituents from the Gum Resin of *Gardenia Lucida* and Its Pharmacological Potential. **Biomedicine & Pharmacotherapy** -v. 85, p. 444–56, 2017.

NAKAD, R.; SCHUMACHER, B. DNA Damage Response and Immune Defense: Links and Mechanisms. **Frontiers in Genetics**, v. 9; n. 7, p. 147, 2016.

NANDHAKUMAR, S. et al. Evaluation of DNA Damage Using Single-Cell Gel Electrophoresis (Comet Assay). **Journal of Pharmacology & Pharmacotherapeutics**, v. 2, n. 2, p. 107–11, 2011

NASCIMENTO, J.; COLLARES-BUZATO, C.; HYSLOP, S. Apoptosis induced by an acidic deoxyribonuclease (DNase II) from *Bothrops alternatus* snake venom in MDCK cells. **Febs Journal**, v. 275, p. 265-265, Jun. 2008.

NAUMANN, G. B. et al. Cytotoxicity and inhibition of platelet aggregation caused by an L-amino acid oxidase from *Bothrops leucurus* venom. **Biochimica Et Biophysica Acta-General Subjects**, v. 1810, n. 7, p. 683-694, Jul 2011.

NEUZIL, J. Classification of mitocans, anti-cancer drugs acting on mitochondria. **Mitochondrion** v. 13, n. 2013, p.199–208, 2013.

OMENE, C. et al. Propolis and its Active Component, Caffeic Acid Phenethyl Ester (CAPE), Modulate Breast Cancer Therapeutic Targets via an Epigenetically Mediated Mechanism of Action. **Journal of Cancer Science and Therapy**, v. 5, n. 10, p.334–342, 2013.

PRASAD, N. R.; JEYANTHIMALA, K.; RAMACHANDRAN, S. Caffeic acid modulates ultraviolet radiation-B induced oxidative damage in human blood lymphocytes. **Journal of Photochemistry and Photobiology. Biology**, v. 95, n. 3, p.196-203, jun. 2009.

PRASAD, N. R. et al. Caffeic Acid Modulates Ultraviolet Radiation-B Induced Oxidative Damage in Human Blood Lymphocytes. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 95, n. 3, p.196–203, 2009.

RAMAWAT, K. G.; MÉRILLON, J-M. **Natural Products – Phytochemistry, Botany and Metabolism of Alkaloids, Phenolics and Terpens**, v. 3, Springer reference. v. 3, p.1951-1969, 2013.

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

SARWAR T. et al. Caffeic acid binds to the minor groove of calf thymus DNA: A multi-spectroscopic, thermodynamics and molecular modelling study. **International Journal of Biological Macromolecules**, Aligarh, v. 98, p. 319-328, Fev. 2017.

SESTILI, P. et al. Plant-derived phenolic compounds prevent the DNA single-strand breakage and cytotoxicity induced by tert-butylhydroperoxide via an iron-chelating mechanism. **The Biochemical Journal**, v. 364, n.(Pt 1), p.121-8, May. 2002.

SEVGI, K.; TEPE, B.; SARIKURKCU, C. Antioxidant and DNA Damage Protection Potentials of Selected Phenolic Acids Gallic Acid. **Food and Chemical Toxicology**, v. 77, p. 12–21, 2015.

TANAKA, M., ISHIBASHI, T.; TOYOMIZU, M. Time Course of Oxidative Phosphorylation in Liver Mitochondria of Chickens Fed on High-protein Diet. **British Poultry Science**, Niigata, v. 36, n. 1, p. 143–54, 1995.

THOMSEN, R.; CHRISTENSEN, M. H. MOLDOCK: A new technique for high-accuracy molecular docking. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 49, n. 11, p. 3315-3321, Jun. 2006.

VANESSA, S. G. et al. Morelloflavone and Its Semisynthetic Derivatives as Potential Novel Inhibitors of Cysteine and Serine Proteases. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 9, n. 13, p. 426–34, 2015.

1 **ARTIGO 2**

2 **Gallic acid and Vanilic acid: specific interactions with cytogenotoxic molecules**

3

4 Tatiane Silva de Abreu¹, Mariana Aparecida Braga¹, Gustavo Henrique Andrade Machado¹,
5 Pedro Henrique Souza César¹, Elaine Fontes Ferreira da Cunha², Silvana Marcussi^{1*}

6

7

8

9 ¹Chemistry Department, Biochemistry Laboratory, Universidade Federal de Lavras (UFLA),
10 Campus UFLA, Lavras, Minas Gerais, 37200-000, Brazil.

11 ²Chemistry Department, Computacional Chemistry Laboratory, Universidade Federal de Lavras
12 (UFLA), Campus UFLA, Lavras, Minas Gerais, 37200-000, Brazil.

13

14

15

16

17 *Author for corresponding: Dra. Silvana Marcussi, Biochemistry Laboratory, Department of
18 Chemistry, Federal University of Lavras, University Campus, CP: 3037, Lavras 37200-000, Brazil
19 (telefax number: +55(35)3829-1271, e-mail: marcussi@dqi.ufla.br).

20

21 Artigo formatado segundo as normas da revista *International Journal of Biological*
22 *Macromolecules*.

23 **Resumo**

24 Diferentes compostos fenólicos tem sido alvo de prospecções farmacológicas e nutraceuticas. No presente
25 trabalho, foram avaliadas interações entre os ácidos gálico e vanílico e toxinas presentes em peçonhas de
26 serpentes, que resultam em ação inibitória de moléculas com potencial genotóxico como, por exemplo,
27 proteases, fosfolipases A₂ e peptídeos com ação sobre canais iônicos. No teste de fragmentação de DNA de
28 leucócitos de sangue periférico humano, avaliado por eletroforese em gel de agarose, as peçonhas de *L.*
29 *muta muta* e *B. atrox* mostraram-se genotóxicas, sendo esta atividade parcialmente inibida pelos compostos
30 fenólicos avaliados, principalmente na proporção de 1:0,5 (peçonha: fenólico; m:m). A peçonha de *B.*
31 *jararacussu*, nas condições avaliadas, não induziu fragmentação de DNA. A ação antígenotóxica dos ácidos
32 gálico e vanílico foi confirmada pelo teste do cometa realizado em leucócitos humanos, no qual foram
33 observadas inibições significativas sobre a fragmentação de DNA induzida por peçonha de *B. atrox* e *L.*
34 *muta muta* após incubações com os fenólicos em proporções que variaram de 0,01 a 0,25 (m: m). A maior
35 inibição foi obtida para a proporção de 1:0,25 de peçonha de *B. atrox* previamente incubada com ácido
36 vanílico, em que o valor de unidades arbitrárias foi reduzido em 73% se igualando ao observado para o
37 controle negativo. Os resultados sugerem a presença de interações moleculares fracas entre as toxinas
38 presentes nas peçonhas de serpentes das espécies *Bothrops atrox*, *Bothrops jararacussu* e *Lachesis muta*
39 *muta* com os ácidos gálico e vanílico, uma vez que não foram observadas alterações no perfil de migração
40 das toxinas quando avaliadas por SDS-PAGE após incubação com os compostos fenólicos. A reversão da
41 inibição da succinato desidrogenase pelo malonato na presença dos ácidos fenólicos foi considerada
42 estatisticamente significativa apenas as inibições observadas para o ácido gálico nas doses de 3 e 5µg.
43 Análises computacionais realizadas com a succinato desidrogenase de fígado de frango, usada nos ensaios
44 e altamente homóloga à enzima humana, demonstram a presença de energias favoráveis à ligação dos
45 compostos ao inibidor assim como à enzima. Neste contexto, os compostos fenólicos em baixas doses
46 podem proteger moléculas de DNA contra a ação de agentes genotóxicos, sendo promissores no tratamento
47 de doenças, como coadjuvantes farmacológicos ou na nutrição epigenética. Contudo, novos estudos são
48 necessários para ampliar a caracterização destas moléculas, uma vez que a análise experimental
49 fundamentada pela computacional revelou não apenas interações dos fenólicos com o ácido malônico, mas
50 também com a enzima succinato desidrogenase.

51

52

53

54 **Palavras-chave:** compostos fenólicos; Fragmentação do DNA; Peçonhas de serpentes; Inibidores

55 enzimáticos; Modelagem molecular; Atividade das mitocôndrias.

56

57

58

59

60

61 **ABSTRACT**

62 Different phenolic compounds have been the subject of pharmacological and nutraceutical prospects. In the
63 present work, interactions between gallic and vanillic acids and toxins present in snake venoms which were
64 evaluated, result in the inhibitory action of molecules with genotoxic potential, such as proteases,
65 phospholipases A2 and peptides with action on ion channels. In the DNA fragmentation test of human
66 peripheral blood leucocytes, evaluated by agarose gel electrophoresis, the venoms of *L. muta muta* and *B.*
67 *atrox* were genotoxic. This activity was partially inhibited by the phenolic compounds evaluated, mainly in
68 the ratio of 1: 0.5 (venom: phenolic; w: w). The highest inhibition was obtained for the ratio of 1: 0.25 of
69 *B. atrox* venom previously incubated with vanillic acid, in which the value of arbitrary units was reduced
70 by 73%, equal to that observed for the negative control. The results suggest the presence of weak molecular
71 interactions between the toxins present in the snakes venoms of *Bothrops atrox*, *Bothrops jararacussu* and
72 *Lachesis muta muta* with gallic and vanillic acids, since no changes in the migration profile of the toxins
73 were observed when evaluated by SDS-PAGE after incubation with the phenolic compounds. Inhibitions
74 were exerted by the phenolics on the action of the malonic acid inhibitor, being considered statistically
75 significant only the inhibitions observed for gallic acid in doses of 3 and 5 μg . Computational analyzes
76 performed with chicken liver succinate dehydrogenase, used in the tests and highly homologous to the
77 human enzyme, demonstrate the presence of energies favorable to the binding of the compounds to the
78 inhibitor as well as to the enzyme. In this context, low dose phenolic compounds can protect DNA molecules
79 against the action of genotoxic agents, being promising in the treatment of diseases, as pharmacological
80 adjuvants or in epigenetic nutrition. However, new studies are needed to extend the characterization of these
81 molecules, since the experimental analysis based on the computational revealed not only interactions of
82 phenolics with malonic acid but also with the enzymes succinate dehydrogenase.

83
84 **Keywords:** phenolic compounds; DNA fragmentation; snake venoms; enzymatic inhibitors; molecular
85 modeling; mitochondria activity.

