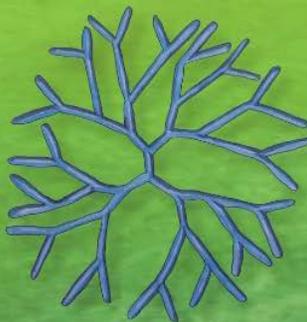
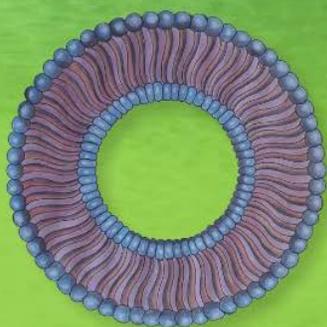


---

# BIOPROSPECÇÃO E INOVAÇÃO TECNOLÓGICA DE PRODUTOS NATURAIS E DERIVADOS DE PLANTAS E ANIMAIS

---



Micheline Freire Donato (Editora-Chefe)  
Caliandra Maria Bezerra Luna Lima (Editora)  
Hilzeth de Luna Freire Pessôa (Editora)  
Margareth de Fátima Formiga Melo Diniz (Editora)

**BIOPROSPECÇÃO E INOVAÇÃO  
TECNOLÓGICA DE PRODUTOS  
NATURAIS E DERIVADOS DE  
PLANTAS E ANIMAIS**



**Reitor**  
**Vice-Reitora**  
**Pró-Reitor PRPG**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA**

VALDINEY VELOSO GOUVEIA  
LIANA FILGUEIRA ALBUQUERQUE  
GUILHERME ATAÍDE DIAS



**Editora**  
**UFPB**  
**Diretor**  
**Coordenadora de editoração**  
**Revisora gráfica**  
**Revisor de pré-impressão**  
**Chefe de produção**

**EDITORA UFPB**

REINALDO FARIAS PAIVA DE LUCENA  
SÂMELLA ARRUDA ARAÚJO  
ALICE BRITO  
WELLINGTON COSTA OLIVEIRA  
JOSÉ AUGUSTO DOS SANTOS FILHO

**Conselho editorial**

Adailson Pereira de Souza (Ciências Agrárias)  
Eliana Vasconcelos da Silva Esrael (Linguística, Letras e Artes)  
Fabiana Sena da Silva (Interdisciplinar)  
Gisele Rocha Côrtes (Ciências Sociais Aplicadas)  
Ilda Antonieta Salata Toscano (Ciências Exatas e da Terra)  
Luana Rodrigues de Almeida (Ciências da Saúde)  
Maria de Lourdes Barreto Gomes (Engenharias)  
Maria Patrícia Lopes Goldfarb (Ciências Humanas)  
Maria Regina Vasconcelos Barbosa (Ciências Biológicas)

**Conselho científico**

Maria Aurora Cuevas-Cerveró (Universidad Complutense Madrid/ES)  
José Miguel de Abreu (UC/PT)  
Joan Manuel Rodríguez Díaz (Universidade Técnica de Manabí/EC)  
José Manuel Peixoto Caldas (USP/SP)  
Letícia Palazzi Perez (Unesp/Marília/SP)  
Anete Roese (PUC Minas/MG)  
Rosângela Rodrigues Borges (UNIFAL/MG)  
Silvana Aparecida Borsetti Gregorio Vidotti (Unesp/Marília/SP)  
Leilah Santiago Bufrem (UFPR/PR)  
Marta Maria Leone Lima (UNEB/BA)  
Lia Machado Fiuza Fialho (UECE/CE)  
Valdonilson Barbosa dos Santos (UFCEG/PB)

**Editora filiada à:**



Micheline Freire Donato  
Caliandra Maria Bezerra Luna Lima  
Hilzeth de Luna Freire Pessôa  
Margareth de Fátima Formiga Melo Diniz

**BIOPROSPECÇÃO E INOVAÇÃO  
TECNOLÓGICA DE PRODUTOS  
NATURAIS E DERIVADOS DE  
PLANTAS E ANIMAIS**

João Pessoa  
Editora UFPB  
2020

Direitos autorais 2020 – Editora UFPB

Efetuada o Depósito Legal na Biblioteca Nacional, conforme a Lei nº 10.994, de 14 de dezembro de 2004.

TODOS OS DIREITOS RESERVADOS À EDITORA UFPB

É proibida a reprodução total ou parcial, de qualquer forma ou por qualquer meio.

A violação dos direitos autorais (Lei nº 9.610/1998)

é crime estabelecido no artigo 184 do Código Penal.

O conteúdo desta publicação é de inteira responsabilidade do autor.

**Projeto Gráfico e  
Editoração Eletrônica**

Editora UFPB

**Catálogo na fonte:**

**Biblioteca Central da Universidade Federal da Paraíba**

---

D677b Donato, Micheline Freire  
Bioprospecção e inovação tecnológica de produtos naturais e derivados de plantas e animais / Micheline Freire Donato... [et al.]. - João Pessoa: Editora UFPB, 2020.  
549 p.: il.  
E-Book  
ISBN 978-65-5942-053-7  
1. Produtos naturais. 2. Plantas e animais - Derivados. 3. Inovação tecnológica. 4. Bioprospecção I. Caliandra Maria Bezerra Luna Lima. II. Hilzeth de Luna Freire Pessôa. III. Margareth de Fátima Formiga Melo Diniz. IV. Título.

---

UFPB/BC

CDU 547.9

---

*Livro aprovado para publicação através do Edital N° 01/2020/Editora Universitária/ UFPB - Programa de Publicação de E-books.*

**EDITORA UFPB**

Cidade Universitária, Campus I, Prédio da editora Universitária, s/n  
João Pessoa – PB

CEP 58.051-970

<http://www.editora.ufpb.br>

E-mail: [editora@ufpb.br](mailto:editora@ufpb.br)

Fone: (83) 3216.7147

# SUMÁRIO

<b>PREFÁCIO</b> .....	11
<b>AGRADECIMENTOS</b> .....	20
<b>DEDICATÓRIAS</b> .....	21
<b>SEÇÃO I – PRODUTOS NATURAIS E DERIVADOS DE PLANTAS</b>	
<b>01 AS PLANTAS MEDICINAIS NUMA ABORDAGEM HISTÓRICA E ETNOFARMACOLÓGICA</b> .....	23
Humberto de Carvalho Aragão Neto Ricardo Dias Castro Reinaldo Nóbrega de Almeida	
<b>02 ETNOBOTÂNICA E OS METABÓLITOS SECUNDÁRIOS</b> .....	43
Kiriaki Nurit-Silva	
<b>03 EXTRAÇÃO E ISOLAMENTO DE PRODUTOS NATURAIS DE PLANTAS E PRODUÇÃO DE DERIVADOS</b> .....	57
Gabriela Ribeiro de Sousa Laisla Rangel Peixoto Natanael Teles Ramos de Lima José Maria Barbosa Filho	
<b>04 DAS PLANTAS AOS FITOTERÁPICOS</b> .....	71
Catarina Alves de Lima Serafim Edvaldo Balbino Alves Júnior Maria Elaine Cristina Araruna Leônia Maria Batista	
<b>05 ALCALOIDES</b> .....	85
Ana Laura de Cabral Sobreira Diégina Araújo Fernandes Maria de Fátima Vanderlei de Souza	

**06 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE PRODUTOS NATURAIS E DERIVADOS DE PLANTAS..... 100**

Marcela Lins Cavalcanti de Pontes  
Inácio Ricardo Alves Vasconcelos  
Zilka Nanes Lima  
Zilmara Vieira Pedrosa  
Hilzeth de Luna Freire Pessôa

**07 ATIVIDADE ANTIPARASITÁRIA DOS PRODUTOS NATURAIS: UM ENFOQUE NA ESQUISTOSSOMOSE .....117**

Caliandra Maria Bezerra Luna Lima  
Clélia de Alencar Xavier Mota  
Allan Batista Silva

**08 O PAPEL DOS POLIFENÓIS NA PREVENÇÃO E/OU COMBATE ÀS DOENÇAS CARDIOVASCULARES ..... 132**

Arthur José Pontes Oliveira de Almeida  
Tays Amanda Felisberto Gonçalves  
Mathania Silva de Almeida Rezende  
Sabine Helena Dantas  
Isac Almeida de Medeiros

**09 ATIVIDADE ANTICONVULSIVANTE E NEUROPROTETORA DE PRODUTOS NATURAIS E DERIVADOS DE PLANTAS..... 155**

Gyllyandeson de Araújo Delmondes  
Irwin Rose Alencar de Menezes  
Cícero Francisco Bezerra Felipe  
Lucindo José Quintans Júnior  
Marta Regina Kerntopf

**10 APLICAÇÕES MÉDICAS OFTALMOLÓGICAS DE PRODUTOS NATURAIS E DERIVADOS DE PLANTAS ..... 171**

Luiza Toscano  
Micheline Freire Donato  
Caliandra Maria Bezerra Luna Lima  
Maria Carmen Toscano Tavares de Araújo  
Margareth de Fátima Formiga Melo Diniz

- 11 MEDICAL APPLICATIONS AND PHARMACOLOGY OF THE PHYTOCANNABINOIDS (APLICAÇÕES MÉDICAS E FARMACOLOGIA DOS FITOCANABINOIDES)..... 185**  
SPH Alexander
- 12 TOXICOLOGIA NÃO CLÍNICA IN VIVO DE PLANTAS MEDICINAIS USADAS NO TRATAMENTO DA ASMA ..... 202**  
Cinthia Rodrigues Melo  
Igor Gabriel da Silva Ramalho  
Caliandra Maria Bezerra Luna Lima  
Micheline Freire Donato  
Margareth de Fátima Formiga Melo Diniz
- 13 MODELOS DE AVALIAÇÃO DE TOXICOLOGIA REPRODUTIVA E DE GENOTOXICIDADE DE PRODUTOS BIOATIVOS ..... 216**  
Rita de Cássia da Silveira e Sá  
Mayara Karla dos Santos Nunes  
Aleson Pereira de Sousa  
Fernanda Patrícia Torres Barbosa  
Hilzeth de Luna Freire Pessôa
- 14 ALTERAÇÕES HISTOPATOLÓGICAS NOS ANIMAIS EM ESTUDOS TOXICOLÓGICOS DE PLANTAS MEDICINAIS..... 238**  
Giciane Carvalho Vieira  
Wesley Ferreira de Moraes Brandão
- 15 AROMATERAPIA E AS PLANTAS MEDICINAIS .. 251**  
Lívia Maria Trindade de Souza  
Heloisa de Freitas Pacífico  
Josemar dos Santos Soares  
Jucianny Sales Silva  
Liana Clébia de Moraes Pordeus

## **SEÇÃO II – TOXINOLOGIA: VENENOS, PEÇONHAS E TOXINAS DE ANIMAIS**

- 16 ANIMAIS VENENOSOS E PEÇONHENTOS ..... 265**  
Alexandre Augusto de Assis Dutra
- 17 SERPENTES DE IMPORTÂNCIA MÉDICA NO  
BRASIL ..... 281**  
Gentil Alves Pereira Filho  
Washington Luiz Silva Vieira  
Frederico Gustavo Rodrigues França
- 18 VENENOS E TOXINAS DE ARTRÓPODES ..... 304**  
Alessandra Matavel  
Barbara Bruna Ribeiro Oliveira-Mendes  
Ana Luiza Bittencourt Paiva
- 19 VENENOS E TOXINAS DE PEIXES ..... 323**  
Helena B. Fiorotti  
Fabiana V. Campos  
Fábio L. S. Costa  
Suely G. Figueiredo
- 20 ARSENAL BIOQUÍMICO DAS PEÇONHAS DE  
SERPENTES: FONTE DE NOVOS FÁRMACOS ..... 337**  
Thyfanne Suelen Tavares Linhares  
Micheline Freire Donato
- 21 ESTRUTURA E ATIVIDADE FARMACOLÓGICA DE  
TOXINAS DE TRÊS-DÍGITOS (“THREE-FINGERS  
TOXINS”) DE SERPENTES ELAPIDAE ..... 354**  
Micheline Freire Donato  
Luana Moreira Resende
- 22 ATIVIDADE FARMACOLÓGICA DE FOSFOLIPASES  
A2 DE SERPENTES ELAPIDAE ..... 373**  
Allan Leal  
Bruna Trindade Borges  
Carlos Gabriel M. de Almeida  
Cháriston André Dal Belo

- 23 VENENOS E TOXINAS NAS TERMINAÇÕES NERVOSAS E NEUROMUSCULARES .....386**  
Anita de Oliveira Silva  
Éder Ricardo de Moraes
- 24 PEPTÍDEOS ANTIMICROBIANOS ISOLADOS DE ARTRÓPODES ..... 398**  
Daniel Moreira dos Santos  
Pablo Victor dos Reis
- 25 PNPP-19, PEPTÍDEO SINTÉTICO DERIVADO DE UMA TOXINA DA ARANHA PHONEUTRIA NIGRIVENTER, COMO POTENCIAL FÁRMACO PARA O TRATAMENTO DA DISFUNÇÃO ERÉTIL ..... 413**  
Carolina Nunes da Silva  
Maria Elena de Lima
- 26 TOXINAS E PEPTÍDEOS DE ARANHA E VESPA COM ATIVIDADE NEUROPROTETORA ..... 427**  
Wagner Ferreira dos Santos

### **SEÇÃO III – INOVAÇÃO TECNOLÓGICA, DRUG DISCOVERY E PRÓTIPOS DE FÁRMACOS**

- 27 ESTUDOS IN SILICO ADMET NA BIOPROSPECÇÃO DE FÁRMACOS ..... 447**  
Heloísa Mara Batista Fernandes de Oliveira  
Aleson Pereira de Sousa  
Abrahão Alves de Oliveira Filho
- 28 TRANSCRIPTOMA DE VENENOS E TOXINAS RECOMBINANTES ..... 461**  
Luciana Souza de Oliveira  
Valéria Gonçalves de Alvarenga
- 29 TECNOLOGIAS APLICADAS À DESCOBERTA DE FÁRMACOS ..... 472**  
Ellen Gonçalves de Oliveira  
João Paulo L. Velloso  
Rubens L. do Monte-Neto

- 30 TECHNOLOGICAL INNOVATION AND DELIVERY SYSTEM BIOPROSPECTING THE NATURAL PRODUCTS (INOVAÇÃO TECNOLÓGICA E SISTEMA DE ENTREGA NA BIOPROSPECÇÃO DE PRODUTOS NATURAIS) ..... 492**  
Ana Letícia Braz
- 31 BIOMATERIAIS COMO NOVAS POSSIBILIDADES DE TRATAMENTO E DIAGNÓSTICO EM ODONTOLOGIA ..... 506**  
Lilia van der Linden  
Caroline Uchôa Souza Carvalho  
Kalinka Zuleika da Silva Dias  
Mysrayn Yargo de Freitas Araújo Reis  
Fabio Correia Sampaio
- 32 CULTIVOS CELULARES E SUAS APLICAÇÕES BIOTECNOLÓGICAS E NA INDÚSTRIA FARMACÊUTICA ..... 521**  
Sérgio Ricardo Aluotto Scalzo  
Anderson Kenedy Santos
- 33 PATENTES E INOVAÇÃO TECNOLÓGICA A CAMINHO DE UM MEDICAMENTO ..... 536**  
Bruno Cabral de Lima Oliveira  
Flávia De Marco Almeida  
Rosângela da Silva Lomeo

## PREFÁCIO

O livro *“Bioprospecção e Inovação Tecnológica de Produtos Naturais e Derivados de Plantas e Animais”* foi concebido a partir na necessidade de unir áreas aparentemente distintas, mas que cruzam seus estudos e aplicações acerca da prospecção de fármacos e medicamentos oriundos de produtos naturais, em especial da rica biodiversidade brasileira. A obra é composta por 33 capítulos e está dividida em três seções sendo a primeira, “Produtos Naturais e Derivados de Plantas”, em que estão reunidos os capítulos com abordagens diversificadas, como os aspectos históricos, a etnofarmacologia, etnobotânica, os processos fitoquímicos, as atividades antimicrobiana, antiparasitária, cardiovascular, anticonvulsivante e neuroprotetora, as suas aplicações médicas oftalmológicas, aplicações médicas e farmacologia dos fitocannabinóides, a Toxicologia geral, reprodutiva, genotoxicidade, as alterações histopatológicas observadas em animais, além da Aromaterapia e as plantas medicinais. A

segunda parte, “Toxinologia: venenos, peçonhas e toxinas de animais”; a terceira, “Inovação tecnológica, *Drug Discovery*” e Protótipo de Fármacos”. O livro tem como objetivo suprir algumas lacunas e atender as reais necessidades de alunos da Pós-graduação e Graduação das áreas da Saúde, Biológicas, Biotecnologia e Química Medicinal. Este livro traz temas selecionados e elaborados por especialistas jovens e sênior, e fornece ferramentas para fortalecer o processo de ensino-aprendizagem, formação intelectual e reflexão científica.

Micheline Donato &  
Reinaldo Almeida

*Professor Titular aposentado e voluntário do Depto de Ciências Farmacêuticas, CCS/UFPB; Membro Permanente da Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, UFPB.*

Venenos animais são considerados uma extensa fonte de compostos bioativos que apresentam grande diversidade estrutural e farmacológica, sendo, portanto, uma área ilimitada e abundante a ser explorada. Estes componentes quando isolados constituem um instrumento efetivo para a

manipulação de sistemas fisiológicos, podendo originar modelos químicos de candidatos a novas drogas, que têm sido amplamente utilizadas por empresas de pesquisa em bioprospecção. A segunda seção deste livro apresenta uma cobertura compreensiva sobre estudos desenvolvidos com venenos de várias espécies de animais e suas toxinas – a toxinologia –, mostrando seu potencial para aplicação biotecnológica.

Suely Gomes de Figueiredo

*Professora Titular de Bioquímica do Departamento de Ciências Fisiológicas, da Universidade Federal do Espírito (UFES);  
Toxinologista.*

Na seção “Toxinologia - venenos, peçonhas e toxinas de animais”, o estudo de toxinas animais tem nos revelado ferramentas valiosas para a compreensão de fenômenos biológicos, bem como tem identificado moléculas com alto valor econômico. Essas toxinas são fruto dos milhões de anos de evolução dos animais peçonhentos, durante os quais foram sendo selecionadas aquelas moléculas capazes de atuar em

baixas concentrações em alvos vitais - para matar ou paralisar suas presas. É essa capacidade de atuar com alta afinidade que as tornam ferramentas importantes para a Ciência. Servem de sondas moleculares capazes de inibir ou alterar o funcionamento normal de enzimas ou canais iônicos, assim permitindo a identificação e o estudo do funcionamento dessas estruturas. Dependendo do alvo, essa inibição ou alteração funcional poderá atuar de forma benéfica em situações patológicas, o que as torna modelos valiosos para a criação de novos fármacos com alta eficiência e especificidade. Por outro lado, também é importante se conhecer os efeitos do veneno que contém essas toxinas sobre o ser humano, para termos uma conduta racional e baseada em evidência no tratamento de pessoas que sofreram acidentes com animais peçonhentos. A biodiversidade brasileira nos oferece a oportunidade e o desafio de conhecermos a enorme variedade das toxinas presentes nos animais peçonhentos existentes no nosso país, e nesse livro podemos encontrar parte

significativa desses resultados. Ao ver esses relatos, podemos nos entusiasmar com essas elegantes moléculas e ter uma ideia da perda que se tem ao se destruir de forma insensata a natureza e o tesouro contido na nossa biodiversidade.

Paulo Sérgio Lacerda Beirão

*Professor Titular do Departamento de Bioquímica e Imunologia da UFMG; Comendador da Ordem Nacional do Mérito Científico; Membro titular da Academia Brasileira de Ciências; Diretor de Ciência, Tecnologia e Inovação da FAPEMIG.*

Na terceira seção de “Bioprospecção e Inovação Tecnológica de Produtos Naturais e Derivados de Plantas Plantas e Animais” o leitor terá oportunidade de acompanhar o Estado da Arte de tecnologias voltadas à descoberta e desenvolvimento de fármacos. Trata-se de num compêndio multidisciplinar escrito por especialistas que atuam desde as caracterizações moleculares à proteção intelectual; pesquisadores jovens e experientes de destaque nacional e internacional, atuando em instituições como a UFPB, UEPB, UFMG, Fundação Ezequiel Dias, Fiocruz e

University of Nottingham. Nesta seção as organizadoras exploram o tema em ordem de complexidade, apresentando inicialmente a bioprospecção de fármacos em seus aspectos químicos e físicos, considerando ferramentas de modelagem molecular e de predição da farmacocinética e farmacodinâmica. Em seguida o leitor tem a chance de acessar a aplicação de inovações tecnológicas, por exemplo, do estudo de venenos e toxinas à utilização teranóstica de biomateriais em odontologia, passando por sistemas de liberação de fármacos. A seção tem seu *grand finale* brindado com a aplicação biotecnológica do cultivo celular e com os aspectos legais na trajetória uma molécula até se tornar um medicamento disponível no mercado. A obra se contextualiza num cenário de rápida evolução tecnológica, cuja obsolescência tem meia vida de dois anos em média. Novas tecnologias de sequenciamento de DNA, democratização e acesso a novas alternativas para caracterização de moléculas e os avanços no processamento de dados, guiam o

desafio da descoberta de fármacos para o tratamento e organização da informação, exigindo equipes multidisciplinares e dispostas a se adaptarem ao mundo 4.0. A seção III busca atrair o leitor e lhe apresentar o que se tem de mais atual na área, mesmo que as tecnologias ainda não estejam completamente desenvolvidas, portanto, uma visita ao futuro na descoberta e desenvolvimento de fármacos. Nesse contexto, estimula a busca por aprofundamento no tema e dá caminhos para que o leitor mais esperto busque conhecimentos.

Como egresso do Programa de Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, é uma honra e imenso prazer poder compartilhar e colaborar com esse trabalho, organizado por queridas amigas e companheiras de turma do Mestrado, Micheline e Caliandra, além de eternas professoras Hilzeth Lima e Margareth Diniz (última magnífica reitora reeleita da UFPB). A obra é um compêndio que em suas entrelinhas revela as afirmações das mulheres

cientista e se traduz em qualidade e equidade na produção científica nacional.

Rubens Lima do Monte Neto

*Egresso do Programa de Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos – UFPB/2005-2007*  
*Pesquisador em Saúde Pública da Fundação Oswaldo Cruz – Instituto René Rachou, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil*

Prediction of biological activity of chemical compounds is one of the most important applications of informational technology, particularly, statistical, and more recently, machine learning and artificial intelligence methods in chemical sciences. This book summarizes some recent technological advances achieved by UFPB in these fields and also highlights the applicability of informational and computational techniques to a wide range of research areas including computer-assisted drug design, computational toxicology, nanotechnology, natural products, and, recently clinical informatics and antiviral research in section three. With recent enormous spike of the amount of data generated in all fields of science and technology, the knowledge of

robust data-driven computational and data science methods will become essential for scientists working both in experimental and especially theoretical laboratories. Moreover, this book will serve to address the modern challenges in the field.

Eugene N Muratov

*Research Associate Professor and Associate Director of the Laboratory for Molecular Modeling at the UNC Eshelman School of Pharmacy, University of North Carolina, Chapel Hill, NC. Professor Visitante da PGPNSB/ DCF-UFPB.*

## **AGRADECIMENTOS**

À Editora UFPB pela iniciativa da chamada e suporte, em parceria com a Universidade Federal da Paraíba que prioriza a educação e formação de qualidade.

À Associação Brasileira de Apoio Cannabis Esperança - ABRACE pelas imagens concedidas.

Ao desenhista e ilustrador Jocean Lima pelas ilustrações e artes.

Aos órgãos de fomento nacionais CNPq e CAPES, pelas bolsas de pesquisa e financiamento de projetos.

*Aos Pesquisadores cientistas e Acadêmicos, que fazem da Ciência a sua maior missão de vida e contribuição ao Planeta, nossa grande morada. Laboriosamente vibram no universo todas as invenções antes mesmo de torná-las realidade e, como num passe de mágica cheio de fofato e alquimia, se debruçam sobre células, modelos de experimentação animal, vidrarias, reagentes e máquinas transformando o inimaginável numa grande descoberta.*

*Aos nossos adoráveis parentes: pais, filhos, cônjuges e irmãos, alguns in memoriam*

Dedicamos

# Seção 1: PRODUTOS NATURAIS E DERIVADOS DE PLANTAS

Figura 1  
Semente da Árvore Pau Rosa,  
produto linalol (Aniba roseodora).  
Ilustração: Caneta nanquim.



Figura 2  
Caule do Pau Rosa, produto linalol  
(Aniba roseodora).  
Ilustração: Técnica em tinta aquarela

Figura 3

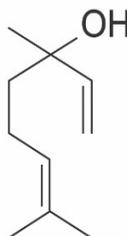


Figura 3  
Estrutura química do Linalol

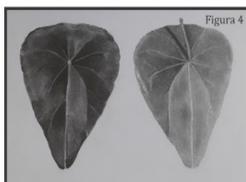


Figura 4  
Folha da planta *Cissampelos sympodialis* (milona)  
Ilustração: Lápis grafite

Figura 5  
Semente da planta  
*Cissampelos sympodialis* (milona)  
Ilustração: Lápis grafite



## *CAPÍTULO 01*

# **AS PLANTAS MEDICINAIS NUMA ABORDAGEM HISTÓRICA E ETNOFARMACOLÓGICA**

Humberto de Carvalho Aragão Neto;

Ricardo Dias Castro;

Reinaldo Nóbrega de Almeida.

### **Introdução**

A observação de fatos e fenômenos da natureza constitui a base de sustentação para acumulação de conhecimentos por toda humanidade. Até o surgimento do conhecimento científico, que, considerando uma perspectiva teórica, ocorreu por volta do século XVI, a elaboração e transmissão do saber popular colaborou para desenvolvimento das diferentes sociedades nos campos da produção de alimentos, construção de cidades, proposição de normas de comportamento, bem como de cuidados em saúde.

O uso de plantas medicinais constituiu, durante muito tempo, a principal estratégia pelos seres humanos para tratamento das doenças. E, ainda hoje, os produtos naturais, incluindo os de origem vegetal e animal, são considerados fontes para proposição cerca de 85% dos medicamentos aprovados pela Food and Drug Administration (FDA) entre os anos de 1994 e 2014 nos Estados Unidos da América, seja a partir do isolamento de moléculas, semi-síntese das mesmas ou síntese orgânica com inspiração em estruturas químicas encontradas na natureza<sup>1</sup>.

O conhecimento científico, ao se apropriar do saber popular acerca do uso de plantas medicinais, incorpora o conceito de etnofarmacologia para designar a área de conhecimento que tem como objeto de interesse a investigação destinada ao descobrimento e desenvolvimento de novos medicamentos a partir da diversidade cultural e biológica de diferentes regiões geográficas. Ou seja, a etnofarmacologia é o ramo do conhecimento que se destina ao estudo das propriedades medicinais de

produtos naturais a partir do uso e conhecimento popular.

Neste capítulo propomos discutir a aplicação da etnofarmacologia como estratégia para ampliação do conhecimento sobre propriedades medicinais de espécies vegetais, com ênfase nos estudos científicos que abordaram os principais biomas brasileiros, destacando as principais plantas medicinais, populações estudadas e forma de utilização.

## **Desenvolvimento**

O Brasil é um país com grande diversidade de plantas e de grupos sociais. Esses fatores impulsionam o desenvolvimento de terapias baseadas em recursos medicinais oriundos de produtos naturais. O uso popular de plantas no Brasil é resultado do conhecimento acumulado e da interação entre diferentes culturas ao longo dos anos<sup>2</sup>.

Do ponto de vista histórico, a chegada dos povos europeus às terras americanas tinha o propósito de exploração de recursos naturais que as

terras conquistadas poderiam oferecer especialmente ouro e metais preciosos. Entretanto, o vasto domínio do uso das plantas nativas pelos povos indígenas chamou atenção dos primeiros viajantes, a exemplo de Gabriel Soares de Souza (1879) que cita a “embaíba”, utilizada no tratamento de feridas, e a “caraobamirim” para o tratamento de febre<sup>3</sup>; padre jesuíta Fernão Cardim que, entre os anos de 1583 a 1601, registrou as propriedades medicinais da “teigcucu” (para tratar “febres), “cayapiá” (uso contra veneno de cobra) e “erva santa” (usada no tratamento de feridas, catarros, doenças no estômago e asma)<sup>4</sup>. Para os colonos, conhecer a nova terra significava aprender a dominar a natureza a partir do conhecimento dos nativos, incluindo aspectos relacionados aos tipos e usos de plantas curativas.

Atualmente, os estudos etnofarmacológicos contribuem para o avanço do conhecimento sobre as plantas medicinais e sustentam hipóteses de pesquisas no campo da farmacologia (básica e clínica) e química medicinal.

A realização de pesquisas científicas no campo dos estudos culturais, a exemplo dos estudos etnofarmacológicos, deve envolver uma pluralidade de conhecimentos que sustente a complexidade do objeto de investigação. Do ponto de vista cultural, é necessário considerar valores e percepções, sejam do pesquisador ou sujeito. Para Laraia (2008), o modo de ver o mundo, as apreciações de ordem moral e valorativas são produtos de uma herança cultural e influenciam diretamente no modo de agir e pensar das pessoas<sup>5</sup>.

De modo geral, os estudos etnofarmacológicos consideram populações com características culturais e sociais peculiares e que estão inseridas em regiões geográficas com características botânicas singulares. Por exemplo, *Aloe vera*, conhecida popularmente como babosa, apresentada na Figura 1, é uma planta comum em regiões de clima tropical e amplamente utilizada pela população brasileira, devido sua propriedade cicatrizante<sup>6</sup>. Assim, diferentes populações indígenas, comunidades quilombolas,

moradores de periferias de grandes centros urbanos, por não terem acesso facilitado aos serviços de saúde, desenvolvem estratégias de autocuidado em saúde que, muitas vezes, são caracterizadas pela utilização de plantas medicinais, e a transmissão oral das informações, que ocorrem de pais para filhos, representam a forma mais comum de disseminação do conhecimento. Profissionais de saúde, líderes espirituais e comerciantes de ervas e produtos naturais em feiras livres podem ser incluídos nos estudos. Os pesquisadores utilizam geralmente metodologias qualitativas e quantitativas para coleta e análise dos dados.

Instrumentos específicos para coleta e análise dos dados podem ser utilizados para determinar a versatilidade de uso das plantas a partir do índice de importância relativa (IR)<sup>7</sup> e identificação das principais indicações terapêuticas considerando os sistemas corporais<sup>8</sup>. A identificação botânica das espécies citadas pelos entrevistados corresponde uma das estratégias investigativas.

Figura 1. A *Aloe vera*, popularmente conhecida como Babosa, é uma planta que cresce em climas tropicais. Esta espécie é amplamente utilizada pela população brasileira, e desempenha importante contribuição na evolução histórica da etnofarmacologia no país. Seu uso medicinal decorre principalmente de sua atividade cicatrizante.



Fonte: Foto do autor.

As principais variáveis de estudo relacionadas aos estudos etnofarmacológicos são: nomes popular e científico das plantas, indicações terapêuticas, parte da planta utilizada (folha, caule, flores, etc), forma de preparo (infusão, maceração, decocção, etc) e modo

de utilização (aplicação tópica, uso interno, inalação, etc).

O quadro 1 apresenta os resultados de estudos etnofarmacológicos realizados em diferentes regiões brasileiras, adotando algumas variáveis como: região onde é possível encontrar as plantas medicinais, o público que faz uso dessas plantas, o nome popular das principais plantas citadas nas pesquisas e a forma com que elas são utilizadas na medicina tradicional. A figura 2 esquematiza o uso de plantas medicinais pela população que reside na região Nordeste. Essas variáveis são importantes, pois fornecem uma perspectiva da profundidade com que as plantas medicinais estão inseridas no cotidiano da população.

O uso popular de plantas medicinais no Brasil é um processo de produção e reprodução de conhecimentos e práticas variadas, originários de diferentes culturas, resultantes da interação social entre vários grupos que compõem, neste caso, a cultura brasileira, a exemplo das comunidades tradicionais (pantaneiros, quilombolas, pescadores,

indígenas, agricultores familiares e raizeiros), que possuem um amplo conhecimento sobre plantas e seu ambiente <sup>2,9</sup>.

O hábito de usar plantas medicinais na rotina ainda é comum em populações que residem nas pequenas cidades. Isso decorre principalmente de uma tradição baseada na agricultura e pecuária. Essa população incorpora a natureza em sua cultura, e implementa um sistema extrativo essencialmente baseado na intuição e nos conhecimentos adquiridos de geração em geração através dos antepassados, muitas vezes sem nenhum ou pouco embasamento científico<sup>10</sup>.

Sabendo que muitas pessoas fazem uso de plantas medicinais para os mais diversos fins, uma das etapas cruciais e que determina a efetividade da terapia trata-se do cultivo da planta. Quando feito corretamente ele é capaz de manter e aprimorar ambos, produção e qualidade da matéria-prima vegetal, a fim de garantir as propriedades fitoquímicas e farmacológicas.

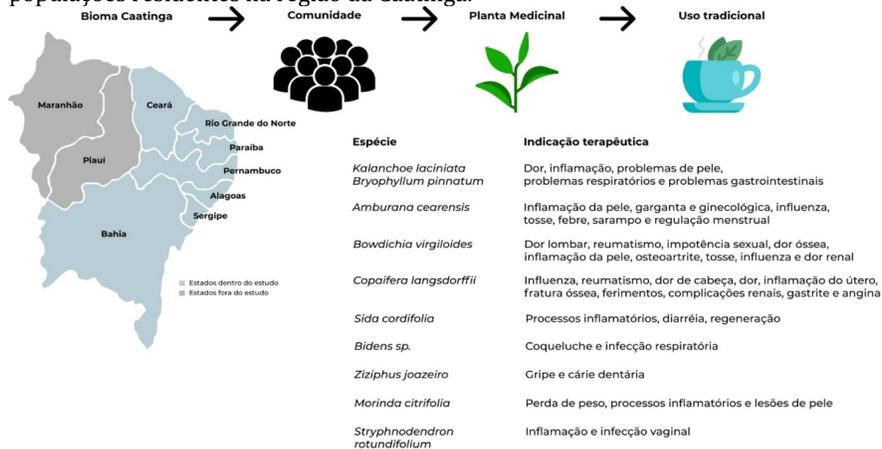
Em locais onde a medicina popular se mantém forte, as plantas medicinais em sua maior parte são comercializadas pelos próprios produtores, ou seja, pelas pessoas responsáveis pelo cultivo e coleta da planta<sup>11</sup>. Os indivíduos que comercializam as plantas medicinais são conhecidos como “Raizeiros” ou “Erveiros”. Eles podem ser localizados em feiras livres, mercados ou no meio da rua. Inexiste garantia científica que a planta correta está sendo comercializada, muito menos se ela foi cultivada e coletada adequadamente. Em sua grande parte, essas atividades estão atreladas ao conhecimento popular das pessoas que a praticam<sup>11</sup>.

Geralmente as plantas medicinais são comercializadas em sua forma seca, pulverizada, fragmentada ou suas partes isoladas (sementes, raízes, folhas ou cascas), dificultando a correta identificação das espécies<sup>11</sup>.

Quadro 1. Informações de estudos etnofarmacológicos realizados no Brasil.

<b>Localização</b>	<b>Público-alvo</b>	<b>Principais plantas citadas</b>	<b>Formas de utilização</b>	<b>Referência</b>
Município de Marmeleiro - Paraná	Idosos de área urbana	Erva-cidreira, malva, quebra-pedra, sálvia, camomila, o guaco, carqueja, macela, pata-de-vaca, alecrim e babosa	Infusão e decocção	Balbinot, Velasquez e Düsman, 2013 [12]
Rio Unini - Amazonas	Comunidade ribeirinha	Breu branco, guanandi, copaíba e jatobá	Exsudatos	Lago et al., 2016 [13]
Municípios de Nova Olinda, Crato, Barbalha, Moreilândia e Exu - Pernambuco e Ceará	Comunidades rurais	Imburana de cheiro, Copaíba, Barbatimão, Sucupira	Infusão e/ou decocção	Macedo et al., 2018 [14]
Municípios de São Gabriel, Santana do Livramento,	Comunidade local	Capim-limão, falso-boldo, carqueja, funcho	Infusão e/ou decocção	Teixeira et al., 2016 [11]
Bagé, Uruguaiana e Santa Maria - Rio Grande do Sul				
Alagoas, Pernambuco, Bahia, Rio Grande do Norte, Ceará, Paraíba, Sergipe, Espírito Santo, Rio de Janeiro, Minas Gerais, São Paulo, Paraná, Santa Catarina, Distrito Federal, Mato Grosso do Sul e Acre	População geral	Saião	Suco, decocção, infusão, xarope, cataplasma e pasta	Fernandes et al., 2019 [15]
Alto Amazonas (AM), Alto Envira/Tarauacá (AC)	Comunidade local	Pau-mulato	Cataplasma, emplasto, infusão, decocção, xampu e creme	Santos et al., 2016 [16]
Campo Grande - Mato Grosso do Sul	Comunidade local	Cajuzinho do Cerrado, Moreira, Alecrim do Campo, Jenipapo, Japocanga, Espinho-de-sogra, Arnica do campo e Guavira	Infusão e/ou decocção	Mendonça et al., 2019 [2]
Ilha Massangano, Ilha Rodeadouro e Ilha Jatobá - Vale do Rio São Francisco	Residentes das ilhas	Hortelã, malva-santa, picão-preto, juá, mastruz, pitanga, arruda	Chá, banho e/ou xarope	Pio et al., 2019 [10]

Figura 2. Esquema dos estudos etnofarmacológicos realizados nos últimos 5 anos com populações residentes na região da Caatinga.



Fonte: Elaborado pelos autores.

Nesse contexto, o uso popular das plantas medicinais ainda precisa se fortalecer, principalmente em termos de disseminação do conhecimento para os usuários. É necessário entender que a atividade terapêutica da planta medicinal é baseada no mesmo princípio do medicamento sintético, ou seja, as mesmas substâncias que trazem efeitos benéficos, também podem causar efeitos maléficos, o que demanda cuidado em sua utilização. Ainda existe um mito de que por ser planta e por ser natural não promoverá mal. Esse mito precisa ser extinto, uma vez que a utilização da preparação e via incorretas, a dose exagerada, e a planta inadequada (em virtude de uma identificação errônea) para determinada condição podem ocasionar transtornos ao indivíduo, intoxicações ou efeitos adversos.

Um marco importante para a disseminação da informação segura sobre plantas medicinais ocorreu no ano de 1978 em Genebra, com a Conferência Internacional sobre Atenção Primária em Saúde, cujo resultado foi a elaboração da Declaração de Alma Ata,

onde a partir de então, a Organização Mundial da Saúde (OMS) passou a reconhecer o uso de plantas medicinais com finalidade profilática, curativa e paliativa<sup>17</sup>.

A institucionalização de práticas em saúde que consideram o uso de plantas medicinais está inserida no contexto do Sistema Único de Saúde (SUS), que a partir de estratégias que consideram a universalização e a integralidade do atendimento, valoriza e impulsiona a prática da fitoterapia. Como reflexo disso, e em consonância com as recomendações da OMS, o Ministério da Saúde criou a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC) através da portaria nº 971 de 03 de maio de 2006, contemplando, entre outras práticas, a implantação de ações e serviços relacionados à fitoterapia. Essa política incentivou a elaboração de uma relação nacional de plantas medicinais e de fitoterápicos, o provimento e acesso de plantas medicinais e fitoterápicos aos usuários do SUS, bem como, o incentivo à pesquisa, ao

desenvolvimento de plantas medicinais e fitoterápicos, priorizando a biodiversidade brasileira<sup>18</sup>.

Percebe-se, portanto, que a relação entre os saberes populares e científicos associados ao uso de plantas medicinais representa uma importante estratégia para tratamento de doenças, pois incorporam aspectos de vínculo, autocuidado, eficácia e segurança dos agentes terapêuticos.

### **Considerações Finais**

Não obstante os grandes avanços atualmente vivenciados no desenvolvimento de novos produtos medicamentosos para prescrição das mais diversas condições clínicas, os estudos para obtenção de fármacos que possam ser mais eficazes ou mesmo ter uma maior seletividade de ação e menos efeitos indesejáveis, tem se ampliado em todo o mundo.

Dentro dessa perspectiva as plantas medicinais aliadas ao conhecimento popular fazem parte das estratégias.

Um exemplo está no presente momento em que se enfrenta a pandemia decorrente da COVID-19, onde tem se visto uma intensa corrida na busca de vacinas e de possíveis medicamentos que de alguma forma possa contribuir o tratamento da doença. Portanto, as plantas medicinais podem representar uma das importantes fontes para esse fim terapêutico.

## Referências

1. Newman DJ, Cragg GM. Natural products as sources of new drugs from 1981 to 2014. *J. Nat. Prod.* 2016; 79(3):629-61.
2. Mendonça LABM, Matias R, Zanella DFP, Porto KRA, Guilhermino JF, Moreira DL, Roel AR, Pott A, Carvalho CME. Toxicity and phytochemistry of eight species used in the traditional medicine of sul-mato-grossense, Brazil. *Braz. J. Biol.* In Press 2019. Epub Oct 21, 2019.
3. Souza GS. Tratado descritivo do Brasil em 1587. 2ª Ed. Rio de Janeiro: Typographia de João Ignácio da Silva. 1879; 409.

4. Cardim, F. *Tratados da terra e gente do Brasil: introduções e notas de Baptista Caetano, Capístrano de Abreu e Rodolpho Garcia*. Rio de Janeiro: J. Leite & Cia. 1925; 440.
  
5. Laraia RB, 2008. *Cultura: um conceito antropológico*. 22<sup>a</sup> ed. Rio de Janeiro: Jorge Zahar. 2008, 117.
  
6. Faleiro CC, Elias STH, Cavalcanti LC, Cavalcanti ASS. O extrato de folhas de babosa, *Aloe Vera* na cicatrização de feridas experimentais em pele de ratos, num ensaio controlado por placebo. *Natureza on line*. 2009; 7(2):56-60.
  
7. Bennett BC, Prance GT. Introduced plants in the indigenous pharmacopoeia of Northern South America. *Econ. Bot.* 2000; 54(1):90-102.
  
8. Trotter R, Logan M. Informant consensus: a new approach for identifying potentially effective medicinal plants. *Indigenous medicine and diet: biobehavioural approaches*. J. Ethnopharmacol. 1986; 91-112.

9. Athayde EAD, Richetti E, Wolff J, Garibotti M, Weber M, Sphagneticola L. “Arnicas” from Brazil: comparative analysis among ten species. *Rev. Bras. Farmacogn.* 2019; 29(4): 401-24.
  
10. Pio IDSL, Lavor AL, Damasceno CMD, Menezes PMN, Silva FS, Maia GLA. Traditional knowledge and uses of medicinal plants by the inhabitants of the islands of the São Francisco river, Brazil and preliminary analysis of *Rhaphiodon echinus* (Lamiaceae). *Braz. J. Biol.* 2019; 79(1):87-99.
  
11. Teixeira MP, Cruz L, Franco JL, Vieira RB, Stefenon VM. Ethnobotany and antioxidant evaluation of commercialized medicinal plants from the Brazilian Pampa. *Acta Bot. Bras.* 2016; 30(1): 47-59.
  
12. Balbinot S, Velasquez PG, Dusman E. Reconhecimento e uso de plantas medicinais pelos idosos do Município de Marmeleiro - Paraná. *Rev. Bras. Plantas Med.* 2013; 15(4): 632-38.

13. Henrique J, Lago G, Tezoto J, Yazbek PB, Cassas F, Santos JDFL, Rodrigues E. Exudates used as medicine by the “caboclos river-dwellers” of the Unini River , AM , Brazil – classification based in their chemical composition. Rev. Bras. Farmacogn. 2016; 26(3): 379–384.
  
14. Macêdo MJF, Ribeiro, DA, Santos, MO, Macêdo JGF, Almeida BV, Saraiva ME, Lacerda MNS, Souza MMA. Fabaceae medicinal flora with therapeutic potential in Savanna areas in the Chapada do Araripe, Northeastern Brazil. Rev. Bras. Farmacogn. 2018, 28(3): 738–750.
  
15. Fernandes JM, Cunha LM, Azevedo EP, Fernandes-Pedrosa MF, Zucolotto SM. *Kalanchoe laciniata* and *Bryophyllum pinnatum*: an updated review about ethnopharmacology, phytochemistry, pharmacology and toxicology. Rev. Bras. Farmacogn. 2019; 29(4): 529–558.
  
16. Santos AB, Ribeiro-Oliveira JP, Carvalho CM. Sobre a botânica, a etnofarmacologia e a química de *Calycophyllum spruceanum* (Benth.) Hook. f. ex K. Schum. Rev. Bras. Plantas Med. 2016; 18(1):383–389.

17. Organização Mundial De Saúde/Unicef. Cuidados Primários de Saúde. Brasília: Ministério da Saúde. Relatório da Conferência Internacional sobre Cuidados Primários da Saúde, Alma-Ata, URSS. 1979; 64.
  
18. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde, 2006. Departamento de Atenção Básica. Política Nacional De Práticas Integrativas e Complementares no SUS: atitude de ampliação de acesso / MS. Secretaria de Atenção à Saúde. Dpto de Atenção Básica. Brasília: MS. 2006; 92 p.: il. Disponível em: <<http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/pnpic.pdf>>. Acesso em 05 mai. 2020.