86

87

88

89

90

91

92

93

94

95

96 **Introdução**

97
98 Ácidos fenólicos são moléculas simples que possuem um anel aromático e pelo menos um de seus
99 substituintes é um grupo hidroxila. Na natureza são provenientes do metabolismo secundário dos vegetais
100 pela via do chiquimato e pela via dos fenilpropanoides (RANDHIR; LIN; SHETTY, 2004). Além das
101 funções que desempenham nas plantas como alelopatia, proteção contra patógenos e predadores estas
102 moléculas podem apresentar propriedades farmacológicas e nutricionais relevantes para os humanos e
103 animais.

104 O ácido gálico (ácido 3,4,5 trihidroxibenzoico) é usado como um aditivo antioxidante nos alimentos
105 e na indústria farmacêutica. Pode ter propriedades quimiopreventivas contra o câncer. É encontrado em
106 alimentos na amora, geleia de marmelo, cravos, castanhas, soja, couve flor, berinjela, chicória e azeitona.
107 Já o ácido vanílico (ácido 4-hidroxi-3-metoxibenzoico) é encontrado em cereais como arroz parboilizado,
108 integral e refinado, milho, aveia, azeite de oliva, óleo de soja, orégano, amêndoa e azeitona.

109 Os compostos fenólicos destacam-se por suas propriedades antioxidantes por conseguirem abstrair
110 a espécie reativa de oxigênio, formarem um híbrido de ressonância estável e finalmente uma quinona,
111 reduzindo desta forma a propagação do dano que os radicais livres podem proporcionar às células,
112 membranas, organelas e até ao DNA (ANANTHARAJU et al., 2016). Os ácidos fenólicos também
113 apresentam atividades antiofídicas (CARVALHO et al., 2013), antitumorais, antígenotóxicas
114 (DHANANJAYA et al., 2009; DHANANJAYA; GOWDA; D'SOUZA, 2010) e epigenética ao modularem
115 a sinalização celular e desenvolvimento de doença relacionada com a expressão gênica (BUSCH et al.,
116 2015).

117 O mecanismo epigenético do ácido gálico consiste em diminuir a secreção de citocinas inflamatórias
118 através da regulação da histona acetiltransferase / histona desacetilase em monócitos humanos induzidos
119 por taxa de alta glicose desta forma o ácido gálico pode ter potencial para o tratamento e prevenção da
120 diabetes e suas complicações (LEE et al, 2015).

121 Outra ação do ácido gálico é agir como inibidor não competitivo da HAT (Histona acetiltransferase)
122 reduzindo assim o desenvolvimento de processos inflamatórios (CHOI et al, 2009). Um desequilíbrio de
123 acetilação de proteínas e desacetilação em sinalização celular pode levar a doenças humanas, incluindo
124 inflamação e câncer. Mais de 70 proteínas são reguladas pela acetilação dos seus resíduos de lisina
125 (GLOZAK et al, 2005).

126 Um recente alvo de estudo para o tratamento de inúmeras doenças tem sido sobre as mitocôndrias,
127 organelas que estão presentes na maioria das células e são importantíssimas para o metabolismo celular. A
128 nossa escolha foi pela enzima succinato desidrogenase (SDH) desidrogenase succínica, succinato ezima Q

129 redutase ou Complexo II que está enzima ligada à membrana interna mitocondrial e participa no ciclo de
130 Krebs ao converter o succinato à fumarato e na cadeia de transporte de elétrons ao reduzir a ubiquinona em
131 ubiquinol.

132 Os compostos fenólicos fazem parte de um grupo de moléculas classificados como mitocans, que
133 são mitocôndrias-alvo, isto é, drogas mitocondriótropas anticâncer, derivadas de compostos fenólicos
134 como quercetina e resveratrol têm sido sintetizados e relatados para induzir eficientemente a morte de
135 linhagens de células cancerígenas *in vitro* (GORLACH; FICHNA; LEWANDOWSKA, 2015). No entanto,
136 os compostos fenólicos podem ligar-se com malato ou succinato e interferir no ciclo de Krebs quando
137 analisados pela quantidade de FADH₂ produzido (MAURYA ET AL. 2017).

138 Dentre os aspectos funcionais e estruturais, a succinato desidrogenase animal apresenta 4
139 subunidades (HUANG; MILLAR, 2013), sendo observada homologia funcional e alta porcentagem de
140 homologia estrutural (91,8 %) entre a enzima de *Avian*, utilizada no presente trabalho e a de *Homo sapiens*
141 (podendo desta forma extrapolar os resultados para análises em humanos). O ácido malônico também
142 chamado de ácido propanodioico é um inibidor reversível competitivo da succinato desidrogenase
143 (DERVARTANIAN; VEEGER, 1964) impedindo desta forma a respiração celular desencadeando a
144 citotoxicidade.

145 As peçonhas de serpentes apresentam uma diversidade de enzimas dentre elas algumas proteases
146 que podem clivar enzimas envolvidas na síntese de DNA e na cromatina e fosfolipases que quebram
147 glicerofosfolipídeos. Estas moléculas são ferramentas indutoras de danos e podem ser usadas a fim de
148 complementar a caracterização das atividades dos fenólicos trazendo mais informações para possibilitar a
149 aplicação com eficácia e segurança (ARUN et al., 2014; DHANANJAYA et al., 2009; MARCUSSI et al.,
150 2012; MARCUSSI et al., 2013).

151 Em face deste exposto, o objetivo deste trabalho foi avaliar *in vitro* as interações
152 moleculares entre as peçonhas de *Bothrops atrox*, *Bothrops jararacussu* e *Lachesis muta muta* e os ácidos
153 fenólicos por SDS-PAGE. Em sequência foi analisado a fragmentação do DNA de sangue periférico
154 humano induzido por peçonha destas serpentes com tratamento do ácido gálico e vanílico por eletroforese
155 em gel de agarose e pelo teste do cometa. Posteriormente, foi avaliada a atividade da enzima succinato
156 desidrogenase na presença do inibidor competitivo, ácido malônico, dos ácidos fenólicos ou de ambos, e
157 em complementação, análises computacionais foram feitas para verificar as possíveis interações entre as
158 moléculas.

159 O objetivo foi avaliar a influência dos ácidos fenólicos gálico e vanílico na fragmentação do DNA
160 induzida por peçonhas de serpente e na reversão da inibição da enzima succinato desidrogenase pelo
161 malonato ou ainda a ação destes fenólicos sobre a enzima succinato desidrogenase.

162 **Material e métodos**

163 O experimento conduzido está de acordo com as normas do Comitê de Ética em Pesquisa Humana
164 (COEP) da Universidade Federal de Lavras e aprovado por este comitê (Nº CAAE 56618616.9.0000.5148).

165 O sangue usado foi obtido de voluntários do sexo masculino e feminino, entre 20 e 35 anos,
166 saudáveis, que não fizeram uso de drogas, álcool ou medicamentos nos dias que antecederam os
167 experimentos.

168 As peçonhas brutas e liofilizadas de *Lachesis muta muta*, *Bothrops atrox*, *B. jararacussu* foram
169 obtidas comercialmente no serpentário Bioagents (Batatais, São Paulo). Os ácidos fenólicos gálico e
170 vanílico foram adquiridos a Sigma Aldrich™. As peçonhas de serpente e ácidos fenólicos foram dissolvidos
171 em solução salina tamponada com fosfato (PBS) para uso e armazenados ao abrigo da luz a - 12° C. Os
172 demais reagentes utilizados foram em grau analítico e pertenciam às marcas Merck, Synth e Uniscience.

173 A extração de fígado de frango da enzima succinato desidrogenase ocorreu por dissolução em
174 solução de sacarose e tampão fosfato, sendo armazenada à - 20° C.

175

176 **2.1 Eletroforese SDS-PAGE**

177 Amostras de peçonha das espécies *Bothrops atrox*, *B. jararacussu* e *Lachesis muta muta* na
178 concentração de 80µg/µL foram previamente incubadas com 20 µg e 40µg de ácidos gálico e vanílico (1:
179 0,5 e 1:25 m:m), por 30 minutos a 37°C, assim como controles contendo peçonhas ou fenólicos isoladamente
180 foram submetidos às mesmas condições de incubação. Em seguida, os incubados foram submetidos à
181 eletroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes. A corrida eletroforética foi realizada por
182 aproximadamente 3 horas, programada a 100V e 300mA.

183 No tampão de amostra foram utilizados agentes quelantes (EDTA), redutor (2-mercaptoetanol),
184 detergente aniônico (SDS-dodecil sulfato de sódio), sacarose para conferir maior densidade à mistura de
185 moléculas e azul de bromofenol como marcador de frente. O gel de empacotamento foi elaborado a 6% de
186 poliacrilamida e o gel de separação a 12% em poliacrilamida. As amostras também foram aquecidas em
187 banho de ebulição, por 5 minutos. O tampão de corrida foi constituído por Tris 1,5%, glicina 9,4% e solução
188 de SDS a 10%. Ao término da corrida o gel foi corado com uma solução de *Coomassie brilliant blue G 250*/
189 metanol/ ácido acético e descorado com ácido acético a 10% conforme metodologia descrita por Laemmli
190 (1970).

191

192 **2.2 Eletroforese em gel de agarose para análise da fragmentação de DNA humano**

193 Foi realizado o protocolo de extração de DNA de sangue humano de acordo com Lahiri and
194 Numberger (1991). O DNA foi pré-incubado, por 10 minutos, com ácido gálico ou vanílico (3, 7,5 e 15 µg

195 diluídos em PBS) e em seguida foi incubado, por 30 minutos, com soluções de peçonhas de *B. atrox*, *B.*
196 *jararacussu* ou *Lachesis muta muta* ($30\mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$). As proporções foram de 1:0,1, 1:0,25 e 1:0,5 (m:m;
197 peçonha: fenólico) foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 1% para análise da fragmentação do
198 DNA e coradas com Gel Red.

199

200 **2.3 Teste do Cometa**

201 O teste cometa foi utilizado para a detecção de fragmentação em moléculas de DNA em células
202 individualizadas de leucócitos de sangue periférico humano. 300 μL de sangue com 200 μL de PBS e 100
203 μL de citrato de sódio e os tratamentos com peçonha *B. atrox* e *L. muta muta*, com os fenólicos em diferentes
204 proporções sendo incubados por 4 h à 37°C , desta solução foi retirado uma alíquota de 45 μL e adicionada
205 à 300 μL de agarose LPM (*low melting point*). Desta mistura, foram pipetados em triplicata 100 μL em cada
206 lâmina e estas foram tratadas conforme descrito por Nandhakumar et al. (2011). Após a eletroforese (25V,
207 300mA por 35 min), os nucleoides foram corados com iodeto de propídeo e analisados em microscópio de
208 epifluorescência. A classificação dos cometas mediante score visual foi feita conforme descrito por Collins
209 et al (1997) com adaptações nas classes 3 e 4 (40-85% e dano>85%, respectivamente).

210

211 **2.4 Inibição da Succinato desidrogenase**

212

213 A extração da enzima hepática de frango seguiu o protocolo descrito por Toyomizu et al. (1999)
214 revisado por Tanaka, Ishibashi e Toyomizu, 2007, com adaptações. A enzima teve uma diluição de 1:20 em
215 solução de sacarose $0,25 \text{ mol L}^{-1}$ em tampão fosfato $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ pH 7,4. As soluções para a reação foram
216 preparadas com água, tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, succinato de sódio $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, KCN $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ e DCPI
217 $0,0004 \text{ mol L}^{-1}$ enquanto que a solução do inibidor foi preparada em uma mesma composição porém com o
218 acréscimo de ácido malônico $0,1 \text{ mol L}^{-1}$. A reação foi interrompida com ácido malônico $0,3 \text{ mol L}^{-1}$ em
219 banho de gelo.

220 Os cálculos para a atividade enzimática foram realizados segundo Lambert-beer ($A = \epsilon \cdot b \cdot c$),
221 no qual A é a Absorbância, ϵ é o coeficiente de absortividade molar, correspondente ao comprimento de
222 onda de 600nm do DCPI, foi de $21500 \mu\text{mol.L}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ (BARDAWEEL et al., 2011), b é o caminho óptico e
223 a concentração (c) é a própria atividade da enzima em U. mL^{-1} . A porcentagem de inibição (I %) é a
224 diferença desta atividade. Todas as reações foram feitas em triplicata.

225

226

227

228 2.4.1 Simulações de ancoramento molecular e estudo mecânico quântico

229
230 Com a finalidade de se obter a conformação inicial dos ácidos gálico e vanílico, necessário para
231 os estudos de ancoramento molecular, suas estruturas tridimensionais foram construídas no programa
232 *HyperChem Release 7.03* (Hyperchem, 2002). A geometria foi otimizada e as cargas parciais atômicas
233 calculadas através do método semi-empírico AM1 (DEWAR et al., 1985).

234 As coordenadas da estrutura cristalográfica da enzima succinato desidrogenase aviária
235 complexada com malonato foram obtidas a partir do banco de dados *Protein Data Bank* (PDB)
236 (<http://www.rcsb.org/pdb>) cujo código é o 2H89, e a resolução do cristal desta proteína é de 2.4 Å.

237 O programa utilizado para o cálculo das energias do ancoramento molecular foi o *Molegro Virtual*
238 *Docker (MVD)* (THOMSEN; CHRISTENSEN; MOLDOCK, 2006), sendo que este permite determinar a
239 conformação mais provável de interação do ligante com uma macromolécula. As estruturas tridimensionais
240 dos compostos previamente minimizadas foram transferidas para o programa *MVD* e cada inibidor foi
241 ancorado ao sítio ativo da enzima succinato utilizando como referência o malonato, por possuir uma
242 estrutura química muito similar à dos compostos estudados.

243 No intuito de estudar as energias de interações entre o malonato e os dois ácidos fenólicos, foram
244 realizados cálculos de orbitais moleculares (HOMO - highest occupied molecular orbital e LUMO - lowest
245 unoccupied molecular orbital) no nível Hartree-Fock com a função de base 6-31G. É importante salientar
246 que estas propriedades medem o caráter doador/aceptor dos elétrons em um composto fornecendo o índice
247 de reatividade química, ou seja: quanto maior a energia do HOMO, maior a capacidade elétron-doadora e,
248 quanto menor a energia do LUMO menor será a resistência para aceitar elétrons. Além disso, uma pequena
249 diferença de energia entre HOMO e LUMO implica em uma alta reatividade, e enquanto uma maior
250 diferença entre HOMO e LUMO implica em uma baixa reatividade.

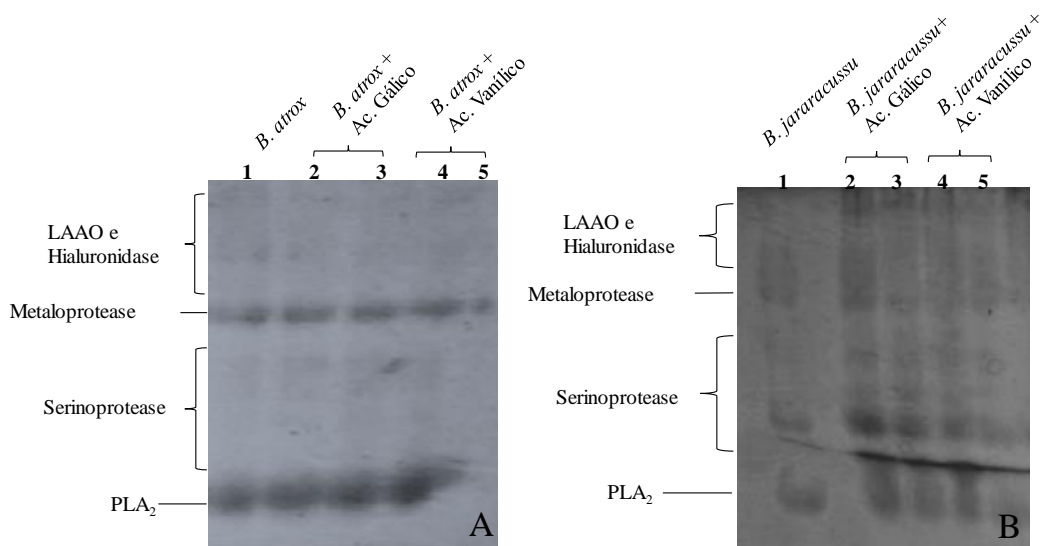
251 252 **Análise estatística**

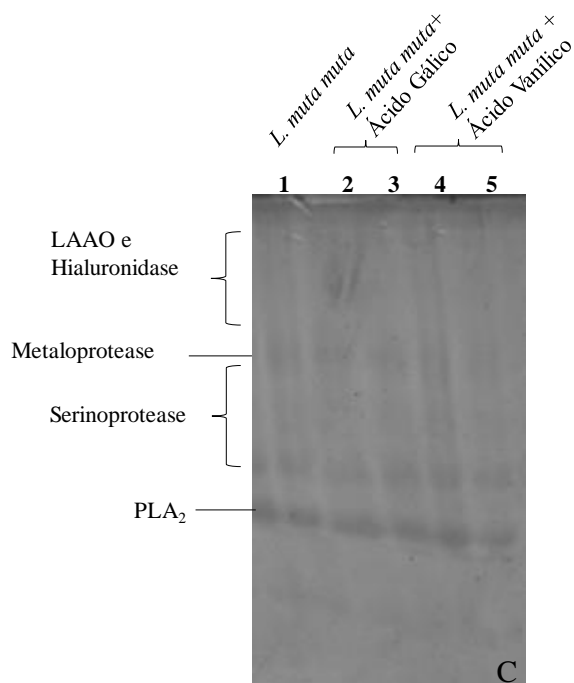
253 Os dados foram submetidos a uma análise de variância unidirecional (ANOVA), e as médias de
254 todos os parâmetros analisados foram comparadas utilizando o teste de Scott Knott a um nível de 5% de
255 probabilidade. A análise estatística foi realizada utilizando o programa estatístico "R" (R Development Core
256 Team, 2011).

257 258 **Resultados e Discussão**

259 **3.1 Eletroforese SDS-PAGE – interações entre os ácidos fenólicos e proteínas que compõem as** 260 **peçonhas**

261 A avaliação do perfil eletroforético das proteínas presentes nas peçonhas mostrou que não houve
 262 interações fortes e/ou irreversíveis (covalentes) destas com os ácidos gálico e vanílico, uma vez que não
 263 foram observadas alterações no perfil de migração das toxinas (Figura 1A, 1B e 1C), nas condições
 264 avaliadas. Assim, podem ser observadas íntegras as bandas correspondentes as principais classes de toxinas
 265 presentes nas peçonhas avaliadas, proteases e fosfolipases A₂. Sugere-se que os compostos fenólicos possam
 266 interferir em algumas atividades induzidas pelas enzimas, por meio de interações fracas como, por exemplo,
 267 de hidrogênio e hidrofóbicas. O ácido vanílico também foi avaliado após incubação com as peçonhas na
 268 proporção de 1:0,5 (m/m), porém a concentração elevada do composto vegetal interferiu na coloração das
 269 moléculas proteicas com o Coomassie, impossibilitando a visualização do perfil de corrida (dados não
 270 mostrados).





272
 273 Figura 1: Perfil Eletroforético (SDS-PAGE) de peçonhas previamente incubadas com os ácidos cafeico e siríngico.
 274 (A) amostras: 1- *Bothrops atrox* (100µg), 2- *B. atrox* + ácido cafeico (1:0,25; m/m), 3- *B. atrox* + ácido cafeico (1:0,5;
 275 m/m), 4- *B. atrox* + ácido siríngico (1:0,25; m/m), 5- *B. atrox* + ácido siríngico (1:0,5; m/m). (B) amostras: 1- *Bothrops*
 276 *jararacussu* (100µg), 2- *B. jararacussu* + ácido cafeico (1:0,25; m/m), 3- *B. jararacussu* + ácido cafeico (1:0,5; m/m),
 277 4- *B. jararacussu* + ácido siríngico (1:0,25; m/m), 5- *B. jararacussu* + ácido siríngico (1:0,5; m/m). (C) amostras: 1-
 278 *Lachesis muta muta* (100µg), 2- *L. muta muta* + ácido cafeico (1:0,25; m/m), 3- *L. muta muta* + ácido cafeico (1:0,5;
 279 m/m), 4- *L. muta muta* + ácido siríngico (1:0,25; m/m), 5- *L. muta muta* + ácido siríngico (1:0,5; m/m).