*CAPÍTULO 02*

**ETNOBOTÂNICA E OS METABÓLITOS  
SECUNDÁRIOS**

Kiriaki Nurit-Silva

As populações humanas, desde os primórdios, fazem uso dos recursos da natureza para sanar suas necessidades de sobrevivência, com finalidades diversas, seja na alimentação, vestuário, construção de moradias, fabricação de utensílios e ferramentas, bem como em suas práticas médicas e religiosas. Neste acervo de informações acumulado pelo homem sobre o ambiente que o cerca, destaca-se o conhecimento relativo ao mundo das plantas com o qual estas sociedades estão em contato <sup>(1)</sup>.

Embora a relação homem-plantas ocorra desde a antiguidade, o termo etnobotânica foi empregado pela primeira vez por John William Harshberger em 1895 <sup>(2)</sup>, para designar o estudo sobre a utilização dos vegetais por povos primitivos e aborígenes. Em um

conceito mais atual, de acordo com Albuquerque <sup>(3)</sup>, a etnobotânica estuda a relação entre a cultura de uma população com a biodiversidade de onde vivem, e promove a compreensão da origem, distribuição, usos e diversidade local.

Como um ramo da etnobotânica, a etnofarmacologia se preocupa em investigar práticas médicas usadas em sistemas tradicionais de medicina. A abordagem etnofarmacológica para o estudo de plantas medicinais consiste na combinação de informações adquiridas com as comunidades locais que fazem uso da flora medicinal, juntamente com estudos químicos / farmacológicos realizados em laboratórios <sup>(4)</sup>.

Estima-se que existam aproximadamente 430 mil espécies de plantas no mundo, das quais as espécies brasileiras perfazem entre 8,8 e 12,8% deste total <sup>(5)</sup>. Nesse cenário, o Brasil é considerado um País megadiverso, cujas estimativas atuais reconhecem 48.404 espécies para a flora brasileira <sup>(6)</sup>. Entre os elementos que constituem essa biodiversidade estão

as plantas medicinais, cujo conhecimento sobre o uso e preparo das espécies é oriundo da influência étnica dos povos indígenas, Africanos e Europeus <sup>(7)</sup>.

As plantas medicinais são utilizadas pela população com fins terapêuticos e em rituais religiosos, sendo esta uma prática repassada oralmente através das gerações, nos núcleos familiares e/ou sociais. A obtenção dessas plantas pela população ocorre, principalmente, através da compra a raizeiros em feiras e mercados públicos das cidades <sup>(8)</sup>, ou pela coleta em seus próprios domicílios, onde são cultivadas em jardins ou quintais.

Levantamentos etnobotânicos realizados em feiras e mercados públicos de diversas regiões brasileiras demonstram que os raizeiros possuem um amplo conhecimento acerca da utilização destas plantas para tratamento de diversas doenças, cujas partes (folhas, cascas de caules, raízes, inflorescências e frutos) são comercializadas na forma desidratada, acondicionadas em sacos plásticos ou em cestarias <sup>(8)</sup> (Figura 1).

Figura 1. Estocagem de plantas medicinais desidratadas comercializadas por raizeiros em uma feira livre da região Nordeste, acondicionadas em sacos (A) ou em cestos de palha contendo fragmentos de partes das plantas (B).



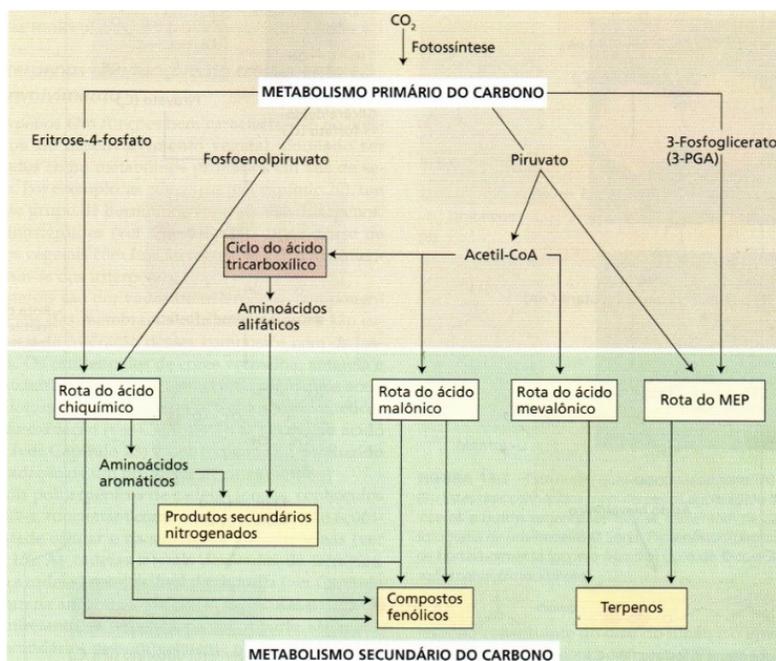
Fonte: Nóbrega, Nurit-Silva <sup>(8)</sup>.

Segundo Ashebo <sup>(9)</sup>, a coleta de informações locais sobre o uso de plantas com fins medicinais, por meio do registro do conhecimento das sociedades étnicas, fornece subsídios para a seleção de espécies a terem suas atividades avaliadas, através de estudos farmacológicos.

No metabolismo vegetal são formados inúmeros compostos químicos, os quais são divididos em metabólitos primários e secundários, dependendo

da via metabólica responsável pela sua síntese <sup>(10)</sup>  
(Figura 2).

Figura 2. Esquema das principais rotas biossintéticas dos metabólitos secundários e suas inter-relações com o metabolismo basal.



Fonte: Taiz, Zeiger <sup>(10)</sup>.

Os metabólitos secundários, ou metabólitos especiais, são derivados dos produtos do metabolismo basal (metabólitos primários),

sintetizados apenas durante fases específicas do desenvolvimento das plantas, cuja produção e biodisponibilidade são alterados por diversos fatores ambientais <sup>(11)</sup>.

São conhecidos cerca de 1.000 metabólitos especiais provenientes de plantas, caracterizados por possuírem baixa massa molecular, alta variabilidade química estrutural e distribuição limitada na natureza <sup>(11)</sup>, fato pelo qual podem ser utilizados como marcadores taxonômicos (quimiosistemática), fornecendo assim subsídios a identificação de espécies e de grupos vegetais.

Muitos metabólitos secundários possuem importância econômica e comercial nas áreas alimentar, agronômica, cosmética, e um grande valor do ponto de vista farmacêutico <sup>(10)</sup>, pelo fato de serem os princípios ativos das drogas vegetais.

As principais classes de compostos do metabolismo secundário extraídas de plantas estão divididos em três grupos quimicamente distintos:

terpenos ou terpenóides, compostos fenólicos e compostos nitrogenados <sup>(10)</sup>.

Os terpenos constituem a maior e estruturalmente mais diversa classe de metabólitos secundários, e são substâncias formadas pela fusão de unidades isoprênicas pentacarbonadas (unidades C<sub>5</sub>). São classificados como monoterpenos, sesquiterpenos, diterpenos, triterpenos, etc. <sup>(10)</sup>.

São sintetizados por duas rotas biossintéticas distintas: rota do ácido mevalônico, que ocorre no citoplasma, e rota do metileritritol fosfato (MEP), que ocorre nos plastídeos <sup>(10, 11)</sup> (Figura 2).

Monoterpenos e sesquiterpenos constituem a maioria dos componentes dos óleos voláteis que estão presentes em muitas drogas vegetais, e contribuem para as propriedades terapêuticas atribuídas a muitas espécies da família Lamiaceae, tais como *Mentha x piperita* L. (hortelã pimenta; ações antimicrobiana e carminativa), *Melissa officinalis* L. (melissa; ação antioxidante), além de outras famílias botânicas, como Myrtaceae, cujas espécies de *Eucalyptus*

(eucalipto) possuem cineol que lhe confere ação anti-inflamatória e antisséptica <sup>(12)</sup>.

Os compostos fenólicos encontram-se amplamente difundidos no reino vegetal, distribuídos por toda a planta e constituem um grupo quimicamente heterogêneo, sendo sintetizados por diferentes rotas metabólicas, como a rota do ácido chiquímico e a rota do ácido malônico <sup>(10)</sup> (Figura 2).

Os flavonoides constituem a maior classe de fenólicos vegetais, com grande diversidade química, cuja estrutura é formada a partir de 15 átomos de carbonos organizados em dois anéis aromáticos, os quais são conectados por uma ponte de três átomos de carbonos (C6-C3-C6) <sup>(10)</sup>.

Presente em grande abundância nas plantas superiores, especialmente nas Angiospermas, os flavonóides do ponto de vista farmacológico, possuem diversas atividades relacionadas a função de defesa do organismo, como antibacteriana <sup>(13)</sup>, antiviral <sup>(14)</sup>, antioxidante, antiinflamatória, antitumoral, estrogênica <sup>(15)</sup>, dentre outras.

Dentre os vegetais empregados na medicina popular, cujas ações são atribuídas a presença de flavonoides, podemos citar: *Passiflora alata* Curtis e *P. edulis* Sims (Passifloraceae), que possuem atividades sedativas, antiespasmódicas e ansiolíticas; *Citrus* spp. (Rutaceae), cujos heterosídeos de flavonas e de flavanonas presentes no pericarpo dos frutos possuem indicações no tratamento de manifestações de insuficiência venosa crônica <sup>(15)</sup>.

Os compostos nitrogenados são metabólitos secundários que possuem nitrogênio como parte de sua estrutura. Dentre estes, os alcaloides constituem uma das classes mais estudadas e conhecidas <sup>(10)</sup>, encontrados especialmente em plantas superiores, nos seus mais diversos tipos celulares <sup>(16)</sup>.

Os alcaloides são uma classe de metabólitos extremamente versáteis, que apresentam um nitrogênio na forma de heterociclo, biossintetizados a partir de aminoácidos, e constituem o grupo de produtos naturais de maior interesse farmacêutico <sup>(16)</sup>.

Alcalóides possuem papel na defesa dos vegetais, importante uso medicinal, muitos são empregados em rituais religiosos e de magia e, são considerados tóxicos tanto para animais quanto humanos <sup>(10)</sup>.

Relatos do uso de plantas medicinais que contêm alcaloides em sua constituição remontam a antiguidade, como *Papaver somniferum* L., de onde é extraída a morfina; *Atropa belladonna* L. e *Mandragora officinarum* L., dentre outros <sup>(16)</sup>. Os alcaloides possuem uma vasta gama de atividades biológicas, dependentes de sua estrutura química, dentre os quais podemos citar vimblastina e vincristina, alcaloides de *Catharanthus roseus* (L.) G. Don com atividade antitumoral; e a quinina, com ação antiparasitária <sup>(16)</sup>.

Considerando a megadiversidade vegetal brasileira, e a grande variedade de metabólitos secundários extraídos de plantas, estudos etnobotânicos com plantas medicinais possuem um papel fundamental para direcionar a pesquisa por

novos fármacos, através da descoberta de substâncias bioativas. Destaca-se, assim, a necessidade de somarem-se esforços de pesquisa, com vistas a se investir em estudos de bioprospecção da flora brasileira.

## **Referências**

1. Amorozo, MCM. A Abordagem etnobotânica na pesquisa de plantas medicinais. *In*: Di Stasi LC. Plantas medicinais: arte e ciência -um guia de estudo interdisciplinar. São Paulo: Unesp; 1996. p. 47-68.

2. Harshberger JW. Purposes of ethnobotany. *Botanical Gazette*. 1896; 21(3):146-154.

3. Albuquerque UP. Is the use-impact on native caatinga species in Brazil reduced by the high species richness of medicinal plants? *J. Ethnopharmacol*. 2007; 113(1):156-170.

4. Elisabetsky E. Etnofarmacologia como ferramenta na busca de substâncias ativas. *In*: Simões CMO et al. Farmacognosia: da planta ao medicamento. 6 ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRGS/Editora da UFSC; 2010. p. 87-99.

5. Forzza RC, [Baumgratz, JF](#), [Bicudo CEM](#), Canhos DAL, [Carvalho Junior A](#), Costa A et al. Síntese da Diversidade. *In*: Forzza RC et al. Catálogo de Plantas e Fungos do Brasil. 1 ed. Rio de Janeiro: Andrea Jakobsson Estúdio & Jardim Botânico do Rio de Janeiro. 2010; 1:21-42.

6. Flora do Brasil 2020 em construção. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. [acesso em 09 jun 2020]. Disponível em: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br>

7. Brandão MGL. Plantas Úteis e Medicinais na Obra de Frei Vellozo. 1. ed. Belo Horizonte: Editora 3i; 2018.

8. Nóbrega LB, Nurit-Silva K. Levantamento Etnobotânico de Plantas Medicinais Comercializadas por Raizeiros em uma Feira Livre no Município de Baraúna-PB. *In*: Anais do III Congresso Nacional de Pesquisa e Ensino em Ciências, 2018; Campina Grande. Campina Grande: Realize editora; 2018.

9. Ashebo TA. Review on the Qualitative Method of the Study of People-Plants' Relationship in their Environment. *Int J Environ Sci Nat Res*. 2019; 22(1):21-29.

10. Taiz L, Zeiger E. *Fisiologia Vegetal*. 5 ed. Porto Alegre: Artmed; 2013.
11. Kreis W, Munkert J, Pádua RM. Biossíntese de metabólitos primários e secundários. *In: Simões CMO et al. Farmacognosia: do Produto Natural ao Medicamento*. Porto Alegre: Artmed Editora; 2017. p. 147-166.
12. Heinzmann BM, Spitzer V, Simões CMO. Óleos voláteis. *In: Simões CMO et al. Farmacognosia: do Produto Natural ao Medicamento*. Porto Alegre: Artmed Editora; 2017. p. 167-184.
13. Adamczak A, Ozarowski M, Karpinski TM. Antibacterial Activity of Some Flavonoids and Organic Acids Widely Distributed in Plants. *J. Clin Med*. 2020; 9:109-125.
14. Lalani S, Poh CL. Flavonoids as Antiviral Agents for *Enterovirus A71 (EV-A71)*. *Viruses*. 2020; 12(2):184-217.
15. Zuanazzi JAS, Montanha JA, Zucolotto SM. Flavonoides. *In: Simões CMO et al. Farmacognosia: do*

Produto Natural ao Medicamento. Porto Alegre:  
Artmed Editora; 2017. p. 209-233.

16. Klein-Júnior L, Henriques AT. Alcaloides:  
generalidades e aspectos básicos. *In*: Simões CMO et  
al. Farmacognosia: do Produto Natural ao  
Medicamento. Porto Alegre: Artmed Editor

## *CAPÍTULO 03*

# **EXTRAÇÃO E ISOLAMENTO DE PRODUTOS NATURAIS DE PLANTAS E PRODUÇÃO DE DERIVADOS**

Gabriela Ribeiro de Sousa;

Laisla Rangel Peixoto;

Natanael Teles Ramos de Lima;

José Maria Barbosa Filho.

### **Introdução**

Tradicionalmente as plantas têm sido utilizadas em preparações simples (chás, tinturas, garrafadas) para alcançar fins terapêuticos. O avanço técnico-científico tornou possível o isolamento de substâncias bioativas que compõem o fitocomplexo. Sendo assim, as plantas vem sendo a principal fonte na busca de novos fármacos, sendo estes estruturalmente análogos ou derivados sintéticos mais potentes e seguros que o protótipo natural.

## **Extração de produtos naturais**

As pesquisas na área de química de produtos naturais utilizam técnicas simples e eficientes que ainda se mostram úteis na obtenção de variados compostos químicos. De modo geral, pode-se citar o processo de maceração e/ou percolação, extração por fluido supercrítico, processos de destilação para extração dos óleos voláteis e, cabe ainda destacar o Soxhlet para a extração de substâncias termo resistentes.

Com o intuito de aprimorar a efetividade da extração foram desenvolvidos métodos mais inovadores e modernos, alguns exemplos serão discutidos a seguir.

### **- Extração assistida por ultrassom (EAU)**

A extração utilizando ondas ultrassônicas promove a destruição da parede celular do vegetal facilitando a transferência de massa para o solvente, através de um processo chamado cavitação. É um método de baixo custo, simples e geralmente

apresenta melhores resultados que os métodos de extração convencionais. Krambeck e colaboradores<sup>(1)</sup> (2020) compararam a capacidade de extração utilizando método de Soxhlet e ultrassom e, apenas por EAU, foi detectado os teores de polifenóis (resveratrol e piceatanol) em sementes do maracujá. Este fato pode ter ocorrido devido à degradação de polifenóis, causada pelo uso de altas temperaturas e maior tempo de extração do método de Soxhlet.

- Extração assistida por micro-ondas (EAM)

O material vegetal que absorve as micro-ondas, sofre elevações pontuais na temperatura e na pressão intracelular, levando ao rompimento da membrana vegetal e liberação dos componentes para o líquido extrator. Em um estudo realizado por Jacotet-Navarro et al.<sup>(2)</sup> (2015), é visto que a EAM do alecrim resulta em maiores rendimentos com o aumento da temperatura e, que essa técnica é mais eficiente na obtenção do ácido rosmarínico quando comparada com a extração por ultrassom.

#### - Extração assistida por enzimas (EAE)

A extração assistida por enzimas consiste na degradação seletiva da parede celular vegetal, através de reações enzimáticas e, decorrente liberação dos compostos bioativos. As enzimas mais utilizadas em EAE são: as celulases, hemicelulases e pectinases. O interesse na aplicação deste método é que muitos compostos são encontrados associados às estruturas da matriz celular. A exemplo dos ácidos fenólicos que se encontram ligados às ligninas, as proteínas que complexam fortemente com os taninos e, os flavonoides que estão ligados covalentemente a estruturas de açúcares<sup>(3)</sup>.

#### - Extração por campo elétrico pulsado (ECEP)

A extração com a presença de um campo elétrico pulsado promove uma eletroporação (eletropermeabilização) que otimiza a difusão das substâncias para o líquido extrator pelo aumento da permeabilidade da membrana celular vegetal. Estudo realizado por Hossain e colaboradores<sup>(4)</sup> (2015)

demonstrou que o pré-tratamento com campo elétrico pulsado de maior intensidade aumentou o rendimento extrativo de alcaloides esteroidais das cascas de batata, quando comparado ao pré-tratamento com luz pulsada.

### **Métodos cromatográficos no isolamento de produtos naturais**

O avanço tecnológico proporcionou o surgimento de técnicas cromatográficas mais avançadas, com maior versatilidade, rendimento e pureza, em comparação com métodos cromatográficos clássicos tais como a cromatografia em papel (CP) e a cromatografia em camada delgada (CCD). O isolamento de produtos naturais só é possível quando os métodos analíticos são transpostos e adaptados para a escala preparativa, ou seja, quando utiliza uma maior quantidade de amostra na etapa de separação e, portanto, permite a coleta e o isolamento em quantidades substanciais.

A cromatografia é uma técnica que pode ser classificado de acordo com a FM ou FE (cromatografia líquida, supercrítica, gasosa) e pelo modo de separação (adsorção, partição, troca iônica, exclusão molecular). A cromatografia em coluna é a técnica mais usual para isolamento de substâncias puras advindas de uma fração complexa. É extensamente usada no fracionamento, isolamento e purificação de amostras; sendo uma técnica prática, de baixo custo e versátil. A CC, além do seu uso de bancada, pode ser adaptada a equipamentos automatizados, melhorando sua eficiência, velocidade e separação.

A cromatografia em camada delgada (CCD) é uma técnica planar aplicada na pesquisa científica como ferramenta auxiliar para racionalizar o processo de separação via CC e monitoramento da pureza de compostos. Existem diversos métodos aplicáveis em CCD, como a CCDA, a cromatografia em camada delgada de alta eficiência (do inglês, *High-performance thin-layer chromatography* - HPTLC) e a

cromatografia em camada delgada preparativa (CCDP).

Difere de métodos clássicos pelo uso de altas pressões e por empregar partículas de diâmetro reduzido como fase estacionária. Quanto menor a partícula, maior a pressão a ser utilizada para conduzir a fase móvel pela coluna e melhor a separação dos compostos. A fase estacionária pode ser classificada em fase reversa (apolar) ou fase normal (polar) e sua escolha vai depender, principalmente, da classe de compostos de interesse a serem isolados.

A Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) é a técnica analítica e/ou preparativa mais utilizada na área de produtos naturais, por ser eficaz na análise, quantificação e isolamento de diversas estruturas químicas.

Quadro 1. Exemplos de substâncias isoladas por CLAE

Substâncias Isoladas	Espécie	Ref.
Alcaloides	<i>Anaxagorea dolichocarpa</i>	5
Sesquiterpenos, Cromonas	<i>Evolvulus linarioides</i>	6
Flavonoides O- glicosilados, Vicenina-2	<i>Cissampelos sympodialis</i>	7
Soyasaponina II	<i>Zornia brasiliensis</i>	8
Triterpenos, diterpenos	<i>Stillingia loranthacea</i>	9

Fonte: Elaborado pelos autores

A Cromatografia Contracorrente (CCC) é uma técnica de separação baseada no coeficiente de partição líquido-líquido do soluto, sem fase estacionária sólida. A FE líquida é retida na coluna por uma força centrífuga enquanto uma fase móvel imiscível passa. A CCC pode ser usada largamente na separação, isolamento e purificação de produtos naturais, biológicos e enantiômeros. A Cromatografia Contracorrente de Alta Velocidade (CCCAV) é reconhecida como uma técnica preparativa eficiente e muito usada para separação e purificação de

catequinas, proantocianidinas oligoméricas, compostos fenólicos e antocianinas<sup>(10)</sup>.

Outro tipo de técnica cromatográfica, difundida em escala analítica, é a Cromatografia Gasosa (CG). Mesmo sendo usada fundamentalmente em escala analítica, existem métodos que a utilizam na escala preparativa (CG-prep), permitindo a separação e isolamento, especialmente, de compostos voláteis em misturas complexas, como terpenos presentes em óleos essenciais<sup>(11)</sup>.

Uma das técnicas mais modernas para isolamento seletivo de compostos é a tecnologia de impressão molecular. Consiste em produzir um polímero sintético que contenha sítios específicos, moldados a partir de uma estrutura modelo (átomo, molécula, complexo ou um conjunto molecular, microrganismo) em que uma estrutura de interesse (molécula modelo) vai se ligar seletivamente nos locais estabelecidos pela estrutura modelo.<sup>(12)</sup> Ghasemi & Nematollahzadeh<sup>(13)</sup> (2018) desenvolveram uma membrana de polissulfona

molecularmente impressa contendo nano cavidades para separação e enriquecimento seletivo do paclitaxel a partir do extrato de teixo (*Taxus baccata* L.).

### **Produção de derivados**

A síntese total de produtos naturais, tem se mostrado inviável devido à alta complexidade estrutural destes compostos. A fim de contornar tais limitações, ferramentas da quimioinformática vêm sendo adotadas, dado que permitem prever modificações estruturais que preservam elementos essenciais para atividade biológica, favorecendo assim a produção de derivados sinteticamente mais simples.

Neste sentido, estudos sintéticos realizados por Borges e colaboradores<sup>(14)</sup> (2018) permitiram a preparação de ésteres de fenilpropanoides naturais isolados das espécies de *Verbesina macrophylla* e *Rollinia leptopetala* com rendimentos que variaram de 52 a 84%. Pode-se citar ainda os análogos estruturais de produtos naturais da classe dos lignoides, obtidos

através de reações orgânicas simples por Oliveira e colaboradores<sup>(15)</sup> (2019) os quais apresentaram um potencial de inibição do crescimento de linhagens de células tumorais superior ao protótipo natural. Portanto, a síntese orgânica pode subsidiar a produção de derivados mais potentes e com bons rendimentos.

Pode-se perceber então que os produtos naturais são, em grande maioria, potencialmente bioativos e têm sido protótipos para o desenvolvimento de derivados mais simples, sinteticamente viáveis, mais potentes e seguros. Pode-se citar ainda que o planejamento racionalizado por técnicas de bioinformática vem tornando o processo de desenvolvimento de fármacos mais consciente, preciso, econômico e sustentável.

## Referências

<sup>1</sup>KRAMBECK, K. *et al.* Identification and quantification of stilbenes (piceatannol and resveratrol) in *passiflora edulis* by-products. **Pharmaceuticals**, v. 13, p. 73-82, 2020.

<sup>2</sup>JACOTET-NAVARRO, M. *et al.* Ultrasound versus microwave as green processes for extraction of rosmarinic, carnosic and ursolic acids from rosemary. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 27, p. 102-109, 2015.

<sup>3</sup>NADAR, S. S.; RAO, P.; RATHOD, V. K. Enzyme assisted extraction of biomolecules as an approach to novel extraction technology: A review. **Food Research International**, v. 108, p. 309-330, 2018.

<sup>4</sup>HOSSAIN, M. B. *et al.* Effect of pulsed electric field and pulsed light pre-treatment on the extraction of steroidal alkaloids from potato peels. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 29, p. 9-14, 2015.

<sup>5</sup>SALES, K. A. *et al.* Dois novos alcaloides azafenantreno de *Anaxagorea dolichocarpa* Sprague & Sandwith. **Química Nova**, 2020.

<sup>6</sup>PEREIRA, L. C. O. *et al.* A new seco-limonoid from the inflorescences of *Dictyoloma vandellianum*. **Química Nova**, v. 43, n. 5, p. 568-571, 2020.

<sup>7</sup>LIMA, N. T. R. **Contribuição ao conhecimento fitoquímico de *Cissampelos sympodialis* Eichl. (Menispermaceae)**. 2020. Dissertação (Mestrado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos) – Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa.

<sup>8</sup>NASCIMENTO, Y. M. *et al.* Rapid characterization of triterpene saponins from *Zornia brasiliensis* by HPLC-ESI-MS/MS. **Molecules**, v. 24, n. 14, p. 2519-2533, 2019.

<sup>9</sup>ABREU, L. S. *et al.* Tri-and diterpenoids from *Stillingia loranthacea* as inhibitors of Zika virus replication. **Journal of Natural Products**, v. 82, n. 10, p. 2721-2730, 2019.

<sup>10</sup>LUO, L. *et al.* Preparative separation of grape skin polyphenols by high-speed counter-current chromatography. **Food Chemistry**, v. 212, p. 712-721, 2016.

<sup>11</sup>SCIARRONE, D. *et al.* Advanced preparative techniques for the collection of pure components from essential oils. **Natural Volatiles & Essential Oils**, v. 2, n. 2, p. 1-15, 2015.

<sup>12</sup>CHEN, L. *et al.* Molecular imprinting: perspectives and applications. **Chemical Society Reviews**, v. 45, n. 8, p. 2137-2211, 2016.

<sup>13</sup>GHASEMI, S.; NEMATOLLAHZADEH, A. Molecularly imprinted ultrafiltration polysulfone membrane with specific nano-cavities for selective separation and enrichment of paclitaxel from plant extract. **Reactive and Functional Polymers**, v. 126, p. 9-19, 2018.

<sup>14</sup>BORGES, F. V. P. *et al.* Synthesis of natural phenylpropanoid esters via conventional chemical reactions. **Organic Communications**, v. 11, n. 1, p. 53-61, 2018.

<sup>15</sup>OLIVEIRA, B. H. M. *et al.* Synthesis and tumoral test of (±)-4-O-demethylkadsurenin M a natural compound and analogues. **Brazilian Journal of Development**, v. 5, n. 10, p. 19109-19123, 2019.

*CAPÍTULO 04*  
**DAS PLANTAS AOS FITOTERÁPICOS**

Catarina Alves de Lima Serafim;  
Edvaldo Balbino Alves Júnior;  
Maria Elaine Cristina Araruna;  
Leônia Maria Batista;

**Considerações gerais**

O uso de plantas medicinais com o objetivo de recuperar ou manter a saúde é uma prática que se confunde com a própria história da humanidade. No Brasil, a utilização de plantas medicinais é bastante difundida, sendo resultado de um acúmulo secular de conhecimentos repassados por meio da tradição oral por diferentes gerações e etnias. Além de possuir características próprias devido à riqueza da flora, a extensão do território e a tradição do uso<sup>(1)</sup>.

A planta medicinal é uma importante fonte de matéria prima a ser utilizada tanto nas preparações caseiras ou de produtos com potencial terapêutico, a

exemplo dos medicamentos fitoterápicos ou produtos tradicionais fitoterápicos<sup>(2)</sup>.

Segundo a OMS 80% da população dos países em desenvolvimento utilizam plantas medicinais nos cuidados básicos em saúde<sup>(3)</sup>. O Brasil se destaca por ser um dos países com maior biodiversidade do mundo, com 50.000 espécies de plantas (20% da flora mundial). Dessa forma, a partir de estudos agronômicos, fitoquímicos e farmacológicos, as plantas medicinais apresentam um grande potencial para o delineamento de novas moléculas<sup>(4)</sup>. Estima-se que 35% dos medicamentos disponíveis no mercado são oriundos de fontes naturais<sup>(5)</sup> o que afirma a importância dos produtos naturais e da química medicinal<sup>(6)</sup>. Entretanto, poucos medicamentos foram desenvolvidos no país com os constituintes ativos oriundos de sua biodiversidade<sup>(7)</sup>.

### **Fitoterapia no SUS**

A Fitoterapia foi institucionalizada no SUS a partir da Política Nacional de Práticas Integrativas e

Complementares (Portaria nº 971, de 03/05/2006) que objetivou a ampliação das opções terapêuticas e melhoria da atenção à saúde aos usuários do SUS<sup>(8)</sup>.

Para garantir seu uso na atenção básica foi criada a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos - PNPMF (Decreto nº 5.813, de 22/06/2006) e posteriormente o Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos no SUS (Portaria nº 2.960 de 09/12/2008) que visa o acesso seguro e o uso racional de plantas medicinais e fitoterápicos, promovendo o uso sustentável da biodiversidade, o desenvolvimento da cadeia produtiva e da indústria nacional e valorização do conhecimento popular<sup>(9,10)</sup>.

Na perspectiva de auxiliar o PNPMF foi lançada em 2009, a Relação Nacional de Plantas Medicinais de interesse do SUS (RENISUS), a qual contemplou 71 espécies medicinais já utilizadas pela população, visando à validação de segurança e eficácia<sup>(11)</sup>. Como forma de subsidiar o uso dessas espécies vegetais, em 2011 foi elaborado o Formulário de Fitoterápicos da Farmacopeia Brasileira com 47 monografias de

drogas vegetais<sup>(12)</sup>. Em 2016 foi lançado o Memento Fitoterápico, com 28 monografias de espécies vegetais e em 2018 o 1º Suplemento do Formulário de Fitoterápicos da Farmacopeia Brasileira<sup>(13,14)</sup> com suas respectivas atualizações que visam orientar a prescrição de plantas medicinais e fitoterápicos.

Atualmente integram a Relação Nacional de Medicamentos Essenciais (2017) doze medicamentos fitoterápicos<sup>(15)</sup> (listados no quadro 1).

Quadro 1. Relação de fitoterápicos ofertados pelo SUS

Nome científico	Denominação genérica
<i>Cynara scolymus</i>	Alcachofra
<i>Schinus terebinthifolius</i>	Aroeira
<i>Aloe vera</i>	Babosa
<i>Rhamnus purshiana</i>	Cáscara-sagrada
<i>Maytenus ilicifolia</i>	Espinheira-santa
<i>Harpagophytum procumbens</i>	Garra-do-diabo
<i>Mikania glomerata</i>	Guaco
<i>Mentha x piperita</i>	Hortelã
<i>Glycine max</i>	Isoflavona-de-soja
<i>Plantago ovata</i>	Plantago
<i>Salix alba</i>	Salgueiro
<i>Uncaria tomentosa</i>	Unha-de-gato

Fonte Própria - Elaboração baseada na Rename<sup>(15)</sup>

## Legislação dos Fitoterápicos

Com a crescente procura por fitoterápicos houve a necessidade de regulamentar as etapas de produção desses medicamentos. No Brasil, a ANVISA é o órgão responsável por esse controle<sup>(16)</sup>.

Figura 1. Representação cronológica das normas de regulamentação dos fitoterápicos no Brasil



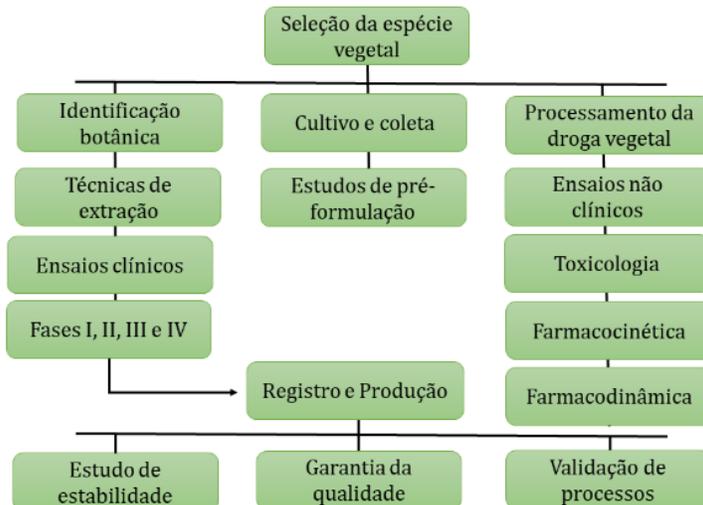
Fonte: Elaborada pelos autores

Em 2014 a Resolução nº 26 de 13 de maio de 2014, agrupou os fitoterápicos em produtos tradicionais fitoterápicos (PTF) e medicamentos fitoterápicos (MF). Os PTF são obtidos com emprego exclusivo de matérias-primas ativas vegetais cuja segurança e efetividade é baseada na literatura técnico-científica no período de 30 anos. Já os MF são obtidos com emprego exclusivo de matérias-primas

ativas vegetais cuja segurança e eficácia são baseadas em evidências clínicas<sup>(17)</sup>.

Todavia, para se chegar a produção de um Fitoterápico deve ser levado em consideração que existe uma cadeia produtiva (figura 2).

Figura 2. Representação esquemática das etapas de produção de medicamentos fitoterápicos



Fonte: Elaborada pelos autores

## Etapas da cadeia produtiva de fitoterápicos

Para selecionar as espécies vegetais para uso medicinal ou fins de pesquisa científica se faz necessário a utilização de critérios: 1) abordagem

randômica: escolha da planta pela disponibilidade do recurso vegetal; 2) prospecção etnofarmacológica: estuda plantas medicinais utilizadas tradicionalmente pela população; 3) quimiotaxonômico ou filogenético: identificação de espécies por meio da morfologia, histologia e classe dos metabólitos<sup>(18)</sup>.

É preciso garantir a qualidade da espécie vegetal desde o cultivo, se fazendo necessário estudos de sazonalidade<sup>(19)</sup>. Após o cultivo e coleta, a espécie vegetal é submetida à triagem, estabilização, secagem, obtendo-se a droga vegetal. Esta segue para os processos extrativos para obtenção do derivado vegetal<sup>(18)</sup>. Esse derivado vegetal passa por estudos de pré-formulação para avaliação das características físico-químicas e assim é feita a sua associação aos excipientes para obtenção da forma farmacêutica<sup>(20)</sup>.

O controle de qualidade é de fundamental importância na cadeia produtiva fazendo parte de todas as etapas, desde a seleção da espécie até a obtenção do produto acabado<sup>(20)</sup>.

A próxima etapa da cadeia produtiva são os estudos não-clínicos que envolvem os ensaios de toxicidade, farmacocinética e farmacodinâmica.

Nos ensaios de toxicidade se determina a segurança do produto por meio dos testes de toxicidade de dose única e de doses repetidas, toxicidade reprodutiva, carcinogenicidade, genotoxicidade, tolerância local e toxicocinética, conforme preconiza o guia da ANVISA (2013)<sup>(21)</sup>.

A farmacocinética estuda os processos de absorção, distribuição, metabolização e excreção, sendo importante para determinar o regime terapêutico<sup>(22)</sup>.

A avaliação do efeito farmacológico envolve modelos experimentais *in vitro* e *in vivo*. Os testes *in vitro* são úteis na avaliação do contato direto dos produtos com células. Os testes *in vivo*, com animais, fornecem informações sobre a farmacocinética e farmacodinâmica no organismo vivo <sup>(23)</sup>.

O ensaio clínico consiste na investigação conduzida no ser humano destinada a verificar os

efeitos de um novo medicamento. Esse ensaio é realizado em várias etapas: Fase I) avaliação inicial com pequenos grupos de voluntários sadios (20-80), visando coletar dados preliminares de segurança e farmacocinética; Fase II) avalia o efeito terapêutico e segurança em curto prazo em um número limitado de pacientes doentes (25-100); Fase III) realizada com grandes e variados grupos de pacientes, para demonstrar a eficácia e segurança a longo prazo; Fase IV) envolve os estudos de farmacovigilância pós-comercialização <sup>(24)</sup>.

Após comprovação da eficácia e segurança na fase III dos ensaios clínicos, o fitoterápico pode ser registrado por meio da apresentação de um dossiê a ANVISA. Esse dossiê deve conter: identificação botânica, caracterização da droga vegetal, estudos fitoquímicos, toxicológicos e farmacológicos, controle de qualidade, boas práticas de fabricação, validação de métodos analíticos e estudo de estabilidade <sup>(25)</sup>.

A produção de fitoterápicos é feita por indústrias certificadas pela ANVISA. Essa certificação

é a comprovação que a empresa cumpre as normas de boas práticas de fabricação e controle e que possui condições técnicas e operacionais para a produção (25).

### **Considerações finais**

Os estudos com plantas medicinais e fitoterápicos são de grande relevância, uma vez que possibilitam o resgate do conhecimento popular, validação do uso, ampliação das opções terapêuticas e o acesso seguro para população.

### **Referências**

1. Batista LM, Valença AMG. A Fitoterapia no Âmbito da Atenção Básica no SUS: Realidades e Perspectivas. *PesqBrasOdontopedClin Integr.* 2012; 12(2):293-96.
2. Santana M D O, et al. O Poder das Plantas Mediciniais: uma Análise Histórica e Contemporânea sobre a Fitoterapia na visão de idosas. *Multid.* 2018; 2(2):10-27.2018.

3. Moura MDG, et al. Brazilian oral herbal medication for osteoarthritis. *Syst. Rev.* 2016; 5: 86.
4. Dutra RC, et al. Medicinal plants in Brazil: Pharmacological studies, drug discovery, challenges and perspectives. *Pharmacol Res.* 2016; 112: 4-29.
  
5. Newman DJ, Cragg, GM. Natural Products as Sources of New Drugs from 1981 to 2014. *J NatProd.* 2016; 79: 629.
  
6. Barreiro EJ. What is hidden in the biodiversity? The role of natural products and medicinal chemistry in the drug discovery process. *An Acad Bras Cienc.* 2019; 91.
  
7. Calixto J. B. The role of natural products in modern drug discovery. *An Acad Bras Cienc.* 2019; 91.
  
8. Brasil. Portaria nº 971 03/05/2006. Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC) no SUS, DOU. 4/05/2006.
  
9. Brasil. Decreto nº 5.813, 22/06/2006. Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos, DOU. 23/06/2006.

10. Brasil. Portaria Interministerial nº 2.960, de 9/12/2008. Aprova o Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos e cria o Comitê Nacional. DOU. 10/12/2008.
11. Brasil. MS. Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse do SUS – RENISUS, 2009.
12. Anvisa. RDC nº 60, 10/11/2011. Aprova o Formulário de Fitoterápicos da Farmacopeia Brasileira, primeira edição e dá outras providências. DOU 11/11/2011.
13. Anvisa. Memento fitoterápico: farmacopeia brasileira. Brasília, DF, 2016.
14. Anvisa. Primeiro Suplemento do Formulário de Fitoterápicos da Farmacopeia Brasileira, 1ª ed. 2018.
15. Brasil. MS. *Relação Nacional de Medicamentos Essenciais*: RENAME 2014. Departamento de Assistência Farmacêutica e Insumos Estratégicos. 2017; 9 ed: 230.
16. Oliveira DR, et al. O estado regulatório dos fitoterápicos no Brasil: Um paralelo entre a legislação

- e o mercado farmacêutico (1995–2015). *Vigil. sanit. debate* 2016;4(4):139-148.
17. Anvisa. RDC nº 26, 13/5/2014, dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos e o registro e a notificação de produtos tradicionais fitoterápicos. Brasília, DF, 2014.
18. Taiz L, et al. *Fisiologia e desenvolvimento vegetal*. 6. ed. Porto Alegre: Artmed. 2017; 858 p.
19. Isenberg C, Nozak MH. Influência da temperatura e das posições na secagem de plantas medicinais em um secador a base de energia solar. *Rev. A C AAmb*. 2011; 9 (1): 57-64.
20. Vohona D, Vohona, SB. *Safety Concerns for Herbal Drugs*. Nova York: CRC Press. 2016.
21. Anvisa. Guia para a condução de estudos não clínicos de toxicologia e segurança farmacológica para o desenvolvimento de medicamentos, 2013.
22. Federico MP, et al. Noções sobre parâmetros farmacocinéticos/farmacodinâmicos e sua utilização na prática médica. *Rev Soc Bras Clin Med*. 2017 15(3):201-5.

23. Khan A, et al. In Vitro and In Vivo Animal Models: The Engineering Towards Understanding Human Diseases and Therapeutic Interventions. Omics Tech and Bio-Engin. 2018; 431-448.

24. Hulley S B, et al. Delineando a pesquisa clínica-4. Artmed Editora. 2015.

25. Carvalho A C B, et al. Regulação brasileira em plantas medicinais e fitoterápicos. Rev Fitos. 2013; 7 (1).

## *CAPÍTULO 05*

### **ALCALOIDES**

Ana Laura de Cabral Sobreira<sup>1</sup>

Diégina Araújo Fernandes<sup>2</sup>

Maria de Fátima Vanderlei de Souza<sup>3</sup>

#### **Resumo**

Os metabólitos primários são constituintes químicos precursores dos metabólitos secundários, que caracterizam famílias, gêneros e/ou espécies como os alcaloides que caracterizam as espécies dos gêneros da família Papaveraceae.

Os métodos extrativos, cromatográficos e espectroscópicos são indispensáveis para definição os constituintes químicos numa espécie.

#### **Introdução**

Os recursos naturais sempre foram fontes de vida para humanidade que encontrou nas plantas verdadeiros pilares para a sua sobrevivência e

principalmente para cura de males, nascendo, portanto, o grande elo Homem X Natureza. Entre as moléculas que compõem o arsenal natural de compostos químicos se destacam os alcaloides.

### **Definição**

Os alcaloides são substâncias nitrogenadas, possui estruturas complexas e variadas com um ou mais átomo de nitrogênio, logo apresentam pH alcalino. O termo alcaloides deriva-se do árabe “**Al Kali**”, refrigerante, e do grego “**Eidos**”, o aspecto, <sup>(1)</sup>.

### **Histórico**

No início do Séc. I (60 dC) Pedânios Dioscórides descreveu a obtenção do ópio (*Papaver somniferum*) e em 1803 Derosne isolou desta droga uma mistura de morfina e nicotina. Em 1816 Friedrich Wilhelm Sertürner descobriu a morfina e em 1832, Pierre Robiquet descobriu a codeína. Dessa mesma espécie em 1848, Georg Merck descobriu a papaverina. Entre 1817 e 1827 Pelletier e Joseph

Caventou isolaram a emetina da *Psychotria ipecacuanha* (ipecacuanha) e a quinina da *Cinchona Officinalis* (quina-quina), ambas pertencentes à família Rubiaceae<sup>(2)</sup>.

O primeiro alcaloide brasileiro, Pereirina, foi isolado em 1838 das cascas do Pau-pereira, *Geissospermum vellosii* Allemão (Apocinaceae). Espécie utilizada pelos indígenas no Brasil para tratamento de febres<sup>(3)</sup>.

## **Distribuição e Localização**

Os alcaloides são encontrados principalmente em angiospermas, como: Amaryllidaceae; Liliaceae; Annonaceae; Apocynaceae; Fumariaceae; Lauraceae; Loganiaceae; Magnoliaceae; Menispermaceae; Papaveraceae; Ranunculaceae, Rubiaceae, Rutaceae, Solanaceae, Malvaceae, etc, citadas por alguns autores como responsáveis pela biossíntese de 10-15% dessas moléculas, encontrados em todos os gêneros da família Papaveraceae. Podem ser encontrados em algumas espécies de fungos do gênero *Claviceps* e

excepcionalmente na bactéria *Pseudomonas aeruginosa* (piocianina), além de organismos marinhos como esponjas e algas<sup>(1)</sup>.

Os alcaloides geralmente se armazenam em todas as partes da espécie, todavia em maior percentagem nos tecidos periféricos, cascas externas do córtex de talos, raízes e nos tegumentos da semente<sup>(1)</sup>.

### **Biossíntese e classificação dos alcaloides**

Os alcaloides são biossintetizados nos tecidos das raízes e talos em crescimento, nos cloroplastos e são armazenados nos vacúolos<sup>(1)</sup>.