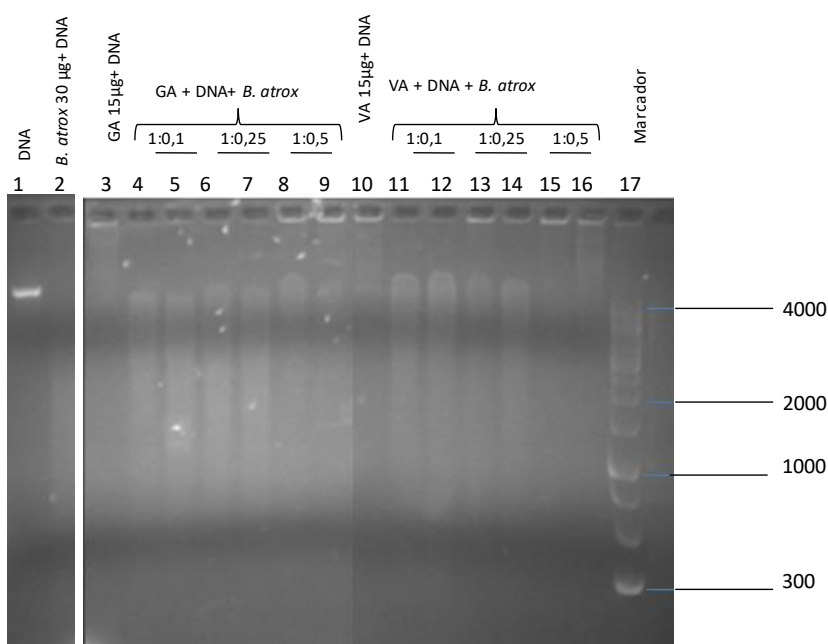
280
 281
 282 Alguns autores descrevem a ação inibitória de compostos fenólicos presentes no extrato metanólico
 283 de folhas de *Camellia sinensis* L. (Theaceae) contra as peçonhas de *Naja naja kaouthia* e *Calloselasma*
 284 *rhodostoma* (LEANPOLCHAREANCHAI et al., 2009;
 285 PITHAYANUKUL; LEANPOLCHAREANCHAI; SAPARPAKORN, 2010). Esse extrato inibiu a
 286 atividade de fosfolipases assim como inibiu proteases, hialuronidases e L-aminoácido oxidases, presentes
 287 nessas peçonhas. Em outro estudo, realizado por Borges et al. (BORGES et al., 2000), o extrato aquoso de
 288 *Casearia sylvestris*, rico em ácido elágico e seus derivados, foi hábil em inibir a atividade fosfolipásica
 289 induzida por diferentes peçonhas botrópicas. Diversos estudos apontam outros compostos vegetais, como
 290 flavonoides, alcaloides e polihidroxifenóis como inibidores de fosfolipases presentes em peçonhas ofídicas
 291 (grupos I e II) e em mamíferos (grupo I) (DA SILVA et al., 2004; LINDAHL; TAGESSON, 1996;
 292 VISHWANATH; FAWZY; FRANSON, 1988).

293

294

295 3.2 Eletroforese em gel de agarose para análise da fragmentação de DNA humano

296
297 Os ácidos gálico e vanílico quando pré-incubados, isoladamente, com o DNA interagiram de forma
298 a impedir que as moléculas de DNA penetrassem no gel e realizassem a corrida eletroforética.
299

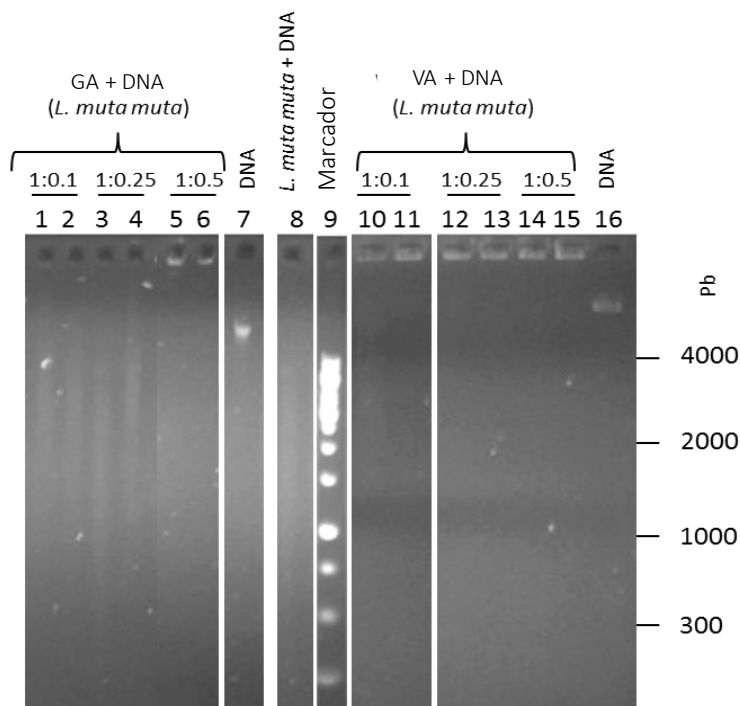


300
301
302
303 **Figura 2.** Perfil eletroforético de amostras de DNA previamente incubadas com os compostos fenólicos e
304 posteriormente submetidas a incubação com peçonha de *B. atrox* ou PBS. Amostras: 1- DNA (10 µL DNA; 303,5
305 ng/µL); 2- peçonha de *B. atrox* + DNA; 3- ácido gálico + DNA; 4 ao 9- DNA pré-incubado com ácido gálico à 37°C
306 por 10 minutos e posterior adição da peçonha de *B. atrox* seguindo com incubação por mais 30 minutos à 37 °C; 10-
307 ácido vanílico + DNA; 11 ao 16- DNA pré-incubado com ácido vanílico à 37°C por 10 minutos e posterior adição da
308 peçonha de *B. atrox* seguindo com incubação por mais 30 minutos à 37 °C; 17- Marcador: marcador de peso molecular.
309 A imagem representa análises realizadas em duplicatas para cada tratamento.

310
311
312 A peçonha de *B. jararacussu*, nas condições avaliadas, não induziu fragmentação das moléculas de
313 DNA e por isso não pode ser utilizada para os testes de inibição com os compostos fenólicos.

314 O ácido gálico, previamente incubado com o DNA seguido da adição posterior das peçonhas de *B.*
315 *atrox* (Figura 2) e *L. muta muta* (Figura 3), inibiu parcialmente a fragmentação das moléculas de DNA,
316 induzida pela peçonha, na proporção 1:0,5 (peçonha/fenólico; m/m). Já o ácido vanílico inibiu a
317 fragmentação induzida pela peçonha de *B. atrox* nas proporções 1:0,5 (m/m) (Figura 2), e pela peçonha de
318 *L. muta muta* nas proporções de 1:0,1; 1:0,25 e 1,0,5 (Figura 3).

319



320

321

322 **Figura 3.** Perfil eletroforético de amostras de DNA previamente incubadas com os compostos fenólicos e
 323 posteriormente submetidas à incubação com peçonha de *Lachesis muta muta* ou PBS. Amostras: 1 ao 6- DNA pré-
 324 incubado com ácido gálico à 37°C por 10 minutos e posterior adição da peçonha de *Lachesis muta muta* seguindo com
 325 incubação por mais 30 minutos à 37 °C; 7- DNA (10 µL DNA; 303,5 ng/µL); 8- peçonha de *L. muta muta* + DNA; 9-
 326 MW marker: marcador de peso molecular; 10 ao 15- DNA pré-incubado com ácido vanílico à 37°C por 10 minutos e
 327 posterior adição da peçonha de *L. muta muta* seguindo com incubação por mais 30 minutos à 37 °C; 16- DNA (10 µL
 328 DNA; 303,5 ng/µL). A imagem representa análises realizadas em duplicatas para cada tratamento.

329

330

331 Sugere-se que o efeito protetor observado seja resultante de interações entre os compostos fenólicos
 332 e moléculas de DNA, de forma que estas interações alteram a massa molecular das moléculas impedindo
 333 que elas adentrem o gel, assim como tornam as moléculas de DNA menos susceptíveis ao ataque das toxinas
 334 presentes nas peçonhas (Figuras 2 e 3).

335 Metaloproteinases (SVMP) e serinoproteases (SVSP) de peçonhas de serpentes, atuam sobre
 336 diferentes substratos proteicos, degradando proteínas da matriz extracelular, proteínas da cascata de
 337 coagulação, proteínas do sistema imune, presentes na composição de membranas, assim como as presentes
 338 no arcabouço que envolve moléculas de DNA, alterando processos de inflamação, resposta imune, além
 339 de promover desarranjo estrutural em membranas celulares (podendo levar a apoptose celular, logo a
 340 fragmentação de DNA) e ainda tornar o material genético mais susceptível à fragmentação mediante a

341 degradação de seu arcabouço proteico (GUTIÉRREZ; RUCAVADO, 2000). O mesmo desarranjo na
342 estrutura de membranas, promovido por proteases pode também ser induzido por fosfolipases A₂, uma vez
343 que estas atuam na degradação de fosfolipídios que compõem membranas celulares, destacando o
344 potencial genotóxico destas enzimas (MARCUSSEI et al, 2007) Assim, sugere-se com base nos resultados
345 obtidos no presente estudo, que os compostos fenólicos podem atuar na proteção das moléculas de DNA
346 contra a ação de diferentes classes de proteases e fosfolipases presentes nas peçonhas avaliadas.

347 Com relação à fragmentação de DNA analisada pelo perfil de migração eletroforético em gel de
348 agarose, um estudo descrito em literatura relata que o ácido vanílico (0,002, 0,004, 0,008, 0,016 e 0,032
349 mg/mL) exerceu ação protetora, sobre as moléculas de DNA correspondentes a plasmídeo pBR322, contra
350 danos induzidos por H₂O₂ e radiação UV. Efeito protetor também foi observado após tratamento do DNA
351 com ácido gálico, embora este tenha sido efetivo apenas nas concentrações de 0,004, 0,008, 0,016 e
352 0,032mg/mL (SEVGI; TEPE; SARIKURKCU, 2015).

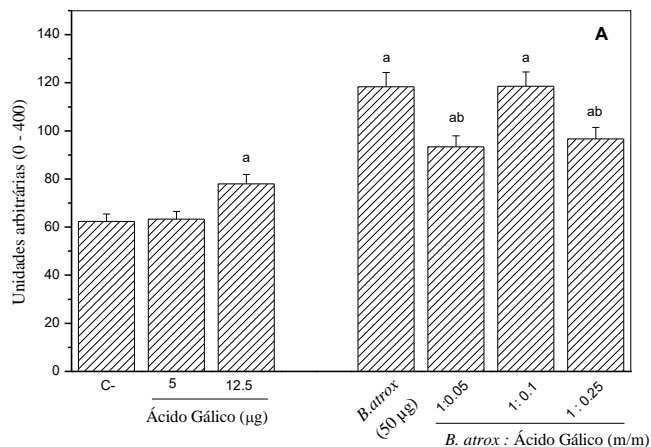
353 Em um estudo realizado por Weng et al. (2015) foi avaliado o resultado da exposição de células
354 SCC-4 (linhagem de câncer oral humano; 5 x 10⁵ células/ poço), por período de 48 horas a 0, 100, 200 e 300
355 µmol.L⁻¹ de ácido gálico. O perfil eletroforético obtido revelou a fragmentação do DNA pela ação do ácido
356 gálico nas concentrações de 200 e 300 µmol.L⁻¹. Destacando assim as ações farmacêuticas ou tóxicas que
357 podem ser obtidas com o uso de compostos fenólicos em diferentes doses e formas de administração.