Geralmente se formam a partir de aminoácido por reações simples (Figura 1) e a variabilidade de suas estruturas químicas é justificada pelas reações de oxidações alílicas e de núcleos aromáticos, acoplamentos oxidativos, reações de esterificações e eterificações. Em algumas espécies vegetais registra-se sais de alcaloide uma vez que estando na sua forma livre se combinam com grupos ácidos presente nestas

plantas e dão origem a um sal<sup>(4)</sup> que adquire a forma ionizada, aumentando assim a sua polaridade, tornando-os solúveis em solvente polares. Essa variação estrutural (Quadro 1) divide os alcaloides em: Protoalcaloides; Pseudoalcaloides; e Alcaloides propriamente ditos (Tabela 1).

- Protoalcaloides: são aminas simples cujo nitrogênio não se encontra no sistema heterocíclico.

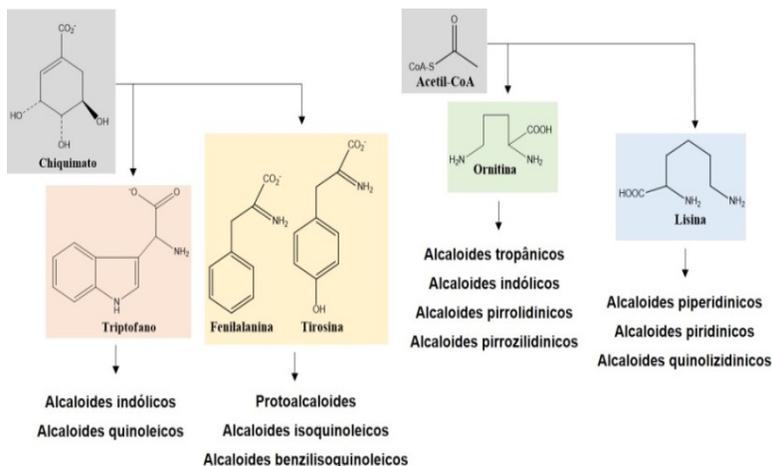
Ex: Putrecina

- Pseudoalcaloides: são aqueles resultantes da transaminação de uma molécula oriunda da via mevalônica. Este grupo de substâncias caracterizam as espécies do gênero *Solanum* – Solanaceae.

- Alcaloides propriamente ditos ou alcaloides verdadeiros: são oriundos dos aminoácidos e se classificam de acordo com a estrutura química do seu núcleo fundamental.

Figura 1. Origem biossintética dos alcaloides propriamente dito ou alcaloides verdadeiros a partir dos aminoácidos.

Fonte: Adaptado de Bruneton, 2011<sup>(1)</sup>.



Fonte: Adaptado de Bruneton, 2011<sup>(1)</sup>.

Quadro 1. Núcleo básico dos alcaloides.

<b>Piridina</b>	<b>Pirrolidina</b>	<b>Quinolina</b>	<b>Indol</b>
<b>Piperidina</b>	<b>Quinolizidina</b>	<b>Isoquinolina</b>	<b>Imidazol</b>

Fonte: Adaptado de Bruneton, 2011<sup>(1)</sup>.

Tabela 1. Alguns alcaloides, suas fontes e atividades farmacológicas.

<b>Espécie</b>	<b>Núcleo alcalóidico</b>	<b>Substância isolada</b>	<b>Atividade biológica</b>	<b>Ref.</b>
<i>Ricinus comunis</i>	Piridina	Ricinina	Inibição da acetilcolinesterase	(5)
<i>Conium maculatum</i>	Piperidina	Coniina	Antagonista nicotínico da acetilcolina	(6)
<i>Nicotiana tabacum</i>	Pirrolidina	Nicotina	Inseticida	(7)
<i>Chinchona ledgeriana</i>	Quinolina	Quinina	Antimalárica	(8)
<i>Hippeastrum solandriiflorum</i>	Isoquinolina	Galantamina e Sanguinina	Inibição da acetilcolinesterase	(9)
<i>Physostigma venenosum</i>	Indol	Fisostigmina	Inibição da acetilcolinesterase	(10)
<i>Senecio brasiliensis</i>	Pirrolizidina	Retronecina	Inibição da acetilcolinesterase	(11,12)
<i>Sida rhombifolia</i>	Indoquinolinico	Sal da criptolepina	Vasorelaxante em artéria mesentérica de roedores	(13)
<i>Atropa belladonna</i>	Tropano	Atropina	Antimuscarínica	(14)
<i>Cissampelos sympodialis</i>	Benzilisoquinolina	Varifiteina	Antiasmática	(15)
<i>Lupinus lanatus</i>	Quinolizidina	Esparteina	Antiarritmica	(16)
<i>Pilocarpus jaborandi</i>	Imidazólico	Pilocarpina	Tratamento do glaucoma	(17)

Fonte: Elaborada pelos autores.

## **Funções dos alcaloides nos vegetais**

Os alcaloides atuam como protetores das espécies vegetais contra predadores; invasão de microrganismos; exercem um poder quelante e/ou citotóxico, funcionam como: hormônio regulador do crescimento; reserva de nitrogênio, auxiliam na manutenção do equilíbrio; regulam o crescimento, do metabolismo interno e da reprodução; protegem contra raios UV; e devido à sua diversidade estrutural levanta-se a hipótese de que favorecem a adaptação do indivíduo ao seu habitat<sup>(1)</sup>.

## **Propriedades Físico-químicas**

- Os alcaloides são compostos com massa molecular entre 100 e 900 u.m.a;
- Os não oxigenados como coniina, nicotina e esparteína, são líquidos a temperatura ambiente;
- Em sua maioria são sólidos, cristalizáveis e raramente coloridos;
- Devido à presença de centros quirais quase sempre são capazes de desviar a luz polarizada;

- Apresentam baixo ponto de fusão;
- Dependendo dos seus substituintes são solúveis em solventes orgânicos apolares, semi-polares e álcool de elevada graduação;
- São pouco solúveis ou insolúveis em água; A variabilidade na basicidade do alcaloide dependerá da disponibilidade do par de elétrons livre do seu nitrogênio e/ou do poder doador ou retirador de elétrons do grupo que se encontra vizinho ao nitrogênio;
- Alguns apresentam caráter anfótero;
- Formam sal quando na presença de um ácido, que os tornam solúveis em água, estáveis e a forma farmacêutica comercializada <sup>(1,2)</sup>.

## **Extração**

Por se tratar de compostos alcalinos a extração dos alcaloides requer uma rota laboratorial específica, citada por Souza e Silva, 2006 <sup>(18)</sup>.

## **Reações de caracterização dos alcaloides**

A presença de alcaloides numa droga natural pode ser pesquisada no seu extrato bruto através de reações de caracterização que resultam da capacidade destes em precipitar e produzir efeitos colorimétricos quando reagem com metais (Quadro 2) <sup>(1,18)</sup>.

**Quadro 2:** Reações de caracterização de alcaloides por precipitação e coloração.

<b>Reativos gerais de alcaloides</b>	<b>Composição</b>	<b>Cor do precipitado</b>
Dragendorff	Iodo bismutato de potássio	Alaranjado
Mayer	Iodo mercurato de potássio	Branco
Bertrand	Ácido sílico-túngstico	Branco
Bouchardat/Wagner	Iodo-iodeto de potássio	Marrom

Fonte: Bruneton, 2011<sup>(1)</sup>.

## **Isolamento e caracterização estrutural dos alcaloides**

O isolamento e a definição estrutural dos alcaloides oriundos de fontes naturais, requer o uso de métodos cromatográficos clássicos (CC; CCDP); e espectroscópicos: Infravermelho (IV), RMN<sup>1</sup>H; RMN<sup>13</sup>C) uni e bidimensionais, espectrometria de massa

de alta resolução (EM); análises de raios X de cristal único, dicroísmo circular rotatório (DCR), além das técnicas hífenadas como cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massas (CGMS), cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a RMN ou EM (CLAE/RMN ou CLAE/EM) e cromatografia líquida acoplada ao espectrômetro de massas (CLEM)<sup>(19)</sup>.

### **Considerações finais**

Os alcaloides são moléculas dotadas de grande capacidade de modificações estruturais e que fornecem aos seres vivos capacidade de se adaptarem as mais variadas condições ambientais, atuam como fonte de alimentos e fármacos para a cura de males.

### **Referências**

1. Bruneton, J. Farmacognosia: Fitoquímica Plantas Medicinales. 2ª Ed, Espanã: Editora Acribia; 2011.
2. Cabral C, Pita JR. Alcaloides: Relevância na Farmácia e no medicamento. Coimbra: Edição: Centro de Estudos Interdisciplinares do Século XX (CEIS 20) –

Grupo de História e Sociologia da Ciência e da Tecnologia; 2015. p. 1-32.

3. Almeida MR, Lima JÁ, Santos NP, Pinto AC. Pereirina: o primeiro alcaloide isolado no Brasil? Rev Bras Farmacog 2009 Out/Dez; 19(4): 942– 952.

4. Chaves OS, Gomes RA, Tomaz ACA, Fernandes MG, Mendes Junior LG, Agra MF et al. Secondary Metabolites from *Sida rhombifolia* L. (Malvaceae) and the Vasorelaxant Activity of Cryptolepinone. Molecules 2013; 18(3): 2769-2777.

5. Khan, B, Rasheed, A., Yasin, KA, Ahmed, MN. Evaluation of Anti-Acetylcholinesterase activity and antioxidant potential of Ricinine (a Central Nervous System Stimulant) isolated from *Ricinius communis* L. Journal of the Chemical Society of Pakistan, Karachi 2016; 38: 326-326.

6. Hotti, H, Rischer, H. The killer os Socrates: Coniine and related alkaloids in the plant kingdom. Molecules 2017; 22: 1962-1985.

7. Vignoli-Silva, M, Ments, LA. O gênero *Nicotiana* L. (Solanaceae) no Rio Grande do Sul, Brasil. *Iheringia* 2005; 60: 151-173.
  
8. Izaguirry, AP. Avaliação de quinina e nanocápsulas contendo quinina sobre o sistema reprodutivo e toxicidade pré-natal em ratos. Tese (Doutorado em Bioquímica) – Universidade Federal do Pampa; 2017.
  
9. Carvalho KR. Alcaloides bioativos e fenólicos de *Hippeastrum solandriiflorum* (Lindl.)– Amaryllidaceae. Fortaleza. Dissertação [Mestrado em Química] - Universidade Federal do Ceará; 2014.
  
10. Negreiros-Neto, TS. Alcaloides do gênero *Crotalaria*: Isolamento, elucidação estrutural, síntese de derivados e potencial biológico. Dissertação [Mestrado em Ciências Farmacêuticas] – Universidade Federal do Rio Grande do Norte; 2015.
  
11. Martinez ST, SANTOS AP, PINTO AC. Determinação Estrutural do Alcaloide Pirrolizidínico Monocrotalina: Exemplo dos Desafios da Química de Produtos Naturais Até os Anos sessenta do século XX. *Rev Virtual Quim* 2013; 5(2):300-311.

12. Almeida, WAM. Design e síntese de derivados da retronecina e avaliação da atividade in vivo no modelo de *Caenorhabditis elegans* para doença de Alzheimer. Dissertação (Mestre em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal do Rio Grande do norte; 2018.
  
13. Chaves OS, Teles YCF, Monteiro MMO, Mendes Junior LG, Agra MF, Braga VA et al. Alkaloids and Phenolic Compounds from *Sida rhombifolia* L. (Malvaceae) and Vasorelaxant Activity of Two Indoquinoline Alkaloids. *Molecules* 2017; 22(94):2-9.
  
14. MARTINEZ ST, ALMEIDA MR, PINTO AC. Alucinógenos naturais: um voo da Europa medieval ao Brasil. *Química nova* 2009; 32(9):2501-2507.
  
15. Vieira GC, Gadelha FAAF, Pereira RF, Ferreira LKDP, Barbosa-Filho JM, Bozza PT et al. Warifteine, an alkaloid of *Cissampelos sympodialis*, modulates allergic profile in a chronic allergic rhinitis model. *Rev Bras Farmacogn* 2018; 28(1): 50-56.
  
16. Tiburski-Neto, A. Estudo fitoquímico e atividade biológica de *Lupinus lanatus*. Dissertação (Mestre em Química) – Universidade Federal de Santa Maria; 2011.

17. Santos, AP, Moreno, PRH. *Pilocarpus* spp.: a survey of its chemical constituents and biological activities. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas* 2004; 40: 115-137.
18. Souza MFV, Silva, DA. Extração, Isolamento e Caracterização Estrutural de constituintes Químicos in Reinaldo Nóbrega de Almeida (Org) *PSICOFARMACOLOGIA: Fundamentos Práticos*. 1ª ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara; 2006. p. 183-87.
19. Goldhaber-Pasillas GD, Choi YH, Verpoorte, R. New methods of analysis and investigation of terpenoid indole alkaloids. *Advances in Botanical Research*, Editora: Elsevier; 2013. p. 233-72.

## *CAPÍTULO 06*

### **ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE PRODUTOS NATURAIS E DERIVADOS DE PLANTAS**

Marcela Lins Cavalcanti de Pontes;

Inácio Ricardo Alves Vasconcelos;

Zilka Nanes Lima;

Zilmara Vieira Pedrosa;

Hilzeth de Luna Freire Pessôa.

Os antimicrobianos são produtos naturais (antibióticos) ou sintéticos (quimioterápicos) que agem sobre microrganismos inibindo o seu crescimento ou causando a sua destruição <sup>(1)</sup>.

O consumo inadequado, caracterizado pela exposição demasiada das populações microbianas a esses produtos farmacêuticos provoca a resistência microbiana. Os agentes etiológicos que causam as doenças infecciosas deixam de ser impactados e os medicamentos passam a ser limitados no combate às enfermidades. A Organização Mundial da Saúde

(OMS) define resistência microbiana como a “capacidade de um micro-organismo impedir a atuação de um antimicrobiano”. Além disso, cita que algumas das infecções mais comuns do mundo, e potencialmente as mais perigosas, estão provando ser resistentes aos antimicrobianos licenciados <sup>(2)</sup>.

A utilização inadequada desses produtos vem sendo descrita durante anos. Em 1970, observou-se que 62% das indicações de antimicrobianos eram feitas a pacientes sem infecção<sup>(3)</sup>. Kunin concluiu em artigo publicado em 1973 que 50% das prescrições de antimicrobianos não tinham indicação<sup>(4)</sup>. Jogerst e Dippe em 1981, classificaram como inadequadas 59% das prescrições antimicrobianas<sup>(5)</sup>.

Os principais mecanismos pelos quais os micro-organismos desenvolvem resistência aos agentes antimicrobianos são variáveis e podem ser estudados em quatro grupos: (a) inativação ou modificação da droga<sup>(6)</sup> (b) modificação do alvo<sup>(7)</sup>, (c) impermeabilidade da membrana<sup>(8)</sup>, (d) bomba de efluxo<sup>(9)</sup>. Dessa forma, a concentração intracelular da

droga se torna insuficiente para bloquear as funções celulares microbianas.

Na avaliação da atividade antimicrobiana de produtos naturais e derivados de plantas, diferentes métodos podem ser utilizados, seja na fase planctônica ou não-planctônica (biofilme) dos micro-organismos. A fase planctônica envolve o cultivo de micro-organismos a partir dos quais é possível determinar a inibição por testes de difusão e a Concentração Inibitória Mínima (CIM), Concentração Bactericida Mínima (CBM) e Concentração Inibitória Fracionada (CIF) dos agentes antimicrobianos.

Nessa fase, testes para avaliar a resistência antimicrobiana por meio das bombas de efluxo podem ajudar a entender o funcionamento dessas proteínas transmembrana que podem atuar na exportação de antimicrobianos contra um gradiente de concentração. A aquisição de um único sistema por uma célula pode diminuir a susceptibilidade dessa a um amplo espectro de quimioterápicos <sup>(10,11)</sup>.

Já os biofilmes são constituídos por água, matriz de polímeros extracelulares (exopolissacarídeos - EPS), partículas retidas e substâncias dissolvidas e adsorvidas, onde os microorganismos passam da forma planctônica para a vida séssil<sup>(12)</sup>. Os modelos de estudo da atividade antibiofilme são propostos para um melhor entendimento do efeito antimicrobiano dos agentes testados *in vivo*, uma vez que apresentam uma composição heterogênea, configurando uma estrutura complexa de microcolônias e canais que permitem fluxo de fluidos e nutrientes <sup>(13)</sup>.

O estudo da Concentração Inibitória Mínima e da Concentração Bactericida Mínima é primeiro passo na investigação e desenvolvimento de um diagnóstico adequado de cada um dos antibióticos candidatos ao tratamento das fontes de infecção <sup>(14)</sup>. Uma das formas de resistência microbiana é caracterizada pela formação de biofilme, que possui um mecanismo de ação bastante complexo e dinâmico, onde colônias de

micro-organismos crescem envoltas por material viscoso aderido em superfície <sup>(15)</sup>.

Para a avaliação da atividade antimicrobiana, são utilizadas as normatizações internacionalmente conhecidas, tais como; do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI), da *British Society for Antimicrobial Chemoterapy* (BSAC) e do *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (EUCAST) como base para o seu desenvolvimento e os sistemas de execução das técnicas descritas podem ser manuais, automatizados ou semi-automatizados.

### **Testes de difusão**

O teste de difusão em ágar, também conhecido por teste de difusão em placas, é um método no qual um micro-organismo é desafiado contra uma substância biologicamente ativa em meio de cultura sólido e relaciona o tamanho da zona de inibição de crescimento do micro-organismo com a concentração da substância testada <sup>(16)</sup>.

As técnicas de aplicação da substância antimicrobiana no método de difusão podem ser viabilizadas por meio de discos de papel, cilindros de aço inoxidável ou vidro e perfuração em ágar <sup>(17)</sup>. A substância se difunde criando um gradiente de concentração no ágar. Diferentes concentrações da mesma substância podem ser aplicadas na mesma placa. No entanto, a aplicação do método de difusão se limita a micro-organismos de crescimento rápido, sendo eles aeróbios estritos ou aeróbios facultativos <sup>(18)</sup>. De acordo com o grau de inibição do crescimento dos micro-organismos, estes podem ser classificadas como sensíveis, moderadamente sensíveis ou resistentes <sup>(19,20)</sup>.

O método de difusão em ágar foi proposto por vários autores para verificar a atividade antimicrobiana de extratos vegetais, como <sup>(19,21)</sup>. Já Ostrosky e colaboradores <sup>(17)</sup> mencionaram o método de microdiluição em caldo como sendo o mais confiável para avaliar agentes antimicrobianos, por fornecer resultados quantitativos e não ser

influenciado pela velocidade de crescimento do micro-organismo. Por outro lado, Othan e colaboradores<sup>(22)</sup> propuseram que, tanto o uso em base caldo como em base ágar são necessários para obtenção de resultados confiáveis da atividade antimicrobiana de produtos naturais e derivados de plantas.

### **Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM)**

A concentração inibitória mínima é definida como a menor concentração de um antimicrobiano ( $\text{mg.mL}^{-1}$ ) necessária para inibir o crescimento de um micro-organismo. Para a realização do estudo da CIM, utiliza-se a técnica da microdiluição em placa. O produto a ser testado é diluído e sua atividade antimicrobiana é avaliada<sup>(23)</sup>.

Orienta-se a utilização de indicadores de viabilidade celular para determinação da susceptibilidade dos micro-organismos. Esses compostos funcionam como substratos cromogênicos

de enzimas desidrogenases, agem como indicadores de oxi-redução e são reduzidos durante o metabolismo celular <sup>(24)</sup>.

A CBM é definida como a menor concentração de um antimicrobiano necessária para inibir 99 a 99,5 % do crescimento microbiano. A depender da concentração, o produto poderá resultar na morte, na diminuição da virulência ou não terá efeito sobre os micro-organismos testados <sup>(23)</sup>.

### **Determinação da Concentração Inibitória Fracionada (CIF)**

Microdiluições de determinado produto natural pode ser combinado a outro produto e sua interação microbiana, *in vitro*, pode ser quantificada pela determinação da Concentração Inibitória Fracionada (CIF)<sup>(25,26)</sup>. Esse estudo é empregado quando já tem-se conhecimento da CIM de ambos os produtos isoladamente e pretende-se testar o potencial antimicrobiano da sua combinação. Os índices CIF são calculados e de acordo com os valores

obtidos são interpretados como sinergismo, adição, indiferença ou antagonismo <sup>(25)</sup>.

### **Bombas de efluxo**

As bombas de efluxo são encontradas em quase todas as espécies bacterianas e apesar de estarem presentes tanto em bactérias gram-negativas como em gram-positivas, a resistência mediada por efluxo em bactérias gram-negativas é mais complexa. Esse efeito deve-se, sobretudo, à existência da membrana externa que dificulta a entrada do antimicrobiano na célula e à capacidade de exportação deste, através de bombas de efluxo, diminuindo assim o acúmulo intracelular de antimicrobianos e aumentando a resistência aos agentes terapêuticos <sup>(27)</sup>.

A busca por novos agentes antimicrobianos tem indicado os produtos naturais como moduladores da atividade antimicrobiana por bomba de efluxo <sup>(28)</sup>.

O estudo desse mecanismo de resistência utiliza a técnica de microdiluição onde são avaliadas

as CIM na ausência e na presença dos agentes inibidores de bombas de efluxo da linhagem microbiana estudada. No entanto, também é possível realizar estudos utilizando linhagens microbianas que super expressam genes codificadores de proteínas responsáveis pelo efluxo de antimicrobianos. Assim, avalia-se a atividade moduladora da droga por meio da CIM em concentrações subinibitórias <sup>(29)</sup>.

### **Determinação da atividade antibiofilme**

O estudo da fase não-planctônica envolve o cultivo de micro-organismos dispersos em ambiente aquoso, sólidos ou semi-sólidos a partir dos quais pode-se determinar a atividade antibiofilme dos agentes antimicrobianos<sup>(12)</sup>.

Os modelos de biofilme para estudo podem ser mono-espécie, quando agregam a mesma espécie de micro-organismos ou multi-espécie, quando agregam mais de um tipo de espécie de micro-organismos. Os modelos de estudo em biofilme podem, ainda, envolver dois tipos de sistema: sistema aberto e

sistema fechado, a depender do fornecimento de nutrientes <sup>(30)</sup>

Além disso, os produtos com potencial antibiofilme podem ser combinados com um antibiótico licenciado para controlar eficientemente a formação do biofilme, bem como perturbar o biofilme já consolidado, permitindo que a droga consiga atingir as células bacterianas que vivem em seu interior<sup>(31)</sup>.

Os antimicrobianos naturais geralmente apresentam estruturas químicas complexas importantes para as interações específicas e reconhecimento por alvos macromoleculares em microrganismos patogênicos. As novas estratégias da pesquisa em produtos naturais com atividade antimicrobiana podem acelerar o processo de descoberta de novos agentes antimicrobianos, extremamente importantes num cenário de rápido desenvolvimento de resistência pelos microrganismos aos agentes terapêuticos disponíveis. A ampla biodiversidade existente no país combinada às diversas técnicas para avaliar atividade

antimicrobiana indica que novos compostos antimicrobianos podem ser descobertos através da pesquisa a partir de fontes naturais.

## **Referências**

<sup>1</sup>SÁEZ-LLORENS, X et al. Impact of an antibiotic restriction policy on hospital expenditures and bacterial susceptibilities: a lesson from a pediatric institution in a developing country. **Pediatr Infect Dis J**, v.19, p.200-206, 2000.

<sup>2</sup>BRASIL, ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. **Novos dados revelam níveis elevados de resistência aos antibióticos em todo o mundo**. Brasília – DF: OMS, 2018.

<sup>3</sup>SHECKLER, WE; BENNETT, JV. Antibiotic usage in seven community hospitals. **JAMA**, v.213, p.264-267, 1970.

<sup>4</sup>KUNIN, CM; TUPASI, T; CRAIG, WA. Use of antibiotics: a brief exposition of the problem and some tentative solutions. **Ann Intern Med**, v.79, p.555-560, 1973.

<sup>5</sup>JÖGERST, GJ; DIPPE, SE. Antibiotic use among medical specialties in a community hospital. **JAMA**, v.245, p.842-846, 1981.

<sup>6</sup>BUSH, K; MILLER, GH. Bacterial enzymatic resistance:  $\beta$ -lactamases and aminoglycoside-modifying enzymes. **Current Opinion in Microbiology**, v. 1, p.509-515, 1998.

<sup>7</sup>RUIZ, J. Mechanisms of resistance to quinolones: target alterations, decreased accumulation and DNA gyrase protection. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.51, p.1109–1117, 2003.

<sup>8</sup>NIKAIDO, H. Molecular Basis of Bacterial Outer Membrane Permeability Revisited. **Microbiology and molecular biology reviews**, v.67, p.593–656, 2003.

<sup>9</sup>LI, XZ; NIKAIIDO, H. Efflux-Mediated Drug Resistance in Bacteria. **Drugs**, v.69, p.1555–1623, 2009.

<sup>10</sup>PAULSEN, IT; BROWN, MH; SKURRAY, RA. Proton-dependent multidrug efflux systems. **Microbiol Rev**, v.60, p.575-608, 1996.

<sup>11</sup>PIDDOCK, LJV. Multidrug-resistance efflux pumps-not just resistance. **Nat Rev Microbiol**, v.4, p.629-635, 2006.

<sup>12</sup>DAVEY, ME; O'TOOLE, G. Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. **Microbiol Mol Biol Ver**, v.64, p.847-867, 2000.

<sup>13</sup>COSTERTON, JW; LEWANDOWSKI, Z. Microbial biofilms. **Annu Rev Microbiol**, v.49, p.711-714, 1995.

<sup>14</sup>TURNIDGE, JD; FERRARO, MJ; JORGENSEN, JH. Susceptibility Test Methods: General Considerations. **Manual of Clinical Microbiology**. 8 ed. Washington. American Society of Clinical Microbiology, 2003.

<sup>15</sup>CLUTTERBUCK, AL et al. Biofilms and their relevance to veterinary medicine. **Vet Microbiol**, v.121, p.1-17, 2007.

<sup>16</sup>OSTROSKY, EA et al. Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração mínima inibitória (CMI) de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.18, p.301-307, 2008.

<sup>17</sup>PINTO, TJA; KANEKO, TM; OHARA, MT. **Controle Biológico de Qualidade de Produtos Farmacêuticos, Correlatos e Cosméticos**. 2.ed. São Paulo: Atheneu Editora, 325 p., 2003.

<sup>18</sup>BARRY, AL; THORNSBERRY, C. Susceptibility tests: Diffusion Test Procedures. **Manual of clinical microbiology**. 5.ed. Washington, DC: American Society for Microbiology, p.1117-1125, 1991.

<sup>19</sup>KARAMAN, I. et al. Antimicrobial activity of aqueous and methanol extracts of *Juniperus oxycedrus* L. **J Ethnopharmacol**, v.85, p.231-235, 2003.

<sup>20</sup>SPRINGFIELD, EP et al. An assessment of two *Carpobrotus* species extracts as potential antimicrobial agents. **Phytomedicine**, v.10, p.434-439, 2003.

<sup>21</sup>NASCIMENTO, GGF et al. Antibacterial activity of plant extracts and phytochemicals on antibiotic-resistant bacteria. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.31, p.247-256, 2000.

<sup>22</sup>OTHMAN, M. et al. Optimal methods for evaluating antimicrobial activities from plant extracts. **Journal of Microbiological Methods**, v.84, p.161-166, 2011.

<sup>23</sup>TRIPATHI, KD. **Essentials of Medical Pharmacology** 7ed. New Delhi, India: Jaypee Brothers Medical Publishers, 2013.

<sup>24</sup>KONEMAN, EW et al. **Diagnostic microbiology.** Color atlas and textbook. 5a<sup>a</sup> ed. New York: Lippincott; 1997.

<sup>26</sup>GANI, O. et al. Synergy Tests by E Test and Checkerboard Methods of Antimicrobial Combinations against *Brucella melitensis*. **J Clin Microbiol**, v.43, n.1, p.140-143, 2005.

<sup>27</sup>SUN, J; DENG, Z; YAN, A. Bacterial multidrug efflux pumps: Mechanisms, physiology and pharmacological exploitations, **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.453, p.254–267, 2014.

<sup>28</sup>BARBARA, Z; ILARIA, V. Inhibitors of Multidrug Resistant Efflux Systems in Bacteria. **Recent patents on anti-infective drug discovery** , v.4, p.37-50, 2009.

<sup>29</sup>STAVRI, M; PIDDOCK, LJV; GIBBONS, S. Bacterial efflux pump inhibitors from natural sources. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.59, p.1247–1260, 2007.

<sup>30</sup>SREY, S et al. Biofilm formation in food industries: A food safety concern June. **Food Control**, v.31, p.572-585, 2013.

<sup>31</sup>ABRAHAM, SVPI et al. Antiquorum sensing and antibiofilm potential of *Capparis spinosa*. **Arch Med Res**, v. 42, p.658-668, 2011.

## CAPÍTULO 07

# ATIVIDADE ANTIPARASITÁRIA DOS PRODUTOS NATURAIS: UM ENFOQUE NA ESQUISTOSSOMOSE

Caliandra Maria Bezerra Luna Lima;

Clélia de Alencar Xavier Mota;

Allan Batista Silva.

### Introdução

A esquistossomose é uma doença infecto-parasitária, de caráter agudo e crônico, ocasionada, no Brasil por *S. mansoni*<sup>1</sup>.

O medicamento recomendado pelo Ministério da Saúde para tratamento da doença é o praziquantel (PZQ). Diante disso, observa-se a necessidade de novas pesquisas científicas que busquem identificar novos compostos, de baixo custo e eficazes contra a esquistossomose. Dentre esses novos compostos com potencial esquistossomicida, destacam-se os de origem natural, principalmente de plantas<sup>2</sup>.

Os ensaios *in vitro* têm sua aplicação quando se deseja observar fenômenos morfológico e fisiológicos do parasita, que podem ser importantes no mecanismo de ação do fármaco. Para os estudos *in vitro* são utilizados diferentes parâmetros, por exemplo, a motilidade, alterações morfológicas nos vermes, danos tegumentares e mortalidade<sup>3</sup>.

Para os ensaios *in vivo* se deve considerar alguns parâmetros: oograma, distribuição de vermes no sistema porta, avaliação da carga parasitária dos animais tratados, quantificação dos ovos eliminados pelas fezes e avaliação do efeito modulador sobre os granulomas hepáticos<sup>4</sup>.

Neste capítulo, serão apresentados exemplos de estudos realizados com extratos, óleos essenciais ou metabólitos secundários com potencial esquistossomicida para ilustrar a importância dos produtos naturais no processo de desenvolvimento de novos fármacos com atividade contra *Schistosoma mansoni*.

## **Óleos essenciais**

A atividade esquistossomicida dos óleos essenciais tem sido focada, principalmente, em estudos *in vitro*<sup>5,6</sup>.

A avaliação da atividade esquistossomicida *in vitro* dos óleos essenciais de *Citrus limonia* e *C. reticulata* demonstrou atividade moderada contra vermes adultos, mas o óleo de *C. reticulata* promoveu a separação dos vermes com mais eficiência, condição importante para impedir o desenvolvimento sexual e eliminação de ovos<sup>3</sup>.

A administração do eugenol, *in vivo*, reduziu de forma moderada a carga de vermes e o número de ovos na parede intestinal dos camundongos infectados por *S. mansoni*, quando comparados com os animais tratados com o PZQ<sup>7</sup>.

## **Extratos brutos e preparações à base de plantas com atividade contra *Schistosoma mansoni***

Várias espécies do gênero *Artemisia* e *Tanacetum* constituem fontes importantes de

compostos bioativos. As atividades esquistossomicidas *in vitro* dos extratos brutos das folhas de *A. absinthium* e *T. parthenium* e seus compostos isolados foram investigadas e demonstraram que os extratos promoveram a morte de todos os vermes adultos<sup>8</sup>.

O tratamento de camundongos infectados por *S. mansoni* com os extratos etanólico e hexânico de *Phyllanthus amarus* promoveu redução da carga de vermes jovens e adultos e do número e do tamanho dos granulomas hepáticos, quando comparados com o grupo tratado com o PZQ<sup>9</sup>.

O tratamento de camundongos infectados por *S. mansoni*, com os extratos metanólicos das raízes de *Ozoroa pulcherrima* e das folhas de *Capparis spinosa* L., promoveu um decréscimo da carga de vermes, da contagem de ovos nos tecidos hepático e intestinal, e do número de granuloma hepático<sup>10,11</sup>.

O tratamento com o extrato aquoso das partes aéreas de *Sida pilosa* de camundongos infectados por *S. mansoni* induziram uma redução significativa da

hepatoesplenomegalia e do aumento do intestino dos animais, provavelmente, pela diminuição do número e do diâmetro dos granulomas nesses órgãos<sup>12</sup>.

### **Metabólitos secundários**

Vários alcaloides exibem atividades promissoras esquistossomicidas promovendo destruição do tegumento, diminuição da atividade motora ou morte dos vermes adultos. Citam-se, por exemplo, piperamide, epiisopiloturina, sanguinarina, solamargine e solasonine<sup>5,6</sup>.

A atividade esquistossomicida da piplartine, *in vitro*, foi demonstrada contra a fase de esquistossômulo e vermes adultos, provocando alterações no tegumento dos vermes. Outro estudo de avaliação da atividade da piplartine e de cinco análogos sintéticos mostraram que a Piplartine é ativa em baixas concentrações, mas seus análogos não. As propriedades esquistossomicidas da piplartine também foram avaliadas *in vivo*, utilizando camundongos infectados com estágios adulto e juvenil

de *S. mansoni*, através de uma dose única de (100, 200 ou 400 mg/kg) ou doses diárias por cinco dias consecutivos (100 mg/kg/dia) administradas por via oral, que resultou na redução da carga de vermes e da produção de ovos<sup>13</sup>.

Piperamide, um alcaloide isolado de *Piper amalago*, foi avaliado, *in vitro*, contra vermes adultos de *S. mansoni*. Os resultados mostraram que, na concentração de 25 a 50µM, ocorreu significativa redução da atividade motora, mas, na concentração de 100 µM, foi verificada a mortalidade de todos os vermes<sup>5,6</sup>.

Estudo com o alcaloide Epiisopiloturina, encontrado nas folhas de *Pilocarpus microphyllus*, foi conduzido em diferentes estágios do *S. mansoni*. Os resultados demonstraram que o Epiisopiloturina, na concentração de 500µM, não apenas provocou mortalidade dos vermes adultos e esquistossômulos, mas também inibiu a postura de ovos<sup>5,6</sup>.

Na literatura, com atividade esquistossomicida, são citados os monoterpenos (Rotundifolona, Acetato

de carvacrol e (+) limoneno epóxido), o diterpeno (Fitol), os triterpenos (Karavilagenin C, Betulin e Balsaminol F), os sesquiterpenos (Artemisinina, Diidroartemisinina, Artesunato, Artemether, Budlein-A, 4 $\alpha$ ,5- dihydrobudlein A, Nerolidol, Alfa-humuleno e trans-cariofileno)<sup>5,6,14</sup>.

A atividade da artemisina e dos seus derivados contra *Schistosoma spp* foi descrita, *in vivo*, inicialmente, contra *S. japonicum*. Posteriormente, seus efeitos foram confirmados também para *S. mansoni* e *S. haematobium*. O ensaio, *in vitro*, de seis derivados da artemisina demonstrou maior atividade esquistossomicida do ácido artesúnicico e do acetato de di-hidroartemisinina, e, portanto, foram testados *in vivo*, demonstrando redução significativa da carga de vermes, do número de ovos eliminados no material fecal e de ovos imaturos nos tecidos intestinais dos animais tratados<sup>4</sup>.

Um estudo com a liberação sustentada de artemisina induziu de forma potente, tanto a eliminação dos esquistossomos, quanto a redução da

patologia hepática. A principal vantagem das artemisinas sobre o PZQ é sua eficácia contra os estágios iniciais de desenvolvimento do parasita<sup>15</sup>.

Alfa-humuleno e trans-carofileno são sesquiterpenos naturais, que podem ser obtidos a partir do óleo essencial de *Cordia verbenacea* D.C. Os estudos, *in vitro*, demonstraram atividade contra *S. mansoni* adulto, sobre parâmetros como atividade motora, oviposição, alterações tegumentares e mortalidade<sup>14</sup>.

Já os efeitos esquistossomicidas, *in vivo*, do tratamento com o nerolidol demonstrou redução da carga de vermes, da produção total de ovos em todos os estágios de desenvolvimento e, de acordo com a análise, do número de ovos na amostra fecal. O estudo, *in vitro*, desse terpeno já havia mostrado que ele é capaz de reduzir a atividade motora e causar a morte de vermes, além de ser capaz de causar alterações morfológicas no tegumento dos esquistossomos adultos - mostrando, nesse caso, uma correlação dos estudos *in vivo* e *in vitro*<sup>16</sup>.

## **Pesquisa clínica:**

Vários compostos têm sido avaliados em modelos *in vitro* ou em animais, no entanto, poucos são os estudos clínicos em humanos. As pesquisas relacionadas ao tratamento da esquistossomose estão direcionadas, principalmente, à associação terapêutica de novos fármacos com o PZQ, destacando-se nessa perspectiva, a associação da artemisina e seus derivados<sup>2,17</sup>.

Ensaio clínico randomizado, duplo-cego, com duas espécies de *Artemisia*, *A. annua* e *A. afra* foi realizado e os resultados mostraram que os pacientes tratados com *Artemisia spp.* exibiram menos efeitos adversos quando comparados ao PZQ, sugerindo que as infusões de *A. annua* e *A. afra* devem ser consideradas como parte do esforço global para combater a esquistossomose<sup>17</sup>.

No Egito, foi realizado um ensaio clínico randomizado em crianças, para avaliar o efeito profilático do artemether (ART) administrado em conjunto com o PZQ, através de dois grupos: PZQ/ART

e PZQ/ART-placebo. Os resultados mostraram que a taxa de cura do PZQ em nenhum momento se aproximou de 100%, e só foi eficaz contra os vermes adultos maduros, e o ART foi eficaz contra as formas imaturas<sup>18</sup>.

## **Perspectivas**

Os produtos naturais vêm ganhando destaque como fontes de novos medicamentos para o tratamento das doenças parasitárias, entre elas a esquistossomose. Uma vez que, a maioria das pesquisas são focadas em metodologias *in vitro*; todavia, nem sempre se encontra correlação entre a atividade esquistossomicida *in vitro* e *in vivo* de vários fármacos e o investimento nas pesquisas clínicas são escassos. Entre os produtos naturais, a artemisina e seus derivados ganham destaque nas pesquisas com atividade esquistossomicida.

É importante ressaltar que o PZQ constitui o principal tratamento da doença, e que a busca por novos produtos é essencial. Uma vez que o uso

generalizado desse medicamento tem desenvolvido resistência, evidenciando assim a necessidade de novas pesquisas científicas que busquem identificar novos compostos - de baixo custo e eficazes contra a esquistossomose.

### **Referências**

1. Soares DA, Souza AS, Silva DJ, Silva AB, Cavalcante UMB, Lima CMBL. Avaliação epidemiológica da esquistossomose no estado de Pernambuco pelo modelo de regressão beta. Arch Health Sci. 2019;26(2):116-20.
2. Katz N. Terapêutica experimental da esquistossomose mansoni. In: Carvalho OS, Coelho PMZ, Lenzi HL (editores). *Schistosoma mansoni* e esquistossomose uma visão multidisciplinar. Rio de Janeiro: Fiocruz; 2008. P.823-47.
3. Martins MH, Fracarolli L, Vieira TM, Dias HJ, Cruz MG, Deus CC, et al. Schistosomicidal Effects of the Essential Oils of *Citrus limonia* and *Citrus reticulata* Against *Schistosoma mansoni*. Chem Biodivers. 2017;14(1):e1600194.

4. Corrêa SAP, de Oliveira RN, Mendes TMF, Dos Santos KR, Boaventura Sjr, Garcia VL, et al. *In vitro* and *in vivo* evaluation of six artemisinin derivatives against *Schistosoma mansoni*. Parasitol Res. 2019;118(2):505-16.
  
5. Lago EM, Xavier RP, Teixeira TR, Silva LM, da Silva Filho AA, de Moraes J. Antischistosomal agents: state of art and perspectives. Future Medicinal Chemistry. 2018;10(1):89–120.
  
6. De Moraes J. Natural products with antischistosomal activity. Future Med Chem. 2015;7(6):801–820.
  
7. El-kady AM, Ahmad AA, Hassan TM, El-Deek HEM, Fouad SS, Althagfan SS. Eugenol, a potential schistosomicidal agent with anti-inflammatory and antifibrotic effects against *Schistosoma mansoni*, induced liver pathology. Infect Drug Resist. 2019;12:709-19.
  
8. Almeida LMS, Carvalho LSA, Gazolla MC, Pinto PLS, Silva MPN, Moraes J, et al. Flavonoids and Sesquiterpene Lactones from *Artemisia absinthium* and *Tanacetum parthenium* against *Schistosoma mansoni* Worms. Evid Based Complementary Altern Med. 2016;2016:1-10.

9. De Oliveira CNF, Frezza TF, Garcia VL, Figueira GM, Mendes TMF, Allegretti SM. Schistosoma mansoni: In vivo evaluation of Phyllanthus amarus hexanic and ethanolic extracts. Exp Parasitol. 2017;183:56-63.
10. Jatsa HB, Feussom NG, Nkondo ET, Kenfack MC, Simo ND, Fassi JBK, et al. Efficacy of *Ozoroa pulcherrima* *Schweinf* methanolic extract against *Schistosoma mansoni*-induced liver injury in mice. J Tradit Complement Med. 2019;9(4):304-11.
11. El-Hawary SS, Taha KF, Kirillos FN, Dahab AA, El-Mahis AA, El-Sayed SH. Complementary Effect of Capparis Spinosa L. and Silymarin With/without Praziquantel on Mice Experimentally Infected with Schistosoma mansoni. Helminthologia. 2018;55(1):21-32.
12. Jatza HB, Femoe UM, Njiaza J, Tombo DST, Mbolang LN, Nkondo ET, et al. Efficacy of *Sida pilosa* Retz aqueous extract against *Schistosoma mansoni* - induced granulomatous inflammation in the liver and the intestine of mice: histomorphometry and gastrointestinal motility evaluation. BMC Complement Altern Med. 2018;18(1):247-62.

13. Mengarda AC, Mendonça OS, Morais CS, Cogo RM, Mazloum SF, Salvadori MC, et al. Antiparasitic activity of pipartine (piperlongumine) in a mouse model of schistosomiasis. *Acta Trop.* 2020;205:105350.
  
14. De Oliveira RN, dos Santos KR, Mendes TMF, Garcia VL, Santos ASO, de Lourdes JVS, Allegretti SM. Sesquiterpenes evaluation on *Schistosoma mansoni*: survival, excretory system and membrane integrity. 2017;90:813-20.
  
15. Gold D, Alian M, Domb A, Karawani Y, Jbarien M, Chollet J, et al. Elimination of *Schistosoma mansoni* in infected mice by slow release of artemisone. *Int J Parasitol Drugs Resist.* 2017;7(2):241-7.
  
16. Silva MP, de Oliveira RN, Mengarda AC, Roquini DB, Allegretti SM, Salvadori MC, et al. Antiparasitic activity of nerolidol in a mouse model of schistosomiasis. *Int J Antimicrob Agents.* 2017;50:467-72.
  
17. Munyangi J, Cornet-Vernet L, Idumbo M, Lu C, Lutgen P, Perronne C, et al. Effect of *Artemisia annua* and *Artemisia afra* tea infusions on schistosomiasis in a large clinical trial. *Phytomedicine.* 2018;51:233-40.

18. Elmorshedy H, Tanner M, Bergguist RN, Sharaf S, Barakat R. Prophylactic effect of artemether on human *Schistosomiasis mansoni* among Egyptian children: A randomized controlled trial. *Acta Trop.* 2016;158:52-8.

## *CAPÍTULO 08*

# **O PAPEL DOS POLIFENÓIS NA PREVENÇÃO E/OU COMBATE ÀS DOENÇAS CARDIOVASCULARES**

Arthur José Pontes Oliveira de Almeida;

Tays Amanda Felisberto Gonçalves;

Mathania Silva de Almeida Rezende;

Sabine Helena Dantas;

Isac Almeida de Medeiros.

### **Resumo**

As doenças cardiovasculares (DCVs), como hipertensão e doenças coronarianas, são as principais causas de morte no Brasil e no mundo. Fatores de risco como tabagismo, obesidade e o envelhecimento, aumentam a susceptibilidade do desenvolvimento dessas doenças. As DCVs são desordens multifatoriais que englobam danificações e remodelamento nos vasos sanguíneos, afetando a circulação e gerando impacto negativo em órgãos alvos como o coração, os rins e o cérebro. Em nível molecular, as células do sistema cardiovascular (ex. célula endotelial) se

apresentam disfuncionais, com grande produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e produção de citocinas pró-inflamatórias, o que contribuem para um ambiente propício ao desenvolvimento e agravamento das DCVs. Produtos bioativos derivados de plantas são ferramentas terapêuticas essenciais no combate e/ou prevenção dessas doenças. Desse modo, o presente capítulo objetiva descrever alguns dos pontos-chaves envolvidas nas DCVs, e como moléculas bioativas podem interferir em suas respectivas vias de sinalização.

**Palavras chave:** antioxidantes, produtos naturais, doenças cardiovasculares.

## **Introdução**

As doenças cardiovasculares (DCVs), como hipertensão e insuficiência cardíaca, são a principal causa de morte no Brasil e no mundo. Dados de 2016 apontam que em todo território nacional, 28 % das mortes são decorrentes dessas doenças <sup>(1)</sup>. Tal fato se agrava com o envelhecimento da população brasileira,

o principal grupo acometido pelas DCVs, gerando grande impacto no sistema de saúde e, conseqüentemente, na economia do País <sup>(2)</sup>.

Com efeito, estratégias que previnam e/ou combatam as DCVs são de extrema necessidade na promoção à saúde. No Brasil, país privilegiado em sua biodiversidade, os produtos naturais são uma fonte rica em compostos bioativos, os quais permitem a possibilidade de desenvolvimento de novos fármacos, seja pela sua estrutura química encontrada na natureza, seja como estrutura base para seu melhoramento químico. Atualmente, existem milhares de moléculas derivadas de produtos naturais sendo estudada por todo o mundo com ação benéfica, entre outros, sobre o sistema cardiovascular <sup>(3)</sup>.

Neste capítulo de livro, abordaremos os aspectos benéficos dos compostos bioativos derivados de plantas sobre o sistema cardiovascular, incluindo aspectos *in vitro* e *in vivo*. Além disso, relacionaremos a atividade antioxidante desses compostos com suas propriedades farmacológicas na proteção

cardiovascular, os quais são importantes na prevenção e ou combate as DCVs.

### **Mecanismos moleculares envolvidos na fisiopatologia das DCVs**

As DCVs são desordens multifatoriais que englobam danificações e remodelamento nos vasos sanguíneos, afetando a circulação e gerando impacto negativo em órgãos alvos como o coração, os rins e o cérebro <sup>(4)</sup>. O envelhecimento também é um fator de risco para DCVs <sup>(5, 6)</sup>. As mudanças que ocorrem no sistema cardiovascular decorrentes do envelhecimento englobam o remodelamento vascular, hipertrofia cardíaca, acúmulo de dano oxidativo e de um processo inflamatório persistente <sup>(7)</sup>. Ademais, o acúmulo de células senescentes pelo organismo contribuem para perda funcional de tecidos e órgãos. Juntos, essas modificações tornam o organismo mais susceptível ao desenvolvimento das DCVs <sup>(5, 8)</sup>.

Em nível molecular, uma das características principais das DCVs é a perda da responsividade a estímulos

protetores dos vasos sanguíneos. As artérias tendem a contrair mais e relaxar menos (desbalanço do tônus vascular) <sup>(9)</sup>. Em níveis local e sistêmico, há uma maior produção de fatores contracturantes (ANG II, noradrenalina, endotelina-1), além da perda funcional do endotélio, o qual diminui a biodisponibilidade de NO <sup>(9)</sup>. Tais processos são acompanhados pelo estresse oxidativo, gerando dano celular, liberação de citocinas, aumento do processo inflamatório e apoptose <sup>(10)</sup>.

- **Disfunção endotelial**

O endotélio é considerado um órgão metabólico que controla a função e estrutura dos vasos sanguíneos <sup>(11)</sup>. As células endoteliais secretam uma variedade de substâncias bioativas com função relaxantes e contraturantes de forma a mediar o controle do tônus vascular. Dentre os fatores relaxantes, o NO é um principal componente vasoprotetor <sup>(12)</sup>. O NO é um gás formado nas células endoteliais pela ação da enzima sintase de óxido nítrico (eNOS), que converte

L-arginina e oxigênio em L-citrulina e NO. O NO se difunde para camada média, e atua sobre a ciclase de guanilil solúvel (CGs), mediando o relaxamento vascular dependente de endotélio <sup>(11, 12)</sup>. Além disso, o NO tem a função de regular a atividade de plaquetas e do processo inflamatório característico de dano endotelial. Desse modo, a produção do NO e a função das enzimas que o produzem e medeiam suas ações são comumente relacionados com a saúde vascular <sup>(13)</sup>.

Todavia, uma desregulação na função endotelial, caracterizada pela diminuição de NO e aumento do estresse oxidativo, culminam com o desenvolvimento de DCVs <sup>(10)</sup>. As EROs podem levar a diminuição do fator BH4 e aumento de BH2, gerando uma disfunção da eNOS e aumento a produção de mais EROs, além de culminar com a redução na biodisponibilidade de NO <sup>(14)</sup>. De fato, a disfunção endotelial é um marcador observado antes do remodelamento estrutural dos vasos sanguíneos, fator que contribui para a gênese e desenvolvimento das DCVs <sup>(15)</sup>. Tais observações são

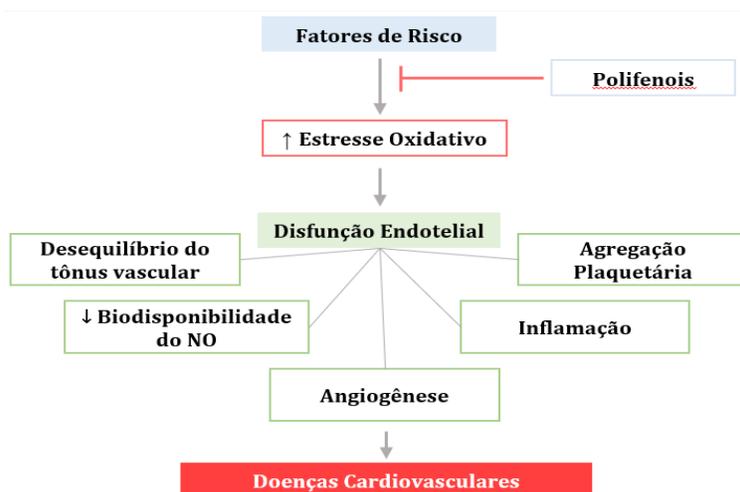
encontradas, por exemplo, em pacientes idosos, fumantes, e principalmente, aqueles acometidos de hipertensão, diabetes, síndrome metabólica e insuficiência cardíaca <sup>(10)</sup>. Além disso, a senescência endotelial (marcador do envelhecimento biológico) está implicada na desregulação da homeostase vascular, e está relacionada com a diminuição da biodisponibilidade de NO, liberação de fatores pró-inflamatórios e grande produção de EROs, o que explica, pelo menos em parte, a estreita relação do envelhecimento com as DCVs <sup>(5, 8)</sup> (Figura 1).

- **Estresse oxidativo**

As espécies reativas de oxigênio (EROS) são produzidas por todos os organismos vivos em resposta ao próprio metabolismo <sup>(16)</sup>. Apesar dos organismos apresentarem seus sistemas antioxidantes intrínsecos (enzimas, proteínas, vitaminas), as EROs podem se acumular, seja devido a uma superprodução, seja por uma falha no sistema antioxidante, levando ao estágio de estresse oxidativo

(16). Desse modo, o dano oxidativo persistente em biomoléculas como lipídeos, proteínas e o DNA, estão implicados como fatores deletérios relacionados com as DCVs (17).

**Figura 1** - Relação entre estresse oxidativo e disfunção endotelial no desenvolvimento de doenças cardiovasculares.



Fonte: do presente autor.

Existem muitas fontes de EROS presentes no sistema cardiovascular, como a mitocôndria e a NADPH oxidase, as principais fontes de EROs intracelular (18). Ambas as fontes apresentam interações entre si, e

contribuem mutuamente para o estresse oxidativo <sup>(17)</sup>. A mitocôndria produz EROs através da respiração celular, e uma disfunção dessa organela, pode levar a um aumento maciço na produção de EROs <sup>(5)</sup>. Já a NADPH oxidase, as quais são expressas tanto nos vasos sanguíneos quanto no coração, são ativados via interação com receptor da angiotensina II (Ang II), receptor AT1, o qual se encontra *up* regulado em condições como hipertensão e doenças coronarianas, além de citocinas como Tnf- $\alpha$  que são estimuladas via Nf- $\kappa$ B pelo aumento de EROs intracelular, criando um ciclo vicioso de ativação da NADPH oxidase <sup>(19)</sup>. Juntos, esses mecanismos explicam, pelo menos em parte, a relação do estresse oxidativo com o processo inflamatório e o desenvolvimento das DCVs. Por outro lado, terapias antioxidantes podem levar a uma ação benéfica sobre o sistema cardiovascular <sup>(9, 20)</sup>.

## **Principais polifenóis com atividade protetora sobre o sistema cardiovascular**

Os polifenóis são uma classe estrutural de produtos químicos orgânicos principalmente naturais, mas também sintéticos ou semi-sintéticos, caracterizados pela presença de grandes múltiplos de unidades estruturais de fenol. O número e as características dessas estruturas fenólicas estão subjacentes às propriedades físicas, químicas e biológicas (metabólicas, tóxicas, terapêuticas, etc.) únicas de membros específicos da classe. O consumo de produtos ricos em polifenóis, como chás, vinhos, frutas e vegetais, vem sendo associado a muitos benefícios na progressão de doenças cardiovasculares <sup>(21)</sup>. Atualmente, torna-se cada vez mais evidente, através de estudos *in vitro*, *in vivo* e ensaios clínicos, que os polifenóis apresentam impacto positivo para saúde e em especial sobre o sistema cardiovascular. Várias atividades biológicas estão relacionadas com seu efeito benéfico no sistema cardiovascular, incluindo atividade antioxidante e atividade anti-inflamatória <sup>(21)</sup>. Abaixo discutiremos sobre a ação dos

diferentes compostos fenólicos sobre o sistema cardiovascular.

- **Estudos *in vitro***

Nos estudos *in vitro* os efeitos benéficos dos polifenóis envolvem atividade antioxidantes, através da redução da formação de EROs e aumento a ativação do fator Nrf-2, atividade anti-inflamatória, por meio da inibição do Nf-κB levando a redução da produção de marcadores da inflamação (TNF-α, IL-6, ICAMs), e um aumento da biodisponibilidade do NO. Na tabela 1 estão sumarizados alguns estudos *in vitro* que comprovam a ação desses compostos.

**Tabela 1** – Estudos *in vitro* que comprovam os efeitos benéficos dos polifenóis no sistema cardiovascular.

<b>Composto</b>	<b>Modelo</b>	<b>Efeito</b>	<b>Referência</b>
<b>Flavonol:</b> Quercetina	Células endoteliais de aorta humana (HAEV) estimuladas com LPS ou Ang II	Proteção contra lesões inflamatórias por inibir a via do Nf-κB e MAPK.	(22)

<b>Estibileno:</b> Resveratrol	HUVEC	Aumento da expressão de fatores antioxidantes	(23)
<b>Antocianina:</b> Antocianina	HUVEC	Redução da produção de IL-6 e VCAM-1.	(24)
<b>Flavan-3-ol:</b> (-)-Epicatequina	Modelo de isquemia e reperfusão (I/R) <i>in vitro</i>	Diminuição da área do infarto, redução de liberação de LDH, melhora da recuperação da função cardíaca	(25)
<b>Flavona:</b> Apigenina	HUVEC	Aumenta produção de NO e reduz a atividade de Nf-κB e expressão de ICAM-1	(26)
<b>Ácido elágico:</b> Ácido elágico	HAEV estimuladas com glicose	Redução de EROs, inibição da ativação de ERK1/2 e redução da expressão de NADPH.	(27)
<b>Ácido fenólico:</b> Ácido gálico	Fibroblatos cardíacos primários de ratos	Redução de fibrose por inibição do fator de crescimento transformador β1 (TGF-β1)	(28)

Fonte: do presente autor.

- **Estudo *in vivo***

Consistente com testes laboratoriais *in vitro*, estudos realizados com animais e pesquisas clínicas sugerem que fontes naturais ricas em polifenóis apresentam efeitos benéficos na função vascular em humanos <sup>(29)</sup>. Neste sentido, nos últimos anos a investigação dos efeitos protetores dos polifenóis sobre a função vascular e cardíaca vem se intensificando, através de estudos *in vivo*, com objetivo de caracterizar os mecanismos envolvidos na proteção cardiovascular, mostrando como os principais mecanismos atividade antioxidante, anti-inflamatória, melhora da disfunção endotelial e remodelamento de células musculares lisas <sup>(21)</sup>. Na tabela 2, ilustramos alguns estudos *in vivo* relacionados com os efeitos positivos dos polifenóis sobre as DCVs.

**Tabela 2** – Estudos *in vivo* e ensaios clínicos sobre o efeito de compostos fenólicos no sistema cardiovascular

<b>Composto</b>	<b>Modelo</b>	<b>Efeito</b>	<b>Referência</b>
<b>Flavonol:</b> Quercetina	Pacientes com sobrepeso/obesos com hipertensão	Redução da pressão arterial e ICAM-1 sérico.	(30)
<b>Estilbeno:</b> Resveratrol	Modelo de I/R em	Atividade anti-apoptótica e	(31)

	camundongos	melhora da recuperação da função cardíaca	
	Pacientes hipertensos	Melhora da função endotelial	(32)
<b>Antocianina:</b> Antocianina	Mulheres saudáveis	Redução do risco de infarto do miocárdio.	(33)
<b>Flavan-3-ol:</b> (-)- Epicatequina	Voluntário saudáveis	Redução da pressão arterial e níveis séricos de ET-1	(34)
<b>Ácido elágico:</b> Ácido elágico	Modelo de disfunção vascular induzida por glicose em ratos	Melhora a disfunção endotelial	(27)
<b>Ácidos fenólicos:</b> Ácido gálico	Insuficiência cardíaca em ratos através da constrição aórtica transversal	Reduz a hipertrofia cardíaca, disfunção, fibrose perivascular e expressão de colágeno	(28)
<b>Cumarina:</b> Cumarina hidrazona	Modelo de infarto do miocárdio induzido por isoproterenol em ratos	Atividade cardioprotetora, prevenção do aumento sérico de lipídeos e biomarcadores de lesão cardíaca.	(35)

Fonte: do presente autor.

## Conclusão e perspectivas futuras

Ao longo dos anos, têm surgido evidências crescentes de que vários produtos ricos em polifenóis são capazes de melhorar a função cardíaca e vascular em modelos experimentais e estudos clínicos. Tais estudos tem revelado que além da atividade antioxidante efeitos adicionais, como atividade anti-inflamatória, prevenção da oxidação de lipoproteínas de baixa densidade, melhora da função endotelial e redução da migração e proliferação de células musculares lisas estão associados com as propriedades positivas dos polifenóis sobre as DCVs. Desta forma, sugere-se que a ingestão regular de produtos ricos em polifenóis parece ser uma abordagem atraente para promover a prevenção e tratamento de DCVs. No entanto, são necessárias mais pesquisas para elucidar os mecanismos responsáveis pelos efeitos benéficos desses metabólitos nas DCVs, investigar sua relevância clínica e identificar quais compostos representam candidatos promissores para o desenvolvimento de medicamentos, alimentos

funcionais ou nutracêuticos úteis contra DCVs e distúrbios associados.

## **Referências**

1. WHO. Noncommunicable diseases country profiles 20182018. 223 p.
2. Brown GC. Living too long: the current focus of medical research on increasing the quantity, rather than the quality, of life is damaging our health and harming the economy. EMBO reports. 2015;16(2):137-41.
3. Diniz M, Scotti L, Scotti M, Alves M. Natural Products and Drug Discovery: From Pharmacochemistry to Pharmacological Approaches: Editora UFPB; 2018.
4. Dyck GJB, Raj P, Zieroth S, Dyck JRB, Ezekowitz JA. The Effects of Resveratrol in Patients with Cardiovascular Disease and Heart Failure: A Narrative Review. International journal of molecular sciences. 2019;20(4):904.

5. Almeida AJPO, Ribeiro TP, Medeiros IA. Aging: Molecular Pathways and Implications on the Cardiovascular System. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2017;2017:19.
  
6. de Almeida AJPO, de Almeida Rezende MS, Dantas SH, de Lima Silva S, de Oliveira JCPL, de Lourdes Assunção Araújo de Azevedo F, et al. Unveiling the Role of Inflammation and Oxidative Stress on Age-Related Cardiovascular Diseases. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2020;2020:1954398.
  
7. Fajemiroye JO, Cunha LCd, Saavedra-Rodriguez R, Rodrigues KL, Naves LM, Mourao AA, et al. Aging-Induced Biological Changes and Cardiovascular Diseases. *BioMed Research International*. 2018;2018:14.
  
8. Jia G, Aroor AR, Jia C, Sowers JR. Endothelial cell senescence in aging-related vascular dysfunction. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*. 2019;1865(7):1802-9.
  
9. Ribeiro TP, Oliveira AC, Mendes-Junior LG, França KC, Nakao LS, Schini-Kerth VB, et al. Cardiovascular effects induced by northeastern

Brazilian red wine: Role of nitric oxide and redox sensitive pathways. *Journal of Functional Foods*. 2016;22:82-92.

10. Incalza MA, D'Oria R, Natalicchio A, Perrini S, Laviola L, Giorgino F. Oxidative stress and reactive oxygen species in endothelial dysfunction associated with cardiovascular and metabolic diseases. *Vascular Pharmacology*. 2018;100:1-19.

11. Zhao Y, Vanhoutte PM, Leung SWS. Vascular nitric oxide: Beyond eNOS. *Journal of Pharmacological Sciences*. 2015;129(2):83-94.

12. Vanhoutte PM. Nitric Oxide: From Good to Bad. *Annals of vascular diseases*. 2018;11(1):41-51.

13. Ahmad A, Dempsey SK, Daneva Z, Azam M, Li N, Li P-L, et al. Role of Nitric Oxide in the Cardiovascular and Renal Systems. *International journal of molecular sciences*. 2018;19(9):2605.

14. Satta S, Mahmoud AM, Wilkinson FL, Yvonne Alexander M, White SJ. The Role of Nrf2 in Cardiovascular Function and Disease. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2017;2017:9237263.

15. Chaudhary P, Pandey A, Azad CS, Tia N, Singh M, Gambhir IS. Association of oxidative stress and endothelial dysfunction in hypertension. *Analytical Biochemistry*. 2020;590:113535.
16. Sies H, Berndt C, Jones DP. Oxidative Stress. *2017;86(1):715-48*.
17. Cervantes Gracia K, Llanas-Cornejo D, Husi H. CVD and Oxidative Stress. *Journal of clinical medicine*. 2017;6(2):22.
18. Daiber A, Di Lisa F, Oelze M, Kröller-Schön S, Steven S, Schulz E, et al. Crosstalk of mitochondria with NADPH oxidase via reactive oxygen and nitrogen species signalling and its role for vascular function. *British journal of pharmacology*. 2017;174(12):1670-89.
19. Sriramula S, Francis J. Tumor Necrosis Factor - Alpha Is Essential for Angiotensin II-Induced Ventricular Remodeling: Role for Oxidative Stress. *PLOS ONE*. 2015;10(9):e0138372.

20. Albuquerque JGF, Assis VL, Almeida AJPO, Basílio IJLD, Luciano MN, Meireles BRLA, et al. Antioxidant and vasorelaxant activities induced by northeastern Brazilian fermented grape skins. *BMC Complement Altern Med.* 2017;17(1):376-.
21. Oak MH, Auger C, Belcastro E, Park SH, Lee HH, Schini-Kerth VB. Potential mechanisms underlying cardiovascular protection by polyphenols: Role of the endothelium. *Free radical biology & medicine.* 2018;122:161-70.
22. Cui S, Tang J, Wang S, Li L. Kaempferol protects lipopolysaccharide-induced inflammatory injury in human aortic endothelial cells (HAECs) by regulation of miR-203. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie.* 2019;115:108888.
23. Liu J, Bi X, Chen T, Zhang Q, Wang S, Chiu J, et al. Shear stress regulates endothelial cell autophagy via redox regulation and Sirt1 expression. *Cell death & disease.* 2015;6(7):e1827-e.
24. Warner EF, Smith MJ, Zhang Q, Raheem KS, O'Hagan D, O'Connell MA, et al. Signatures of anthocyanin metabolites identified in humans inhibit biomarkers of vascular inflammation in human endothelial cells. *Molecular nutrition & food research.* 2017;61(9):1700053.

25. Qi Y, Yang C, Jiang Z, Wang Y, Zhu F, Li T, et al. Epicatechin-3-gallate signaling and protection against cardiac ischemia/reperfusion injury. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 2019;371(3):663-74.
26. Ren B, Qin W, Wu F, Wang S, Pan C, Wang L, et al. Apigenin and naringenin regulate glucose and lipid metabolism, and ameliorate vascular dysfunction in type 2 diabetic rats. *European journal of pharmacology*. 2016;773:13-23.
27. Rozentsvit A, Vinokur K, Samuel S, Li Y, Gerdes AM, Carrillo-Sepulveda MA. Ellagic acid reduces high glucose-induced vascular oxidative stress through ERK1/2/NOX4 signaling pathway. *Cellular Physiology and Biochemistry*. 2017;44(3):1174-87.
28. Jin L, Sun S, Ryu Y, Piao ZH, Liu B, Choi SY, et al. Gallic acid improves cardiac dysfunction and fibrosis in pressure overload-induced heart failure. *Scientific reports*. 2018;8(1):1-11.
29. Schini-Kerth VB, Etienne-Selloum N, Chataigneau T, Auger C. Vascular protection by

natural product-derived polyphenols: in vitro and in vivo evidence. *Planta medica*. 2011;77(11):1161-7.

30. Brüll V, Burak C, Stoffel-Wagner B, Wolffram S, Nickenig G, Müller C, et al. Effects of a quercetin-rich onion skin extract on 24 h ambulatory blood pressure and endothelial function in overweight-to-obese patients with (pre-) hypertension: a randomised double-blinded placebo-controlled cross-over trial. *British Journal of Nutrition*. 2015;114(8):1263-77.

31. Xu H, Cheng J, Wang X, Liu H, Wang S, Wu J, et al. Resveratrol pretreatment alleviates myocardial ischemia/reperfusion injury by inhibiting STIM1-mediated intracellular calcium accumulation. *Journal of Physiology and Biochemistry*. 2019;75(4):607-18.

32. Marques B, Trindade M, Aquino J, Cunha A, Gismondi R, Neves M, et al. Beneficial effects of acute trans-resveratrol supplementation in treated hypertensive patients with endothelial dysfunction. *Clinical and Experimental Hypertension*. 2018;40(3):218-23.

33. Cassidy A, Mukamal KJ, Liu L, Franz M, Eliassen AH, Rimm EB. High anthocyanin intake is associated with a reduced risk of myocardial infarction in young

and middle-aged women. *Circulation*. 2013;127(2):188-96.

34. Grassi D, Desideri G, Necozione S, Di Giosia P, Barnabei R, Allegaert L, et al. Cocoa consumption dose-dependently improves flow-mediated dilation and arterial stiffness decreasing blood pressure in healthy individuals. *Journal of hypertension*. 2015;33(2):294-303.

35. Ghazouani L, Khdhiri E, Elmufti A, Feriani A, Tir M, Baaziz I, et al. Cardioprotective effects of (E)-4-hydroxy-N'-(1-(3-oxo-3H-benzo [f] chromen-2-yl) ethylidene) benzohydrazide: a newly synthesized coumarin hydrazone against isoproterenol-induced myocardial infarction in a rat model. *Canadian journal of physiology and pharmacology*. 2019;97(10):989-98.

*CAPÍTULO 09*

**ATIVIDADE ANTICONVULSIVANTE E  
NEUROPROTETORA DE PRODUTOS NATURAIS E  
DERIVADOS DE PLANTAS**

Gyllyandeson de Araújo Delmondes;  
Irwin Rose Alencar de Menezes;  
Cícero Francisco Bezerra Felipe;  
Lucindo José Quintans Júnior;  
Marta Regina Kerntopf.

**Resumo**

O tema produtos naturais e atividade anticonvulsivantes tem sido extensivamente explorado na literatura científica, portanto, neste capítulo buscamos sumarizar alguns destes aspectos e alguns exemplos sobre a potencial aplicação de produtos naturais, especialmente os derivados de plantas medicinais no manejo das crises convulsivas e/ou epiléticas.

**Palavras-chave:** Produtos naturais; derivados de plantas; convulsão.

## **Introdução**

Convulsões são desordens decorrentes de descargas elétricas atípicas dos neurônios, que podem resultar em alterações comportamentais e/ou disfunções cerebrais <sup>(1)</sup>.

Os fármacos utilizados na terapêutica das crises convulsivas atuam potencializando a ação do ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA) e/ou interagindo com canais de iônicos dependentes de voltagem, cuja finalidade é promover uma redução na responsividade dos impulsos nervosos de alta frequência que surgem nos focos epileptogênicos <sup>(2)</sup>.

Referente à sua eficácia, os fármacos anticonvulsivantes fornecem um controle adequado em cerca de dois terços dos pacientes; entretanto podem apresentar falhas terapêuticas com efeitos colaterais associados <sup>(3)</sup>.

Os eventos adversos associados com a elevada toxicidade das consideradas drogas anticonvulsivantes e antiepilépticas (DAE's) são fatores que contribuem negativamente com adesão terapêutica e motivam os pacientes a buscarem alternativas medicamentosas que nem sempre são mais seguras e eficazes. Dentre as diferentes alternativas terapêuticas, as plantas e seus derivados têm contribuído por anos na formulação de novos medicamentos; e isso desperta cada vez mais o interesse de pesquisadores no desenvolvimento de novos medicamentos que possam ser utilizados no tratamento de distúrbios que afetam o Sistema Nervoso Central (SNC). O recente caso do canabidiol (CBD), que age em diversos sistemas neuronais e também no sistema endocanabinóide (GABA, serotonina, glutamato, entre outros), tem demonstrado a perspectiva dos produtos naturais no controle das crises convulsivas<sup>[39]</sup>.

## Epilepsia

O termo epilepsia, derivado do verbo grego “*epilambanein*” (επιλβνεινα), que significa “apreender, possuir ou afligir”, é utilizado para se referir a uma doença decorrente de um conjunto de desordens neurológicas crônicas que tem como principal característica a incidência de descargas elétricas atípicas e imprevisíveis no SNC <sup>(4)</sup>. A Organização Mundial de Saúde (OMS) estima que cerca de 50 milhões de pessoas, em todo o mundo, vivem com epilepsia <sup>(5)</sup>.

O diagnóstico dos tipos de epilepsia pode ser realizado clinicamente, através da anamnese e exame físico, e com bases nos exames de neuroimagem (tomografia ou ressonância magnética) e elétricos (eletroencefalograma) <sup>(4,6)</sup>.

Quanto aos fatores etiológicos, o quadro abaixo apresenta um resumo atual das possíveis causas etiológicas da epilepsia estabelecidas pela ILAE <sup>(7)</sup>:

Quadro 1. Classificação etiológica da epilepsia proposta pela *International League Against Epilepsy*.

<b>Classificação</b>	<b>Causas etiológicas</b>
Genética	Quando há dedução ou comprovação de uma causa genética. A maioria das epilepsias antes consideradas idiopáticas.
Estrutural	Secundárias a uma lesão cerebral estrutural identificável. Lesão(ões) congênita(s) (ex.: lisencefalia), adquirida(s) (ex.: devido acidente vascular cerebral, trauma e infecção) ou progressiva(s) (ex.: neoplasia). Algumas epilepsias estruturais geneticamente determinadas (ex.: esclerose tuberosa).
Metabólica	Secundárias a existência de uma doença metabólica (genética ou adquirida) que resulta em crises epiléticas.
Imune	Secundárias a um processo patológico mediado pelo sistema imunológico, com evidência de inflamação no sistema nervoso central (ex.: encefalite autoimune).
Infecçiosa	Secundárias a uma infecção, tais como: malária cerebral, neurocisticercose, toxoplasmose cerebral ou encefalite viral.
Desconhecida	Quando não há uma causa identificável ou que não pode ser deduzida.

Fonte: adaptado de Zuberi & Symonds <sup>(8)</sup> *apud* ILAE <sup>(7)</sup>.

No que se refere ao tratamento farmacológico, as DAE's utilizadas no controle as crises convulsivas são classificadas em classes distintas conforme seus mecanismos de ação molecular. São inclusos na 1ª geração os fármacos que atuam bloqueando os canais de Na<sup>+</sup> e potencializando a ação do GABA endógeno, como a fenitoína, fenobarbital, benzodiazepínicos, carbamazepina e ácido valpróico. Na 2ª geração são

inclusos tiagabina, vigabatrina, lamotrigina e o topiramato, e na 3ª geração temos a dezinamida, fosfenitoina e remacemida <sup>(1)</sup>.

### **Potencial anticonvulsivante de produtos naturais e derivados de plantas**

A atividade anticonvulsivante de plantas medicinais e produtos naturais tem sido reportada ao longo dos anos e que podem ser exploradas nos excelentes artigos de revisões <sup>(9,10,11,12,13)</sup>. Além disso, pesquisas científicas têm demonstrado que diferentes classes de metabólitos secundários são promissoras entidades químicas como possíveis DAE's ou, pelo menos, com promissores mecanismos farmacológicos que possam mitigar as crises convulsivas, tais como os alcaloides, flavonoides, terpenoides, saponinas, cumarinas, lipídios e triterpenoides <sup>(14)</sup>.

A literatura reporta que várias outras espécies vegetais, pertencentes a diferentes famílias e gêneros, possuem este efeito, como: *Heracleum persicum* Desf. ex Fisch. <sup>(15)</sup>, *Ferula assa-foetida* L <sup>(16)</sup>, *Hiptis martiusii*

Benth. <sup>(17)</sup>, *Rosa damascena* mill L. <sup>(18)</sup>, *Ocimum basilicum* L. <sup>(19)</sup>, *Salvia sahendica* Boiss. & Buhse <sup>(20)</sup>, *Ruta graveolens* L. <sup>(21)</sup>, *Elaeagnus angustifolia* L. <sup>(22)</sup>, *Ziziphora tenuior* L. <sup>(23)</sup>.

Compostos derivados de plantas são reportados na literatura como agentes anticonvulsivante, são exemplos: bilobalida <sup>(24)</sup>, cannabidiol <sup>(25,26)</sup>, curcumina <sup>(27,28)</sup>, linalol <sup>(29)</sup>, nerolidol <sup>(30)</sup>, quercetina <sup>(31)</sup>,  $\beta$ -eudesmol <sup>(32)</sup>. Dentre as vias de sinalização envolvidas nos efeitos anticonvulsivantes destes compostos destacam-se os receptores GABA<sub>A</sub> <sup>(33)</sup>. Obviamente, o tema tem extensiva literatura e autores buscaram sumarizar n tabela 1 apenas alguns fitocompostos que apresentam mecanismos de ação reportados na literatura por possuírem efeito anticonvulsivante e que podem ser promissores em estudos clínicos ou que já demonstram ação bem estabelecida como é o caso do canabidiol.

Tabela 1. Mecanismos de ação de compostos anticonvulsivantes derivados de plantas.

Fitocomposto	Mecanismo de ação	Referência
(+)-Deidrofuquinona	Via GABAérgica	Garlet <i>et al.</i> (34)
Apigenina	GABA <sub>A</sub>	Johnston <i>et al.</i> (24)
Berberina	Canais de Ca <sup>2+</sup> do tipo-P (Ca <sub>v</sub> 2.1)	Lee <i>et al.</i> (35)
Bilobalida	GABA <sub>A</sub>	Johnston <i>et al.</i> (24)
Canabidiol	Receptores serotoninérgicos (5-HT <sub>3</sub> , 5-HT <sub>1a</sub> ) Receptores TRPV1 Glicina	Iannotti <i>et al.</i> (25) Devinsky <i>et al.</i> (26)
Curcumina	Canais do tipo Kv1.3 e Kv1.4	Lian <i>et al.</i> (27) Liu, Danthi & Enyeart (28)
Curcumol	Via GABAérgica	Ding <i>et al.</i> (36)
Ginsenosídeo Rg3	Canais de Ca <sup>2+</sup> do tipo-P (Ca <sub>v</sub> 2.1), do tipo-N (Ca <sub>v</sub> 2.2) e do tipo-T (Ca <sub>v</sub> 3.x)	Lee <i>et al.</i> (35)
Linalol	ACh e receptores nicotínicos	Re <i>et al.</i> (29)
Nerolidol	Monoaminas (NE, DA, 5-HT) Acetilcolinesterase Antioxidante	Kaur, Pahwa & Goel (30)
Quercetina	GABA <sub>C</sub>	Kim <i>et al.</i> (31)
Quinina	Canais de Cl <sup>-</sup>	Gogelein & Capek (37)
α-Asarona	GABA <sub>A</sub>	Wang, Levinson & Heinbockel (38)
β-eudesmol	Níveis de K <sup>+</sup> na camada piramidal CA1	Chiou, Ling & Chang (32)

Fonte: Autoral.

## **Considerações Finais**

A farmacoresistência e os efeitos colaterais pelo uso das DAE's comprometem a segurança e a aceitação do tratamento pelos pacientes. Por estas razões, apesar da variedade medicamentosa existente, a busca por novas substâncias bioativas, com maior seletividade e menor toxicidade, vem se consolidando nas últimas décadas na tentativa de solucionar o que ainda há de falho na terapia medicamentosa das crises epilépticas.

## **Referências**

(1) Katzung BG, Masters SB, Trevor AJ. Farmacologia básica e clínica. 12. ed. Porto Alegre: AMGH, 2014.

(2) Rodgers CC, Groben VJ. Wong: Fundamentos de Enfermagem Pediátrica. 9. ed. Rio de Janeiro: Mosby, 2015.

(3) Schmidt D, Schachter SC. Drug treatment of epilepsy in adults. Bmj 2014;348(254):130-6.

(4) Fisher RS, Cross JH, French JA, Higurashi N, Hirsch E, Jansen FE, et al. Operational classification of seizure

types by the International League Against Epilepsy: Position Paper of the ILAE Commission for Classification and Terminology. *Epilepsia* 2017a;58(4):522-50.

(5) Organização Mundial de Saúde (OMS). Epilepsy. 2018 [acesso em 22 de mai 2020]. Disponível em: <http://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/epilepsy>

(6) Fisher RS, Cross JH, D'souza C, French JA, Haut SR, Higurashi N, et al. Instruction manual for the ILAE 2017 operational classification of seizure types. *Epilepsia* 2017b;58(4):531-42.

(7) International League Against Epilepsy (ILAE). Epilepsy diagnosis. 2015 [acesso em 17 de abr 2020]. Disponível em: <https://www.epilepsydiagnosis.org/>

(8) Zuberi SM, Symonds JD. Update on diagnosis and management of childhood epilepsies. *J Pediatr* 2015;91(6):67-77.

(9) Almeida RN, Agra MF, Maior FNS, Sousa DP. Essential Oils and Their Constituents: Anticonvulsant Activity. *Molecules* 2011;16:2726-42.

- (10) Nsour WN, Lau CBS, Wong ICK. Review on phytotherapy in epilepsy. *Seizure* 2000;9:96-107.
- (11) Quintans-Júnior LJ, Almeida JRGS, Lima JT, Nunes XP, Siqueira JS, Oliveira LEG, et al. Plants with anticonvulsant properties - a review. *Braz. J. Pharmacog* 2008;18:798-19.
- (12) Kumar S, Madaan R, Bansal G, Jamwal A. Plants and Plant Products with Potential Anticonvulsant Activity – A Review. *Pharmacogn. Commun.* 2012;2(1):3-99.
- (13) Farzan B, Shahsavari S, Abbaszadeh S, Teimouri H. Phytotherapy for seizure: An overview of the most important indigenous Iranian medicinal plants with anticonvulsant properties. *PST* 2019;6(4):367-72.
- (14) Parle M, Sharma N, Ghimire K, Khare, N. Role of Bioactive Phytoconstituents from Several Traditional Herbs as Natural Neuroprotective Agents. *Inventi Rapid: Planta Activa* 2016;2016(4).
- (15) Saeidi F, Azhdari-Zarmehri H, Alimohammadi B, Erami E. The Effect of hydroalcoholic extract of *Heracleum persicum* on pentylenetetrazol induced

seizure in mice. Zanzan Uni Med Sci 2014;21(86):45-55.

(16) Bagheri SM, Rezvani ME, Vahidi AR, Esmaili M. Anticonvulsant Effect of *Ferula assa-foetida* Oleo Gum Resin on Chemical and Amygdala-Kindled Rats. N Am J Med Sci. 2014;6(8):408-12.

(17) De-Figuêiredo FRSDN, Monteiro AB, Menezes IRA, Sales VS, Nascimento EP, Rodrigues CKS, et al. Effects of the *Hyptis martiusii* Benth. leaf essential oil and 1,8-cineole (eucalyptol) on the central nervous system of mice. Food Chem Toxicol 2019;133:1-9.

(18) Homayoun M, Seghatoleslam M, Pourzaki M, Shafieian R, Hosseini M, Bideskan AE. Anticonvulsant and neuroprotective effects of *Rosa damascena* hydroalcoholic extract on rat hippocampus. Avicenna J Phytomed 2015;5(3)260-70.

(19) Modaresi M, Pouriyanzadeh A. Effect of *Ocimum basilicum* hydroalcoholic extract against pentylenetetrazole-induced seizure in mice. Yasouj Uni Med Sci J 2013;18(8)615-22.

(20) Azhdari-Zarmehri H, Naderi F, Erami E, Mohammad-Zadeh M. Effects of *Salvia sahendica* hydroalcoholic extract on PTZ induced seizure in male mice. *Koomesh* 2013;14(4):497-504.

(21) Keihanian F, Rostampour M, Saeidinia A, Elmieh AR. Elmieh. Effect of *Ruta graveolens* hydro-alcoholic extract on pentylenetetrazole-induced seizure in male Mice. *J Babol Univ Med Sci* 2012;14(4):30-6.

(22) Mirazi N, Hosseini AK. Effects of hydroethanolic extract of *Elaeagnus angustifolia* on pentylenetetrazole induced seizure in male mice. *Med. J. Tabriz Univ. Med. Sci. Health Serv.* 2014;36(1):74-81.

(23) Piri H, Alimohammadi B, Saeidi F, Naderi F. Anticonvulsant activity of hydro-alcoholic extract of *Ziziphora tenuior* L. on pentylenetetrazol induced seizure in mice. *JSUMS* 2016;23(1):151-60.

(24) Johnston GAR, Hanrahan JR, Chebib M, Duke RK, Mewett KN. Modulation of ionotropic GABA receptors by natural products of plant origin. *Adv Pharmacol* 2006;54:285-316.

(25) Iannotti FA, Hill CL, Leo A, Alhusaini A. Nonpsychotropic plant cannabinoids, cannabidivarin (CBDV) and cannabidiol (CBD), activate and desensitize transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1) channels *in vitro*: potential for the treatment of neuronal hyperexcitability. ACS Chem Neurosci 2014;5:1131–41.

(26) Devinsky O, Cilio MR, Cross H, Fernandez-Ruiz J, French J, Hill C, et al. Cannabidiol: pharmacology and potential therapeutic role in epilepsy and other neuropsychiatric disorders. Epilepsia 2014;55:791–802.

(27) Lian Y-T, Yang X-F, Wang Z-H, Yang Y, Yang Y, Shu Y-W, et al. Curcumin Serves as a Human K<sub>v</sub>1.3 Blocker to Inhibit Effector Memory T Lymphocyte Activities. Phytother Res 2013;27:1321–7.

(28) Liu H, Danthi SJ, Enyeart JJ. Curcumin potently blocks K<sub>v</sub>1.4 potassium channels. Biochem Biophys Res Commun 2006;344:1161–5.

(29) Re L, Barocci S, Sonnino S, Mecarelli A, Vivani C, Paolucci G, et al. Linalool modifies the nicotinic receptor-ion channel kinetics at the mouse neuromuscular junction. Pharmacol. Res. 2000;42:177-81.

(30) Kaur D, Pahwa P, Goel RK. Protective Effect of Nerolidol Against Pentylentetrazol-Induced Kindling, Oxidative Stress and Associated Behavioral Comorbidities in Mice. *Neurochem. Res.* 2016;41(11):2859-67.

(31) Kim HJ, Lee BH, Choi SH, Jung SW, Kim HS, Lee JH, et al. Differential effects of quercetin lycosides on GABA<sub>c</sub> receptor channel activity. *Arch Pharm Res* 2015;38:108–14.

(32) Chiou LC, Ling JY, Chang CC. Chinese herb constituent beta-eudesmol alleviated the electroshock seizures in mice and electrographic seizures in rat hippocampal slices. *Neurosci. Lett.* 1997;231(3)171-4.

(33) Sucher NJ, Carles MC. A pharmacological basis of herbal medicines for epilepsy. *Epilepsy Behav* 2015;52:308-18.

(35) Lee JH, Jeong SM, Kim J-H, Lee B-H, Yoon I-S, Lee J-H, et al. Effects of Ginsenosides and Their Metabolites on Voltage-dependent Ca<sup>2+</sup> Channel Subtypes. *Mol Cells* 2006;21:52–62.

(36) Ding J, Wang JJ, Huang C, Wang L, Deng S, Xu TL, et al. Curcumol from *Rhizoma Curcumae* suppresses

epileptic seizure by facilitation of GABA<sub>(A)</sub> receptors. *Neuropharmacology* 2014;81:244-55.

(37) Gogelein H, Capek K. Quinine inhibits chloride and nonselective cation channels in isolated rat distal colon cells. *Biochim Biophys Acta* 1990;1027:191-8.

(38) Wang ZJ, Levinson SR, Sun L, Heinbockel T.

Identification of both GABA<sub>A</sub> receptors and voltage-activated Na<sup>(+)</sup> channels as molecular targets of anticonvulsant alpha-asarone. *Front Pharmacol* 2014;5:40.

[39] Iffland K, Grotenhermen F. An Update on Safety and Side Effects of Cannabidiol: A Review of Clinical Data and Relevant Animal Studies. *Cannabis Cannabinoid Res.* 2017;2(1):139-154.

## *CAPÍTULO 10*

### **PRODUTOS NATURAIS NA OFTALMOLOGIA**

Luiza Toscano;

Micheline Freire Donato;

Caliandra Maria Bezerra Luna Lima;

Maria Carmen Toscano Tavares de Araújo;

Margareth de Fátima Formiga Melo Diniz.

#### **Resumo**

A natureza é uma fonte inquestionável de produtos com benefícios para a saúde geral e ocular. O objetivo deste capítulo é abordar algumas destas substâncias que possuem uso oftalmológico já estabelecido, como a atropina, pilocarpina, alguns anestésicos oculares, implantes de hidroxiapatita e viscoelásticos, assim como outras substâncias que estão sendo estudadas com o objetivo de ampliar as opções farmacológicas atualmente existentes.

**Palavras-chave:** oftalmologia; produtos naturais; plantas medicinais; colírios.

## Introdução

Existem evidências que produtos naturais e seus derivados estão envolvidos na prevenção e reversibilidade de diversas doenças oculares. Terapias que envolvem o uso sistêmico ou tópico destas substâncias estão emergindo como potencialmente efetivas no controle e/ou reversão de patologias oftalmológicas. Contudo, o mecanismo exato dos efeitos benéficos em algumas destas doenças é desconhecido e ainda precisa ser explorado. Com o interesse aumentado no uso de produtos naturais, oftalmologistas e outros profissionais de saúde precisam estar informados sobre as evidências que apoiam os benefícios e riscos de determinados componentes antes de recomendar aos pacientes.

O uso de extratos herbais para tratar doenças oftalmológicas é conhecido desde os tempos antigos. O uso tópico do fruto macerado da *Atropa belladonna* pelos egípcios é o primeiro caso conhecido de um agente derivado da natureza para tratar uma doença

oftalmológica. A rainha egípcia Cleópatra usava em seus olhos um extrato de *Atropa* que produzia midríase (dilatação da pupila). O nome belladonna (*Atropa belladonna*) deriva do suposto uso desse extrato para dilatação das pupilas de mulheres italianas<sup>(1)</sup>. A atropina, usada atualmente na forma sulfato como colírios nas concentrações de 0.5% e 1% para midríase e cicloplegia, é um alcaloide extraído da *A. belladonna*. Devido ao aumento importante na prevalência de miopia nas últimas décadas, estudos têm apontado que o uso da atropina 0,01%, retarda a progressão da miopia com menos efeito rebote e efeitos adversos comparado com as doses maiores<sup>(2)</sup>.

A descoberta das propriedades anestésicas da cocaína, derivada da planta *Erythroxylon coca*, um marco na história da farmacologia ocular, aconteceu apenas no final do século XIX. Desde então, tem acontecido o crescimento exponencial no arsenal de drogas derivadas de produtos naturais na indústria farmacêutica<sup>(3)</sup>.

## Uso de Produtos Naturais e Derivados na Oftalmologia

- Fisostigmina, Pilocarpina e o glaucoma

O glaucoma é uma das doenças oftalmológicas severas que mais estimula a busca por novos fármacos derivados da natureza. Em 1864 foi identificado a fisostigmina, o primeiro remédio herbal contra a progressão do glaucoma. Esse alcaloide foi isolado do feijão de cabaca, sementes da planta *P. venenosum*. A fisostigmina é um inibidor da acetilcolinesterase. Depois da instilação no olho, ela induz miose pelo aumento da atividade da acetilcolina livre no esfíncter da pupila, levando a acomodação pela contração da porção circular do músculo ciliar. O efeito hipotensor ocular relatado ocorre devido ao aumento na drenagem do humor aquoso pela via trabecular, que resulta da contração da porção longitudinal do músculo ciliar, assim como da tração do esporão escleral e expansão do ângulo iridocorneal. O isolamento da fisostigmina foi um

passo inicial para a criação de uma classe de hipotensores oculares chamados mióticos. Por causar muitos efeitos colaterais, a fisostigmina tem sido substituída por drogas mais seguras, eficazes e com menos efeitos adversos<sup>(3)</sup>.