358

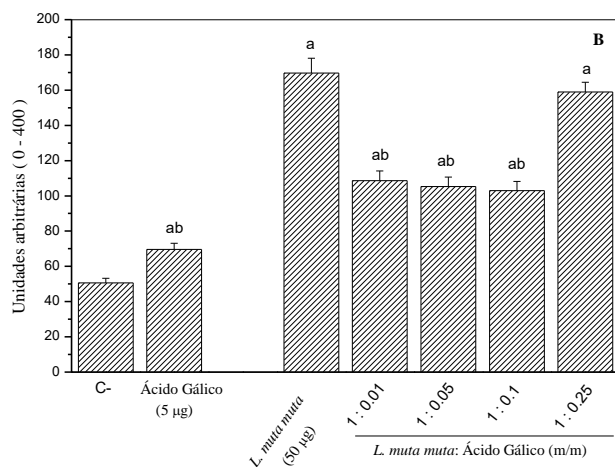
359 3.3 Teste do cometa

360 No teste do Cometa, no qual foram avaliados níveis de fragmentação de moléculas de DNA obtidas
361 de leucócitos humanos, as unidades arbitrárias mostraram que houve aumento significativo de danos ao
362 DNA causados pelo tratamento com os ácidos fenólicos avaliados, exceto para o ácido gálico na
363 concentração de 5µg, quando comparados com o controle negativo (PBS) (Figuras 4 e 5). No entanto, este
364 aumento foi inferior aos danos causados pelas peçonhas de *B. atrox* e *L. muta muta* que proporcionaram um
365 maior número de nucleoides com cometas classificados como 3 e 4 (Figuras 4 e 5).

366 Quando previamente incubados com as peçonhas de *B. atrox* e *L. muta muta* os ácidos fenólicos
367 avaliados se mostraram efetivos em inibir os danos causados por estas peçonhas sobre os nucleoides. O
368 ácido gálico foi mais efetivo em inibir a genotoxicidade induzida pela peçonha de *L. muta muta*, com
369 diminuição das unidades arbitrárias em aproximadamente 64% nas proporções 1:0,01, 1:0,05 e 1:0,1
370 (peçonha:fenólico; m:m) (Figura 4). Já o ácido vanílico inibiu com maior eficiência a genotoxicidade
371 induzida pela peçonha de *B. atrox* na proporção 1:0,25 e pela peçonha de *L. muta muta* na proporção 1:0,05,
372 com reduções aproximadas de 31 e 47%, respectivamente (Figura 5).



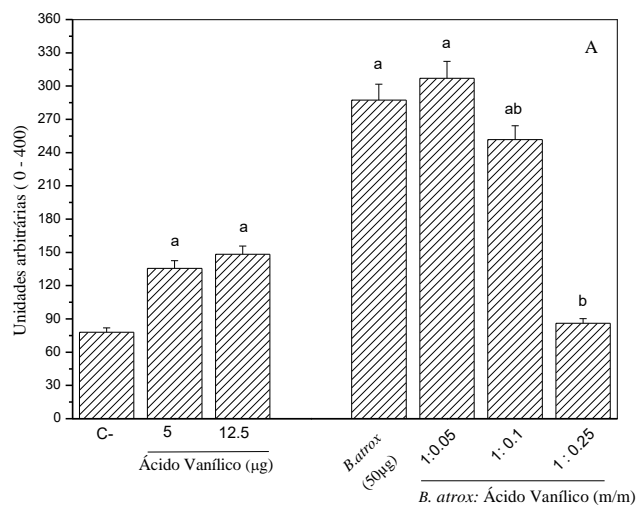
373



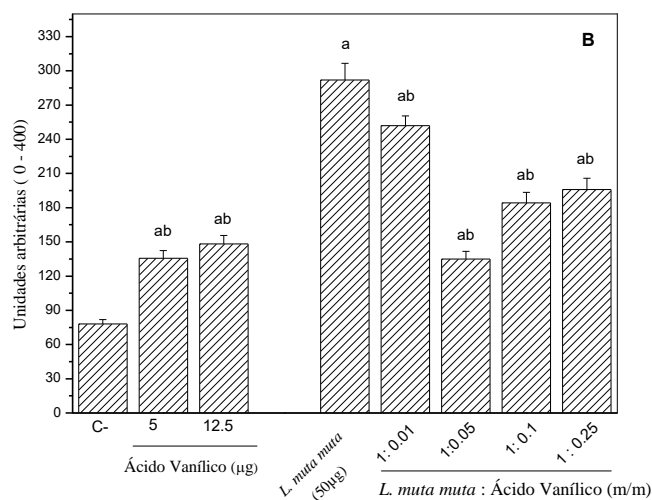
374

375 **Figura 4.** Teste do cometa para avaliação dos potenciais genotóxico e/ou antigenotóxico do ácido gálico sobre
 376 nucleoides obtidos de leucócitos de sangue periférico humano. (A) peçonha de *Bothrops atrox* utilizada como controle
 377 indutor de fragmentação nas moléculas de DNA. (B) peçonha de *Lachesis muta muta* utilizada como controle indutor
 378 de fragmentação nas moléculas de DNA. Controle negativo: PBS. Unidades arbitrárias calculadas conforme descrito
 379 por Collins et al. (2004): (1 x número de nucleoides em classe 1) + (2 x número de nucleoides em classe 2) + (3 x
 380 número de nucleoides em classe 3) + (4 x número de nucleoides em classe 4). a = difere estatisticamente do controle
 381 negativo. b = difere estatisticamente do controle positivo.

382



383



384

385 **Figura 5.** Teste do cometa para avaliação dos potenciais genotóxico e/ou antígenotóxico do ácido vanílico sobre
 386 nucleoides obtidos de leucócitos de sangue periférico humano. **(A)** peçonha de *Bothrops atrox* utilizada como controle
 387 indutor de fragmentação nas moléculas de DNA. **(B)** peçonha de *Lachesis muta muta* utilizada como controle indutor
 388 de fragmentação nas moléculas de DNA. Controle negativo: PBS. Unidades arbitrárias calculadas conforme descrito
 389 por Collins et al. (2004): (1 x número de nucleoides em classe 1) + (2 x número de nucleoides em classe 2) + (3 x
 390 número de nucleoides em classe 3) + (4 x número de nucleoides em classe 4). a = difere estatisticamente do controle
 391 negativo. b = difere estatisticamente do controle positivo.
 392

393 **Tabela 2.** Distribuição das classes de cometa e suas frequências em nucleoides tratados com o ácido gálico,
 394 com a peçonha de *Bothrops atrox* e com pré-incubados contendo peçonha de *Bothrops atrox* mais ácido
 395 gálico.

Tratamento		Classes de Nucleoides no Teste do Cometa (%) ¹				
		0 (< 5%)	1 (5-20%)	2 (20-40%)	3 (40-85%)	4 (>85%)
C (-) ²		43,00	51,67	5,33	0,00	0,00
Ácido Gálico (5 µg mL ⁻¹)		45,00	46,67	8,33	0,00	0,00
Ácido Gálico (12,5 µg mL ⁻¹)		29,33	63,33	7,33	0,00	0,00
<i>B. atrox</i> (50 µg mL ⁻¹)		12,33	58	28,67	1,00	0,00
<i>B. atrox</i> + Ácido Gálico (m/m)	(1: 0,05)	16,33	74,33	9,00	0,33	0,00
	(1: 0,1)	26,33	62,67	11,00	11,31	0,00
	(1: 0,25)	21,67	60,00	17,00	1,33	0,00

396 ¹Os dados representam as médias dos valores obtidos em 3 lâminas, sendo 100 nucleoides analisados em cada lâmina,
 397 e 3 lâminas/tratamento/voluntário. ²Controle Negativo: PBS.
 398

399

400

401

402

403

404

405

406 **Tabela 3.** Distribuição das classes de cometa e suas frequências em nucleoides tratados com o ácido gálico,
 407 com a peçonha de *Lachesis muta muta* e com pré-incubados contendo peçonha de *Lachesis muta muta* mais
 408 ácido gálico.

Tratamento		Classes de Nucleoides no Teste do Cometa (%) ¹				
		0 (5%)	1 (5-20%)	2 (20-40%)	3 (40-85%)	4 (>85%)
C (-) ²		53	43,33	3,67	0	0
Ácido Gálico (5 µg mL ⁻¹)		37,33	55,67	7	0	0
<i>L.muta muta</i> (50 µg mL ⁻¹)		0	52,67	31	10,33	6
<i>L.muta muta</i> + Ácido Gálico (m/m)	(1: 0,01)	13	65,67	21	0,33	0
	(1: 0,05)	17	62,33	19,67	0,33	0,67
	(1: 0,1)	21	55	24	0	0
	(1: 0,25)	0	27,67	50,67	21	0,67

409 ¹Os dados representam as médias dos valores obtidos em 3 lâminas, sendo 100 nucleoides analisados em cada lâmina,
 410 e 3 lâminas/tratamento/voluntário. ²Controle Negativo: PBS.
 411

412 Os dados apresentados nas tabelas 1, 2, 3 e 4 permitem a visualizar as porcentagens de nucleoides
 413 classificados com os maiores níveis de fragmentação (classes 3 e 4) para cada tratamento (peçonha pura,
 414 fenólico puro, peçonha + fenólico).
 415
 416
 417
 418
 419
 420
 421

422 **Tabela 4.** Distribuição das classes de cometa e suas frequências em nucleoides tratados com o ácido
 423 vanílico, com a peçonha de *Bothrops atrox* e com pré-incubados contendo peçonha de *Bothrops atrox* mais
 424 ácido vanílico.

Tratamento		Classes de Nucleoides no Teste do Cometa (%) ¹				
		0 (< 5%)	1 (5-20%)	2 (20-40%)	3 (40-85%)	4 (>85%)
C (-) ²		21	78	0	0	0
Ácido Vanílico (5 µg mL ⁻¹)		15	50,67	22	8,34	4
Ácido Vanílico (12,5 µg mL ⁻¹)		15,67	35	36,67	10,67	2
<i>B. atrox</i> (50 µg mL ⁻¹)		0	0	31,67	49,33	19
<i>B. atrox</i> + Ácido Vanílico (m/m)	(1: 0,05)	0	0	24	45	31
	(1: 0,1)	0	0	58,33	31,67	10
	(1: 0,25)	30,67	56,33	9,33	3,67	0

425 ¹Os dados representam as médias dos valores obtidos em 3 lâminas, sendo 100 nucleoides analisados em cada lâmina.
 426 e 3 lâminas/tratamento/voluntário. ²Controle Negativo: PBS.
 427

428

429

430

431

432

433

434

435

436

437 **Tabela 5.** Distribuição das classes de cometa e suas frequências em nucleoides tratados com o ácido
 438 vanílico, com a peçonha de *Lachesis muta muta* e com pré-incubados contendo peçonha de *Lachesis muta*
 439 *muta* mais ácido vanílico.