A pilocarpina, a segunda droga miótica capaz de reduzir a pressão intraocular, foi isolada das folhas do *Pilocarpus jaborandi*, um arbusto encontrado em regiões subtropicais do Brasil. A pilocarpina age diretamente nos receptores muscarínicos do esfíncter pupilar e músculo ciliar. Por ter efeitos adversos mais toleráveis que outros parassimpaticomiméticos, é usada até hoje<sup>(3)</sup>.

- *Erythroxylon coca* e anestesia ocular tópica

A cocaína é um alcaloide isolado a partir da planta *E. coca* que originou a anestesia oftalmológica. Como anestésico local, a cocaína age bloqueando os canais de sódio nas membranas das terminações nervosas, bloqueando o impulso. Além disso, pela inibição da recaptação da norepinefrina nas sinapses

adrenérgicas, a cocaína age como um agonista adrenérgico, causando midríase e vasoconstrição conjuntival<sup>(3)</sup>.

O hidróclorido de cocaína foi formulado em soluções aquosas de 1% e 4%, causando completa anestesia da córnea, 20 minutos após a instilação. O efeito durou 1 a 2 h. Contudo, a cocaína é tóxica para o epitélio corneano, levando ao seu abandono para tal uso. Devido a esses estudos pioneiros a indústria farmacêutica investiu no desenvolvimento de anestésicos de uso oftálmico com perfil mais seguro e tolerável, como a proparacaína, tetracaína e lidocaína, que são usadas até os dias de hoje<sup>(3)</sup>.

- *Aloe vera*

*A. vera*, uma planta nativa de climas tropicais e conhecida popularmente como babosa, pertence à família *Liliaceae* tem muitas propriedades farmacológicas, como efeito antioxidante, cicatrizante, bactericida, imunomodulador, antiviral, anti-inflamatório e antifúngico<sup>(4)</sup>. O extrato de *A. vera*

contém componentes como, flavonoides, antraquinonas, ácidos fenólicos, enzimas e vitaminas. Num estudo *in vitro*, foi observado que a solução de *Aloe vera* pode ter potencial de acelerar a reepitelização e decréscimo na fibrose de lesões corneanas superficiais<sup>(5)</sup>.

Figura 1. *Aloe vera* (babosa)



Fonte: Autoral.Horto IPeFarM/ UFPB

#### - Fitocanabinoides

O gênero *Cannabis* sp., popularmente conhecidas como maconha, inclui as plantas *C. sativa*, *C. indica*, e *C. ruderalis* (figura 2). O interesse em canabinoides na fisiologia ocular iniciou quando foi demonstrado que usuários crônicos de maconha

tinham uma redução da pressão intraocular (PIO). Os mecanismos pelos quais isso ocorre ainda não foram completamente elucidados. Algumas evidências sugerem que está relacionado à diminuição da pressão sanguínea e/ou aos seus efeitos nos receptores canabinoides CB1 e CB2 presentes na malha trabecular e corpo ciliar, reduzindo a produção de humor aquoso e aumentando sua drenagem. O uso da *Cannabis* inalada, administrada por via oral ou intravenosa, induzem aproximadamente 25% de redução da PIO, durando 3 à 4h<sup>(3)</sup>.

Além do efeito hipotensor ocular, os fitocannabinoides possuem atividade antioxidante, anti-inflamatória e neuroprotetora. A neurodegeneração ainda é uma das maiores causas de deficiência visual e ainda não existe alternativa terapêutica efetiva para melhorar essa condição. Contudo, modelos experimentais *in vitro* e *in vivo* de excitotoxicidade retiniana induzida demonstraram forte evidência que endocannabinoides e cannabinoides sintéticos possuem um efeito neuroprotetor em várias

doenças através de um efeito direto no receptor CB1<sup>(3)</sup>.

Figura 2. Plantas híbridas de *Cannabis* sp.



Fonte: César Matos. Associação Brasileira de Apoio Cannabis Esperança - ABRACE <<https://abraceesperanca.org.br/home/>>.

#### - Euterpe oleracea

O açai (*E. oleracea*) é uma palmeira encontrada no norte do Brasil. A tintura do açai tem sido usada para corar a membrana hialoide posterior, facilitando sua separação da membrana limitante interna durante a cromovitrectomia. Em relação a uso potencial em doenças corneanas, foi demonstrado que o extrato do açai foi efetivo no *cross-linking* corneano, em córneas de coelhos<sup>(3)</sup>.

## - Carotenoides

As xantofilas (luteína e zeaxantina) são carotenoides antioxidantes presentes nos pigmentos maculares retinianos. Esses pigmentos são responsáveis por protegerem a retina contra os danos das reações fotoquímicas e por retardarem a progressão da degeneração macular relacionada à idade, que é uma das principais causas de cegueira em idosos. O espinafre, couve e pimenta laranja são excelentes fontes de xantofilas. Relatos têm demonstrado que a suplementação diária com  $\beta$ -caroteno, vitamina C, vitamina E, zinco, e cobre diminui a progressão para formas mais avançadas de DMRI em 25%, como confirmado no Age-Related Eye Disease Study 1 (AREDS 1). Contudo, o  $\beta$ -caroteno foi associado a um risco de câncer de pulmão em ex-fumantes, logo foi substituído por luteína e zeaxantina no AREDS 2. A nova formulação também foi capaz de reduzir a progressão da DMRI para formas mais avançadas<sup>(4)</sup>.

## - Hidroxiapatita

O principal motivo para uma reconstrução óculo-orbital após uma cirurgia radical (como evisceração e enucleação, cirurgias necessárias em situações como alguns cânceres oculares) é o impacto psicológico e socioeconômico dessas intervenções nas condições de vida dos pacientes. O uso da hidroxiapatita de corais marinhos já tem sido empregado como enxertos ósseos para assoalho da órbita e implantes para cirurgias de evisceração/enucleação. Atualmente, é o recurso mais usado após enucleação primária. A estrutura interconectada da hidroxiapatita derivada de corais permite crescimento fibrovascular, potencialmente reduzindo o risco de migração, extrusão e infecção<sup>(5,6)</sup>.

## - Ácido hialurônico

O isolamento do ácido urônico do vítreo bovino em 1934 por Karl Meyer e John Palmer originou o termo ácido hialurônico (HA) da hialoide (vítreo) e ácido urônico. HA foi encontrado depois na córnea, íris e cristalino, assim como na matriz

extracelular de diversos tecidos. Apesar de sua origem natural, a extração inicial de HA de olhos bovinos ou cristas de galo era um processo caro e trabalhoso. Um método mais barato e em maior escala foi desenvolvido para produzir um HA altamente puro por bactérias como *Streptococcus equi* e *S. zooepidemicus*. Devido às suas propriedades benéficas, o HA tem sido amplamente usado em cirurgias intraoculares, como a cirurgia de catarata, tanto para manter espaços facilitando assim manobras cirúrgicas, como para proteger o endotélio corneano de danos durante o procedimento. Também é uma terapia adjuvante para a síndrome do olho seco ou usado como sistema de administração de drogas<sup>(3)</sup>.

### **Perspectivas futuras**

A natureza continua sendo uma importante fonte de substâncias com benefícios comprovados para a saúde ocular. Contudo, ao mesmo tempo em que existe um aumento exponencial no número de componentes naturais com possíveis efeitos

terapêuticos oculares, a maioria ainda não foi estudada suficientemente para provar segurança e eficácia. Por outro lado, a pesquisa continuada pode melhorar a habilidade de sintetizar novos componentes baseados em protótipos derivados da natureza, criando novas opções farmacológicas com propriedades adicionais.

## **Referências**

1. Canaes, L. S. Desenvolvimento de métodos para determinação de metilbrometo de homatropina em produtos farmacêuticos empregando turbidimetria em fluxo e titulação condutimétrica / Larissa de Souza Canaes – São Carlos UFSCAR, 2004. Dissertação de Mestrado – Universidade Federal de São Carlos.
2. Chia A, Lu QS, Tan D. Five-Year Clinical Trial on Atropine for the Treatment of Myopia 2: Myopia Control with Atropine 0.01% Eyedrops. *Ophthalmology*. 2016;123(2):391-399.

3. PINHEIRO, Gleyse Karina Lopes de Oliveira et al. Nature as a source of drugs for ophthalmology. *Arq. Bras. Oftalmol.*, São Paulo, v. 81, n. 5, p. 443-454, Oct. 2018.
4. Rhone M, Basu A. Phytochemicals and age-related eye diseases. *Nutr Rev.* 2008;66(8):465-472.
5. Catalu CT, Istrate SL, Voinea LM, Mitulescu C, Popescu V, Radu C. Ocular implants-methods of ocular reconstruction following radical surgical interventions. *Rom J Ophthalmol.* 2018;62(1):15-23.
6. Baino F, Vitale-Brovarone C. Bioceramics in ophthalmology. *Acta Biomater.* 2014;10(8):3372-3397.

## CAPÍTULO 11

### MEDICAL APPLICATIONS AND PHARMACOLOGY OF THE PHYTOCANNABINOIDS

#### (Aplicações médicas e farmacologia dos Fitocannabinoides)

SPH Alexander

Around the world, there are major differences in attitudes towards *Cannabis* for medicinal and non-medicinal uses. In those jurisdictions, such as Canada, where medicinal *Cannabis* is legally available, the primary indications include multiple sclerosis, pain, epilepsy, sleeping disorders, dementia, schizophrenia and post-traumatic stress disorder. The *Cannabis* plant (Figure 1) is a natural product and contains over 110 unique metabolites<sup>1</sup>, the vast majority have no or limited pharmacology. The mass-produced medicinal preparations worldwide primarily describe the content of two metabolites,  $\Delta^9$ -tetrahydrocannabinol (THC, Figure 2) and cannabidiol (CBD). Typically, three preparations

are available: balanced THC:CBD; high THC:low CBD or high CBD:no THC versions.

Figure 1. *Cannabis* sp. hybrids plants used to prepare medicinal *Cannabis* in João Pessoa, Paraíba – Brazil



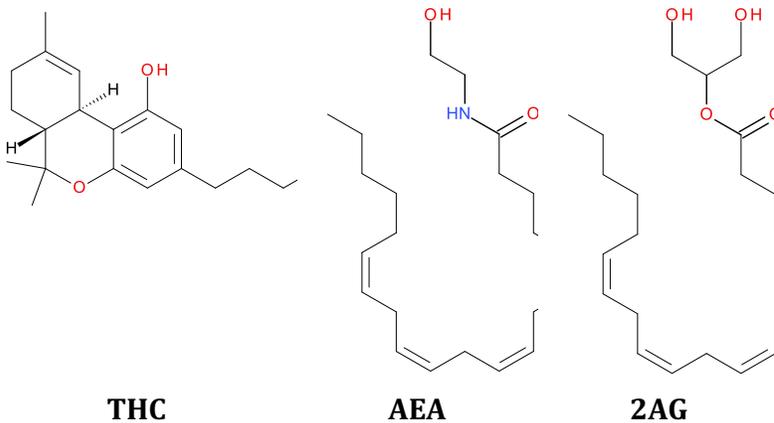
Credits: César Matos. Associação Brasileira de Apoio Cannabis Esperança - ABRACE <<https://abraceesperanca.org.br/home/>>.

### **THC as a psychoactive entity**

THC is the most well-studied of the *Cannabis* metabolites with an established pharmacological profile. The familiar psychoactivity of euphoria (the high) and dissociation from the environment (the dope) both appear to be mediated through a single molecular entity, the CB<sub>1</sub> cannabinoid receptor. This is a G protein-coupled receptor, which is probably the most abundant of the type in the central nervous system<sup>2</sup>. The CB<sub>1</sub> receptor is found at numerous nerve terminals and is particularly abundant

at the presynapse of neurones that use GABA as a transmitter. THC activates the CB<sub>1</sub> receptor as a partial agonist to reduce release of GABA and other transmitters in many brain regions. It mimics the effects of endogenous lipid derivatives of which the two best defined (Figure 1) are anandamide (*N*-arachidonylethanolamine, AEA) and 2-arachidonoylglycerol (2AG)<sup>2</sup>.

Figure 2. The principle cannabinoid receptor agonists from the *Cannabis* plant (THC) and in humans (AEA and 2AG)



Credits: author

The best-understand signalling pattern of endocannabinoid neurophysiology involves the production of 2AG post-junctionally following high frequency activity of glutamatergic synapses in the Schaffer collateral commissural pathway in the hippocampus. This excessive stimulation causes activation of perisynaptic metabotropic glutamate receptors coupled to phospholipase C- $\beta$ , which generates two second messengers inositol 1,4,5-trisphosphate and 1,2-diacylglycerol. The latter is hydrolysed by diacylglycerol lipases into free fatty acid and 2-monoacylglycerol, predominantly 2AG. Somehow, this 2AG is released from the postjunctional neurone and diffuses in a retrograde manner to activate CB<sub>1</sub> receptors located on a prejunctional neurone. If that neurone is the glutamate-releasing neurone causing the excessive postjunctional stimulation described above, there is an inhibition of glutamate release. This feedback inhibition is described as depolarisation-evoked suppression of excitation (DSE). The 2AG may

alternatively interact with CB<sub>1</sub> receptors more predominantly expressed on GABAergic terminals which impinge on the glutamatergic neurones. The ensuing inhibition of GABA release leads to a disinhibition of the glutamatergic neurones leading to an increased activation of the postjunctional neurone. This feedback potentiation is described as depolarisation-evoked suppression of inhibition (DSI). Together these two versions of neuronal short-term plasticity underlie the molecular and cellular effects of THC. Although the precise neuronal pathways involved in particular human responses to THC and *Cannabis* preparations is often impossible to pin down, there seems to be a clear link between DSE and the widely-described effects of THC and *Cannabis* preparations in generating short-term memory loss and the subjective sense of time slowing. This phenomenon may be of clinical benefit in the treatment of patients suffering from post-traumatic stress disorder where unpleasant memory retrieval may be reduced upon THC/*Cannabis* administration<sup>3</sup>.

CB<sub>1</sub> receptors are expressed in the spinal cord and higher centres of the brain associated with the transmission of pain sensation and its regulation. THC and *Cannabis* have been shown to have an analgesic profile in animal models of pain behaviours, which can be mimicked by CB<sub>1</sub>-selective agonists and blocked by CB<sub>1</sub>-selective antagonists. There are anecdotal suggestions from those US states where medicinal and/or non-medicinal *Cannabis* is available, that there are reduced deaths and harm from opiates. Evidence from animal models indicates concomitant administration of cannabinoids produces an additive or synergistic effect when combined with morphine<sup>4</sup>. One lesser indication for synthetic THC (dronabinol) is the treatment of nausea and vomiting associated with chemotherapy, particularly for cancer<sup>5</sup>. The cellular mechanism appears to be CB<sub>1</sub> receptors in the hypothalamus. The use of dronabinol has largely been superseded with the availability of the 5HT<sub>3</sub> receptor antagonists, such as ondansetron.

A familiar symptom of consumption of THC and *Cannabis* preparations is the stimulation of appetite, in particular, for calorie-rich, palatable foods, such as chocolate bars. The molecular mechanism for this effect was also identified to be mediated through the CB<sub>1</sub> receptor, although the neuronal pathways involved likely include hypothalamic and nucleus accumbens systems, as well as peripheral CB<sub>1</sub> receptors (probably in the liver and adipose tissue). CB<sub>1</sub> receptor activation of the paraventricular nucleus of the rat hypothalamus lead to an indirect increase in GABA release, which was mediated through an inhibition of serotonin release <sup>6</sup>. Direct administration of a CB<sub>1</sub>-selective agonist into the paraventricular nucleus caused an increase in food intake within 2 h. The role of the CB<sub>1</sub> receptor in feeding behaviours was validated by the licensing of a selective CB<sub>1</sub> receptor antagonist, rimonabant in Europe in 2007 for the treatment of metabolic disorder/obesity. Rimonabant was only a partial success in that it was effective at maintaining weight loss, a profile which has not been

common among therapies for obesity. However, many patients reported a relatively high incidence of depression and suicidal ideation, which led to the manufacturer removing rimonabant from the market within 18 months of its approval.

A molecular explanation of the adverse effects of rimonabant derives from the blockade of CB<sub>1</sub> receptors in synapses in the nucleus accumbens. Elevated dopamine release in this brain region is a hallmark of the behavioural phenomena of reward in response to stimuli such as palatable food and sex. Drugs of abuse, such as nicotine, cocaine and heroin, cause marked elevations of dopamine release in this brain region in a manner that correlates well with addictive behaviours. THC and *Cannabis* preparations also elicit a dopamine elevation in the nucleus accumbens, which is mediated by CB<sub>1</sub> receptors. CB<sub>1</sub> receptor blockade by rimonabant prevents THC-evoked dopamine release and was also found to reduce behavioural responses to ethanol, cocaine and heroin<sup>7</sup>. A subsidiary indication for rimonabant,

which was not applied because of its withdrawal, was assisting in smoking cessation, with potential for treating other addictive disorders.

Rimonabant under non-addictive conditions, has been interpreted as acting through this same pathway to dampen down the natural peaks of reward encountered in everyday life, thereby promoting feelings of anhedonia and depression.

THC itself is an agent which does show addictive potential. In the human population, approximately 10 % of chronic consumers of *Cannabis* can be profiled as 'addicted'. The impact of this addiction is, however, much less than is evident for nicotine, heroin or alcohol, for example. This probably derives from the pharmacokinetic profile of THC and, in particular, the very slow (and very variable) terminal half-life of elimination<sup>8</sup>. This contrasts sharply with the rapid elimination of alcohol and nicotine from the body, which precipitate withdrawal symptoms, which can be physically extreme (in the case of alcohol withdrawal) or psychologically demanded (as is true

for cigarette cravings). The symptoms associated with cessation of THC/*Cannabis* administration are mild and might involve excessive sweating and abdominal cramps.

### **THC as a modulator of immune disorders**

Aside from the CB<sub>1</sub> receptor, there is a related G protein-coupled receptor, which is targeted by THC. The CB<sub>2</sub> receptor is normally absent (or at least very difficult to detect) in central nervous tissues, but it is primarily associated with cells of the immune system, such as leukocytes and macrophages. However, its expression becomes elevated in a variety of tissues under inflammatory conditions.

Multiple sclerosis (MS) is a chronic neuroinflammatory condition, which is characterised by progressive losses in the myelin coating of neurones in the brain and spinal cord. The symptoms vary between individuals and also with time, often with a remission:relapse profile, and can include overt neurological and psychiatric problems. As an

adjunct therapy a 40:40 mix of THC and CBD, termed nabiximols, has been licensed in many countries to treat the pain and spasticity associated with MS. Although the precise molecular and cellular mechanisms of action of these cannabinoids in MS is not precisely defined, targetting of immune cells, such as microglia and infiltrating macrophages, to reduce pro-inflammatory cytokine release is a logical pathway for nabiximols. Individually, both THC and CBD have been observed to inhibit pro-inflammatory cytokine production in a variety of cellular and animal models<sup>9</sup>. The molecular target for THC often seems to be complex, with evidence for mediation through CB<sub>1</sub>, CB<sub>2</sub> receptors or other targets. One potential target is the family of peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs). PPAR $\gamma$  has been shown to have anti-inflammatory properties and to be activated by both THC and CBD in vitro<sup>10</sup>, although it is unclear whether this is the molecular mechanism of action of nabiximols in the treatment of MS.

Given the potentially utility of well-tolerated alternatives to modulate the immune system, it is slightly surprising that further applications of cannabinoids in the immune system have not been demonstrated.

### **CBD as an anti-epileptic**

CBD doesn't exhibit the same psychoactivity found in THC. Presumably this derives from a lack of activation of either CB<sub>1</sub> or CB<sub>2</sub> receptors by CBD. Indeed, CBD has been described to act as a negative allosteric modulator of the CB<sub>1</sub> receptor, which may underlie the anecdotal reports that CBD could mitigate the adverse effects of higher doses of THC.

Smaller studies have suggested that CBD might have potential as a novel therapy for anxiety<sup>11</sup>. This has wider ramifications for other disorders, since anxiety is a negative component of multiple chronic conditions, not least of a cancer diagnosis. In human participant studies, CBD has been well tolerated at relatively high doses. Moreover, repeated

administration of these high doses doesn't result in an overt syndrome upon cessation, indicating a lack of addiction potential<sup>11</sup>.

Currently, a pure CBD preparation has been licensed in a number of countries for the treatment of drug-resistant childhood epilepsies. The precise mechanism of CBD action in Dravet and Lennox-Gastaut syndromes of epilepsy has yet to be clarified. One potential explanation comes from the therapeutic use of CBD, which is combined with a traditional anti-epileptic, clobazam. Both clobazam and CBD are metabolised by a common cytochrome P450 in the liver. CBD has been reported to increase plasma clobazam levels through this drug;drug interaction. In animal models of epilepsy, however, CBD provides an anti-epileptic profile in the absence of clobazam co-therapy, so it seems possible that its molecular mechanism of action has yet to be pinpointed<sup>12</sup>.

In vitro, CBD interacts with a number of potentially-relevant targets. It inhibits an adenosine transporter, which may elevate local levels of this inhibitory

neuromodulator. It has also been reported to block the enzyme which hydrolyses AEA, thereby leading to an indirect activation of CB<sub>1</sub> receptors thereby reducing the unchecked transmitter release observed in epilepsy. Additionally, there are effects on the serotonin system, which may explain some of CBD's psychiatric profile<sup>11</sup>.

### **Further plant-derived cannabinoids**

Although this review focusses on THC and CBD, since there is so much more information about these entities in the literature, there is an abundance of other unique metabolites in the *Cannabis* plant, many of which have been observed to have molecular, cellular and behavioural effects distinct from THC and CBD. These include cannabigerol, cannabidiolic acid, tetrahydrocannabinolic acid, tetrahydrocannabidivarin and cannabidivarin. It appears likely, therefore, that there is much more potential for therapeutic agents from this versatile plant.

## References

1. Aizpurua-Olaizola O, Soydaner U, Ozturk E, et al. Evolution of the Cannabinoid and Terpene Content during the Growth of *Cannabis sativa* Plants from Different Chemotypes. *J Nat Prod* 2016; 79: 324-331. 2016/02/03. DOI: 10.1021/acs.jnatprod.5b00949.

2. Pertwee RG, Howlett AC, Abood ME, et al. International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXIX. Cannabinoid receptors and their ligands: beyond CB<sub>1</sub> and CB<sub>2</sub>. *Pharmacol Rev* 2010; 62: 588-631. Review 2010/11/17. DOI: 10.1124/pr.110.003004.

3. Ney LJ, Matthews A, Bruno R, et al. Cannabinoid interventions for PTSD: Where to next? *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2019; 93: 124-140. 2019/04/05. DOI: 10.1016/j.pnpbp.2019.03.017.

4. Chen X, Cowan A, Inan S, et al. Opioid-sparing effects of cannabinoids on morphine analgesia: participation of CB<sub>1</sub> and CB<sub>2</sub> receptors. *Br J Pharmacol* 2019; 176: 3378-3389. 2019/06/21. DOI: 10.1111/bph.14769.

5. Allan GM, Finley CR, Ton J, et al. Systematic review of systematic reviews for medical cannabinoids: Pain, nausea and vomiting, spasticity, and harms. *Can Fam Physician* 2018; 64: e78-e94. 2018/02/17.
  
6. Cruz-Martinez AM, Tejas-Juarez JG, Mancilla-Diaz JM, et al. CB1 receptors in the paraventricular nucleus of the hypothalamus modulate the release of 5-HT and GABA to stimulate food intake in rats. *Eur Neuropsychopharmacol* 2018; 28: 1247-1259. 2018/09/16. DOI: 10.1016/j.euroneuro.2018.08.002.
  
7. Marinho EA, Oliveira-Lima AJ, Santos R, et al. Effects of rimonabant on the development of single dose-induced behavioral sensitization to ethanol, morphine and cocaine in mice. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2015; 58: 22-31. 2014/12/17. DOI: 10.1016/j.pnpbp.2014.11.010.
  
8. Johansson E, Agurell S, Hollister LE, et al. Prolonged apparent half-life of D<sup>1</sup>-tetrahydrocannabinol in plasma of chronic marijuana users. *J Pharm Pharmacol* 1988; 40: 374-375. 1988/05/01.

9. Katchan V, David P and Shoenfeld Y. Cannabinoids and autoimmune diseases: A systematic review. *Autoimmun Rev* 2016; 15: 513-528. 2016/02/16. DOI: 10.1016/j.autrev.2016.02.008.
  
10. O'Sullivan SE. An update on PPAR activation by cannabinoids. *Br J Pharmacol* 2016; 173: 1899-1910. 2016/04/15. DOI: 10.1111/bph.13497.
11. Elsaid S, Kloiber S and Le Foll B. Effects of cannabidiol (CBD) in neuropsychiatric disorders: A review of pre-clinical and clinical findings. *Prog Mol Biol Transl Sci* 2019; 167: 25-75. 2019/10/12. DOI: 10.1016/bs.pmbts.2019.06.005.
  
12. Anderson LL, Absalom NL, Abelev SV, et al. Coadministered cannabidiol and clobazam: Preclinical evidence for both pharmacodynamic and pharmacokinetic interactions. *Epilepsia* 2019; 60: 2224-2234. 2019/10/19. DOI: 10.1111/epi.16355.

## CAPÍTULO 12

### **TOXICOLOGIA NÃO CLÍNICA *in vivo* DE PLANTAS MEDICINAIS USADAS NO TRATAMENTO DA ASMA**

Cinthia Rodrigues Melo;

Igor Gabriel da Silva Ramalho;

Caliandra Maria Bezerra Luna Lima;

Micheline Freire Donato;

Margareth de Fátima Formiga Melo Diniz.

#### **Resumo**

O estudo da toxicidade não-clínica *in vivo* de uma substância obtida de produtos naturais de plantas e animais, ou uma nova substância sintética é de extrema importância, porque permite que se tenha uma margem de segurança da dose que poderá ser utilizada em humanos. Nesse capítulo abordaremos a importância de alguns dos ensaios toxicológicos para o tratamento da asma, além disso, para a bioprospecção de novos medicamentos a partir de plantas medicinais.

**Palavras-chave:** Toxicologia não-clínica *in vivo*. Dose única. Doses repetidas. Plantas medicinais. Asma

## **Introdução à Toxicologia**

A toxicologia é uma ciência multidisciplinar, na qual estuda os efeitos nocivos das substâncias químicas sobre o organismo vivo. É uma ciência que vem sendo estudada desde a antiguidade, abrangendo diversas áreas do conhecimento <sup>(1)</sup>.

No século XVI Paracelso afirmou: *“Todas as substâncias são tóxicas. Não há nenhuma que não seja tóxica. A dose estabelece a diferença entre um tóxico e um medicamento”*. Assim, nem mesmo as plantas estão isentas de toxicidade, portanto, para a produção de um medicamento, independente de sua origem, é necessário a realização de testes toxicológicos.

Os ensaios toxicológicos para produção de um medicamento, são divididos em diferentes etapas até chegar ao produto final. Dentre estes estudos têm-se os ensaios toxicológicos não clínicos *in vivo*.

## **Toxicidade Não Clínica *in vivo***

Os ensaios toxicológicos não clínicos *in vivo*, correspondem a testes realizados em animais, que são regidos por diretrizes impostas por órgãos regulamentadores. No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) é o órgão responsável pela determinação dos testes de toxicidade não clínica *in vivo*, que orienta a pesquisa através do “Guia para a condução de estudos não clínicos de toxicologia e segurança farmacológica necessários ao desenvolvimento de medicamentos”. Além disso, a Anvisa orienta que os estudos propostos devem ser conduzidos também pelas diretrizes da *Organisation for Economic Cooperation and Development (OECD)* <sup>(2)</sup>. Existem diferentes tipos de testes toxicológicos não clínicos, dentre eles encontram-se estudos de toxicidade aguda e toxicidade de doses repetidas.

### a) Toxicidade não clínica *in vivo* aguda

Os testes de toxicidade aguda permitem a avaliação dos efeitos tóxicos de uma substância quando esta é

administrada em uma ou mais doses por um período não superior a 24 horas, com subsequente avaliação dos animais por um período de 14 dias <sup>(2)</sup>. Através destes ensaios é possível estimar a DL<sub>50</sub> (Dose capaz de matar 50% dos animais em estudo) da substância estudada. Além do que, os resultados obtidos, conduzem sobre as doses a serem utilizadas no estudo de toxicidade de doses repetidas.

Os métodos alternativos preconizados pela OECD visam usar o menor número de animais possíveis, e seus protocolos estão instruídos nas diretrizes da OECD 420 <sup>(3)</sup>, 423 <sup>(4)</sup> e 425 <sup>(5)</sup> (Quadro 1).

Quadro 1. Protocolos da OECD para testes de toxicidade oral aguda não-clínicos *in vivo*.

	<b>OECD 420</b>	<b>OECD 423</b>	<b>OECD 425</b>
<b>Estudo de observação</b>	sim	não	não
<b>Dose</b>	5, 50, 300 e 2000 mg/kg	5, 50, 300 e 2000 mg/kg	Começando com a melhor estimativa de DL <sub>50</sub> (ou 175 mg / kg), seguido de fator de progressão

<b>Nº de animais</b>	5 por nível de dose	3 por nível de dose	até 5 no teste limite, e até 6 no teste principal de acordo com os critérios de parada
<b>Finalidade</b>	Estimar a menor dose que cause toxicidade evidente	Estimar a menor dose que cause morte	Estimar a DL <sub>50</sub>

Fonte: Autoral. Adaptado de OECD 420, 2002; OECD 423, 2002; OECD 425, 2008.

## b) Toxicidade de Doses repetidas

Os estudos de toxicidade de doses repetidas consistem na administração repetida diariamente da substância estudada por um determinado período de tempo. Geralmente utiliza-se 3 doses que são determinadas a partir dos resultados do teste de toxicidade aguda. No qual, a maior dose deve produzir um efeito tóxico, mas não a morte do animal, respeitando o limite máximo de 1.000 mg/kg/dia <sup>(2)</sup>. O objetivo do teste é identificar os efeitos tóxicos da substância, os órgãos alvos, os efeitos quanto ao peso do animal, consumo de água e ração, alterações

hematológicas, bioquímicas, anátomo e histopatológicas.

A OECD 407 é uma diretriz que orienta sobre o ensaio de toxicidade de doses repetidas. Para realização do protocolo, são utilizados ratos e camundongos (machos e fêmeas) divididos em 3 grupos tratados com diferentes doses da substância, contendo 5 animais cada grupo. Estes receberão diariamente por 28 dias a substância estudada, via oral. É avaliado os efeitos tóxicos ocasionados pela substância, presença ou não de morte, alterações fisiológicas, e investigação anátomo e histopatológica <sup>(6)</sup>.

### **Toxicidade de Plantas medicinais no tratamento da asma**

O uso de plantas medicinais para o tratamento de doenças é uma prática comum entre a população mundial <sup>(7)</sup>. Cerca de 80% da população faz uso de produtos naturais para tratar de enfermidades <sup>(8)</sup>.

A asma é uma doença inflamatória do trato respiratório bastante comum, que ocasiona sintomas

como falta de ar, dor no peito e tosse <sup>(9)</sup>. Etnofarmacologicamente, algumas plantas são utilizadas pelo uso popular para o tratamento dessa enfermidade <sup>(10)</sup>.

A *Justicia pectoralis* mais conhecida no Nordeste brasileiro como “chambá”, é uma espécie popularmente utilizada para o tratamento da asma. Esta espécie faz parte de um programa público de fitoterapia no Brasil intitulado “Farmácias Vivas”. Estudos de toxicidade aguda e de doses repetidas do extrato de suas folhas, evidenciaram que essa é uma espécie com baixa toxicidade, sendo classificada na categoria 5 pelo Sistema Harmonizado Global de Classificação e Rotulagem de Produtos Químicos (SHG) <sup>(11)</sup>.

No estado de Goiás uma espécie tradicionalmente utilizada para diversas doenças, dentre elas a asma, é a *Celtis iguanaea*. O extrato de suas folhas apresentou uma baixa toxicidade quando administrado a animais, seguindo a OECD 423, sendo também classificada na categoria 5 da SHG <sup>(12)</sup>.

Figura 1. Folhas da *Celtis iguanaea*



Fonte: GONÇALES, *et al.*, 2015

A literatura descreve diversas plantas de diferentes regiões do mundo, utilizadas popularmente no tratamento da asma <sup>(10),(13)</sup>. Como a espécie *Erythrina senegalensis* popularmente conhecida em países africanos, que quando investigada sua toxicidade oral aguda, do extrato etanólico das folhas, mostrou ter uma baixa toxicidade, com uma  $DL_{50} > 500 \text{ mg/Kg}$  <sup>(14)</sup>. Apesar das folhas serem as principais partes de uma planta utilizadas pela população, e conseqüentemente os estudos toxicológicos se deterem principalmente a elas, outras partes como as

raízes também são usadas. A exemplo temos a espécie *Solanum torvum*, no qual o chá de suas raízes é tradicionalmente consumido na Índia para tratamento da asma. O extrato da raiz de *Solanum torvum* apresentou baixa toxicidade, quando administrado por via oral em ratos seguindo a OECD 423 <sup>(15)</sup>.

A *Cissampelos sympodialis* (figura 2), de uso comum no nordeste brasileiro, é uma espécie utilizada para o tratamento de doenças respiratórias <sup>(16)</sup>, tendo destaque no combate à asma <sup>(17)</sup>. Sua ação como antiasmática foi investigada por laboratórios de pesquisa da UFPB, que comprovaram quão promissora é a espécie. Popularmente as folhas são a parte da planta que detém as atividades farmacológicas desejadas, por meio do qual é feito o infuso, ou mais conhecido como chá. Portanto, foi realizado um estudo toxicológico agudo não clínico do infuso das folhas de *Cissampelos sympodialis*, quando aplicados por via oral na dose de 2.000 mg/kg em ratos, no qual mostrou que a espécie provocou uma

baixa toxicidade aos animais <sup>(18)</sup>. Em outro estudo não-clínico, foi testado também a infusão por via nasal, e as amostras histológicas da cavidade nasal mostraram a atividade vasodilatadora da planta <sup>(19)</sup>.

Figura 2. Folhas da *Cissampelos sympodialis*



Fonte: Horto IPeFarM/ UFPB. Foto autoral.

### **Considerações finais**

É ampla a diversidade e uso de plantas medicinais no tratamento de doenças, entre elas a asma, sendo a maioria delas consumidas sem um prévio estudo toxicológico, o que causa grande risco. Desta forma, é de suma importância a realização de ensaios

toxicológicos *in vivo* para garantia do uso seguro de tais plantas e para a bioprospecção de fármacos.

### **Referências**

[1] KLAASSEN CD, III JBW. Fundamentos em Toxicologia de Casarett e Doull (Lange). AMGH Editora; 2009.

[2] ANVISA. Guia para a condução de estudos não clínicos de toxicologia e segurança farmacológica necessários ao desenvolvimento de medicamentos Brasília: Gerência de Avaliação de Segurança e Eficácia – GESEF, 2013.

[3] OECD Publishing., Test No. 420: Acute Oral Toxicity-Fixed Dose Procedure. Organisation for Economic Co-operation and Development. 2002

[4] OECD Publishing., Test No. 423: Acute oral Toxicity-Acute toxic class method. Organisation for Economic Co-operation and Development. 2002.

[5] OECD Publishing., Test No. 425: acute oral toxicity: up-and-down procedure. Organisation for Economic Co-operation and Development. 2008.

[6] OECD Publishing. Test No. 407: Repeated Dose 28-day Oral Toxicity Study in Rodents. Organisation for Economic Co-operation and Development. 2008.

[7] BELTRÁN-CABRERA C, et al. Mitos, creencias y prácticas en cuidadores de niños con asma respecto al tratamiento con inhaladores en Chiclayo,. *Acta Médica Peruana*. 2018;35(1):28 – 35.

[8] ILLAMOLA SM, et al. Use of Herbal Medicine by Pregnant Women: What Physicians Need to Know. *Frontiers in Pharmacology*,. 2019;10.

[9] LAMBRECHT BN, HAMMAD H, FAHY JV. The Cytokines of Asthma. *Immunity*. 2019;50(4):975 – 991.

[10] JYOTHSNA S, et al. Qualitative elemental analysis of selected potential anti-asthmatic medicinal plant taxa using EDXRF technique. *Heliyon*. 2020;6(2):e03260.

[11] LEAL LKAM, SILVA AH, BARROS VSD. Justicia pectoralis, a coumarin medicinal plant have potential

for the development of antiasthmatic drugs? Revista Brasileira de Farmacognosia. 2017;27(6):794 – 802.

[12] GONÇALVES NZ, et al. Acute oral toxicity of *Celtis iguanaea* (Jacq.) Sargent leaf extract (Ulmaceae) in rats and mice. Revista Brasileira de Plantas Mediciniais. 2015;17(4):1118 – 1124.

[13] SIM LY, RANI NZA, HUSAIN K. Lamiaceae: An Insight on Their Anti-Allergic Potential and Its Mechanisms of Action. Frontiers in pharmacology. 2019;10.

[14] NNAMA TN, et al. Phytochemical Analysis and Acute Toxicological Study of *Erythrina senegalensis* Ethanolic Leaf Extract in Albino Wistar Rats. Anat Physiol. 2017;7(248):2161 – 0940.1000248.

[15] VADAKKAN K. Acute and sub-acute toxicity study of bacterial signaling inhibitor *Solanum torvum* root extract in Wistar rats. Clinical Phytoscience. 2019;5(1):19.

[16] PORTO NM, et al. Estudo farmacobotânico de folhas de *Cissampelos sympodialis* Eichl.(Menispermaceae). *Revista Brasileira de Farmacognosia*. 2008;18(1):102 – 107.

[17] CAVALCANTI AC, et al. Studies with *Cissampelos sympodialis*: the search towards the scientific validation of a traditional Brazilian medicine used for the treatment of asthma. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. 2013;23(3):527 – 541.

[18] ALVES MF, et al. In silico and In vivo Toxicological Evaluation of *Cissampelos Sympodialis* Secondary Metabolites in *Rattus Norvegicus*. *Current drug metabolism*. 2017;18(6):566 – 576.

[19] ALVES MF, et al. Toxicological evaluation in silico and in vivo of secondary metabolites of *C. sympodialis* in *Mus musculus* mice following inhalation. *Natural Product Research*. 2019;33(6):789 – 795

*CAPÍTULO 13*

**MODELOS DE AVALIAÇÃO DE TOXICOLOGIA  
REPRODUTIVA DE GENOTOXICIDADE DE  
PRODUTOS BIOATIVOS**

Rita de Cássia da Silveira e Sá;  
Mayara Karla dos Santos Nunes;  
Aleson Pereira de Sousa;  
Fernanda Patrícia Torres Barbosa;  
Hilzeth de Luna Freire Pessôa.

No mercado mundial, o surgimento de novos produtos bioativos naturais ou sintéticos para o tratamento de enfermidades demanda uma avaliação meticulosa de sua atividade biológica e a possível ocorrência de efeitos tóxicos no organismo humano. Ao considerarmos este potencial risco à saúde, um fator que desperta grande interesse e preocupação é a interferência que esses produtos possam exercer no sistema reprodutor, afetando a produção de descendentes sadios ou causando esterilidade, e no desenvolvimento embrionário, levando ao atraso no

crescimento, malformações e mortes<sup>(1)</sup>. A toxicidade no período de desenvolvimento é, na verdade, bem mais abrangente, pois também compreende a análise dos efeitos adversos durante a gestação, no período pré-natal e no pós-natal, acompanhando o desenvolvimento das crias até a fase adulta<sup>(2)</sup>.

Tradicionalmente, a toxicidade reprodutiva é avaliada em modelos animais que abordam a ação tóxica na função sexual e fertilidade de fêmeas e machos adultos e no desenvolvimento da prole. Ela envolve estudos não clínicos que utilizam protocolos de avaliação de toxicidade aguda, subcrônica e crônica, e testes reprodutivos de uma geração ou de múltiplas gerações<sup>(3,4)</sup>. No sistema reprodutor feminino, os testes de toxicidade *in vivo* visam o estudo morfológico dos órgãos reprodutores, com ênfase nas propriedades fisiológicas dos folículos e suas células, no balanço hormonal e na interação hormônio/receptor, no ciclo estral, nas condições do ambiente uterino, na fertilidade, no blastocisto, na

implantação, no embrião/feto, na lactação e no comportamento materno dentre outros aspectos<sup>(5,6)</sup>.

Devido à importância da influência hormonal no sucesso do processo reprodutivo, muitos trabalhos enfatizam os efeitos dos agentes tóxicos que podem afetar a reprodução ao interferirem com os mecanismos endócrinos, simulando ou inibindo a ação estrogênica a partir de sua ligação com receptores nucleares e de membrana, ou ao interferirem com os mecanismos de *feedback* no eixo hipotálamo-hipófise gonadal. Nos ovários, os folículos em diferentes etapas de crescimento podem exibir maior ou menor susceptibilidade a diferentes toxicantes e a metabolização dessas substâncias poderá aumentar ou reduzir os riscos de toxicidade, dependendo dos metabólitos produzidos. Além disso, em virtude da existência de uma complexa inter-relação entre o oócito, as células da teca e as células da granulosa, a alteração em qualquer uma dessas estruturas afetará todo o funcionamento folicular<sup>(6)</sup>.

Apesar dos modelos experimentais *in vivo* serem adotados em conformidade com as diretrizes de agências reguladoras, como OECD (*Organizaton for Economic Cooperation and Development*) e ANVISA (Agência de Vigilância Sanitária), eles abrangem a utilização de elevado número de animais e são geralmente realizados somente nos estágios mais tardios do processo de desenvolvimento. Por isso, o emprego de métodos alternativos aos modelos animais tradicionais, mais simples e baratos, e que permitem a triagem inicial de maior quantidade de substâncias, despontam como opções viáveis para a avaliação da toxicidade reprodutiva.

Diversos modelos de toxicologia da sistema reprodutor e do desenvolvimento estão disponíveis, incluindo ensaios *in vitro* com cultura de embriões, tecidos e células, e modelos com espécies não mamíferas, como o peixe-zebra. As culturas *in vitro* foram concebidas com o propósito de promover o crescimento de folículos, ou ovários, em vários estágios de desenvolvimento, abrangendo métodos

experimentais de curta ou longa duração, culturas de folículos pré-antrais, de complexos celulares constituídos por células da granulosa e o oócito, e coculturas<sup>(6,7)</sup>. Os modelos de cultura *in vitro* apresentam vários benefícios e podem variar quanto à espécie utilizada, o estágio folicular, à duração do tratamento e o meio de cultura. Porém, cada modelo tem limitações próprias e nenhum deles será capaz de avaliar todos os parâmetros de toxicidade por causa da complexidade da reprodução dos mamíferos. Por esse motivo, os vários aspectos reprodutivos podem ser divididos em componentes biológicos específicos e estudados separadamente ou em conjunto, tornando-se uma estratégia que facilita a identificação de células ou órgãos alvos dos toxicantes<sup>(1)</sup>.

Os modelos de cultura de ovário ou folículos permitem uma avaliação mais criteriosa, abrangente e com maior quantidade de substâncias testes em comparação aos modelos *in vivo*, possibilitando a análise de fatores fisiológicos e moleculares que incluem os mecanismos de ação dos agentes tóxicos,

os danos causados no oócito e nas células da granulosa e tecais, os efeitos nos folículos em diferentes estágios do desenvolvimento ou seus efeitos nas interações parácrinas e hormonais entre os folículos<sup>(6)</sup>.

### **Cultura de embriões**

Este modelo é adotado para a identificação de substâncias tóxicas que afetam o desenvolvimento embrionário e permite a distinção de seu potencial teratogênico<sup>(8,9)</sup>. Ele utiliza conceptos retirados do útero de ratos e camundongos após a implantação, no estágio de 3 a 5 somitos, com o saco vitelínico visceral e o cone ectoplacentário intactos, mas sem o saco vitelínico parietal e a membrana de Reichert. Os embriões são cultivados em meio de cultura específico, rico em soro, por 24 a 48 horas, com o acréscimo das substâncias testes de acordo com o estabelecido no ensaio experimental elaborado. A cultura é mantida sob constante agitação rotatória, a 37 °C, com concentrações crescentes de oxigênio

durante a fase de desenvolvimento, que é considerada um estágio susceptível à toxicidade por ser um momento crítico do processo morfogênético, com danos ao embrião expostos ao agente teratogênico. As limitações desse modelo estão relacionadas ao tempo de ação do toxicante que pode estar restrito apenas aos estágios mais tardios do desenvolvimento e, por isso, seus efeitos podem não ser detectados pelo modelo, e também ao fato de ele não abranger os efeitos no ambiente materno<sup>(10)</sup>.

### **Cultura de ovário neonatal**

Este modelo compreende o cultivo de ovários de roedores a partir do nascimento até o vigésimo dia pós-natal. Ele é apropriado para a avaliação biológica dos folículos primordiais durante o processo de formação e crescimento e de sua transição para folículo primário. É um método que permite a identificação de substâncias com potencial para interferir nesses processos<sup>(6)</sup>.

Além da cultura com ovários neonatais, vários estudos evidenciam a utilização de cultura de ovários de roedores para a avaliação da foliculogênese. Por exemplo, a exposição *in vitro* de ovários de ratas e camundongas, por 24 horas ou sete dias, ao gossipol provocou alterações na maturação folicular, evidenciando o aumento do número de folículos atrésicos e a redução do número de folículos viáveis em todos os estágios do desenvolvimento folicular<sup>(11)</sup>.