Tratamento		Classes de Nucleoides no Teste do Cometa (%) ¹				
		0 (< 5%)	1 (5-20%)	2 (20-40%)	3 (40-85%)	4 (>85%)
C (-) ²		21	78	0	0	0
Ácido Vanílico (5 µg mL ⁻¹)		15	50,67	22	8,34	4
Ácido Vanílico (12,5 µg mL ⁻¹)		15,67	35	36,67	10,67	2
<i>L. muta muta</i> (50 µg mL ⁻¹)		0	0	32,33	43,33	24,33
<i>L. muta muta</i> + Ácido Vanílico (m/m)	(1: 0,01)	0,95	4,5	44,60	43,50	6,45
	(1: 0,05)	25,33	40	15,67	12,33	6,67
	(1: 0,1)	14,33	19,67	41,33	16,67	8
	(1: 0,25)	19,67	18,67	25,67	18	18

440 ¹Os dados representam as médias dos valores obtidos em 3 lâminas, sendo 100 nucleoides analisados em cada lâmina.
 441 e 3 lâminas/tratamento/voluntário. ²Controle Negativo: PBS.
 442

443 O teste do cometa foi realizado com avaliação das células imediatamente tratadas, e as incubações
 444 foram feitas em período inferior ao início da atuação dos check points celulares, conforme ciclo de divisão
 445 celular descrito para linfócitos (MARCUSSEI et al., 2011; 2013). Desta forma, pode-se sugerir que os
 446 nucleoides classificados nos menores níveis, principalmente 1, e possivelmente 2 poderiam ter os danos
 447 total ou parcialmente corrigidos, e assim apenas parte das fragmentações observadas seriam permanentes,
 448 podendo passar para as gerações celulares seguintes, na forma de micronúcleos, aberrações cromossômicas,
 449 etc.

450 Estudos abordam o efeito genotóxico dos ácidos fenólicos em linhagens de células cancerosas
 451 (BUSCH et al., 2015; CALEJA et al., 2016), entretanto, em baixas doses estes mostraram-se protetores da
 452 degradação induzida pelas enzimas presentes nas peçonhas das serpentes avaliadas no presente estudo.

453 O ensaio cometa com a linhagem de células de câncer oral SCC-4 (1×10^6 células/poço) tratado com
454 0, 100, 200 and 300 μM de ácido gálico por 48 horas mostrou danos ao DNA dose dependente, quando
455 comparado a células não tratadas (WENG et al., 2015). Outro estudo com a linhagem celular de câncer de
456 próstata PC-3, foi observado, após exposição das células à diferentes doses (50, 100, and 200 $\mu\text{mol L}^{-1}$) de
457 ácido gálico em vários intervalos de tempo (12, 24, and 48 horas) um aumento progressivo dos fragmentos
458 de DNA observados no perfil eletroforético durante avaliações pelo teste do cometa (LIU et al, 2013).

459 Quando avaliado sobre linfócitos de sangue periférico humano, por meio do teste cometa, o ácido
460 vanílico nas concentrações (0,84; 4,2; 8,4; 16,8; 84 e 168 $\mu\text{g/ mL}$) não apresentou efeitos genotóxicos e
461 ainda foi capaz de inibir a fragmentação das moléculas de DNA induzida pelo H_2O_2 (TANER et al., 2016).

462 O ácido vanílico na concentração de $1\mu\text{g}/\mu\text{L}$ causou 6,75% de diminuição do Índice de Danos
463 Genéticos (GDI) em cultura de linfócitos humanos. Entretanto, quando avaliado na concentração de 2
464 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, o ácido vanílico aumentou a GDI em comparação ao controle realizado com DMSO a 16 %
465 (ERDEM et al., 2012).

466 Pesquisadores têm feito uso do teste do cometa para complementar a caracterização toxicológica de
467 extratos vegetais, investigando assim, os efeitos genotóxicos de metabólicos secundários (ex: compostos
468 fenólicos, alcaloides e terpenos) ao investigar o potencial genotóxico da farinha de feijão branco, contendo
469 taninos e outros compostos fenólicos, sobre o material genético de leucócitos humanos, e descreveram em
470 seus resultados a predominância de baixos níveis de fragmentação das moléculas de DNA, nas condições
471 avaliadas (PEREIRA et al., 2012).

472 O ácido gálico apresentou efeito radioprotetor em ratos expostos à radiação gama por 1 hora
473 reduzindo danos em células da medula óssea, esplenócitos e leucócitos (NAIR; NAIR, 2013) além de reduzir
474 em 41% os danos induzidos por células tratadas com espécies reativas de oxigênio (FERK et al., 2011).

475 Embora estes fenólicos tenham efeito protetor sobre moléculas de DNA, eles se mostram
476 genotóxicos sobre algumas linhagens celulares (ácido gálico agindo sobre células de câncer de próstata PC3
477 e células epiteliais humanas HeLa (EROL-DAYI, ARDA; GÜNHAM, 2012; LIU et al., 2013), sendo
478 necessário o estudo de seus mecanismos de ação, permitindo assim seu uso benéfico para o homem em
479 doses e formas de administração adequadas.

480 Alguns mecanismos de ação já descritos para os compostos fenólicos podem ser considerados para
481 explicar as atividades exercidas por eles no presente trabalho, como a ação antioxidante com sequestro e
482 neutralização de espécies reativas, inibição específica de proteases (que degradam o arcabouço proteico
483 presentes nos nucleoides, induzindo ação genotóxica), precipitação de enzimas por competição e retirada
484 da camada de solvatação que envolve as moléculas, ligações de hidrogênio (transientes) com peptídeos
485 (podendo estes atuar sobre canais iônicos, alterando o fluxo de íons através das membranas e

486 consequentemente o metabolismo celular, podendo resultar em ação genotóxica e indução de apoptose),
487 ligação específica - com inibição reversível - a sítios ativos de diferentes enzimas, sequestro de íons
488 metálicos que são cofatores para diversas enzimas (BRENES et al., 2010; DIAZ et al., 2005; HAVSTEEN,
489 2002).

490 Complementando as informações sobre o contexto toxicológico destes compostos, Wan-Ibrahim,
491 Sidik e Kuppusamy (2010) avaliaram 20 extratos aquosos de plantas e observaram que apenas dois deles,
492 *Vitex Pinnata* L. e *Quercus infectoria* Oliver, causaram danos superiores à 50% no DNA de leucócitos
493 humanos, sendo estes danos atribuídos ao conteúdo fenólico, mais especificamente ao ácido tânico.

494 Strange et al. (2009) analisaram produtos naturais como o guaco (*Mikania glomerata* Spreng),
495 espinheira-santa (*Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reiss) e a sálvia (*Lippia alba* Mill. NE) e observaram
496 atividade citotóxica e genotóxica induzidas por metabólitos como cumarinas, taninos e terpenos,
497 evidenciando a necessidade de caracterização toxicológica dos metabólitos vegetais, visto que estes podem
498 induzir efeitos adversos e/ou terapêuticos dependentes de fatores como dose e período de utilização.

499

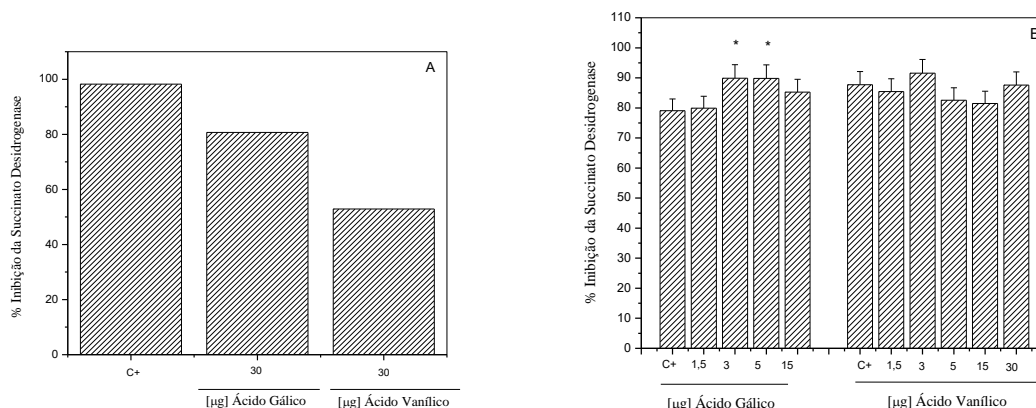
500 **3.4 Succinato desidrogenase**

501

502 A SDH (E.C. 1.3.5.1) é uma enzima importante tanto para o ciclo de Krebs quanto para a
503 fosforilação oxidativa da cadeia de transporte de elétrons. Portanto, era esperado que a inibição de SDH
504 pelo inibidor reversível competitivo ácido malônico poderia causar uma interrupção significativa do
505 metabolismo energético e, possivelmente, a morte celular.

506 As peçonhas de *B. atrox*, *B. jararacussu* e *L. muta muta* não apresentaram efeito inibidor
507 significativo sobre a atividade da enzima succinato desidrogenase, logo, não puderam ser avaliadas neste
508 teste frente a ação dos ácidos fenólicos (resultados não mostrados).

509 Os ácidos gálico e vanílico inibiram a atividade da succinato desidrogenase em 80,67 e 52,97
510 %, respectivamente, enquanto que o ácido malônico (inibidor competitivo - controle positivo) inibiu a
511 atividade da enzima em 97% (Figura 6A), sugerindo que estes ácidos fenólicos apresentam algum tipo de
512 interação com a succinato desidrogenase capaz de causar interferência em seu mecanismo de catálise.



513
 514 **Figura 6. (A)** Inibição da atividade da succinato desidrogenase pelos ácidos gálico e vanílico isoladamente. C (+):
 515 atividade avaliada na presença do inibidor ácido malônico. **(B)** Inibição da atividade da succinato desidrogenase pelos
 516 ácidos gálico e vanílico na presença do ácido malônico. C (+): atividade avaliada na presença do inibidor ácido
 517 malônico. Os ácidos fenólicos foram pré-incubados com a enzima por 30 minutos à 37°C, em seguida foi adicionado
 518 o substrato e ácido malônico (1:1). * potencialização estatisticamente significativa da inibição da atividade da enzima.
 519

520 Pode ter ocorrido um sinergismo entre o ácido gálico e o ácido malônico sobre a atividade da
 521 enzima succinato desidrogenase variando de acordo com a concentração utilizada. Já o ácido vanílico não
 522 apresentou um sinergismo significativo com o ácido malônico. Também é possível sugerir uma somatória
 523 de efeitos exercidos pelos fenólicos e o ácido malônico, visto que os fenólicos isoladamente também
 524 exerceram ação inibidora sobre a atividade da enzima (Figura 6A).