Em estudos mais recentes, a cultura de ovário foi usada para a investigação da atividade esteroidogênica em ratas Wistar (*Rattus norvegicus*) após a exposição neonatal *in vivo* a nanopartículas de dióxido de titânio e o copolímero poli(ácido lático-b-glicol etilênico), componentes transportadores de substâncias biologicamente ativas. Após o período de cultura de seis dias, o meio de cultura foi coletado, em dias alternados, para análise dos níveis de hormônios esteroides, com o emprego de técnicas de radioimunoensaio ou ensaio imunoenzimático (ELISA). Em conjunto, essas técnicas viabilizaram a

observação de alterações na secreção de hormônios ovarianos, com a possível indicação de ocorrência de perturbação do processo reprodutivo<sup>(12)</sup>.

Em outro estudo, os efeitos individuais ou combinados de duas drogas quimioterápicas (*i.e.* cisplatina e doxorubicina) foram avaliados em culturas de ovários humanos e de camundonga (seis dias de cultura e tratamento de 24 horas no segundo dia), no qual foi observada diminuição do número de folículos em camundongas e maior incidência de apoptose e proliferação celular reduzida no tecido ovariano humano<sup>(13)</sup>. Resultado semelhante foi obtido no trabalho sobre a toxicidade gonadal da cisplatina e da carboplatina em cultura de ovário de camundonga pré-púbere<sup>(14)</sup>.

### **Cultura de folículos**

Este tipo de cultura permite o cultivo de folículos para o estudo da foliculogênese e oogênese, e o início do desenvolvimento folicular, desde a fase de oócitos imaturos até a fertilização do gameta. É um

modelo que possibilita a investigação dos efeitos da exposição de baixas doses e em longo prazo de substâncias, além da avaliação da produção de esteroides e da expressão de seus receptores<sup>(15)</sup>.

O folículo é a estrutura morfofuncional do ovário, constituído pelo oócito e pelas células da teca e as células da granulosa, que sintetizam e secretam os hormônios e fatores de crescimento responsáveis pela integração funcional do sistema reprodutor e do sistema nervoso. A exposição folicular aos toxicantes pode afetar os componentes celulares do folículo em etapas específicas de sua formação, o que faz com que o padrão de infertilidade causada pelo agente tóxico dependa do tipo de folículo afetado. Alterações nas células foliculares poderão causar danos ao oócito, gerando erros meióticos, interrupção do processo de fertilização e desenvolvimento alterado<sup>(1)</sup>.

A seleção do tipo de cultura deve ser de acordo com o objetivo do estudo, ou seja, a cultura completa de folículos, quando for necessário estabelecer a interação com o processo ovulatório, ou cultura de

células da granulosa e oócitos para o estudo da interação celular durante a gametogênese. Estes modelos de cultura *in vitro* fornecem evidências e recriam processos fisiológicos *in vivo*, como a morfogênese, a diferenciação, a síntese e ação hormonal. Na foliculogênese *in vitro*, o desenvolvimento do oócito no folículo antral está interrompido e o crescimento folicular depende da presença do hormônio folículo estimulante (FSH). A adição de um estimulador para a ovulação (por exemplo, o hormônio luteinizante – LH), no décimo-segundo dia de cultura, provoca a separação do complexo oócito - *cumulus oophorus*, a mucificação das células da granulosa que formam esse complexo e o reinício da meiose<sup>(2)</sup>.

### **Peixe-zebra**

O peixe-zebra (*Danio rerio*, peixe tropical de água doce) vem sendo utilizado na avaliação da toxicidade reprodutiva e do desenvolvimento devido a uma série de vantagens, a saber: curto período

reprodutivo, produção de grande quantidade de descendentes, facilidade de observação de todo o desenvolvimento em um único embrião/larva, investigação direta dos efeitos dos toxicantes por causa da transparência dos embriões e dos estágios larvais iniciais<sup>(10,16)</sup>. Estudos em laboratórios mostraram similaridades genômicas, morfofuncionais e hormonais, relativos às características básicas dos eixos hipotálamo (H)-hipófise (HF)-gonadal, H-HF-adrenal e H-HF-tireoide, na regulação do processo reprodutivo entre a espécie humana e o peixe-zebra<sup>(16,17)</sup>.

O modelo de toxicidade com o peixe-zebra pode ser combinado a vários métodos experimentais, envolvendo técnicas moleculares e de imagem que facilitam a elucidação de mecanismos relacionados aos efeitos biológicos causados pelo agente tóxico<sup>(10)</sup>. Estudos podem ser elaborados com o propósito de avaliar os efeitos da exposição ao toxicante na expressão gênica com a utilização da técnica de reação em cadeia da polimerase em tempo real (RT-

PCR) e na hibridização em microarranjos<sup>(17,18)</sup>. Danos à reprodução e na progressão do desenvolvimento associado à exposição crônica de substâncias podem também ser investigados por meio de análises histopatológicas, imunohistológicas, de imunofluorescência e a utilização de biomarcadores para apoptose, estresse oxidativo e proliferação do tecido gonadal (método de Tunel, do inglês *Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling*<sup>(19)</sup>).

O teste de toxicidade embrionária pode ser empregado na avaliação da exposição aguda no desenvolvimento com o objetivo de analisar os efeitos teratogênicos nos embriões e larvas recém-eclodidas, utilizando-se técnicas histopatológicas e imunohistoquímicas via detecção de antígenos nucleares de proliferação celular. Outro componente de análise refere-se ao fator de bioconcentração dos compostos presentes na água ou teciduais por meio da cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa<sup>(20)</sup>.

## **Genotoxicidade**

Os testes de genotoxicidade identificam substâncias que podem causar alterações nas células somáticas e/ou germinativas muito tempo após a exposição. O efeito deletério pode ser causado por danos no DNA que ocorrem em uma única célula em baixas exposições. A alteração genética pode resultar em um fenótipo que não apenas persiste, mas pode ser amplificado à medida que a célula se divide, criando um grupo de células anormais que prolifera em um tecido ou órgão. Alterações genéticas nas células somáticas podem causar câncer se afetarem a função de genes específicos (proto oncogenes, genes supressores de tumores e / ou genes envolvidos no reparo do DNA). O acúmulo de danos no DNA de células somáticas tem sido associado com envelhecimento, disfunção imunológica, doenças cardiovasculares e neurodegenerativas. Nas células germinativas, o dano ao DNA está associado a abortos espontâneos, infertilidade, malformação ou

modificações hereditárias na prole e/ou gerações subsequentes que resultam em doenças genéticas. Uma avaliação completa da capacidade de um produto de induzir danos genéticos inclui; testes que podem detectar mutações genéticas, modificações cromossômicas e aneuploidia<sup>(21)</sup>.

O teste de mutação reversa bacteriana (teste de Ames) identifica substâncias que induzem mutações genéticas devido a; deleções, inserções e substituições de pares de base no DNA. Este teste utiliza cepas específicas de duas espécies de bactérias, *Salmonella typhimurium* e *Escherichia coli*. Cada cepa contém mutações em um gene da biossíntese de histidina ou triptofano, respectivamente. Essas mutações impedem o crescimento bacteriano na ausência do aminoácido. A exposição a agentes com potencial mutagênico pode induzir uma reversão da mutação que restaurará a sequência de DNA do tipo selvagem e a capacidade funcional das bactérias para sintetizar o respectivo aminoácido<sup>(22)</sup>.

O teste de micronúcleos de eritrócitos de mamíferos identifica substâncias que induzem micronúcleos em eritroblastos da medula óssea ou eritrócitos de sangue periférico de roedores. Quando um eritroblasto da medula óssea se transforma em um eritrócito imaturo (também conhecido como eritrócito policromático ou reticulócito) e depois migra para o sangue periférico, o núcleo principal é extrudado. Entretanto, qualquer micronúcleo formado pode permanecer no citoplasma e ser detectado com facilidade uma vez que os eritrócitos não possuem um núcleo. Os micronúcleos podem se formar a partir de cromossomos acêntricos, fragmentos de cromossomos retardatários, do processo de divisão celular ou cromossomos inteiros, sendo assim o teste é capaz de detectar substâncias com efeitos clastogênicos e aneugênicos<sup>(23)</sup>.

O teste do cometa identifica substâncias que induzem um dano primário no DNA. Sob condições alcalinas (> pH 13), o teste do cometa pode detectar quebras no DNA fita dupla em células eucarióticas,

resultantes de interações diretas com descontinuidades transitórias da molécula de DNA. Essas quebras podem ser: reparadas, não resultando em nenhum efeito; letais para a célula; ou mantidas como uma mutação, resultando em uma mudança hereditária permanente. Portanto, esse teste detecta quebras primárias no DNA que nem sempre levam a mutações genéticas e/ou aberrações cromossômicas. O teste do cometa pode ser aplicado em qualquer tecido animal a partir do qual, núcleos ou suspensões de células possam ser preparadas. Sendo assim esse teste é útil para detectar a exposição de tecidos-alvo e possíveis tecidos-alvo além de indicar se o produto químico ou seus metabólitos podem causar quebras na molécula de DNA de tecidos específicos.

A constante busca por produtos bioativos naturais para a produção de novos medicamentos exige a realização de grande quantidade de estudos para a comprovação de suas propriedades farmacológicas e a verificação da toxicidade. Apesar das limitações inerentes a qualquer modelo

experimental, os modelos *in vitro* e *ex vivo* estão sendo considerados instrumentos válidos para a avaliação da toxicidade reprodutiva e do desenvolvimento, por terem a vantagem de reproduzir ambientes multicelulares complexos que se assemelham às condições *in vivo*.

## Referências

<sup>1</sup>BREMER, S et al. Reproductive and Developmental Toxicity. **ATLA**, v.33, p.183–209, 2005.

<sup>2</sup>CORTVRINDT, RG; SMITZ, JE. Follicle culture in reproductive toxicology: a tool for in-vitro testing of ovarian function? **Hum Reprod Update**, v.8, p.243-54, 2002.

<sup>3</sup>COOPER, RL. Current developments in reproductive toxicity testing of pesticides. **Reprod Toxicol**, v. 28, p.180-187, 2009.

<sup>4</sup>SAGHIR, AS; DORATO, MA. Reproductive and developmental toxicity testing: Examination of the extended one-generation reproductive toxicity study guideline. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v.79, p.110-117,2016.

<sup>5</sup>SPIELMANN, H. The Way Forward in Reproductive/ Developmental Toxicity Testing. **ATLA**, v.37, p.641–656, 2009.

<sup>6</sup>STEFANSDOTTIRA, A et al. Use of ovary culture techniques in reproductive toxicology. **Reproductive Toxicology**, v.49, p.117–135, 2014.

<sup>7</sup>MURRAY, A; SPEARS, N. Follicular development in vitro. **Semin Reprod Med**, v.18, p.109–22, 2000.

<sup>8</sup>GREEN, ML et al. Use of Alternative Developmental Toxicity Assays to Assess Teratogenicity Potential of Pharmaceuticals. **Applied In Vitro Toxicology**, v.4, p.44-53, 2018.

<sup>9</sup>BHARTI, D et al. *In Vitro* Generation of Oocyte Like Cells and Their In Vivo Efficacy: How Far We have been Succeeded. **Cells**, v.9, p.557-585, 2020.

<sup>10</sup>BRANNEN, KC et al. Alternative Models of Developmental and Reproductive Toxicity in Pharmaceutical Risk Assessment and the 3Rs. **ILAR Journal**, v. 57, p.144–156, 2016.

<sup>11</sup>LUZ, VB et al. *In vitro* study of gossypol's ovarian toxicity to rodents and goats. **Toxicol**, v.145, p.56-60, 2018.

<sup>12</sup>SCSUKOVA, S; MLYNARCIKOVA, AB; ROLLEROVA, E. The use of *ex vivo* ovary culture for assessment of alterations in steroidogenesis following neonatal exposure to poly(ethylene glycol)-*block*-polylactide methyl ether or titanium dioxide nanoparticles in Wistar rats. **Endocrine Regulations**, v.54, p.53-63, 2020.

<sup>13</sup>LOPES, F et al. Single and combined effects of cisplatin and doxorubicin on the human and mouse ovary *in vitro*. **Reproduction**, v.159, p. 193-204, 2020.

<sup>14</sup>ALLEN, CM et al. Comparative gonadotoxicity of the chemotherapy drugs cisplatin and carboplatin on prepubertal mouse gonads. **Molecular Human Reproduction**, v.26, p. 129-140, 2020.

<sup>15</sup>TALBOT, P. *In Vitro* Assessment of Reproductive Toxicity of Tobacco Smoke and Its Constituents. **Birth Defects Research**, v.84, p.61-72, 2008.

<sup>16</sup>HOO, JY et al. Zebrafish: A Versatile Animal Model for Fertility Research. **BioMed Research International**, v.2016, p.1-20, 2016.

<sup>17</sup>HEIDEN, TCK et al. Molecular targets of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) within the zebrafish ovary: Insights into TCDD-induced endocrine disruption and reproductive toxicity. **Reprod Toxicol**, v.25, p.47-57, 2008.

<sup>18</sup>WU, SM et al. Effects of Maternal Cadmium Exposure on Female Reproductive Functions, Gamete Quality, and Offspring Development in Zebrafish (*Danio rerio*). **Arch Environ Contam Toxicol**, v. 65, p.521-536, 2013.

<sup>19</sup>PETROVICI, A et al. Toxicity of Deltamethrin to Zebrafish Gonads Revealed by Cellular Biomarkers. **J Mar Sci Eng**, v.8, p.73-85, 2020.

<sup>20</sup>NOWAKOWSK, K et al. Acute exposure of zebrafish (*Danio rerio*) larvae to environmental concentrations of selected antidepressants: Bioaccumulation, physiological and histological changes. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v.229, p.1-9, 2020.

<sup>21</sup>OECD- Organization for Economic Cooperation and Development. Genetic toxicology guidelines and updates performed in 2014-2015. **Series on Testing & Assessment**, 2016.

<sup>(22)</sup>OECD- Organization for Economic Cooperation and Development. Guideline 471: Bacterial Reverse Mutation Test. **Series on Testing & Assessment**, 1997.

<sup>(23)</sup>OECD- Organization for Economic Cooperation and Development. Guideline 474: Mammalian Erythrocyte Micronucleus Test. **Guideline for the testing of chemicals**, 2016.

<sup>(24)</sup>OECD- Organization for Economic Cooperation and Development. Guideline 489: In Vivo Mammalian Alkaline Comet Assay. **Series on Testing & Assessment**, 2016.

*CAPÍTULO 14*

**ALTERAÇÕES HISTOPATOLÓGICAS NOS ANIMAIS  
EM ESTUDOS TOXICOLÓGICOS DE PLANTAS  
MEDICINAIS**

Giciane Carvalho Vieira;  
Wesley Ferreira de Moraes Brandão

As novas tendências globais de preocupação com a biodiversidade e as ideias de desenvolvimento sustentável trouxeram novos investimentos e interesse da indústria farmacêutica e das instituições de pesquisa pelos produtos naturais, despertando novamente um interesse pela fitoterapia e desenvolvimento de novos fármacos <sup>(1)</sup>.

Entretanto, além de fornecer à sociedade informações quanto ao uso de extratos vegetais é necessário garantir a seguridade do uso de tais produtos, desmitificando a ideia de que por ser natural não acarreta riscos à saúde<sup>(2)</sup>.

O desenvolvimento de um novo medicamento segue um processo longo e complexo. Uma série de atividades e estudos pré-clínicos devem ser concluídos para se obter informações que certifiquem a segurança do material em estudo antes que seja aprovado o uso nos ensaios clínicos e, posteriormente, no uso terapêutico. Nesse sentido, a análise histopatológica permite fornecer dados acerca da toxicidade de plantas e seus compostos, funcionando como uma ótima ferramenta nos estudos toxicológicos com plantas medicinais <sup>(2)(3)</sup>.

A identificação dos riscos potenciais do uso de plantas medicinais se baseia tradicionalmente em estudos em animais laboratoriais, onde alterações na Patologia Clínica e na Histopatologia de grupos-teste em comparação com grupos-controle não tratados definem um efeito adverso. Protocolos padronizados são monitorados para avaliação de parâmetros durante o curso de estudos de toxicidade com o intuito de avaliar as plantas medicinais e seus componentes em órgãos-alvo (Figura 1) <sup>(4)</sup>.



Fonte: Adaptado de Sorenson <sup>(5)</sup> e Freepik.com <sup>(6)</sup>

O significado biológico e a importância toxicológica de quaisquer alterações encontradas entre os grupos-controle e grupo-teste devem ser consideradas e relatadas. As lesões histológicas nos órgãos ou tecidos-alvo são cruciais para que os dados sejam avaliados corretamente <sup>(3)</sup>.

### **Coleta e processamento da amostra**

Após a coleta, o material biológico deve ser fixado a fim de preservar as estruturas que serão analisadas <sup>(7)</sup>. A fixação do material garante a inibição da autólise dos tecidos, além de evitar coagulação ou

endurecimento, permitindo a preservação de componentes celulares e tissulares <sup>(8)</sup>.

O material coletado deve ser registrado com informações de identificação como número, ficha técnica com identificação do órgão, data da fixação e entrada do material no laboratório <sup>(9)</sup>.

A próxima etapa é a clivagem do material para garantir que as substâncias químicas utilizadas durante o processamento do material sejam difundidas mais facilmente através das células <sup>(8)</sup>.

Em seguida, a água presente nos tecidos é retirada através da imersão do material em uma bateria de soluções alcoólicas crescentes até o álcool 100%. O objetivo da desidratação é permitir que a parafina, insolúvel em água, penetre no tecido <sup>(10)</sup>.

Como o álcool também não possui afinidade com a parafina, precisa ser substituído por um outro produto com maior afinidade em um processo chamado de diafanização. Os produtos diafanizadores comumente utilizados em laboratório são xilol, toluol e benzeno <sup>(9)</sup>.

As substâncias mais utilizadas na etapa de impregnação são a parafina e a resina. O sucesso nesta etapa permite que sejam realizados cortes histológicos de qualidade. Este processo deve ser realizado de maneira adequada evitando que os tecidos fiquem amolecidos ou com tamanhos reduzidos e quebradiços <sup>(7)</sup>.

Na inclusão, o material é colocado em um molde em formato de bloco para ser preenchido por parafina. Em seguida, os blocos são esfriados em uma placa fria <sup>(8)</sup>. A posição em que o material é colocado implicará no modo em que os cortes serão vistos no microscópio <sup>(9)</sup>.

A microtomia é realizada através de um aparelho chamado micrótomo e tem por objetivo principal realizar cortes finos, em torno de 3 -10  $\mu\text{m}$  de espessura, do tecido incluído nos blocos de parafina para serem colocados em lâminas <sup>(7)(8)</sup>.

A etapa de coloração consiste na aplicação de corantes e outros reagentes químicos para evidenciar as estruturas microscópicas a serem analisadas <sup>(7)</sup>.

Durante a técnica de coloração podem ser utilizados um corante (monocrômica), dois corantes (bicrômica), três corantes (tricrômica) ou mais (policrômica) (Figura 2) <sup>(9)</sup>.



Fonte: Adaptado de (9).

A coloração mais utilizada nos laboratórios para análise histopatológica é a hematoxilina & eosina (H.E.) <sup>(5)</sup>. A hematoxilina é um corante básico e possui afinidade com estruturas basófilas, a exemplo dos ácidos nucleicos presentes no núcleo. Já a eosina é um corante ácido que permite visualização de estruturas

acidófilas, como as presentes no citoplasmas das células (Figura 3) <sup>(9)</sup>.

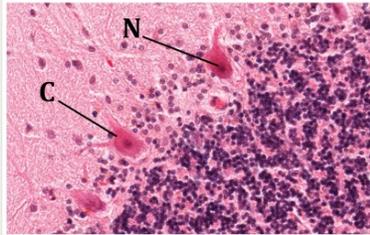
### Figura 3 Colorações e suas afinidades

❖ **Corantes Ácidos:** Eosina, Azul de toluidina, Fucsina.

❖ **Estruturas Básicas:** Citoplasma, (C), mitocôndrias, Grânulos de secreção, fibras colágeno.

❖ **Corantes Básicos:** Hematoxilina, Azul de Toluidina, Azul de Metileno.

❖ **Estruturas ácidas:** Ácido nucleico (N), Glicosaminoglicano.



Cerebelo: Neurônio de Purkinje em Hematoxilina Eosina (H.E.)

Fonte: Adaptado de Sorenson (5).

## Avaliação histopatológica

Os estudos não clínicos de segurança propostos segundo o Guia para Condução de Estudos Não Clínicos de Toxicologia e Segurança Farmacológica Necessários ao Desenvolvimento de Medicamentos incluem: estudos de toxicidade de dose única (Aguda), toxicidade de doses repetidas, toxicidade reprodutiva, genotoxicidade, tolerância

local e carcinogenicidade além de estudos de interesse na avaliação da segurança farmacológica e toxicocinética. A partir dos testes de toxicidade de doses repetidas é possível obter informações sobre os efeitos tóxicos, identificação de órgãos alvos, efeitos na fisiologia do animal, hematológicas, bioquímicas, anátomo e histopatológicas<sup>(3)</sup>.

Os órgãos analisados na histopatologia nos estudos não-clínicos variam de apenas alguns órgãos como fígado, pulmões, estômago, coração e rins no estudo de toxicidade de doses repetidas até necropsia completa e detalhada, que inclui: um exame cuidadoso da superfície externa do corpo, dos orifícios e das cavidades craniana, torácica, abdominal e seus conteúdos no estudo de carcinogenicidade <sup>(3)</sup>.

Os achados histopatológicos não-clínicos relacionados às plantas medicinais e seus compostos não proíbem necessariamente o início dos ensaios clínicos, mas são utilizados para definir as doses iniciais e fornecer informações importantes aos clínicos para monitoramento dos pacientes. Portanto,

a dose e a exposição nas quais ocorrem as alterações são igualmente importantes para medir a potencial toxicidade de um candidato a medicamento<sup>(3)</sup>.

A análise das lâminas é realizada por profissional capacitado e os resultados podem ser expressos de forma qualitativa ou quantitativa. Para a análise quantitativa pode ser feito o uso de Score seguindo uma pontuação por ocorrência/distribuição da alteração por lâmina, por exemplo, 0 – alteração não observada; 1- discreta (até duas ocorrências da alteração por lâmina); 2- moderada (três a cinco ocorrências da alteração por lâmina) e 3- intensa (acima de cinco ocorrências da alteração por lâmina) ou utilização de programas computacionais para análise da intensidade de cor <sup>(2)</sup>.

### **Estudos histopatológicos com plantas medicinais**

A análise histopatológica vem sendo utilizada na pesquisa com plantas medicinais em diferentes áreas na procura por novas alternativas terapêuticas para diferentes patologias como no tratamento da

Síndrome Combinada de Rinite Alérgica e Asma (CARAS) pelos alcaloides warifteina e metilwarifteina<sup>(11)</sup>; da inflamação pulmonar crônica pelo óleo de coco virgem<sup>(12)</sup>; da rinite alérgica crônica pelos alcaloides warifteina e metilwarifteina<sup>(13)</sup> e das úlceras gástricas pelo extrato da planta *Cyssampelos sympodialis*<sup>(14)</sup>.

Portanto, considerando os estudos de toxicidade essenciais para determinar o perfil abrangente de segurança de um medicamento, a realização de ensaios de toxicidade, como a análise histopatológica, nas fases precoces da pesquisa, desempenha um papel relevante, permitindo antecipar riscos e reduzir a probabilidade de compostos promissores falharem em etapas mais avançadas e dispendiosas.

## Referências

1. Santos JS dos, Almeida, Carlos CO de F. Das Plantas Mediciniais À Fitoterapia: Uma Ciência Em Expansão. 2016. 214 p.

2. Guth BD, Grobler AF, Frazier KS, Greiter-Wilke A, Herzyk D, Hough TA, et al. Drug safety Africa: An overview of safety pharmacology & toxicology in South Africa. *J Pharmacol Toxicol Methods*. 2019;98(April).
3. ANVISA. Guia para a condução de estudos não clínicos de toxicologia e segurança farmacológica necessários ao desenvolvimento de medicamentos. Versão 2. 2013;1-48.
4. Calado AM. História do Ensino de Histologia. História da Ciência e Ensino construindo interfaces. 2019;20:455-66.
5. Sorenson RL, Brelje TC. No Title. In: *The Atlas of Human Histology: A Guide to Microscopic Structure of Cells, Tissues and Organs*. 3rd ed. Minnesota; 2014. p. 367.
6. Macrovector. Human anatomy organs infographic. Freepik.com. 2020.
7. Cristina A, Castro G, Cristina A, Castro G. Toxicidade da Exposição Profissional a Formaldeído e a Xilol nos Laboratórios de

Anatomia Patológica e Patologia Forense:  
Utilização de Reagentes Alternativos.  
Universidade do Porto; 2019.

8. Mescher AL. Basic Histology Junqueira. 14th ed. 2016.
9. Nunes C de S, Cinsa LA. Princípios Do Processamento Histológico De Rotina. Rev Interdiscip Estud Exp. 2016;8(Unico):31–40.
10. Aslinda Hassan, Siah Bing Sheng WMS and NB. Chapter 1 Essential Methods of Plant Sample Preparation for Light Microscopy. An Autom Irrig Syst Using Arduino Microcontroller. 2019;1908(January):2–6.
11. Cavalcanti RFP, Gadelha FAAF, de Jesus TG, Cavalcante-Silva LHA, Paiva Ferreira LKD, Paiva Ferreira LAM, et al. Warifteine and methylwarifteine inhibited the type 2 immune response on combined allergic rhinitis and asthma syndrome (CARAS) experimental model through NF- $\kappa$ B pathway. Int Immunopharmacol [Internet]. 2020;85(May):106616. Available from:  
<https://doi.org/10.1016/j.intimp.2020.106616>

12. Vasconcelos LHC, Silva MDCC, Costa AC, Oliveira GAD, Souza ILL De, Righetti RF, et al. Virgin Coconut Oil Supplementation Prevents Airway Hyperreactivity of Guinea Pigs with Chronic Allergic Lung Inflammation by Antioxidant Mechanism. *Oxid Med Cell Longev*. 2020;2020.
  
13. Vieira GC, Gadelha FAAF, Pereira RF, Ferreira LKDP, Barbosa-Filho JM, Bozza PT, et al. Warifteine, an alkaloid of *Cissampelos sympodialis*, modulates allergic profile in a chronic allergic rhinitis model. *Brazilian J Pharmacogn [Internet]*. 2018;28(1):50–6. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bjp.2017.10.009>
  
14. De Sales IRP, Formiga RDO, Machado FDF, Nascimento RF, Pessoa MMB, Barros MEFX, et al. Cytoprotective, antioxidant and anti-inflammatory mechanism related to antiulcer activity of *Cissampelos sympodialis* Eichl. in animal models. *J Ethnopharmacol [Internet]*. 2018;222(November 2017):190–200. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jep.2018.04.019>

## *CAPÍTULO 15*

### **AROMATERAPIA E AS PLANTAS MEDICINAIS**

Lívia Maria Trindade de Souza

Heloisa de Freitas Pacífico

Josemar dos Santos Soares

Jucianny Sales Silva

Liana Clébia de Moraes Pordeus.

**Resumo:** Os óleos essenciais são substâncias voláteis, originados a partir de plantas e suas diversas partes. O uso dos óleos essenciais propicia a prática da aromaterapia. De acordo com o Ministério da Saúde, a aromaterapia faz parte da aromatologia, que é a ciência que investiga os efeitos terapêuticos dos óleos essenciais e de substâncias aromáticas. No Brasil, a aromaterapia é tida como uma prática reconhecida, além disso de acordo com a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC) de 2016, esta é uma prática multiprofissional, integrativa, complementar e pode ser realizada

individualmente ou coletivamente na atenção básica/Sus.

**Palavras-chave:** plantas medicinais, óleos essenciais, aromaterapia.

Diversas espécies de plantas, e as suas partes tais como folhas, flores, cascas, sementes e raízes possuem na sua composição metabólitos secundários denominados de óleos essenciais aromáticos (OE). Essas substâncias são voláteis, de estrutura química distintas, que interagem com o organismo proporcionando diferentes efeitos terapêuticos. Estes óleos possuem propriedades físicas e psíquicas que despertaram o interesse da comunidade científica <sup>(1)</sup>. São caracterizados por ser uma mistura de substâncias orgânicas, dentre elas: terpenos, aldeídos, álcoois, ésteres, fenólicos, éteres e cetonas. Atualmente existe uma alta demanda por produtos à base de óleo essencial ou produtos químicos com aroma natural <sup>(2)</sup>.

Os terpenos são formados pela associação de isoprenos, cadeias de cinco carbonos ligados uns aos outros, e os mesmos se diferenciam pelo número de unidades que se repetem. Monoterpenos e sesquiterpenos possuem uma pequena massa molecular e por isso são muito voláteis, explicando o aroma acentuado e característico dos óleos essenciais (3,4).

A aromaterapia é uma prática terapêutica onde usa-se os OEs e vem sendo realizada há muitos anos, com relatos desde as Civilizações antigas. Atualmente são utilizados como intervenções para diferentes transtornos ocasionados, por exemplo, pelo estresse oxidativo, tumores, sintomatologias psiquiátricas, com ênfase no tratamento dos transtornos de humor e de Ansiedade (5).

Os comportamentos ansiosos e os transtornos de ansiedade se configuram como problema de saúde pública, uma vez que se apresentam com alta taxa de prevalência e incidência na população, trazendo um impacto negativo significativo aos papéis familiares,

sociais e ocupacionais do indivíduo acometido, com efeitos que podem ser nocivos para o desenvolvimento humano em todas as fases da vida, além de onerar o sistema de saúde <sup>(6)</sup>.

Em relatório da OMS, em 2018, o Brasil foi considerado o país com o maior número de pessoas ansiosas do mundo, onde 9,3% da população apresenta o transtorno. O relatório indicou que, na maioria dos países analisados, a ansiedade é o segundo transtorno mental com maior incidência de incapacitação, sendo o primeiro a depressão. A OMS também indicou que o Brasil é o primeiro quanto ao tempo de convivência com a incapacidade provocada por transtornos psiquiátricos <sup>(7)</sup>.

Existem algumas possibilidades de intervenção junto às manifestações e aos transtornos de ansiedade, sendo os tratamentos farmacológicos e psicoterápicos as intervenções tidas como convencionais nos últimos 30 anos <sup>(8)</sup>. No entanto, a abordagem farmacológica apresenta limitações, podendo envolver uma série de efeitos indesejáveis

aos pacientes, tais quais sedação, cefaléia, ataxia, quadros de tolerância e dependência medicamentosa. Sendo assim, o aumento da conscientização sobre os efeitos colaterais das drogas de ação no sistema nervoso central, quando utilizadas sem indicação correta, levou a busca por novos tratamentos que apresentem menores riscos.

No contexto mundial, a OMS recomenda que os órgãos públicos integrem as Medicinas Tradicionais e Complementares aos sistemas nacionais de saúde. De acordo com o Ministério da Saúde, a aromaterapia faz parte da aromatologia, que é a ciência que investiga os efeitos terapêuticos dos OE e de substâncias aromáticas. No Brasil, a aromaterapia é tida como uma prática reconhecida (Ver figura 1), além disso de acordo com a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC) de 2016, esta é uma prática multiprofissional, integrativa, complementar e pode ser realizada individualmente ou coletivamente na atenção básica/Sus <sup>(9)</sup>.

Figura 1. Prática de aromaterapia no SUS



Fonte: André Ferraz, 2018.

Quanto ao uso dos OEs na terapêutica, eles podem ser de grande utilidade ao Sistema Único de Saúde (SUS) no ponto de vista econômico, pois a aromaterapia é considerada uma intervenção de baixo custo e o efeito dos OEs pode beneficiar os pacientes assistidos pelo SUS <sup>(9)</sup>.

Os efeitos dos óleos em funções do Sistema Nervoso Central (SNC), como cognição e comportamento, se devem ao fato de que essas substâncias têm uma excelente absorção e transporte através das membranas em virtude da sua lipossolubilidade, principalmente se administração for por via inalatória <sup>(1)</sup>.

Tendo em vista as limitações e até mesmo a escassez de alguns estudos científicos sobre OE, os possíveis efeitos destes precisam ser mais investigados em diferentes populações, buscando compreender melhor as variações nas dosagens, a melhor via de administração, as indicações terapêuticas dentre outras propriedades que podem influenciar o uso da aromaterapia e, desta forma, servir beneficemente a saúde do indivíduo <sup>(10)</sup>.

Abaixo listamos alguns exemplos de Óleos Essenciais, com indicações sobre o seu uso popular e/ou científico.

### *Citrus Sinensis*

O óleo essencial de *citrus sinensis*, pertencente à família Rutaceae, é conhecido popularmente como laranja doce, apresenta alto teor volátil e sua composição química é rica monoterpenos. Pesquisadores têm investigado sobre a atividade ansiolítica do óleo essencial de *citrus sinensis*. Os

efeitos positivos das espécies do gênero citrus se deve às substâncias bioativas presentes <sup>(10)</sup>.

#### *Citrus Aurantium L.*

O óleo essencial de *Citrus aurantium L.*, pertencente à família Rutaceae, é conhecido popularmente como laranja amarga. Na medicina popular brasileira e em outros países é utilizado para tratar ansiedade, insônia e anticonvulsivante, o que sugere efeito depressor sobre o SNC, entre outras atividades. Os óleos essenciais, principalmente os de aroma cítricos, também são indicados para tratamentos de transtornos de humor e depressão, pois acredita-se que o óleo essencial de laranja apresenta efeito relaxante <sup>(11,12)</sup>.

#### *Rosmarinus officinalis L.*

O OE de Alecrim (*Rosmarinus officinalis L.*) (Ver figura 2) pertence à família Lamiaceae, e pode apresentar potencial efeito antioxidante. Suas propriedades neuroprotetivas vêm sendo estudadas. Segundo Song, et al., (2016) <sup>(13)</sup>, o extrato de alecrim é

considerado um potente tratamento para um melhor desempenho cognitivo, porém este estudo foi realizado com ratos que tinham lesão cerebral traumática leve. O OE *Rosmarinus officinalis L* possui efeitos que podem amenizar o estresse e que contribuem na indução da diferenciação celular neural. Isto se deve principalmente a variedade de substâncias presentes neste OE: antioxidantes, bioativos citoprotetores e potencializadores da cognição.

Figura 2. Óleo essencial de Alecrim



Fonte: [www.mundoboaforma.com.br/15-beneficios-do-oleo-de-alecrim-para-que-serve-e-dicas/](http://www.mundoboaforma.com.br/15-beneficios-do-oleo-de-alecrim-para-que-serve-e-dicas/)

### *Lavandula Angustifolia*

O óleo essencial de *lavandula angustifolia* (Ver figura 3), pertencente à família Lamiaceae, é utilizado

para tratamento de doenças mentais como, transtornos de ansiedade e de Humor. Em sua composição encontra-se principalmente linalol e acetato de linalil <sup>(11,12)</sup>.

Figura 3 - Óleo essencial de *Lavandula angustifolia*



Fonte: flores.culturamix.com/flores/naturais/quais-os-beneficios-do-oleo-essencial-de-lavanda

### **Considerações finais**

Diante do exposto, os óleos essenciais aromáticos são compostos complexos que podem atuar em diferentes contextos em nossos organismos. Existem diversas espécies que podem originar os óleos essenciais aromáticos, algumas foram abordadas neste capítulo como *Citrus Sinensis*, *Citrus Aurantium L.*, *Rosmarinus officinalis L.* e *Lavandula Angustifolia*. Dentre os aspectos abordados de cada

óleo destacamos a atuação destas espécies sobre o SNC.

## **Referências**

1. Zhong Y, Zheng Q, Hu P, et al.(2019). Sedative and hypnotic effects of compound Anshen essential oil inhalation for insomnia. *BMC Complement Altern Med.*19(1):306.
2. Swamy, M. K., Akhtar, M. S., & Sinniah, U. R. (2016). Antimicrobial Properties of Plant Essential Oils against Human Pathogens and Their Mode of Action: An Updated Review. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2016, 1–21.
3. Felipe, L. O.; Bicas, J. L.; Terpenos, aromas e química dos compostos naturais. *Química nova.* (2017). Vol. 39, Nº 2, p. 120-130.
4. Piresa T.C.M, Ribeiro M.G.T.C., Machado A.A. S. C. Extração do r-(+)-limoneno a partir das cascas de laranja: avaliação e otimização da verdura dos processos de extração tradicionais. *Quim. Nova.* (2018). v. 41, n. 03, 355-365.
5. Moss, M., Smith, E., Milner, M., & McCready, J. (2018). Acute ingestion of rosemary water: Evidence

of cognitive and cerebrovascular effects in healthy adults. *Journal of Psychopharmacology*, 0269881118798333.doi:10.1177/0269881118798339

6. Fernandes, L. F. B. et al (2014). Prevenção universal de ansiedade na infância e adolescência. *Revista Psicologia: Teoria e Prática*, 16(3), 83-99.

7. World Health Organization. (2018). The burden of mental disorders in the region of the Americas, 2018.

8. Schmidt N. B., Keough M. E., Hunter L. R., & Funk A. P. (2008) Physical illness and treatment of anxiety disorders. New York: Springer, 341–366.

9. Brasil. Portaria n. 849, de 27 de março 2017. Inclui a Arteterapia...à Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares. *Diário Oficial da União, Brasília*.

10. Villareal, M. O., Ikeya, A., Sasaki, K., Arfa, A. B., Neffati, M., & Isoda, H. (2017). Anti-stress and neuronal cell differentiation induction effects of *Rosmarinus officinalis* L. essential oil. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 17(1).

11. Bakhshaei, S. Phyto-pharmacological effect of nine medicinal plants as a traditional treatment of depression. (2017). *IIOAB Journal*. v. 8, suppl 2, p.76-81.

12. Viana, M. D. M., Vieira, A. C. S., da Silva Neto, G. J., Póvoas, F. T. X., & Campesatto, E. A. (2016). Potencial ansiolítico do gênero Citrus: revisão integrativa da literatura. *Arquivos de Ciências da Saúde da UNIPAR*, v.20, nº. 1.

13. Song, H., Xu, L., Zhang, R., Cao, Z., Zhang, H., Yang, L., Guo, Z., Qu, Y. & Yu, J. (2016). Rosemary extract improves cognitive deficits in a rats model of repetitive mild traumatic brain injury associated with reduction of astrocytosis and neuronal degeneration in hippocampus. *Neuroscience Letters*, 622, 95–101.

## Seção 2: TOXINOLOGIA - VENENOS, PEÇONHAS E TOXINAS DE ANIMAIS

Figura 1  
aranha: *Phoneutria nigriventer*  
(armadeira)  
Ilustração: Lápis grafite



Figura 2  
Estrutura da toxina de três-dígitos  
Ilustração: Lápis grafite

Figura 3  
Serpente *Micrurus ibiboboca*  
(coral nordestina)  
Ilustração: Caneta nanquim com lápis pastel.



*CAPÍTULO 16*  
**ANIMAIS VENENOSOS E PEÇONHENTOS**

Alexandre Augusto de Assis Dutra

Os animais que podem produzir, armazenar, secretar ou inocular substâncias tóxicas contam com uma defesa eficiente contra predadores e uma vantagem competitiva na predação. Normalmente esses animais são ditos “venenosos”, mas é pertinente esclarecer sobre dois termos utilizados em toxicologia: animais venenosos e peçonhentos. Os animais venenosos possuem em seu organismo substâncias tóxicas à outras espécies. Essas toxinas podem estar presentes em órgãos específicos ou em todo o corpo do animal e são chamadas de veneno. Dentre os animais venenosos uma parcela possui aparatos especializados na inoculação da substância tóxica. Esses são ditos peçonhentos e a substância tóxica é denominada peçonha. Vale dizer então que

todo animal peçonhento é venenoso. Mas nem todo animal venenoso é peçonhento <sup>(1,2)</sup>.

Quanto à composição, venenos e peçonhas podem possuir muitas das mesmas toxinas e efeitos parecidos no organismo. Assim, a diferença é que os venenos são inalados, ingeridos ou absorvidos pela pele; enquanto a peçonha deve ser inoculada no organismo da vítima. De fato, algumas toxinas podem ser componentes de um veneno em um animal e de uma peçonha em outro, como é o caso da tetrodotoxina <sup>(3)</sup>.

A tetrodotoxina (TTX) é um alcalóide bloqueador dos canais para sódio. Esse bloqueio interrompe a transmissão nervosa nos músculos esqueléticos causando paralisia <sup>(4)</sup>. Apesar de ser fatal para a maioria dos animais, algumas espécies encontram nela uma aliada. É o caso do baiacu (Tetraodontidae) (**figura 1a**) e o polvo-dos-anéis-azuis (*Hapalochlaena*) (**figura 1b**) <sup>(3,4)</sup>. O baiacu, ou *fugu*, é consumido no Japão, apesar de sabidamente venenoso <sup>(3)</sup>. É interessante notar que a TTX é estável

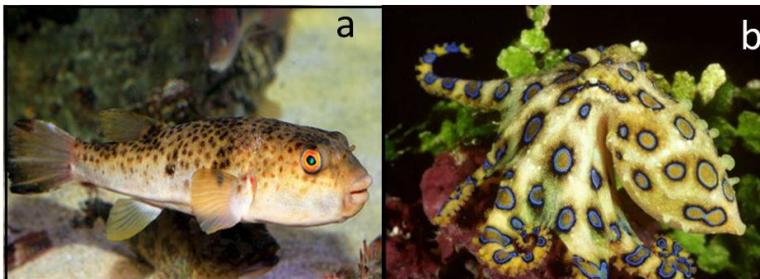
em temperaturas mais altas, por isso cozinhar o peixe não inativa a toxina. Pelo contrário, foi demonstrado que o calor pode aumentar a sua potência <sup>(3)</sup>.

A TTX, um veneno no baiacu, é uma peçonha inoculada na mordida do Polvo-de-anéis-azuis (*Hapalochlaena*) (**figura 1b**). O uso de veneno por polvos já é observado desde 1888<sup>(8)</sup>, mas os polvos do gênero *Hapalochlaena* são os únicos com a TTX na composição da sua peçonha e a já terem causado acidentes fatais em humanos<sup>(3)</sup>. É importante salientar que, assim como acontece com os baiacus, esses polvos não produzem a TTX, mas a obtêm a partir de bactérias endossimbiontes <sup>(4)</sup>.

Obter as suas toxinas de fontes exógenas dispensa o animal dos custos de produção, mas para utilizar esses componentes é importante que o portador seja imune à sua ação no organismo. São necessários meios de transportar e armazenar a toxina de forma segura. As proteínas ligadoras de toxinas (TBP) parecem impedir o acúmulo da TTX no organismo desses animais e são vistas como uma

terapia promissora, já que até o momento não existem antídotos para envenenamentos com a TTX<sup>(4)</sup>. Além disso, os canais para sódio desses animais acumulam mutações que os tornam menos sensíveis à toxina, mas não sem cobrar um preço na eficiência da geração do potencial de ação<sup>(4)</sup>.

Figura 01. Animais venenosos e peçonhentos carregadores de TTX: (a) família Tetraodontidae. Seus membros estão distribuídos da África até o Sudeste Asiático<sup>(3)</sup>. (b) Polvos-dos-anéis-azuis (*Hapalochlaena*). Eles possuem em sua glândula salivar a neurotoxina TTX<sup>(4)</sup>.



Entre os cnidários, as espécies peçonhentas de maior importância médica são as águas-vivas<sup>(7)</sup>. Os acidentes com esse animais, na maioria dos casos,

causam apenas dores locais intensas. Entretanto, no caso de banhistas que tem a infelicidade de se acidentarem com a água-viva australiana *Box Jellyfish* ou *Sea wasp* (Cubozoa)<sup>(3,7)</sup> as conseqüências serão mais graves e até fatais. Em algumas ocasiões os acidentes com esses animais causam a chamada síndrome *Irukandji*, caracterizada por dor aguda, náusea, hipertensão arterial, hemorragia cerebral e morte<sup>(7,8,9)</sup>.

No ambiente terrestre as serpentes são os animais peçonhentos de maior importância médica<sup>(10,11)</sup>. Seu aparato para a inoculação da peçonha é constituído de duas presas conectadas por dutos a glândulas de veneno localizadas na mandíbula superior. A composição da peçonha varia entre as diferentes espécies, mas é composto basicamente por proteínas e peptídeos com ação neurotóxica ou necrosante<sup>(12)</sup>.