525 Na concentração de 30 μ g de ácido gálico não foi possível avaliar a atividade da succinato
 526 desidrogenase, podendo ter ocorrido interações entre o fenólico e a enzima que resultaram na precipitação
 527 da mesma inviabilizando a avaliação da atividade (Figura 6B).

528 Análises computacionais foram realizadas na tentativa de embasar as hipóteses levantadas.

529

530 3.5 Análise computacional

531 A melhor conformação de cada ligante foi selecionada de acordo com sua posição no sítio ativo
 532 540 da succinato desidrogenase, sendo que a conformação escolhida para cada um dos ligantes foi aquela
 533 que possuía o maior grau de similaridade espacial com o ácido malônico que se encontrava cristalizado na
 534 proteína obtida do PDB. Os resultados teóricos obtidos do ancoramento molecular foram avaliados e
 535 comparados com base nos resultados experimentais descritos anteriormente.

536 As conformações escolhidas foram utilizadas para a análise das interações com os resíduos de
 537 aminoácidos do sítio ativo. Para avaliar melhor os fatores mais relevantes para a potência dos compostos,
 538 os seguintes parâmetros foram calculados: (a) energia de ligação de hidrogênio entre o ligante e a proteína

539 ($E_{\text{Lig,H}}$); (b) energia intramolecular do ligante (E_{Intra}); (c) energia intermolecular (E_{inter}); (d) energia de escore.
 540 Observando a Tabela 6, o valor da energia intermolecular dos compostos aumenta seguindo a tendência,
 541 ácido vanílico < ácido gálico < ácido malônico, isto é, o ácido malônico interage mais fortemente com a
 542 succinato desidrogenase que os outros compostos. Este resultado corrobora os dados da Tabela 7.
 543 Analisando as ligações de hidrogênio entre os três compostos e a enzima foi observado: (i) todos os
 544 compostos interagem com FAD, Arg297 e Thr265; (ii) os ácidos vanílico e malônico interagem com Gly62;
 545 (iii) somente o ácido gálico interage com Arg408 e Gly63; (iv) somente o ácido malônico interage com
 546 Glu266. A Figura 7 apresenta os compostos no interior do sítio ativo.

547
 548 **Tabela 6.** Valores de energia obtidas do ancoramento entre a enzima succinato desidrogenase e os
 549 inibidores.

Compostos	$E_{\text{Lig,H}}$ (kcal mol ⁻¹)	E_{Intra} (kcal mol ⁻¹)	E_{inter} (kcal mol ⁻¹)	E_{score} (kcal mol ⁻¹)
Ácido malônico	-11,74	3,42	-81,25	-78,59
Ácido vanílico	0,16	7,38	-37,76	-30,39
Ácido gálico	-8,85	11,37	-48,02	-36,64

550 Fonte: Molegro

551

552

553

554

555

556

557

558

559

560

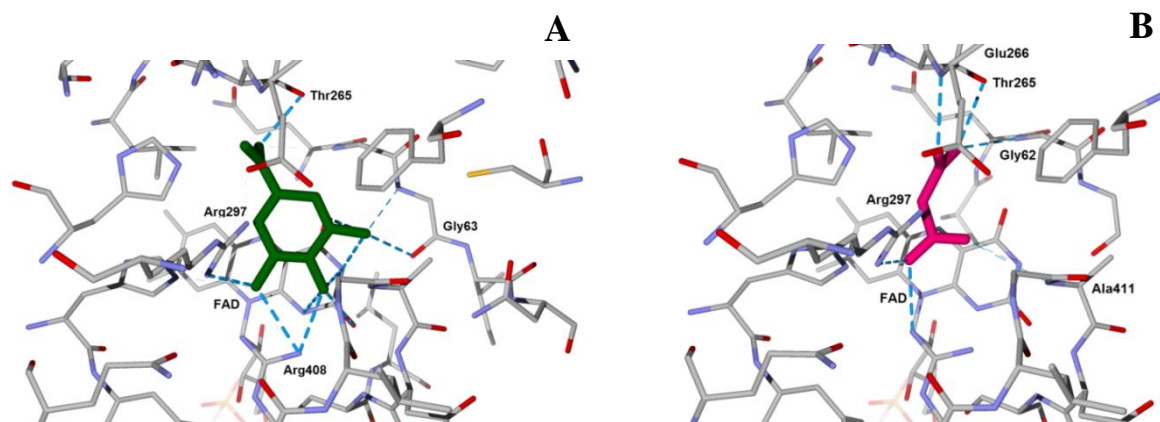
561

562

563

564

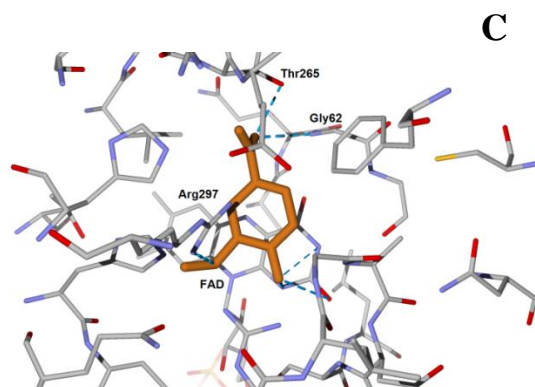
565



566

567

568



569

570

571

572 **Figura 7.** Resultado do ancoramento molecular entre a enzima succinato desidrogenase e os compostos ácido gálico
573 (A), ácido malônico (B) e ácido vanílico (C). Os tracejados azuis representam as interações tipo ligação de hidrogênio.
574 Imagens geradas pelo software Molegro

575

576 As energias dos orbitais sem fronteira HOMO e LUMO foram calculadas no intuito de observar
577 qual dos dois fenólicos interage melhor com o ácido malônico (Tabela 7). Calculando-se a diferença de
578 energia entre o HOMO do ácido malônico, observa-se um alto valor de energia, demonstrando uma alta
579 capacidade doadora deste orbital. A energia do LUMO também é elevada e revela que o ácido malônico não
580 tem grande capacidade de receber elétrons. Desta forma, pode-se concluir que o HOMO do ácido malônico
581 será um dos orbitais mais importantes para racionalizar o mecanismo de interação. A partir da Tabela 7,
582 pode-se concluir que a diferença de energia HOMO (ácido malônico) - LUMO (demais compostos) não é

583 significativa comparada a diferença LUMO (ácido malônico) - HOMO (demais compostos). Assim, estes
 584 compostos podem interagir fora ou no interior do sítio ativo da enzima. Finalmente, a diferença de energia
 585 entre o LUMO do ácido vanílico e gálico é muito pequena, o que corrobora com os dados experimentais
 586 (Tabela 6).

587

588 **Tabela 7.** Energias do HOMO e LUMO (eV).

Composto	HOMO	LUMO
Ácido malônico	2,26.10 ²⁴	3,83.10 ²⁵
Ácido vanílico	-9,25.10 ²⁴	1,85.10 ²⁵
Ácido gálico	-4,40.10 ²⁴	1,87.10 ²⁵

589 HOMO - highest occupied molecular orbital. LUMO - lowest unoccupied molecular orbital.

590 Fonte: HyperChem no nível de cálculo no nível de cálculo Hartree-Fock

591

592 **5 Conclusão**

593 Os ácidos gálico e vanílico apresentam interações moleculares fracas com toxinas presentes nas
 594 peçonhas de *Bothrops atrox*, *B. jararacussu* e *Lachesis muta muta*, pois não influenciaram o perfil
 595 migratório destas toxinas em SDS-PAGE. No entanto, foram capazes de interagir com a enzima succinato
 596 desidrogenase, com o ácido malônico e por fim, com moléculas de DNA. Estes ácidos fenólicos foram
 597 efetivos em inibir a fragmentação de moléculas de DNA por toxinas presentes nas peçonhas de *Lachesis*
 598 *muta muta* e *Bothrops atrox*.

599 Assim, no contexto avaliado, estes compostos fenólicos podem ser futuramente explorados visando
 600 o tratamento de enfermidades (ex: tumores), com uso local, considerando sua ação inibidora sobre a enzima
 601 succinato desidrogenase avaliada (91,8% de homologia com a enzima humana); em outros contextos
 602 patológicos podem atuar como inibidores do ácido malônico; assim como podem ter ação protetiva contra
 603 agentes carcinogênicos como proteases, fosfolipases e peptídeos amplamente distribuídos na natureza,
 604 produzidos por diversos répteis, aracnídeos, insetos, vegetais, parasitas e microorganismos.

605

606

607 **Declaration of interest statement**

608 Este trabalho foi custeado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq),
 609 Coordenação de Aperfeiçoamento de Nível Superior (CAPES) and Fundação de Amparo à Pesquisa do
 610 Estado de Minas Gerais (FAPEMIG). Os autores expressam sua gratidão à Universidade Federal de Lavras
 611 pelo apoio estrutural e logístico aos pesquisadores. Os autores agradecem pela essencial ajuda prestada

612 durante a execução dos experimentos pelo técnico de laboratório Lamartine de Nóbrega Filho do
613 Departamento de Biologia da UFLA.

614

615 Referências

616

617 ANANTHARAJU, P. G. et al. An overview on the role of dietary phenolics for the treatment of cancers.
618 **Nutrition Journal**, v. 15, n. 1, p. 99. Review, Dec. 2016.

619

620 BARDAWEEL, S. et al. *E. coli* histidine triad nucleotide binding protein 1 (ecHinT) is a catalytic regulator
621 of D-alanine dehydrogenase (DadA) activity *in vivo*. **PLoS One**, v. 6, n. 7, Jul. 2011.

622

623 BORGES, M. H. et al. Effects of aqueous extract of *Casearia sylvestris* (Flacourtiaceae) on actions of snake
624 and bee venoms and on activity of phospholipases A2. **Comparative Biochemistry and Physiology Part**
625 **B. Biochemistry & Molecular Biology**, v. 127, n. 1, p.21-30, Sep. 2000.

626

627 BRENES, O. et al. Cell death induced by *Bothrops asper* snake venom metalloproteinase on endothelial
628 and other cell lines. **Experimental and Molecular Pathology**, v. 88, n. 3, p. 424-432, Jun. 2010.

629

630 BUSCH, C. et al. Epigenetic activities of flavonoids in the prevention and treatment of cancer. **Clinical**
631 **Epigenetics**, v. 10, n. 7, p. 64, Jul. 2015.

632

633 CALEJA, C. et al. Phenolic compounds as nutraceuticals or functional food ingredients. **Current**
634 **Pharmaceutical Design**. v. 22, Dec. 2016.

635

636 CARVALHO, B. M. et al. Snake Venom PLA₂s Inhibitors Isolated from Brazilian Plants: Synthetic and
637 Natural Molecules. **BioMed Research International**, v. 2013, 8p. Sep. 2013.