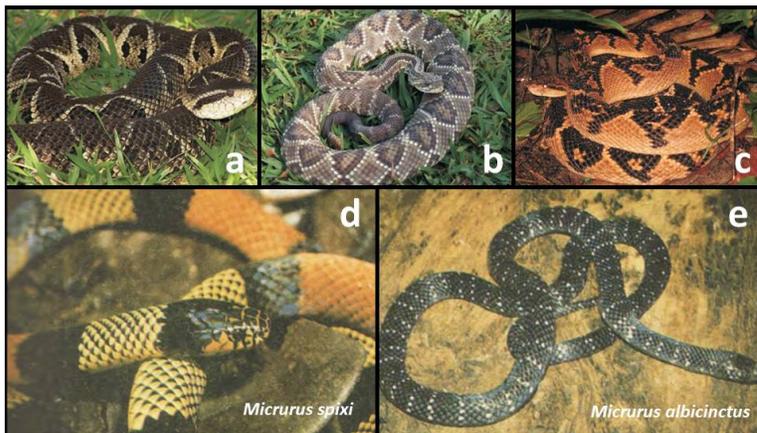
A maioria dos acidentes ofídicos no Brasil são causados por serpentes das famílias Viperidae (*Bothrops*, *Crotalus* e *Laquesis*) e Elapidae<sup>(10,11)</sup>. Os

viperídeos apresentam dentição solenóglifa e fosseta loreal. Destacam-se nessa família as serpentes do gênero *Bothrops*, que englobam as jararacas (**Figura 2a**)<sup>(11)</sup>, do gênero *Crotalus*, onde estão as cascavéis (**figura 2b**), muito embora em 2009, Hose as reclassificou como pertencentes ao gênero *Caudisona*<sup>(13)</sup>. A Surucucu (**figura 2c**), maior espécie de serpente peçonhenta da América do Sul, está classificada no gênero *Lachesis*<sup>(10,11)</sup>.

Na família Elapidae estão as corais-verdadeiras. Elas se distinguem das viperídeos por não possuírem fosseta loreal, pela dentição proteróglifa e por terem uma cabeça arredondada (**figura 2d**)<sup>(11)</sup>. É importante chamar a atenção para um equívoco cometido por leigos no que diz respeito à identificação das corais pelo seu padrão de anéis. É popularmente dito que a coral-verdadeira possui anéis vermelhos que dão a volta completa no corpo e a coral-falsa possui anéis incompletos. Mas na verdade tanto as corais-verdadeiras quanto as falsas podem apresentar anéis completos ao redor do corpo

e algumas corais-verdadeiras apresentam anéis brancos (**figura 2e**) <sup>(10,11)</sup>. A única maneira, obviamente não recomendada para pessoas não treinadas de identificar uma serpente coral é através do exame da dentição. As corais-verdadeiras possuem dentição proteróglifa e as corais falsas, áglifa ou opistóglifa <sup>(10,11)</sup>.

Figura 02. Serpentes da família Viperidae (a) *B. Jararacussu*. Foto por Daniel Loebmann (b) Cascavel (*Caudisona durissa*). Foto por Paulo Bernardes. (c) Surucucu-pico-de-jaca (*Lachesis muta*). É a maior espécie de serpente peçonhenta da América. Serpentes da família Elapidae (d) Embora venenosas, as corais não possuem fosseta loreal e tem a cabeça arredondada. Foto M. Martins. (e) *Micrurus albicinctus*. Nem todas as corais-verdadeiras possuem anéis vermelhos. Foto: Sazima.



No filo Arthropoda aranhas e escorpiões ocupam posição de destaque quando se refere aos animais peçonhentos <sup>(14,15,16)</sup>, mas a utilização de toxinas para defesa ou predação é observada em outras classes. Na classe insecta há representantes peçonhentos ou venenosos que dispõem de uma variedade de compostos tóxicos no auxílio à defesa ou predação. Podemos citar o ácido fórmico encontrado nas formigas e em alguns besouros; o ácido acético que o escorpião-vinagre (*Mastigoproctus giganteus*) asperge quando ameaçado; a melitina, que é uma toxina encontrada na peçonha da abelha *Apis mellifera* <sup>(15,16)</sup>. O coquetel que compõe a maioria dos venenos e

peçonhas de insetos conta com aminas biogênicas responsáveis pelas reações alérgicas e pela dor no local da picada <sup>(16,18)</sup>. Apesar de os acidentes fatais serem raros, eles podem ocorrer nas ocasiões em que a pessoa é picada diversas vezes por abelhas <sup>(15)</sup> ou vespas <sup>(17)</sup>. Em pessoas com hipersensibilidade a essas toxinas, a picada de um único animal pode causar reações mais graves em casos extremos a anafilaxia pode levar à morte <sup>(18)</sup>.

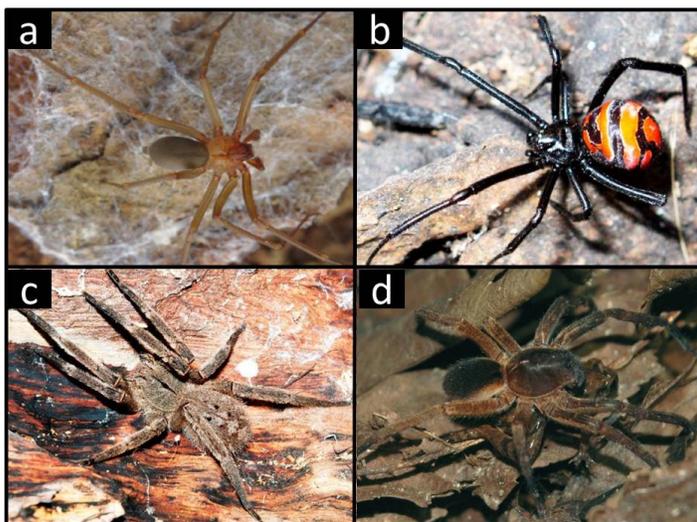
Representantes da classe Arachnida, aranhas e escorpiões possuem em sua peçonha neurotoxinas que respondem pela sua importância médica e veterinária <sup>(19)</sup>. As aranhas responsáveis pelos acidentes de maior gravidade no Brasil pertencem a 3 gêneros <sup>(19)</sup>: *Loxosceles* Heineken & Lowe 1832, *Latrodectus* Walcknaer, 1805 e *Phoneutria* Perty, 1833. No gênero *Loxosceles* estão as aranhas-marrom (**figura 3a**). Apesar de liderarem o número de acidentes <sup>(21)</sup>, essas aranhas não são agressivas e os acidentes muitas vezes ocorrem quando a pessoa a comprime contra o corpo ao se vestir ou calçar. Sua

peçonha tem atividade proteolítica e hemolítica. Nos casos mais graves tem-se o chamado loxoscelismo, que pode evoluir inclusive para a morte. No gênero *Latrodectus* estão as aranhas conhecidas como “viúva-negra” (**figura 3b**). A fêmea, nesse caso, é responsável pelos acidentes. O macho possui presas que não conseguem penetrar a pele humana <sup>(22)</sup>. As fêmeas desse gênero possuem uma coloração preta brilhante, com um abdômen grande onde se vê em vermelho vivo um contorno semelhante à de uma ampulheta <sup>(22)</sup>. A *Phoneutria nigriventer* (**figura 3c**), popularmente conhecida como “aranha-armadeira” ou “aranha-da-bananeira”, é encontrada nas regiões centro-oeste e sudeste do Brasil <sup>(23)</sup> e é tida como a única responsável por acidentes dentro do gênero. É possível, contudo, que outras espécies parecidas com a aranha-armadeira, como a ctenídeas do gênero *Ctenus* (**figura 3d**), sejam responsáveis por acidentes atribuídos à armadeira <sup>(24)</sup>.

Os acidentes com escorpiões raramente tem um desfecho grave. A exceção são os ocorridos com

crianças e idosos. Estes podem evoluir para quadros mais sérios <sup>(20)</sup>. Considerado o responsável pelos quadros de maior gravidade, o escorpião-amarelo *Tityus serrulatus* se adaptou bem ao ambiente urbano. São animais partenogênicos, ou seja, a fêmea se reproduz sem necessidade do macho <sup>(25)</sup>. As toxinas da peçonha de escorpião que atuam em canais para sódio despolarizam terminais nervosos no sistema simpático e parassimpático. Isso resulta na liberação de adrenalina, noradrenalina e acetilcolina, responsáveis pelos sintomas sistêmicos do envenenamento <sup>(26)</sup>.

Figura 03: Aranhas de importância médica no Brasil: (a) *Loxosceles amazonica*. Foto: Pedro H. Martins; (b) *Latrodectus aff. curacaviensis*. Fotos: Pedro H. Martins; (c) *Phoneutria nigriventer* Foto: Pedro H. Martins; (d) *Ctenus medius* foto: Barbo *et al.* (2009).



### Considerações finais

Mais do que permitir o desenvolvimento de terapias mais eficientes em caso de acidentes, o estudo dessas toxinas é um campo vasto para a “prospecção molecular”<sup>(1)</sup>. Peptídeos dessas peçonhas, ou peptídeos sintéticos construídos a partir deles, tem sido utilizados nas mais diversas áreas <sup>(27)</sup>. O exemplo mais ilustre é o anti-hipertensivo Captopril® ou Enalapril®. Desenvolvido entre o final dos anos 1970 e início dos anos 1980, foi sintetizado tendo como base parte da estrutura do Peptídeo

Potenciador de Bradicinina (BPP) isolado a partir da peçonha da jararaca <sup>(1)</sup>.

Normalmente vistos como pragas, os animais venenosos e peçonhentos carregam em suas toxinas ferramentas com aplicações nas mais diversas áreas. São tantas as possibilidades que o estudo dessas moléculas ganhou um nome exclusivo: venômica <sup>(1)</sup>. Obviamente as espécies citadas nesse texto representam apenas uma parcela das espécies venenosas e peçonhentas da fauna brasileira, visto que somos o maior país tropical do mundo com uma variedade de ecossistemas que se reflete na diversidade da nossa fauna.

### **Referências**

1. Russell, F. E. (1965). Marine Toxins and Venomous and Poisonous Marine Animals. *Advances in Marine Biology*, 255–384.
2. Julien Slagboom *et al* (2017) *British Journal of Haematology*, 177, 947–959

3. Kirsten B. Hornbeak & Paul S. Auerbach (2017) Marine Envenomation. *Emerg Med Clin N Am*. In Press.
4. Whitelaw BL *et al* (2018) *Aquatic Toxicology*,
5. Knittel, P. S. *et al.*, (2016). *Toxicon*, 119, 1-7.
6. Djoudi BM *et al.* (2017) When to diagnose Irukandji syndrome? *Toxicon* 137
7. Law, Y.H. (2018) Stopping the sting. *Science* 362 (6415), 631-635.
8. Ghiretti, F. (1960) Toxicity of octopus saliva against crustacea. *Ann NY Acad Sci* **90**, 726-741.
9. Piontek, M. *et al.* (2020) *Toxicon* (6)june2020.
10. Maria Cristina dos Santos *et al.* (1995) *Serpentes de Interesse Médico da Amazônia: Biologia, Venenos e Tratamento de Acidentes / Manaus: UA/SESU*.
11. Bernarde, P.S. *Gazeta Médica da BA* 2011;81:1(Jan-Jun):55-63.

12. Tasoulis, T & Isbister, G.K., (2017) A Review and Database of Snake Venom Proteomes, Toxins (Basel) Sep 18;9(9):290
13. Hoser R. A (2009) Australasian Journal of Herpetology 6: 1-21.
14. Justin O. Schmidt (2019) Arthropod Toxins and Venoms. Medical and Veterinary Entomology, cap3.
15. Wehbe, R. *et al.* (2019 *Molecules*, 24, 2997;
16. Schmidt, J. O. (2018) Clinical consequences of toxic envenomations by Hymenoptera. *Toxicon*, 150, 96-104.
17. Liu, Z., X-D, L., et al. (2016). *Envrtrl Health and Prvt Mdc.*
18. Schmidt, J. O. (2015). Allergy to venomous insects. In J. M. Graham (Ed.) *The hive and the honey bee.* Hamilton, Illinois: Dadant & Sons.

19. Oliveira, U., Brescovit, A.D. & Santos, A.J. (2017) Biodivers Conserv
20. Abroug F *et al* (2020) Scorpion envenomation: state of the art, Intensive Care Med. 2020 Mar;46(3).
21. Almeida, M.Q *et al.* (2017) *Acta amazonica* VOL. 47(2): 163 – 166.
22. Levi, H.W. (1959) Transactions of the American Microscopical Society – JSTOR.
23. Nunes, K.P *et al.* (2008) *Toxicon* (51), Issue 7, 1 June
24. Barbo, F.E. *et al.* (2009) Herpetology Notes, volume 2: 99-100.
25. Cajado-Carvalho *et al.* (2016) *Toxins*, 8(12), 348.
26. Rocha-Resende *et al.* (2018) *Peptides* Vol 98, December.
27. Laustsen, A.H. *et al.* (2018) Pros and cons of different therapeutic antibody formats for recombinant antivenom development, *Toxicon*.

## *CAPÍTULO 17*

### **SERPENTES DE IMPORTÂNCIA MÉDICA NO BRASIL**

Gentil Alves Pereira Filho;  
Washington Luiz Silva Vieira;  
Frederico Gustavo Rodrigues França

#### **Introdução**

As serpentes constituem um grupo de vertebrados com extremo sucesso evolutivo, habitando quase todos os continentes, com exceção da Antártida (1). Apresentam dieta ampla podendo consumir desde grandes mamíferos até pequenos invertebrados, e estão presentes nos mais variados habitats, utilizando desde o solo, árvores, rios, lagos e oceanos (2). Constituem o segundo maior grupo em termos de diversidade dentro dos répteis, com mais de 3.700 espécies conhecidas em todo mundo e que variam bastante em tamanho, coloração e morfologia (3).

O plano corpóreo de uma serpente chama atenção principalmente pela ausência de membros locomotores, os quais foram perdidos durante sua evolução (2). Dessa forma, para manipular e subjugar as presas, as serpentes utilizam apenas o corpo e a cabeça, sendo que alguns grupos de serpentes desenvolveram o veneno para matar e digerir as presas, assim como se defender de predadores de forma muito eficaz (1). É exatamente neste último aspecto (defesa contra predadores) que os acidentes ofídicos acontecem. No Brasil, os principais sistemas notificadores de acidentes ofídicos são o Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN), o Sistema Nacional de Informações Tóxico-Farmacológicas (SINITOX), o Sistema de Informações de Mortalidade (SIM) e o Sistema de Informações Hospitalares do Sistema Único de Saúde (SIH-SUS). Ainda assim, mesmo com quatro sistemas de informação, muitos acidentes ofídicos acabam não sendo informados, gerando uma lacuna nos aspectos relevantes destes acidentes.

Nas Américas, as famílias Viperidae e Elapidae são as principais responsáveis pelos acidentes ofídicos, respondendo pela quase totalidade dos casos, entretanto, algumas espécies da família Dipsadidae também são consideradas causadoras de acidentes em grau moderado ou até mesmo grave (4). Na família Viperidae, quatro gêneros se destacam por causarem acidentes graves no Brasil, são eles: *Bothrocophias*, *Bothrops*, *Crotalus* e *Lachesis*, são conhecidas popularmente como Surucucus (*Lachesis*) (Figura A), Jararacas (*Bothrocophias* e *Bothrops*) (figura B) e Cascavéis (*Crotalus*) (Figura C). Estas serpentes possuem dentição especializada para a injeção de veneno (dentição solenóglifa). No Brasil existem 29 espécies de Jararacas, uma espécie de Cascavel, com algumas subespécies reconhecidas, e uma espécie de Surucucu (5). As Jararacas apresentam distribuição ampla em todo território nacional, podendo estar presentes em florestas como a Amazônica e a Atlântica, em áreas abertas como a Caatinga e o Cerrado, com algumas espécies se

adaptando muito bem a ambientes antropizados como plantações e até mesmo centros urbanos (4, 6). As Cascavéis estão distribuídas majoritariamente em áreas secas do Brasil, como a Caatinga e o Cerrado, entretanto, também são encontradas em ambientes florestais como em áreas da Amazônia e da Floresta Atlântica (7). As Surucucus se distribuem na Amazônia e em boa parte da Floresta Atlântica, com alguns registros em florestas no interior do Brasil (4, 7).

A família Elapidae apresenta cerca de 33 espécies de Cobras Corais Verdadeiras, que representam os gêneros *Leptomicrurus* (3 espécies) e *Micrurus* (30 espécies) (Figura D). Estas serpentes também possuem dentição especializada para inocular o veneno (dentição proteróglifa). As Corais Verdadeiras se distribuem por todo o território brasileiro e são encontradas na Amazônia, Floresta Atlântica, Caatinga, Cerrado e Pantanal. Várias espécies também se adaptam muito bem a áreas

antropizadas, sendo encontradas até mesmo em áreas de grandes cidades (8).

Algumas espécies da família Dipsadidae, também são consideradas de interesse médico. Essas serpentes podem ou não ter dentes especializados na injeção do veneno (dentições opistóglifa e áglifa). Esta família é a mais diversa no Brasil, possuindo mais de 230 espécies, entretanto, apenas alguns gêneros apresentam importância médica, dentre estes, os gêneros *Philodryas* (Figura E) e *Boiruna* se destacam.

### **Espécies de importância médica no Brasil**

Abaixo, apresentamos tabelas referentes as espécies de serpentes de importância médica encontradas no Brasil (Tabelas 1, 2 e 3). A lista de serpentes da família Dipsadidae está representada por gêneros e indicamos algumas espécies com casos registrados na literatura. Também são apresentados de forma geral a sintomatologia dos acidentes causados por estas espécies em particular.

Tabela 1. Espécies da família Viperidae e seus biomas de ocorrência no território brasileiro. Abreviações são: AM - Amazônia, CA - Caatinga, CE - Cerrado, MA - Mata Atlântica, MA-i - Mata Atlântica em ilhas, PA - Pampas/Floresta de Araucária, PT - Pantanal.

<b>Viperidae</b>	<b>Biomas</b>
<i>Bothrocophias hyoprora</i> (Amaral, 1935)	AM
<i>Bothrocophias microphthalmus</i> (Cope, 1876)	AM
<i>Bothrops Alcatraz</i> Marques, Martins & Sazima, 2002	MA-i
<i>Bothrops alternatus</i> Duméril, Bibron & Duméril, 1854	CE, MA, PA
<i>Bothrops atrox</i> (Linnaeus, 1758)	AM
<i>Bothrops bilineatus</i> (Wied, 1821)	AM, MA
<i>Bothrops brazili</i> Hoge, 1954	AM
<i>Bothrops cotiara</i> (Gomes, 1913)	MA
<i>Bothrops diporus</i> Cope, 1862	MA, PA
<i>Bothrops erythromelas</i> Amaral, 1923	CA
<i>Bothrops fonsecai</i> Hoge & Belluomini, 1959	MA
<i>Bothrops insularis</i> (Amaral, 1922)	MA-i
<i>Bothrops itapetiningae</i> (Boulenger, 1907)	CE
<i>Bothrops jararaca</i> (Wied, 1824)	MA, PA
<i>Bothrops jararacussu</i> Lacerda, 1884	MA
<i>Bothrops leucurus</i> Wagler in Spix, 1824	MA
<i>Bothrops lutzi</i> (Miranda-Ribeiro, 1915)	CA, CE
<i>Bothrops marajoensis</i> Hoge, 1966	AM
<i>Bothrops marmoratus</i> Silva & Rodrigues, 2008	CE
<i>Bothrops mattogrossensis</i> Amaral, 1925	AM, CE, PT
<i>Bothrops moojeni</i> Hoge, 1966	CE
<i>Bothrops muriciensis</i> Ferrarezzi & Freire, 2001	MA
<i>Bothrops neuwiedi</i> Wagler in Spix, 1824	CE, PA
<i>Bothrops otavioi</i> Grazziotin, Sazima, Martins & Sawaya, 2012	MA-i
<i>Bothrops pauloensis</i> Amaral, 1925	CE
<i>Bothrops pirajai</i> Amaral, 1923	MA
<i>Bothrops pubescens</i> (Cope, 1870)	MA, PA
<i>Bothrops sazimai</i> Barbo, Gasparini, Almeida, Zaher, Grazziotin, Gusmão, Ferrarini e Sawaya, 2016	MA-i
<i>Bothrops taeniatus</i> Wagler in Spix, 1824	AM
<i>Crotalus durissus</i> Linnaeus, 1758	AM, CA, CE,

---

<i>Lachesis muta</i> (Linnaeus, 1766)	MA, PA, PT AM, MA
---------------------------------------	----------------------

---

Fonte: Autoral

Tabela 2. Espécies da família Elapidae e seus biomas de ocorrência no território brasileiro. Abreviações são: AM - Amazônia, CA - Caatinga, CE - Cerrado, MA - Mata Atlântica, PA - Pampas/Floresta de Araucária, PT - Pantanal.

---

<b>Elapidae</b>	<b>Biomas</b>
<i>Leptomicrurus collaris</i> (Schlegel, 1837)	AM
<i>Leptomicrurus narducci</i> (Jan, 1863)	AM
<i>Leptomicrusus scutiventris</i> (Cope, 1870)	AM
<i>Micrurus albicinctus</i> Amaral, 1926	AM
<i>Micrurus altirostris</i> (Cope, 1859)	MA, PA, PT
<i>Micrurus annelatus</i> (Peters, 1871)	AM
<i>Micrurus averyi</i> Schmidt, 1939	AM
<i>Micrurus boicora</i> Bernarde, Turci, Abegg & Franco, 2018	AM
<i>Micrurus brasiliensis</i> Roze, 1967	CE
<i>Micrurus corallinus</i> (Merrem, 1820)	MA
<i>Micrurus decoratus</i> (Jan, 1858)	MA
<i>Micrurus diana</i> Roze, 1983	CE
<i>Micrurus diutius</i> Burger, 1955	AM
<i>Micrurus filiformis</i> (Günther, 1859)	AM
<i>Micrurus frontalis</i> (Duméril, Bibron & Duméril, 1854)	CE, MA
<i>Micrurus hemprichii</i> (Jan, 1858)	AM
<i>Micrurus ibiboboca</i> (Merrem, 1820)	CA, MA
<i>Micrurus isozonus</i> (Cope, 1860)	AM
<i>Micrurus langsdorffi</i> Wagler in Spix, 1824	AM
<i>Micrurus lemniscatus</i> (Linnaeus, 1758)	AM, CA, CE, MA
<i>Micrurus mipartitus</i> (Duméril, Bibron & Duméril, 1854)	AM
<i>Micrurus nattereri</i> Nettereri Schmidt, 1952	AM
<i>Micrurus pacaraimae</i> Carvalho, 2002	AM
<i>Micrurus paraensis</i> Cunha & Nascimento, 1973	AM
<i>Micrurus potyguara</i> Pires, Silva, Feitosa, Prudente, Pereira Filho & Zaher, 2014	MA
<i>Micrurus psyches</i> (Daudin, 1803)	AM
<i>Micrurus putumayensis</i> Lancini, 1962	AM
<i>Micrurus pyrrhocryptus</i> (Cope, 1862)	AM

---

<i>Micrurus remotus</i> Roze, 1987	AM
<i>Micrurus silviae</i> Di-Bernardo, Borges-Martins & Silva, 2007	PA
<i>Micrurus spixii</i> Wagler in Spixii, 1824	AM
<i>Micrurus surinamensis</i> (Cuvier, 1817)	AM, CE
<i>Micrurus tikuna</i> Feitosa, Silva Jr., Pires, Zaher & Prudente, 2015	AM
<i>Micrurus tricolor</i> Hoge, 1956	CE, PA

Fonte: Autoral

Tabela 3. Espécies da família Dipsadidae com as espécies de interesse médico.

Gêneros com espécies que podem provocar sintomas de envenenamento	Espécies com casos confirmados de envenenamento. O asterisco (*) indica morte de pessoas	Principais sintomas apresentados pelo acidentado	Referências
<i>Apostolepis</i> sp	Espécie não identificada	Dor local e hemorragia local	(4, 9)
<i>Boiruna</i> sp	* <i>Boiruna maculata</i>	Dor local, edema e equimose	(4, 10)
<i>Clelia</i> sp	<i>Clelia plumbea</i>	Dor local, edema e equimose	(4, 10)
<i>Erythrolamprus</i> sp	<i>Erythrolamprus miliaris</i> , <i>E. poecilogyrus</i> , <i>P. viridissima</i>	Dor local, edema, eritema, hemorragia local, lipotimia e prurido	(4, 9-12)
<i>Helicops</i> sp	<i>Helicops modestus</i> , <i>H. angulatus</i>	Dor local, edema, eritema, hemorragia local, lipotimia e prurido	(4, 9, 10, 12)
<i>Hydrodynastes</i> sp	<i>Hydrodynastes gigas</i>	Dor local, edema, paralisia muscular	(9)

<i>Leptodeira</i> sp	<i>Leptodeira annulata</i>	Atividade proteolítica e hemorrágica	(9)
<i>Mussurana</i> sp	Espécie não identificada	Não há registros. Os sintomas provavelmente se assemelham aos das picadas de <i>Boiruna</i> sp e <i>Clelia</i> sp	(4, 10)
<i>Oxyrhopus</i> sp	Espécie não identificada	Efeitos locais leves a moderados no local da picada	(9, 11)
<i>Phalotris</i> sp	<i>Phalotris lemniscatus</i>	Dor local forte, edema, gengivorragia, hematúria, anúria e insuficiência renal aguda	(4, 9, 10, 13)
<i>Philodryas</i> sp	* <i>Philodryas olfersii</i> , <i>P. patagoniensis</i>	Dor local, edema, eritema, ardor, dormência, equimose, gengivorragia, lipotimia e hemorragia local	(4, 9-11, 14, 15)
<i>Pseudoboa</i> sp	<i>Pseudoboa neuwiedii</i>	Não há registros de acidentes. O veneno possui atividade proteolítica e hemorrágica	(16)
<i>Sibynomorphus</i> sp	<i>Sibynomorphus mikanii</i>	Alteração no tempo de coagulação (coagulopatia leve)	(9-11)

<i>Thamnodynastes</i> sp	<i>Thamnodynastes</i> <i>pallidus</i> , <i>T.</i> <i>strigatus</i>	Dor local, Atividade hemorrágica	(9, 17)
<i>Tomodon</i> sp	<i>Tomodon</i> <i>dorsatus</i>	Dor e atividade hemorrágica local	(9)



1- Surucucu (*Lachesis muta*)



2- Jararaca da seca (*Bothrops erythromelas*)



3- Cascavel (*Crotalus durissus*)



4- Coral Verdadeira (*Micrurus potyguara*)



5- Cobra Verde (*Philodryas olfersii*)



6- Mussurana (*Boiruna sertaneja*)

Fonte: Autoral

## Sintomatologia de acidentes ofídicos causados por serpentes da família viperidae e elapidae

- Acidente elapídico (0,9% dos casos)

Causados por serpentes conhecidas pelos nomes vernaculares de Coral, Cobra-Coral, Cobra-Coral-Verdadeira, Coral-Verdadeira (gêneros *Micrurus* e *Leptomicrurus*). A principal atividade do veneno dessas serpentes é neurotóxica (8, 10, 18). Os principais sintomas do acidentado são: dor local, parestesia, diplopia, ptose palpebral, dispneia, abundância de salivação (sialorreia), dificuldade de deglutição e mastigação (8, 10, 18). Nos acidentes mais graves podem evoluir para insuficiência respiratória e levar a vítima a óbito (8, 10, 18).

Todos os acidentes elapídicos são considerados como potencialmente graves pelo risco de insuficiência respiratória. O tratamento adequado da vítima deve ser feito usando aplicação do soro antielapídico (10 ampolas) (10, 19).

- Acidente botrópico (86,2% dos casos)

Causados por serpentes do gênero *Bothrops* e *Bothrocophias*. Conhecidas pelos nomes vernaculares

de Jararacas, Jaracuçu, Urutu-Cruzeiro, Cotiara, Caiçara, Caiçaca, entre outros. A principal atividade do veneno dessas serpentes é proteolítica, coagulante e hemorrágica (10, 18). Os principais sintomas do acidentado são: dor aguda, sangramento no local da picada, inchaço (edema) no local da picada que pode evoluir para todo o membro, hemorragias do tipo hematúria, gengivorragia, equimose, abscesso, formação de bolhas e necrose (10, 18). Nos acidentes mais graves são observados hipotensão e choque periférico em virtude à liberação de mediadores vasoativos e aumento no tempo de coagulação sanguínea (10). Infecção secundária, provocada por bactérias encontradas na flora bucal da serpente, pode ocorrer no local da picada (10). O falecimento da vítima ocorre devido à insuficiência renal aguda.

O acidente botrópico é caracterizado conforme ao tipo de gravidade provocada na vítima. Acidente do tipo leve: quadro local discreto, sangramento discreto em pele ou mucosas (pode haver apenas distúrbio na coagulação); tipo moderado: edema e equimose

evidentes, sangramento sem comprometimento do estado geral (pode haver distúrbio na coagulação) e do tipo grave: alterações locais intensas, hemorragia grave, hipotensão/choque, insuficiência renal, anúria, podendo haver distúrbio na coagulação (10, 19).

O tratamento adequado da vítima deve ser feito dependendo da gravidade do acidente usando aplicação do soro antiofídico (2-4 ampolas em casos de acidentes de gravidade leve) ou antiofídico-laquélico (5-8 ampolas em casos moderados) ou antiofídico-crotálico (12 ampolas em casos graves) (10, 19).

- Acidente Crotálico (9,2% dos casos)

Causados pela Cascavel (*Crotalus durissus*), serpente comum em formações vegetais abertas sul-americanas. A principal atividade do veneno dessa serpente é neurotóxica, miotóxica e coagulante (10, 18). Os principais sintomas do acidentado são: dor e edema discreto ou ausente no local da picada, ptose palpebral, diplopia, parestesia, visão turva, urina

avermelhada ou de coloração marrom (10, 18). Os acidentes mais graves são observados insuficiência respiratória aguda e aumento no tempo de coagulação sanguínea (10, 18). O falecimento da vítima ocorre por insuficiência renal aguda ou respiratória.

O acidente crotálico é caracterizado como: acidente do tipo leve: alterações neuromusculares discretas; sem mialgia, escurecimento da urina ou oligúria; tipo moderado: alterações neuromusculares evidentes, mialgia e mioglobínúria (urina escura) discretas e do tipo grave: alterações neuromusculares evidentes, mialgia e mioglobínúria intensas, oligúria (10, 19).

O tratamento adequado da vítima deve ser feito dependendo da gravidade do acidente usando aplicação do soro anticrotálico (5 ampolas em casos de acidentes de gravidade leve) ou antitrombótico-crotálico (10 em casos moderados e 20 ampolas em casos graves) (10, 19).

- Acidente Laquétrico (3,7% dos casos)

Causados pela Surucucu, Surucucu-Pico-de-Jaca (*Lachesis muta*). A principal atividade do veneno dessa serpente é neurotóxica, proteolítica, coagulante e hemorrágica (10, 18). Os principais sintomas do acidentado são: dor aguda, inchaço (edema) e equimose no local da picada que podem evoluir para todo o membro, abscesso, hematúria, formação de bolhas, hemorragias do tipo hematúria e gengivorragia, bradicardia, hipotensão arterial, náuseas, vômitos, cólicas abdominais, diarreia e sudorese (10, 18). O falecimento da vítima ocorre por insuficiência renal aguda. Devido à semelhança dos sintomas do acidente laquético com o botrópico, isto torna difícil diferencia-los, caso a serpente que provocou o acidente não tenha sido capturada e levada ao hospital (10). Entretanto, o quadro neurotóxico, observado no acidente laquético, quando diagnosticado precocemente, contribui para o tratamento específico e adequado (10).

O acidente laquético é caracterizado como: acidente do tipo moderado: quadro local presente;

pode haver sangramentos, sem manifestações vagas; tipo grave: quadro local intenso, hemorragia intensa, com manifestações vagas.

O tratamento adequado da vítima deve ser feito dependendo da gravidade do acidente usando aplicação do soro antibotrópico-laquéutico (10 ampolas em casos de acidentes de gravidade moderada e 20 em casos graves) (10, 19).

### **Prevenção de acidentes ofídicos e primeiros socorros**

De forma geral, medidas simples previnem muito bem acidentes ofídicos. Uma das medidas mais eficazes é a utilização de botas de cano alto. Estas botas protegem exatamente a região entre os pés e o joelho, local onde ocorre cerca de 70% das picadas. Perneiras a base de couro também são muito eficazes e protegem a mesma região mais afetada pelos acidentes. O uso de luvas de couro também pode prevenir acidentes na região das mãos e dos antebraços. Um dos cuidados mais recomendados é

nunca manipular serpentes sem o conhecimento prévio e sem autorização dos órgãos ambientais competentes. Ao encontrar estes animais, o procedimento sempre deve ser cauteloso, principalmente quando não se sabe se é ou não uma serpente peçonhenta. Para a relocação de animais que estejam em áreas urbanas ou até mesmo dentro de residências, deve-se chamar a Polícia Ambiental ou o Corpo de Bombeiros, os quais possuem equipamento e treinamento para a contenção de serpentes. Em nenhuma hipótese pessoas sem treinamento devem manipular ou tentar capturar serpentes.

Em caso de acidentes, a principal medida que deve ser tomada é acalmar a vítima e lavar o local da picada com água e sabão. Após isso, o acidentado deve ser levado o mais rápido possível para o ambiente hospitalar. Alguns mitos como ingestão de bebidas alcoólicas, fumo, chá de ervas, entre outros, são difundidos em várias regiões do Brasil (10), entretanto não possuem eficácia comprovada

cientificamente e podem causar problemas de saúde adicionais à vítima.

Outras práticas como a sucção do veneno e o uso de torniquetes também não devem ser feitas. Os torniquetes, principalmente em acidentes causados por Jararacas pode maximizar o acidente, uma vez que a ação do veneno das serpentes do gênero *Bothrops* e *Bothrocophias* se dá principalmente no local próximo da picada, dessa forma, o torniquete impede que o veneno se espalhe por outras partes do corpo, ficando concentrado na região próxima da picada. Muitas vezes os torniquetes podem aumentar a chance de amputação de membros, uma vez que impede a oxigenação dos tecidos, maximizando assim o efeito proteolítico do veneno.

### **Considerações finais**

O encontro com serpentes está ficando cada vez mais comum, uma vez que, devido ao crescimento desordenado das cidades e centros urbanos, mais áreas naturais vão sendo devastadas para dar lugar a

tais centros e cidade. Nesta imparável supressão de áreas naturais, a fauna residente sofre impacto direto, ficando desabrigada e sem sítios para alimentação, reprodução, além da perda direta de território (7). No caso das serpentes, estas contam com um problema a mais. A vilanização resultante de anos de desinformação e preconceito, os quais geram uma matança indiscriminada destes animais, mesmo se tratando de espécies inofensivas.

As serpentes desempenham papel fundamental na natureza, pois servem de presa para vários animais como aves e mamíferos, assim como também atuam como predadores, controlando a população de roedores e outros grupos animais. Além das funções ecológicas, as serpentes possuem um alto potencial bioprospectivo devido as potencialidades de seus venenos, sendo o potencial para a fabricação de fármacos ainda desconhecido e pouco explorado. Dessa forma, conservar as serpentes e seus habitats naturais são medidas importantes tanto para evitar acidentes ofídicos (mantendo as áreas naturais destes

animais), tanto para manter o equilíbrio ecológico dos ecossistemas.

### **Referências**

1. Marques O, Medeiros C. Nossas incríveis serpentes: caracterização, biologia, acidentes e conservação. 1. ed. Cotia: Ponto A; 2018.
2. Greene HW. Snakes: the evolution of mystery in nature: Univ of California Press; 1997.
3. Vitt LJ, Caldwell JP. Herpetology: an introductory biology of amphibians and reptiles: Academic press; 2013.
4. Campbell JA, Lamar WW, Brodie ED. The venomous reptiles of the Western Hemisphere: Comstock Pub. Associates Ithaca [NY]; 2004.
5. Costa HC, Bérnils RSJHB. Répteis brasileiros: Lista de espécies 2015. Herpetologia Brasileira. 2015;4(3):75-93.
6. Marques O, Eterovic A, Sazima I. Serpentes da Mata Atlântica: guia ilustrado para as florestas costeiras do Brasil. 1. ed. Cotia: Ponto A; 2019.

7. Pereira Filho G, Vieira WL, Montingelli GG, Rodrigues JB, Alves RRN, França FGR. Diversidade. In: Pereira Filho G, Alves R, Vieira W, França FJJP, editores. Serpentes da Paraíba: diversidade e conservação. João Pessoa; 2017. P. 55-269.
  
8. Bucarechi F, Capitani E, Hyslop S. Aspectos clínicos do envenenamento causado por cobras-corais no Brasil. In: Silva NJ Jr, editor. As cobras-corais do Brasil: biologia, taxonomia, venenos e envenenamentos. Goiânia: Editora da Pontifícia Universidade Católica de Goiás (PUC-Goiás); 2016. P. 346-79.
  
9. Weinstein SA, Warrell DA, White J, Keyler DE. Venomous Bites from Non-Venomous Snakes: A Critical Analysis of Risk and Management of Colubrid Snake Bites: Elsevier; 2011.
  
10. Bernarde PS. Serpentes peçonhentas e acidentes ofídicos no Brasil. São Paulo: Anolisbooks; 2014.
  
11. Silveira PVP, Nishioka SA. Non-venomous snake bite and snake bite without envenoming in a brazilian teaching hospital: analysis of 91 cases. Revista do

Instituto de Medicina Tropical de São Paulo.  
1992;34(6):499-503.

12. Albolea A, Salomão M, Jordao R, Almeida-Santos SJT. Why non-poisonous snakes cause accidents. *Toxicon*. 2000;38:567-8.
13. Lema T. Cobras não venenosas que matam. *Natureza em Revista*. 1978;4:38-46.
14. Correia JM, Santana Neto PL, Pinho MS, Silva Jd, Amorim MLP, Escobar JAC. Poisoning due to *Philodryas olfersii* (Lichtenstein, 1823) attended at Restauração Hospital in Recife, State of Pernambuco, Brazil: case report. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 2010;43(3):336-8.
15. Medeiros CR, Hess PL, Nicoleti AF, Sueiro LR, Duarte MR, de Almeida-Santos SM, et al. Bites by the colubrid snake *Philodryas patagoniensis*: A clinical and epidemiological study of 297 cases. *Toxicon*. 2010;56(6):1018-24.
16. Torres-Bonilla KA, Andrade-Silva D, Serrano SM, Hyslop SJC, Toxicology PPC, Pharmacology. Biochemical characterization of venom from *Pseudoboa neuwiedii* (Neuwied's false boa; Xenodontinae; Pseudoboini). Comparative

Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology. 2018;213:27-38.

17. Araújo P, Medeiros da Silva W, França R, França FG. A case of envenomation by neotropical Opisthoglyphous snake *Thamnodynastes pallidus* (Linnaeus, 1758) (Colubridae: Dipsadinae: Tachymenini) in Brazil. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*. 2018;60.
  
18. Norris R. Venom poisoning by North American reptiles. *The Venomous Reptiles of the Western Hemisphere*. 2004;2:683-708.
  
19. Ministério da Saúde. *Guia de Vigilância em Saúde*. Brasília; 2019. P. 740.

## *CAPÍTULO 18*

### **VENENOS E TOXINAS DE ARTRÓPODES**

Alessandra Matavel;

Barbara Bruna Ribeiro Oliveira-Mendes;

Ana Luiza Bittencourt Paiva

Artropoda é o maior filo do reino Animalia, consistindo em 116 ordens e quase 270 mil espécies conhecidas. No entanto, poucas ordens são peçonhentas, dentre elas a ordem Araneae (aranhas), Scorpiones (escorpiões), Lepdoptera (lagartas) e Hymenoptera (abelhas e vespas).

Durante sua longa história adaptativa de milhões de anos, os venenos de artrópodes tem sofrido um fino ajuste que resultou em um complexo coquetel de compostos bioativos com diversificada gama de ações farmacológicas, incluindo enzimas, polipeptídeos, aminas, íons, dentre outras moléculas usadas para predação, defesa contra predadores ou microrganismos patógenos <sup>(1)</sup>.

Este capítulo foca no potencial biotecnológico dos peptídeos presentes nos venenos destes animais e apresenta a análise das patentes das ordens supracitadas. Foram pesquisadas patentes depositadas até dezembro de 2019 no Espacenet (<https://worldwide.espacenet.com>), e encontradas 448 patentes.

## **Araneae**

Os principais componentes bioativos dos venenos de aranhas são peptídeos entre 2 e 8 KDa. A maioria desses peptídeos é rico em pontes dissulfeto, apresentando uma conformação do tipo ICK (*Inhibitor Cystine Knot*), o que lhes confere grande estabilidade química, térmica, e resistência a proteases<sup>(1)</sup>. De forma geral, essas moléculas têm como alvo molecular canais iônicos e receptores no sistema nervoso de suas presas e/ou predadores. Uma vez que a atividade desses canais iônicos e receptores está relacionada a diversos processos fisiopatológicos, os venenos de

aranha têm sido prospectados como alvos terapêuticos em humanos <sup>(1)</sup>.

Foram registrados 140 patentes relacionadas a toxinas de aranhas. Muitas patentes estão relacionadas com a atividade neuroprotetora, antitumoral, antimicrobiana, analgésica, dentre outros. A atividade analgésica de toxinas de aranhas resulta principalmente da ação em diversos canais envolvidos em vias nociceptivas, como, por exemplo, os canais para sódio, cálcio, canais do tipo ASIC e TRP. Algumas toxinas têm sido descritas como potentes inibidores da principal isoforma de canal para sódio envolvido em vias de nocicepção, o  $Na_v1.7$  <sup>(2,3)</sup>. Uma importante patente de toxina analgésica é a patente brasileira BR2006PI05484 relacionada à toxina  $Ph\alpha1\beta$  (PnTx3-6) da aranha *Phoneutria nigriventer*, que atua em canais para cálcio e que se mostrou mais eficaz que drogas como morfina e ziconotida, e com menos efeitos colaterais <sup>(4)</sup>.

Alguns peptídeos encontrados em várias espécies de aranha apresentam estrutura linear

anfipática em alfa-hélice, o que lhes confere atividade citolítica e possível ação antimicrobiana e antitumoral. Como exemplo, o peptídeo LyeTx1, isolado do veneno da aranha *Lycosa eritrognatha*, demonstra atividade antibacteriana e antifúngica <sup>(5)</sup>. Dentre os peptídeos com atividade antitumoral, podemos citar Licosyn-I, isolado do veneno da aranha *Lycosa singorensis*, que apresenta uma forte capacidade de inibir o crescimento de células tumorais *in vitro* e *in vivo* <sup>(6)</sup>.

Cerca de 25% das patentes estão relacionadas a atividade inseticida, sendo consideradas promissores modelos para o desenvolvimento de novos bioinseticidas. A toxina GS- $\omega$ / $\kappa$ -HXTX-Hv1a derivada de veneno de aranha *Hadronyche versuta* foi registrada em 2014 como um bioinseticida na *US Environmental Protection Agency* com o nome comercial Spear T<sup>®</sup>, e atua em canais para cálcio de insetos <sup>(7)</sup>.

Além dos peptídeos, as acilpoliaminas (<1 KDa), componentes orgânicos não peptídicos, também

representam uma importante classe de moléculas nos venenos de aranhas. Elas são antagonistas de canais iônicos dependentes de ligantes, e atuam principalmente no bloqueio de receptores pós-sinápticos de glutamato no sistema nervoso de vertebrados e invertebrados <sup>(8)</sup>. Algumas dessas moléculas já foram patenteadas para tratamento de doenças neurodegenerativas e também como inseticida (CN107056657A). O potencial biotecnológico das toxinas de aranhas vem se expandindo para diversas outras aplicações, como para o tratamento de disfunção erétil (Cap. 25) e atividade neuroprotetora (Cap. 26).

## **Scorpiones**

Embora haja mais de 2000 espécies descritas no mundo, os escorpiões de importância médica pertencentes à família *Buthidae*. As peçonhas escorpiônicas são misturas complexas, nas quais as neurotoxinas ativas em canais iônicos são os principais componentes tóxicos <sup>(9)</sup>.

As potenciais aplicações terapêuticas de compostos de peçonhas escorpiônicas incluem antitumoral, analgésica, antimicrobiana, antiviral, antiparasitária, imunossupressora, e aplicação como potencializador de bradicinina<sup>(9)</sup>. A toxina bloqueadora de canais de cloreto, clorotoxina, do escorpião israelense *Leiurus quinquestriatus*, tem ação antitumoral, inibindo a migração e invasão das células gliais<sup>(10)</sup>.

A análise das patentes encontrou 156 patentes envolvendo compostos escorpiônicos. A maioria das patentes, 53%, está relacionada à medicina tradicional chinesa que utilizam a peçonha ou até mesmo o animal inteiro em conjunto com outros compostos ativos para a produção de caldos ou emplastos terapêuticos para diferentes finalidades. No entanto, elas são pouco objetivas quanto à espécie do escorpião ou veneno utilizado.

As outras patentes (47%) foram usadas para prospecção de novas drogas, e apontam aplicações terapêuticas mais diretas das peçonhas, peptídeos

isolados ou análogos. Alguns exemplos são a utilização de peptídeos como agente imunossupressor (WO9829446A1), tratamentos para doenças autoimunes (AU2005259533A1), arritmias cardíacas (CN1179975C), toxinas ativas em canais iônicos para tratamento de dor, inflamação ou hipersensibilidade (CN1382443A, CN104427987A, WO0168681A2), antitumoral (CN100564517C), com ação analgésica (CN101041692A) e antimicrobianas (JP2001186887A, MX2011007177A, CN100537748), com atividade cosmética (EP3505532A1), para o carregamento de moléculas (EP2721060A2), imunógenos recombinantes para produção alternativa de antivenenos (MXPA03011014A), dentre outros.

Uma patente americana consiste em um baculovírus recombinante que produz a toxina inseticida AaIT do escorpião paquistanês *Androctonus australis* (US6689356B1), um bioinseticida para substituição dos inseticidas químicos altamente tóxicos.