638

639 CHOI, K. C. et al. Gallic acid suppresses lipopolysaccharide-induced nuclear factor-kappaB signaling by
640 preventing RelA acetylation in A549 lung cancer cells. **Molecular Cancer Research**, v.7, n.12, p. 2011-
641 21, Dec. 2009.

642

643 COLLINS, A. Comet assay in human biomonitoring studies: reliability, validation, and applications.
644 Environmental and **Molecular Mutagenesis**., v. 30, p. 139-4630, Jun. 1997.

645

646 COLLINS, A. R. The Comet Assay for DNA Damage and Repair: Principles, Applications, and Limitations.
647 **Molecular Biotechnology**, v. 26, p. 249-261, Mar. 2004.

648

649 DA SILVA, A. J. et al. Synthesis and pharmacological evaluation of prenylated and benzylated pterocarpan
650 against snake venom. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letter**, v. 14, n. 2, p. 431-5, Jan. 2004.

651

652 DERVARTANIAN, D. V.; VEEGER, C. Studies on succinate dehydrogenase: I. Spectral properties of the
653 purified enzyme and formation of enzyme-competitive inhibitor complexes. **Biochimica et Biophysica**
654 **Acta (BBA) - Specialized Section on Enzymological Subjects**. v. 92, n. 2, p. 233-247, 22 Nov. 1964.

- 655 DEWAR, M.J.S. et al. The development and use of quantum-mechanical molecular-models.76. AM1-A
656 new general-purpose quantum-mechanical molecular-model. **Journal of the American Chemical**
657 **Society**. v.107, p.3902–3909, 1985.
- 658
659
- 660 DHANANJAYA, B. L. et al. Vanillic acid as a novel specific inhibitor of snake venom 5'-nucleotidase: A
661 pharmacological tool in evaluating the role of the enzyme in snake envenomation. **Biochemistry-Moscow**,
662 v. 74, n. 12, p. 1315-1319, Dec. 2009.
- 663
- 664 DHANANJAYA, B. L.; GOWDA, T. V.; D'SOUZA, C. J. M. Evidence for existence of venom 5 '
665 nucleotidase in multiple forms through inhibition of concanavalin A. **Cell Biochemistry and Function**, v.
666 28, n. 7, p. 620-622, Oct. 2010.
- 667
- 668 DIAZ, C. et al. Characterization of events associated with Apoptosis/Anoikis induced by snake venom
669 metalloproteinase BaP1 on human endothelial cells. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 94, n. 3, p. 520-
670 528, Feb. 2005.
- 671
- 672
- 673 ERDEM, M. G. et al. Genotoxic and anti-genotoxic effects of vanillic acid against mitomycin C-induced
674 genomic damage in human lymphocytes *in vitro*. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, v. 13, n.
675 10, p. 4993-8, Oct. 2012.
- 676
- 677 EROL-DAYI Ö, ARDA N, ERDEM G. Protective effects of olive oil phenolics and gallic acid on hydrogen
678 peroxide-induced apoptosis. **European Journal of Nutrition**, v. 51, n. 8, p. 955-60, Dec. 2012.
- 679
- 680 FERK, F. et al. Potent protection of gallic acid against DNA oxidation: results of human and animal
681 experiments. **Mutation Research**, v. 715, n. 1-2, p. 61–71, Oct. 2011.
- 682
- 683 GLOZAK, M. A. et al. Acetylation and deacetylation of non-histone proteins. **Gene**, v. 363, p. 15–23, Nov.
684 2005.
- 685
- 686 GORLACH, S.; FICHNA, J.; Lewandowska, U. Polyphenols as mitochondria-targeted anticancer drugs.
687 **Cancer Letters**, v. 366, n. 2, p. 141-9, Oct. 2015.
- 688
- 689 GUTIÉRREZ, J. M.; RUCAVADO, A. Snake venom metalloproteinases: Their role in the pathogenesis of
690 local tissue damage. *Biochimie*, v. 82, n. 10, p. 841-850, 2000.
- 691
- 692
- 693 HAVSTEEN, B. H. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. **Pharmacology and**
694 **Therapeutics**, v. 96, n. 2-3, p. 67-202, Nov-Dec. 2002.
- 695
- 696 HUANG, S.; MILLAR, H. Succinate dehydrogenase: the complex roles of a simple enzyme. **Current**
697 **Opinion in Plant Biology**, v. 16, n. 3, p. 344–349, 2013.
- 698
- 699
- 700 LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of
701 bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 680-685, Aug. 1970.

- 702
- 703 LAHIRI, D. K.; NURNBERGER, J. I. JR. A Rapid Non-Enzymatic Method for the Preparation of HMW
704 DNA from Blood for RFLP Studies. **Nucleic Acids Research**, v. 19, n. 19, p. 5444, Oct. 1991.
- 705
- 706 LEANPOLCHAREANCHAI, J. et al. Molecular docking studies and anti-enzymatic activities of Thai
707 mango seed kernel extract against snake venoms. **Molecules**, v. 14, n. 4, p. 1404-22, Mar. 2009.
- 708
- 709 LEE, W. et al. Gallic Acid Decreases Inflammatory Cytokine Secretion Through Histone
710 Acetyltransferase/Histone Deacetylase Regulation in High Glucose-Induced Human Monocytes. **Journal**
711 **of Medicinal Food**, v. 18, n. 7, p. 793-801, Jul. 2015.
- 712
- 713 LINDAHL, M.; TAGESSON, C. Zinc (Zn²⁺) binds to and stimulates the activity of group I but not group II
714 phospholipase A2. **Inflammation**, v. 20, n. 6, p. 599-611, Dec. 1996.
- 715
- 716 LIU, K.C.
717 Gallic acid provokes DNA damage and suppresses DNA repair gene expression in human prostatecancer
718 PC-3 cells. **Environmental Toxicology**, v. 28, n. 10, p. 579-87, Oct. 2013.
- 719
- 720 MAURYA, P. et al. 2017. Characterization of Bioactive Constituents from the Gum Resin of *Gardenia*
721 *Lucida* and Its Pharmacological Potential. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 85, p. 444-56, Jan. 2017.
- 722
- 723 MARCUSSI, S. et al. Snake venom phospholipase A(2) inhibitors: Medicinal chemistry and
724 therapeutic potential. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, Ribeirão Preto, v. 7, n. 8, p. 743-
725 756, 2007.
- 726
- 727
- 728 MARCUSSI, S. et al. Evaluation of the genotoxicity of *Crotalus durissus terrificus* snake venom and its
729 isolated toxins on human lymphocytes. **Mutation Research-Genetic Toxicology and Environmental**
730 **Mutagenesis**, v. 724, n. 1-2, p. 59-63, Sep. 2011.
- 731
- 732 MARCUSSI, S. et al. Genotoxic effect of *Bothrops* snake venoms and isolated toxins on human lymphocyte
733 DNA. **Toxicon**, v. 65, n. , p. 9-14, Apr 2013.
- 734
- 735 NANDHAKUMAR, S. et al. Evaluation of DNA Damage Using Single-Cell Gel Electrophoresis (Comet
736 Assay). **Journal of Pharmacology & Pharmacotherapeutics**, v. 2, n. 2, p. 107-11, Apr-Jun. 2011.
- 737
- 738 NAIR, G. G.; NAIR, C. K. K. Radioprotective effects of gallic acid in mice. **BioMed Research**
739 **International**, v. 2013, 13p, Jul. 2013.
- 740
- 741 PEREIRA, L. L. S. et al. Application of Comet assay to assess the effects of white bean meal on DNA of
742 human lymphocytes. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, Lavras, v. 48, n. 1, p. 103-108, Jan-
743 Mar. 2012.
- 744
- 745

- 746 PITHAYANUKUL, P.; LEANPOLCHAREANCHAI, J.; SAPARPAKORN, P. Molecular docking studies
747 and anti-snake venom metalloproteinase activity of Thai mango seed kernel extract. **Molecules**, v. 14, n. 9,
748 p. 3198-213, Aug. 2009.
- 749
750 RANDHIR, R.; LIN, Y-T.; SHETTY, K. Phenolics, their antioxidante and antimicrobial activity in dark
751 germinated fenugreek sprouts in response to peptide and phytochemical elicitors. **Asia Pacific Journal of**
752 **Clinical Nutrition**, v. 13, p. 295-307, Apr. 2004.
- 753
754 SEVGI, K.; TEPE, B.; SARIKURKCU, C. 2015. Antioxidant and DNA Damage Protection Potentials of
755 Selected Phenolic Acids Gallic Acid. **Food and Chemical Toxicology**, v. 77, p. 12–21, Mar. 2015.
- 756
757 STRANGE, V.S., et al. Avaliação do efeito mutagênico do extrato hidroalcoólico bruto, por meio de
758 bioensaios *in vivo* e prospecção fitoquímica de *Cecropia glaziovii* Sneth (embaúba), Cecropiaceae. **Revista**
759 **Brasileira de Farmacognosia**, v.19, n. 2, p.637-642, Jun. 2009.
- 760
761 TANAKA, M.; ISHIBASHI, T.; TOYOMIZU, M. Time Course of Oxidative Phosphorylation in Liver
762 Mitochondria of Chickens Fed on High-protein Diet. **British Poultry Science**, v. 36, n. 1, p. 143–54, Nov.
763 2007.
- 764
765 TANER G. et al Use of *in vitro* assays to assess the potential cytotoxic, genotoxic and antigenotoxic effects
766 of vanillic and cinnamic acid. **Drug and Chemical Toxicology**, v. 16, p. 1-8, Jun. 2016.
- 767
768 THOMSEN, R.; CHRISTENSEN, M. H. MOLDOCK. A new technique for high-accuracy molecular
769 docking. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 49, n. 11, p. 3315-3321, Jun. 2006.
- 770
771 TOYOMIZU, M. et al. Effects of Ammonium Chloride-Induced Acidosis on Oxidative Metabolism in Liver
772 Mitochondria of Chicks. **British Poultry Science**, v. 40, n. 4, p. 541–44, Mar. 1999.
- 773
774 VISHWANATH, B. S.; FAWZY, A. A.; FRANSON, R. C. Edema-inducing activity of phospholipase A2
775 purified from human synovial fluid and inhibition by aristolochic acid. **Inflammation**, v. 12, n. 6, p. 549-
776 61, Dec. 1988.
- 777
778 WAN-IBRAHIM, W. I.; SIDIK, K.; KUPPUSAMY, U. R. A high antioxidant level in edible plants is
779 associated with genotoxic properties. **Food Chemistry**, v. 122, n. 4, p. 1139-1144, Oct. 2010.
- 780
781 WENG, S. W. et al. Gallic acid induces DNA damage and inhibits DNA repair-associated protein
782 expression in human oral cancer SCC-4 cells. **Anticancer Research**, v. 35, n. 4, p. 2077-84, Apr. 2015.
- 783
784
785