O Brasil possui uma patente de um potencial fármaco anti-hipertensivo presente na peçonha do escorpião *Tityus serrulatus* (US2007275901A1).

## **Lepidoptera**

Lagartas representam a fase larval dos insetos da ordem Lepidoptera. A maioria delas são herbívoras vorazes (99%). Quando existente, a glândula de veneno está conectada a espinhos presentes em pelos ocos que recobrem o corpo desses animais, e que podem inocular o veneno quando pressionado. Além disso, os próprios pelos podem causar reação urticante no contato com a pele.

Dentre as lagartas de interesse médico, somente 13 gêneros tiveram seu veneno, pelo menos parcialmente, caracterizados: *Leucanella*, *Lonomia*, *Dendrolimus*, *Arctia*, *Premolis*, *Euproctis*, *Lymantria*, *Thaumetopoea*, *Acharia*, *Doratifera*, *Latoia*, *Lagoa* e *Podalia* <sup>(11)</sup>.

Foram encontradas 23 patentes pertencentes a somente três dos gêneros citados em 4 diferentes

países. Destas, 19 patentes foram depósito de compostos não purificados, feitos a partir do animal inteiro, na Romênia/Moldávia (10 composições, gênero *Lymantria*), e na medicina tradicional chinesa (9 composições, gênero *Dendrolimus*).

O Brasil apresentou 4 patentes, o composto patenteado é a LOPAP (*Lonomia obliqua prothrombin activating protease*), uma proteína de massa molecular de 69 KDa com atividade pró-trombótica e procoagulante. Esta proteína também induz a expressão de moléculas de adesão como ICAM-1 e E-selectina, mas não de VCAM nas células endoteliais (HUVECs), além de um aumento da IL-8 e PG12, sugerindo ação pró-inflamatória <sup>(12)</sup>.

Lagartas de interesse médico são uma fonte de novas biomoléculas e o Brasil é pioneiro em pesquisas com o veneno purificado e suas aplicação direta.

## **Hymenoptera**

Abelhas e vespas são insetos da ordem Hymenoptera. Embora o veneno dos insetos desta

ordem possuam características comuns, como a presença de peptídeos policatiônicos e proteínas alergênicas homólogas, muitos outros componentes são específicos do gênero ou da espécie.

### ***Abelhas***

Abelhas possuem importante papel na polinização tanto ecológico quanto comercial. Além disso, esses insetos produzem inúmeros insumos que são utilizados pelos seres humanos como mel, própolis, geleia real e cera. Dentre os componentes peptídicos do veneno encontra-se a melitina, apamina, tertiapina, adolapina (anti-inflamatório), peptídeo MDC (anti-inflamatório e analgésico), Cardiopep (antiarrítmico), entre outros <sup>(13)</sup>.

Foram encontradas 85 patentes submetidas com apitoxina (60%) ou seus peptídeos purificados. A maioria das patentes com a apitoxina foi depositada na Ásia, sobretudo pela Coreia do Sul e China, e estão relacionadas à medicina tradicional. A utilização da apitoxina é diversa como, por exemplo, doenças

autoimune (KR20050138973A), reumática (CN101002851A, UA45503U, KR20110067407A) anticoagulante (UA7731C2), antivírus a antitumor (KR101553109B1, KR101700606B1), analgésica (KR100483496B1), além de variadas utilizações cosméticas (RU20030039859A, HRP20130733A2, KR101089779B1, KR101418366B1). O Brasil possui uma patente (BRPI0904036A2) de uma formulação tópica da apitoxina com propriedades analgésicas e anti-inflamatórias para o uso em artrite reumatoide.

Patentes de compostos isolados foram encontrados somente para os peptídeos melitina, tertiapina e apamina conjugada com melitina. Esses peptídeos possuem baixa identidade (7,7 a 23,8%) e similaridade (11,5 a 30,7%) na sequência primária, possuindo efeitos bem diversos.

A melitina é a toxina mais estudada do veneno das abelhas (31% das patentes). Ela possui 26 aminoácidos (2,8 KDa) e representa pelo menos 50% do veneno bruto. Possui atividade pró-apoptótica, uma vez que é uma molécula anfipática que interage

com a membrana podendo formar poros <sup>(14)</sup>. Indícios de que a melitina tem tropismo por células cancerígenas, tem direcionado sua extensiva investigação em linhagens celulares tumorais <sup>(15)</sup>. Este mesmo mecanismo de formação de poros na membrana tem colocado a melitina como um peptídeo antimicrobiano de amplo espectro <sup>(16)</sup>.

A apamina é um peptídeo de 18 aminoácidos (2 KDa) e contém 2 pontes dissulfeto. É uma neurotoxina que atravessa a barreira hematoencefálica <sup>(17)</sup> e inibe os canais para potássio dependentes de cálcio de pequena condutância  $K_{Ca2.2}$ , importantes em mecanismos de aprendizado e memória por regularem a excitabilidade neuronal <sup>(18)</sup>. Embora não tenham sido encontradas patentes com a apamina sozinha, há 2 patentes da apamina conjugada com a melitina, uma para doença renal (KR20150137314A) e outra para inflamação (KR101734093B1).

Tertiapina é um peptídeo básico (pI 9,5) de 21 aminoácidos (2,5 KDa) que bloqueia os canais para

potássio retificador de entrada ( $K_{ir}$ ) com maior afinidade pelo canal  $K_{ir}3.2$  <sup>(19)</sup>. Foram encontradas 5 patentes com essa toxina, sendo 4 utilizada em terapia para melhorar o ritmo cardíaco (US2010168030, US201361771702, US9203398P), e uma para inibir apoptose (AUPS230702A).

### ***Vespas***

Estima-se que 70% do peso seco do veneno de vespas sejam peptídeos de baixo peso molecular. Estes peptídeos podem ser mastoporanos (responsável pelas reações alérgicas devido à degranulação de mastócitos), cininas (causam dor), peptídeos quimiotáticos (promovem quimiotaxia de leucócitos), além de outras toxinas peptídicas <sup>(20)</sup>.

Somente 22 patentes envolvendo peptídeos de vespas foram encontradas. Destas, há uma patente cosmética coreana (CN104379125A); uma americana (US3140093A) e uma alemã (DE19957904A) utilizando o veneno de vespa para terapia imunogênica relacionada à alergia. O Brasil publicou

uma patente (BR112012029975) com um peptídeo antitumoral da vespa *Apoica pallens*. A China possui 18 patentes, das quais, 6 estão relacionadas à prevenção e tratamento de isquemia cardiovascular e cerebrovascular (CN103638059A, CN103638060A, CN103641902A, CN103655632A, CN103655633A, CN103665136A), no entanto não está claro se elas se referem ao mesmo composto em diferentes espécies de vespa ou diferentes compostos, uma vez que não estava disponível todo o conteúdo da patente para análise. O mesmo acontece com 5 outras patentes analgésicas e anti-inflamatórias (CN103638063A, CN103638064A, CN103638064A, CN103638066A, CN103655635A). Outras 3 estão relacionadas à medicina tradicional (CN109674772A, CN1274596A, CN105233187A).

## **Considerações Finais**

Com exceção de poucas espécies, os venenos animais ainda são pouco explorados biotecnologicamente. Embora a China tenha

patenteado mais compostos derivados de venenos dos artrópodes analisados, a maioria dessas patentes é com o veneno total ou até mesmo com o animal inteiro, para utilização na medicina tradicional chinesa. O Brasil tem 9 patentes em venenos, em todas as ordens analisadas neste estudo. Todas são baseadas em peptídeos purificados e possuem alvos ou terapias bem determinadas.

O envenenamento por picada de animais peçonhentos foi reconhecido em 2007 pela Organização Mundial de Saúde como um problema de saúde pública negligenciada especialmente países em desenvolvimento. Felizmente o Brasil possui soro antivenenos para o envenenamento de aranhas, escorpiões e lagartas do gênero *Lonomia*. A terapia para o envenenamento por abelhas e vespas é feita pelo tratamento dos sintomas.

## Referências

<sup>1</sup>King GF. Tying pest insects in knots: the deployment of spider-venom-derived knottins as bioinsecticides. *Pest Manag Sci*. 2019 Sep;75(9):2437-2445.

<sup>2</sup>Deuis JR, Wingerd JS, Winter Z, et al. Analgesic effects of GpTx-1, PF-04856264 and CNV1014802 in a mouse model of Nav1.7-mediated pain. *Toxins (Basel)*. 2016; 8(3):78.

<sup>3</sup>Deuis JR, Dekan Z, Wingerd JS, et al. Pharmacological characterisation of the highly Nav1.7 selective spider venom peptide Pn3a. *Sci. Rep.* 2017; 7: 40883.

<sup>4</sup>de Souza AH, Lima MC, Drewes CC, et al. Antiallodynic effect and side effects of Ph $\alpha$ 1 $\beta$ , a neurotoxin from the spider Phoneutria nigriventer: comparison with  $\omega$ -conotoxin MVIIA and morphine. *Toxicon*. 2011; 58:626–633.

<sup>5</sup>Santos DM, Verly RM, Pilo-Veloso D, et al. LyeTx I, a potent antimicrobial peptide from the venom of the spider Lycosa erythrognatha. *Amino Acids* 2010; 39:135–144.

<sup>6</sup>Liu Z, Deng M, Xiang J, et al. A novel spider peptide toxin suppresses tumor growth through dual signaling pathways, *Curr. Mol. Med.*, 2012, 12:1350–1360.

<sup>7</sup>Saez NJ, Herzig V. Versatile spider venom peptides and their medical and agricultural applications. *Toxicon*. 2019; 158:109-126.

<sup>8</sup>Matavel A, Estrada G, De Marco F. Spider Venom in Drug Discovery: a review. In: Gopalakrishnakone P, Corzo GA, de Lima ME, Diego-García E, editors. *Spider Venoms*. Dordrecht: Springer Netherlands, 2015. p. 361–377.

<sup>9</sup>Ahmadi S, Knerr JM, Argemi L, et al. Scorpion Venom: Detriments and Benefits. *Biomedicines*. 2020; 8:118.

<sup>10</sup>Dueñas-Cuellar RA, Santana CJC, Magalhães ACM, et al. Scorpion Toxins and Ion Channels: Potential Applications in Cancer Therapy. *Toxins*. 2020; 12:326.

<sup>11</sup>Villas-Boas IM, Bonfá G, Tambourgi DV. Venomous caterpillars: From inoculation apparatus to venom composition and envenomation. *Toxicon*. 2018; 153:39-52.

<sup>12</sup>Fritzen M, Flores MP, Reis CV, et al. A prothrombin activator (Lopap) modulating inflammation, coagulation and cell survival mechanisms. *Biochem Biophys Res Commun*. 2005; 333(2):517-23.

<sup>13</sup>Kunitz AG. Melitina proveniente do veneno de abelha: processo de purificação, aplicação e avaliação econômica. Mestrado [dissertação]. Florianópolis: Universidade Federal de Santa Catarina; 2015.

<sup>14</sup>Ceremuga M, Stela M, Janik E, et al. Melittin-A natural peptide from bee venom which induces apoptosis in human leukaemia cells. *Biomolecules*. 2020;10(2):247.

<sup>15</sup>Rady I, Siddiqui IA, Rady M, et al. Melittin, a major peptide component of bee venom, and its conjugates in cancer therapy. *Cancer Lett*. 2017; 402:16–31.

<sup>16</sup>Hong J, Lu X, Deng Z, et al. How melittin inserts into cell membrane: conformational changes, inter-peptide cooperation, and disturbance on the membrane. *Molecules*. 2019; 24(9):1775.

<sup>17</sup>Oller-Salvia B, Sánchez-Navarro M, Giralt E, et al. Blood-brain barrier shuttle peptides: an emerging paradigm for brain delivery. *Chem Soc Rev*. 2016; 45(17):4690-4707.

<sup>18</sup>Willis M, Trieb M, Leitner I, et al. Small-conductance calcium-activated potassium type 2 channels (SK2,

K<sub>Ca</sub>2.2) in human brain. *Brain Struct Funct.* 2017; 222(2):973-979.

<sup>19</sup>Patel D, Kuyucak S, Doupnik CA. Structural Determinants Mediating Tertiapin Block of Neuronal Kir3.2 Channels. *Biochemistry.* 2020;59(7):836-850.

<sup>20</sup>Dos Santos-Pinto JRA, Perez-Riverol A, Lasa AM, et al. Diversity of peptidic and proteinaceous toxins from social Hymenoptera venoms. *Toxicon.* 2018; 148:172-196.

## *CAPÍTULO 19*

### **PEÇONHAS E TOXINAS DE PEIXES**

Helena B. Fiorotti;  
Fabiana V. Campos;  
Fábio L. S. Costa;  
Suely G. Figueiredo.

#### **Resumo**

Peçonhas animais têm despertado interesse como objeto de pesquisas que buscam a descoberta de novos instrumentos para a investigação de sistemas fisiológicos e produtos biotecnológicos. Apesar das inúmeras espécies de peixes peçonhentos existentes, as peçonhas destes animais são menos estudadas que aquelas de animais terrestres, representando, portanto, uma fonte para a bioprospecção de compostos bioativos ainda pouco explorados.

#### **Introdução**

Venenos animais são considerados fontes ricas em moléculas bioativas que podem ser usadas como protótipos para o desenvolvimento de novos

medicamentos e ferramentas moleculares. Diversas espécies de peixes são consideradas venenosas. Estima-se que o número total de espécies de peixes venenosos pode chegar a cerca de 3.000, <sup>(1)</sup> número que corresponde a mais da metade de todos os vertebrados venenosos.

Dentre as diversas espécies de animais venenosos existem os classificados como peçonhentos. Estes apresentam uma estrutura glandular especializada para produzir e secretar substâncias nocivas que compõe a peçonha, sendo equipados com uma estrutura traumatogênica para liberá-la. Estas estruturas formam o aparato peçonhento destes animais e, em peixes, são revestidas por uma bainha tegumentar.

O aparato peçonhento e as atividades biológicas de peçonhas de peixes são semelhantes na maioria das espécies. O aparato invariavelmente consiste em espinhos que podem estar localizados em diversas regiões do peixe, sendo mais comuns na região dorsal. O sistema secretor da peçonha encontra-se nas

cavidades anterolaterais dos espinhos, podendo ser constituído por glândulas bem definidas ou um conjunto de células secretórias especializadas. Este sistema evoluiu para produzir secreções com diversas propriedades fisio-farmacológicas, utilizadas para defesa ou predação. O envenenamento ocorre quando o predador ou a presa entram em contato com o espinho, rompendo a bainha tegumentar por pressão mecânica e liberando a peçonha (figura 1).<sup>(2)</sup>



**Figura 1. PEIXE-ESCORPIÃO BRASILEIRO *Scorpaena plumieri*.** Vista lateral do espécime. O envenenamento ocorre quando presa ou predador entram em contato com os espinhos provocando a ruptura da bainha tegumentar (mostrado em evidência) por pressão mecânica, promovendo então a liberação da peçonha. Fotos: arquivo pessoal.

Fonte: Autoral

Praticamente todas as famílias e gêneros de peixes peçonhentos possuem representantes nos rios e na costa brasileira, sendo os mais estudados: o peixe-escorpião *Scorpaena plumieri* (figura 1), o peixe-sapo

*Thalassophryne nattereri*, e as arraias de água doce *Potamotrygon* sp.

Peçonhas de peixes são menos estudadas que as de animais terrestres devido à extrema labilidade de seus componentes tóxicos e aos desafios envolvidos na captura dos espécimes e na extração do veneno. <sup>(3)</sup> No entanto, alguns componentes bioativos já foram identificados ou mesmo isolados destas peçonhas, e muitos ainda podem ser identificados e estudados. A exploração deste potencial representa inúmeras possibilidades para o desenvolvimento de novas drogas e para a compreensão de processos fisiológicos complexos.

### **Sintomatologia do envenenamento**

O envenenamento por peixes peçonhentos, que acomete banhistas, pescadores e mergulhadores, ocorre quando a vítima pisa ou toca acidentalmente no peixe e tem a pele perfurada por seus espinhos. <sup>(4)</sup> A sintomatologia é similar para a maioria das espécies, consistindo de manifestações locais e sistêmicas. Dentre as primeiras destacam-se a dor

excruciante, edema e eritema. Sintomas sistêmicos incluem isquemia, espasmos musculares, fraqueza prolongada e náusea, além da paralisia do membro afetado, podendo também provocar hipotensão, taquicardia e estresse respiratório. <sup>(4)</sup>

Embora pouco letais, acidentes causados por peixes peçonhentos podem ser considerados um problema de saúde pública, pois a recuperação das vítimas pode levar dias ou mesmo semanas. <sup>(4)</sup> O tratamento do envenenamento geralmente consiste em medidas paliativas para aliviar os sintomas.

### **Atividades biológicas de peçonhas de peixes**

Os sintomas descritos no item 2 podem ser causados por um único evento de envenenamento, demonstrando que venenos de peixes promovem um ataque multifacetado, tendo como alvo uma variedade de sistemas e processos fisiológicos. <sup>(2)</sup> Os efeitos dessas peçonhas em processos biológicos vitais, principalmente em relação às respostas inflamatórias, neurotóxicas e cardiovasculares, como também atividades citolítica, enzimática, aglutinante e letal,

têm sido bastante estudados. No entanto, as respostas mais marcantes e comuns podem ser agrupadas de acordo com similaridades fisiológicas.

Peçonhas de peixes são letais em animais experimentais e exibem atividade hemolítica direta “*in vitro*” altamente seletiva para eritrócitos de coelho. Algumas são também capazes de induzir efeitos citolíticos e citotóxicos em outros tipos celulares, incluindo linhagens de células tumorais. <sup>(5)</sup>

Os primeiros e mais notáveis efeitos locais do envenenamento por peixes são dor e edema, <sup>(4)</sup> em geral associados à uma resposta inflamatória caracterizada pela liberação de citocinas pró-inflamatórias e por um influxo de leucócitos. <sup>(6)</sup>

Peçonhas de peixes provocam alterações cardiovasculares, incluindo mudanças na pressão sanguínea e na reatividade vascular, bem como na contratilidade do músculo cardíaco. Estas desordens parecem resultar da ação simultânea da peçonha em vários alvos fisiológicos: ação direta e/ou indireta sobre receptores adrenérgicos e/ou muscarínicos

e/ou de leucotrienos; liberação de óxido nítrico endotelial; modulação da função de canais iônicos. (2, 3). Vários efeitos neurotóxicos, como respostas contrátil e relaxante, fibrilações musculares e despolarização celular são induzidos por peçonhas de peixes em preparações experimentais. Os mecanismos envolvem distúrbios nos terminais pré- e pós-sinápticos, levando à despolarização de membranas celulares e à liberação e depleção de neurotransmissores. (7)

Atividades antimicrobiana, (8, 9) inibitória da ligação de integrinas e hemaglutinante também foram descritas em peçonhas de peixes. (3) Embora essas atividades estejam associadas principalmente à presença de toxinas proteicas nessas peçonhas, componentes não-proteicos, como por exemplo aminas biogênicas, também podem desempenhar um papel relevante no envenenamento. (2)

### **Composição proteica de peçonhas de peixes**

Algumas espécies de peixes já tiveram suas peçonhas parcialmente caracterizadas. Entretanto, somente

cerca de uma dúzia de moléculas foram purificadas a partir dessas peçonhas através de processos convencionais. O advento de abordagens venômicas modernas possibilitou a prospecção de toxinas de venenos em larga escala. Análises venômicas bem-sucedidas foram empregadas no estudo dos venenos dos peixes *S. plumieri* <sup>(8)</sup> e *Synanceia horrida*, <sup>(10)</sup> dentre outros.

Proteínas com atividades biológicas que apresentam interesse terapêutico e biotecnológico já foram identificadas (p. ex. inibidores enzimáticos e peptídeos antimicrobianos) e isoladas de peçonhas de peixes. (Tabela 1). Aspectos bioquímicos de algumas proteínas isoladas são descritos a seguir.

Tabela 1. Classes de proteínas identificadas em peçonhas de peixes e suas atividades biológicas.

ENZIMAS	CITOLISINAS	LECTINAS	INIBIDORES
---------	-------------	----------	------------

<b>Proteases</b> Ação sobre fatores de coagulação, anti-inflamatória, edematogênica, nociceptiva	<b>Toxina formadora de poro em membrana celular</b> Letal, hemolítica, neuromuscular, cardiovascular, edematogênica e nociceptiva.	<b>Toxina aglutinante - interação seletiva com carboidratos.</b> Inflamatória, antimicrobiana, citolítica, mitogênica, inibição da ligação de integrinas, quimiotática e antitumoral.	<b>Inibidores de serino e cisteíno-proteases</b> Modulação de proteases, hipotensiva e vaso-depressora, prejuízo à homeostase.
<b>Hialuronidase</b> Degradação de componentes da matriz extracelular e aumento da permeabilidade tecidual.			

## - Enzimas

Algumas proteases, enzimas envolvidas em diversos processos fisiopatológicos que vão desde a coagulação sanguínea até eventos relacionados à inflamação, já foram isoladas de peçonhas de peixes. Por exemplo, uma família de naterinas, cininogenases envolvidas na indução de dor e edema, foi isolada da peçonha do *T. nattereri*.<sup>(11)</sup>

Hialuronidases hidrolisam componentes da matriz extracelular – principalmente o ácido hialurônico – promovendo o aumento da permeabilidade tecidual, uma propriedade potencialmente interessante em um contexto terapêutico. Hialuronidases foram

purificadas a partir das peçonhas de várias espécies de peixes, tendo sido parcialmente caracterizadas. <sup>(2)</sup>

#### - Toxinas citolíticas

As principais atividades das peçonhas de peixes estão associadas a toxinas citolíticas de alto peso molecular ( $\approx 121$  a  $322$  kDa). Estas moléculas exercem atividade citolítica, hemolítica, aumento da permeabilidade vascular, agregação de plaquetas, edema, atividade neuromuscular e vaso-relaxamento endotelial, sendo, portanto, consideradas toxinas multifuncionais. Embora extremamente lábeis, citolisinas são as moléculas mais amplamente caracterizadas em peçonhas de peixes. <sup>(2, 3)</sup> O estudo da função das citolisinas contribui para a compreensão dos seus mecanismos de ação, sendo, portanto, útil para condução de novas terapias para o tratamento das vítimas do envenenamento por peixes.

#### - Lectinas

Lectinas – proteínas que se ligam específica e reversivelmente a carboidratos – desempenham diversas funções biológicas relevantes, como

aglutinação de eritrócitos e de formas promastigotas de *Leishmania*, modulação da resposta imune, atividades antimicrobiana e antitumoral, agregação de plaquetas e inibição da ligação de integrinas. Este vasto repertório confere a estas proteínas um considerável potencial biotecnológico e terapêutico. Algumas lectinas já foram purificadas de peçonhas de peixes. Por exemplo, a plumieribetina – uma lectina tipo B isolada da peçonha de *S. plumieri* – inibe a interação entre integrinas  $\alpha 1\beta 1$  e moléculas de colágeno tipo IV da membrana basal. <sup>(39)</sup> Moléculas que interferem na ligação entre integrinas e seus ligantes apresentam potencial farmacológico para o tratamento de patologias envolvendo essas moléculas de adesão.

### **Perspectivas**

Peçonhas de peixes são fontes de proteínas bioativas com um grande espectro de ações fisiofarmacológicas. Entretanto, poucas moléculas foram isoladas e caracterizadas bioquímica e funcionalmente até então, ou seja, muitas ainda

podem ser descobertas. Portanto, a exploração de peçonhas de peixes pode contribuir para a prospecção de novas moléculas de interesse biotecnológico.

## Referências

1. Smith WL, Stern JH, Girard MG, Davis MP. Evolution of venomous cartilaginous and ray-finned fishes. *Int and Comp Biol* 2016;56:950-61.
2. Ziegman R, Alewood P. Bioactive components in fish venoms. *Toxins* 2015;7:1497-531.
3. Campos FV, Menezes TN, Malacarne PF, Costa FLS, Naumann GB, Gomes HL et al. A review on the *Scorpaena plumieri* fish venom and its bioactive compounds. *J Venom Anim Toxins incl Trop Dis* 2016;22:35.
4. Haddad Jr. V, Martins IA, Makyama HM. Injuries caused by scorpionfishes (*Scorpaena plumieri* Bloch, 1789 and *Scorpaena brasiliensis* Cuvier, 1829) in the Southwestern Atlantic Ocean (Brazilian coast): epidemiologic, clinic and therapeutic aspects of 23 stings in humans. *Toxicon* 2003;42:79-83.

5. Figueiredo SG, Andrich F, Lima C, Lopes-Ferreira M, Haddad Jr V. Venomous fish: a brief overview. In: de Lima ME, Pimenta AMC, Martin-Eauclaire MF, Zingali R, Rochat H, editors. *Animal Toxins: State of the Art. Perspectives on Health and Biotechnology*. Belo Horizonte: UFMG; 2009.

6. Lima C, Clissa, PCB, Piran-Soares AA, Tanjoni I, Moura-da-Silva AM, Lopes-Ferreira M. Characterisation of local inflammatory response induced by *Thalassophryne nattereri* fish venom in a mouse model of tissue injury. *Toxicon* 2003;42:499–507.

7. Church JE, Hodgson WC. The pharmacological activity of fish venoms. *Toxicon* 2002;40:1083-93

8. Borges MH, Andrich F, Lemos PH, Soares TG, Menezes TN, Campos FV et al. Combined proteomic and functional analysis reveals rich sources of protein diversity in skin mucus and venom from the *Scorpaena plumieri* fish. *J Proteomics* 2018;187:200-11.

9. Conceição K, Cena GL, Silva VA, Neto XAO, Andrade VM, Tada DB et al. Design of bioactive peptides derived from CART sequence isolated from the

toadfish *Thalassophryne nattereri*. 3 Biotech  
2020;10(4):162.

10. Ziegman R, Undheim EAB, Baillie G, Jones A,  
Alewood PF. Investigation of the estuarine stonefish  
(*Synanceia horrida*) venom composition. J Proteomics  
2019;201:12-26

11. Magalhães G.S., Lopes-Ferreira M., Junqueira-de-  
Azevedo I.L., Spencer P.J., Araújo M.S., Portaro F.C. et  
al. Natterins, a new class of proteins with  
kininogenase activity characterized from  
*Thalassophryne nattereri* fish venom. Biochimie  
2005;87:687-99.

12. Evangelista KS, Andrich F, Figueiredo de Rezende  
F, Niland S, Cordeiro MN, Horlacher T et al.  
Plumieribetin, a fish lectin homologous to mannose-  
binding B-type lectins, inhibits the collagen-binding  
alpha1beta1 integrin. J Biol Chem  
2009;284(50):34747-59.

*CAPÍTULO 20*

**ARSENAL BIOQUÍMICO DAS PEÇONHAS DE  
SERPENTES: FONTE DE NOVOS FÁRMACOS**

Thyfanne Suelen Tavares Linhares;  
Micheline Freire Donato.

**Resumo**

As peçonhas de serpentes são uma mistura complexa de biomoléculas ativas ricas em compostos orgânicos com diferentes pesos moleculares, em que proteínas e peptídeos são majoritários, além de uma variedade de compostos inorgânicos. Estas constituem estratégias importantes para a evolução da ampla gama filogenética de animais peçonhentos, possibilitando uma série de vantagens para os mesmos, como a habilidade para captura e digestão eficiente da presa, defesa contra os predadores, competição e dissuasão, entre outras estratégias. Nesse capítulo iremos abordar as classes bioquímicas que caracterizam o rico arsenal de toxinas com diversas atividades

farmacológicas e alta especificidade ao seu alvo, sendo essas a fonte promissora de novos fármacos.

**Palavras-chave:** Peçonha de serpente. Peptídeos. Proteínas. Elapidae. Viperidae. Colubridae.

## **Introdução**

As serpentes peçonhentas são classificadas em quatro famílias: Viperidae, Elapidae, Atractaspididae e Colubridae. O termo peçonha é utilizado para designar toda substância tóxica (veneno) produzida e injetada por um aparato inoculatório presente no organismo peçonhento, neste caso, nas serpentes peçonhentas. As peçonhas ofídicas apresentam cerca de 90% de peso seco constituído por proteínas, que compreendem centenas de diferentes toxinas. Em serpentes viperídicas 80 a 90 % são enzimas e em serpentes elapídicas, entre 25-70 %, havendo também toxinas polipeptídicas não-enzimáticas e proteínas atóxicas [3]. Grande parte dessas é resultante de um recrutamento de eventos bioquímicos, em que um gene de uma proteína que está envolvida em um

processo regulador chave é repetido, e esse novo gene é expresso seletivamente na glândula de veneno, havendo em muitos casos amplificação para obter famílias multigênicas com novas funcionalidades, contudo, preservando a estrutura molecular básica, inclusive a estrutura terciária da proteína ancestral e alterando os grupos funcionais principais para adquirir diferentes atividades farmacológicas <sup>(1)</sup>.

No geral, essas misturas complexas incluem uma variada combinação de proteínas estruturalmente compostas por subunidades polipeptídicas, formando enzimas globulares até simples e pequenos peptídeos; compostos inorgânicos tais como,  $Mg^{2+}$  e  $Zn^{2+}$  (íons importantes para as metaloproteases com atividade hemorrágica), dentre outros; e moléculas orgânicas, como as poliaminas, aminoácidos, neurotransmissores, carboidratos, lipídios, aminas biogênicas, nucleotídeos e aminoácidos, muitos com alta toxicidade e diferentes propriedades farmacológicas

de interesse médico por serem responsáveis pela sintomatologia clínica dos acidentes<sup>(1;2;3)</sup>.

Nessas peçonhas, o conteúdo enzimático é constituído por cinco classes de enzimas, sendo a maior parte de natureza hidrolítica (quadro 1).

Quadro 1. Diversidade enzimática das peçonhas de serpentes

Classe Enzimática	Função Bioquímica	Tipos	Importância Biológica
<b>Oxidorredu-tases</b>	Reações de oxidação	(a) <i>L</i> -aminoácido oxidases (LAO); (b) Lactato desidrogenase	(a) responsável pela cor amarela da peçonha seca; indução ou inibição de agregação plaquetária, atividade anticoagulante ou hemorrágica (b) presente no gênero <i>Naja</i> sp. e <i>Dendroaspis</i> sp.,
<b>Hidrolases</b>	Hidrólisa ligações fosfomonoéster e fosfodiéster dos nucleotídeos e nucleosídeos.	Fosfodiesterases, NAD nucleosidases, ATPases, 5-nucleotidase, fosfatase	encontradas na maioria das peçonhas de serpentes
<b>Glicosidases</b>	catalisa as reações do ácido hialurônico,	Hialuronidase,	atua como fator de difusão, aumentando a permeabilidade tecidual às demais

			toxinas da peçonha
<b>Proteases</b>	agrupadas em dois grandes grupos: as endopeptidases e as exopeptidases.	Metaloproteases (c); Serinoproteases (d)	(c) com especificidade ao substrato, causam os edemas locais e sintomas hemorrágicos; outras sem especificidade ao substrato, não-hemorrágicas
<b>Lipases</b>	Responsáveis pela degradação de lipídeos	Fosfolipases A <sub>2</sub> (PLA <sub>2</sub> ), I (tipo pancreática) e II (tipo sinovial)	Presente em todas as famílias de serpentes. Função digestiva e muitas atividades farmacológicas: neurotoxicidade pré e pós-sináptica, miotoxicidade, cardiotoxicidade, atividade anticoagulante, hemolítica, edematogênica, hipotensiva, convulsivante

(Fonte: Autoral. *Adaptado de: 3; 4; 5*).

Em geral, a predominância das classes bioquímicas presentes nas peçonhas determina os efeitos distintos e suas toxicidades, divididas em três categorias, de acordo com a toxicidade do envenenamento: (i) hemotoxinas, promovendo hemorragia primária, inchaço e necrose; (ii)

neurotoxinas, causando a incapacidade da contração muscular, parada cardíaca e respiratória e (iii) cardiotoxinas, que causam toxicidade específica às células musculares cardíacas, causando despolarização irreversível das membranas celulares<sup>(4)</sup>. A variação dos constituintes depende do gênero da serpente e muda de espécie para espécie.

A família **Elapidae** usualmente contém alta quantidade de neurotoxinas, como as toxinas de três-dígitos (3-Ftx) e as fosfolipases A2 (PLA2), que promove rápida paralisia da presa. Em contraponto, as famílias **Viperidae** e **Colubridae** possuem grande quantidade de metaloproteases e Lectinas do tipo C, e por isso os acidentes estão muito associados às desordens hemorrágicas e circulatórias<sup>(4;6;7)</sup>. Algumas estruturas dessas proteínas podem ser observadas na figura 1.

## **Constituintes bioquímicos das peçonhas Viperídicas**

As serpentes da família Viperidae são amplamente distribuídas no globo terrestre, sendo dividida em três subfamílias: Azemiopnae, no sudeste asiático; Viperinae, na Eurásia e África; Crotalinae, no novo Mundo, sul da Ásia e leste europeu <sup>(5)</sup>.

Nessas peçonhas geralmente há muitas metaloproteases (SVMP), que podem causar envenenamento severo por interferir no sistema de coagulação sanguínea e na formação do tampão homeostático e/ou por degradar a membrana basal ou os componentes da matriz extracelular das vítimas <sup>(6)</sup>. Possuem quantidades abundantes de PLA2 e serinoproteases (SVSP) e, também, pequenas proporções de proteínas pertencentes às desintegrina (DIS), Lectina tipo C / tipo lectina (CTL), NGF, LAO, fosfolipase B (PLB), fosfodiesterase (PDE), glutaminil ciclase (GCY), hialuronidase (HYA), nucleotidase (NUC), entre vários outros. A presença destas proteínas podem induzir atividade proteolítica. Por exemplo, as PLA2 miotóxicas, que potencializam a atividade miotóxica, determinada pela liberação da

atividade da creatina cinase (CK) no plasma, e que podem promover formações de edemas, hemorragias locais, atividade coagulante no plasma humano, entre outras<sup>(3;6;8)</sup>.

As peçonhas botrópicas (*Bothrops* sp.) apresentam predominantemente efeito coagulante e necrosante; as laquesicas (*Lachesis* sp.) efeitos hemolítico e neurotóxico; as elapídicas (*Micrurus* sp.) e crotálicas (*Crotalus* sp.) efeito neurotóxico <sup>(9)</sup>.

## **Constituintes bioquímicos das peçonhas Elapídicas**

A família Elapidae é amplamente distribuída pelo mundo com aproximadamente 360 espécies <sup>(6)</sup>. Filogeneticamente, essa família é classificada em seis subfamílias, tais como a Hydrophiinae (serpentes marinhas e australianas), Bungarinae (cobras, kraits e mambas, africanas e asiáticas), Laticaudinae, Calliophiinae, Maticorinae (asiáticas) e Elapinae (americanas)<sup>(5;8)</sup>. Dentre essas serpentes há espécimes com peçonhas mais potentes do mundo <sup>(10)</sup>.

As peçonhas elapídicas apresentam uma maior diversidade principalmente em classes de proteínas. Nos componentes majoritários encontram-se as enzimas, principalmente as PLA<sub>2</sub> do tipo IA, moléculas que causam mionecrose ou efeito similar, às cardiotoxinas ou, em algumas espécies, atuam como  $\beta$ -neurotoxinas pré-sinápticas<sup>(6)</sup>, e as toxinas protéicas 3-Ftx <sup>(1)</sup>. Outros constituintes proteicos e peptídicos aparecem em menor proporção.

As australianas, com as peçonhas mais tóxicas do mundo, apresentam três principais componentes, que são as enzimas ativadoras de protrombina, PLA<sub>2</sub> tóxicas com inúmeras atividades e 3-Ftx<sup>(10)</sup>. As asiáticas possuem como principais constituintes as PLA<sub>2</sub>, toxinas 3-Ftx e os inibidores de serino protease do tipo kunitz<sup>(6)</sup>. As africanas possuem as 3-Ftx do tipo citotoxinas e neurotoxinas, os peptídeos potenciadores de bradicinina (BPPs), peptídeo natriurético e inibidor de bradicinina como componentes mais abundantes<sup>(11)</sup>.

As americanas possuem como componentes majoritários as toxinas 3-FTx do tipo  $\alpha$ -neurotoxinas de cadeias curta e longa, e as PLA<sub>2</sub><sup>(12)</sup>, que serão abordadas em detalhes nos capítulos 21 e 22.

Dos componentes enzimáticos estão presentes as enzimas hialuronidase<sup>(3;6;13)</sup>; peptidases S1, representadas pelas SVSP; as SVMPS; as LAO<sup>(6)</sup>. Dos componentes não-enzimáticos, pode-se destacar os peptídeos AVIT, provocam contrações da musculatura lisa gástrica e hiperalgisia <sup>(14)</sup>. Outros são proteínas do tipo Lectina-C presentes em algumas elapídicas americanas <sup>(12)</sup>. Os peptídeos natriuréticos atuam como potentes hipotensores, os BPPs (peptídeos potenciadores de bradicinina)<sup>(11)</sup>. As ohanatoxinas geram hipolocomoção, hiperalgisia, além de induzir edema, vasorelaxamento endotélio-dependente, agregação plaquetária e miotoxicidade<sup>(1)</sup>. As proteínas secretórias ricas em cisteínas (CRISP – *cysteine-rich secretory protein*) , inibe alguns canais iônicos para cálcio e potássio, além do receptor de rianodina <sup>(15)</sup>.

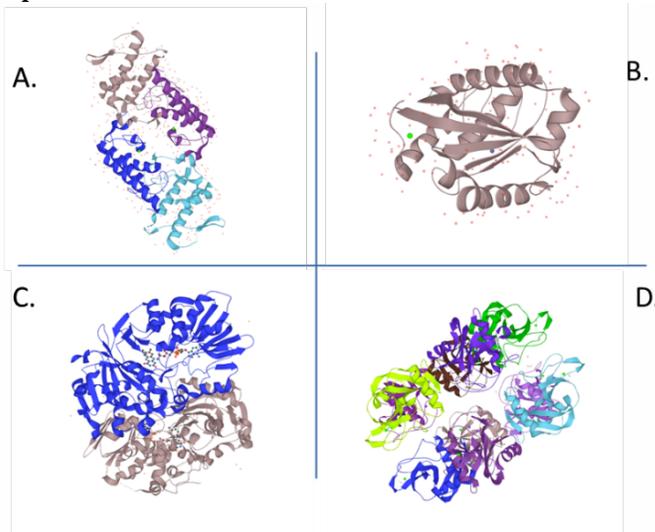
## **Constituintes bioquímicos de peçonhas Colubridicas**

Correspondem as serpentes sem presas frontais proeminentes<sup>(4)</sup>. Zaher (1999) reconheceu a família Colubridae como sendo, do tipo parafilética a qual incluía dez subfamílias: Xenodermatinae, Pareatinae, Calamariinae, Homalopsinae, Boodontinae, Psammophiinae, Pseudoxyrhopiinae, Natricinae, Dipsadinae e Xenodontinae <sup>(8)</sup>. Logo, aplicou-se “Colubroides new taxon” como um nome taxonômico formal.

Nessa superfamília há serpentes de grande importância médica, como visto no capítulo 17, relevante para análise bioquímica dessas peçonhas <sup>(4)</sup>. Diversas peçonhas de Colubridae possuem atividade proteolítica devido à presença de caseína; enzimas como a fosfodiesterase e acetilcolinesterase; e moderada a alta atividade de PLA2<sup>(16)</sup>. Foram descritos outros componentes como, SVMP e SVSP, LAO, proteínas do tipo Kunitz, miotoxinas, proteínas CRISPS e 3-Ftx. Foram identificadas, algumas

atividades toxicológicas, como hemotóxica, fibrinogenolítica e hemorrágica (SVMP e SVSP) e a neurotóxica e citotóxica, (3-FTx, dentre outras) <sup>(4;5;7)</sup>.

Figura 1. Estruturas terciária ou quaternária de algumas proteínas presentes nas peçonhas de serpentes. Componentes enzimáticos: A, B e C; Componentes não-enzimáticos: D



(A) **Phospholipase A2 crotoxin** basic subunit CBc., PDB: 2QOG; *Crotalus durissus terrificus* (South American rattlesnake). UniProtKB - P62022 (PA2BC\_CRODU); (B) Snake venom **metalloproteinase BmooMPalpha-I**, PDB: 3GBO, *Bothrops moojeni* (Lance-headed viper) (Caissaca). UniProtKB - P85314 (VM1BI\_BOTMO); (C) **L-amino-acid oxidase**, PDB: 4E0V, *Bothrops jararacussu* (Jararacussu). UniProtKB - Q6TGQ9 (OXLA\_BOTJR); (D) **C-type lectin BJcuL**, PDB: 5F2Q. *Bothrops jararacussu* (Jararacussu). UniProtKB - P83519 (LECG\_BOTJR)

A figura 2 mostra de forma sucinta os componentes bioquímicos presentes nas peçonhas de cada família de serpente.

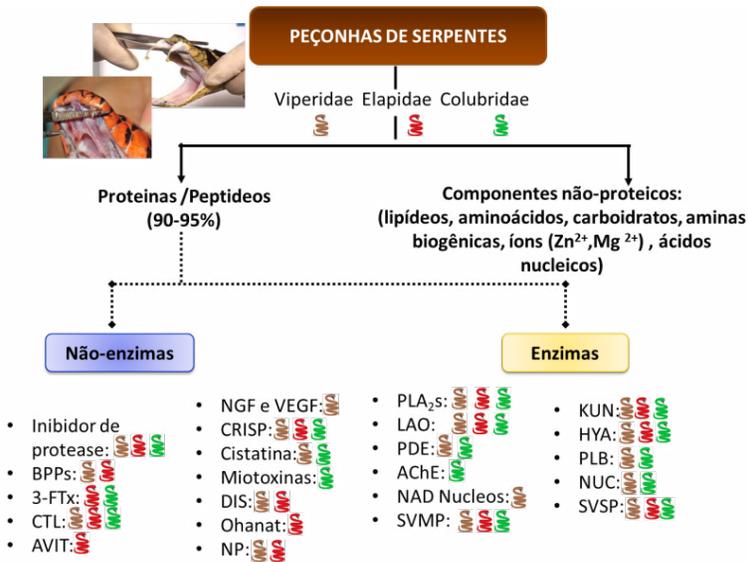
### **Considerações Finais**

A evolução das funções das peçonhas das serpentes e a diversificação dessas toxinas tem sido uma fonte de pesquisa interessante para a compreensão dos processos evolutivos e filogenéticos. Os estudos destes processos também são úteis na clínica para elucidar os eventos fisiopatológicos desencadeados pelo envenenamento. Ademais, a biodiversidade de serpentes, relacionada à variedade de componentes proteicos e peptídicos das peçonhas constituem uma fonte promissora de possíveis novos fármacos.

Figura 2: Composição bioquímica das peçonhas em relação às famílias de serpentes.

**Legenda:** NP= peptideo natriurético; 3-FTx= toxinas do tipo três dígitos; NGF= fator de crescimento neuronal; VEGF= fator de crescimento vascular; CRISP= proteína secretória rica em

cisteína; PLA<sub>2</sub>s= fosfolipase secretória tipo A2; LAO= L-amino oxidase; PDE= fosfodiesterase; AChE= acetilcolinesterase; NAD nucleo.= dinucleotídeo de nicotinamida e adenina; BPPs= peptídeos potenciadores de bradicinina; CTL= lectina tipo C; DIS= desintegrina; SVMP= metaloprotease de veneno de cobra; SVSP= serinoprotease de veneno de cobra; KUN= peptídeo tipo kunitz; HYA= hialuronidase; AVIT= família de proteínas (procitecinas); PLB= fosfolipase beta; NUC= nucleotidase; Ohanat= ohanatoxinas.



Fonte: Autoral. Adaptado de: 5; 6; 7; 11; 12

## Referências

[1] FRY B, et al. The Toxicogenomic multiverse: convergent recruitment of proteins into animal venoms. *Annu Rev Genom Humsn Gene*. 2009;10:483 – 511.

[2] KOH D, ARMUGAM A, JEYASEELAN K. Snake venom components and their application in biomedicine. *Cellular and Molecular Life Science*. 2006;63:3030 – 3041.

[3] MUNAWAR A, et. al. Review Snake Venom Peptides: Tools of Biodiscovery. *Toxins*. 2018 november;474(10):1 – 29.

[4] DASHEVSKY D, DEBONO J, ROKYTA D, et al. Three-finger toxin diversification in venoms of Cat-eye snakes (Colubridae Boiga). *Journal of Molecular Evolution*. 2018;86:531 – 545.

[5] GUTIÉRREZ JM, et. al. Snakebite envenoming. *Nature Reviews Disease Primers*. 2017;3(17063).

[6] TASOULIS T, ISBISTER GK. A Review and Database of Snake Venom Proteomes. *Toxins*. 2017;9(290):1 – 23.

[7] JUNQUEIRA-DE-AZEVEDO ILM, et. al. Colubrid Venom Composition: An - Omics Perspective. *Toxins*. 2016;230(8):1 – 24.

[8] ZAHER H, et al. Filogenia molecular de serpentes avançadas (Serpentes, Caenophidia) com ênfase nos xenodontinos da América do Sul: uma classificação revisada e descrições de novos táxons. Pap Avulsos Zool. 2009;49(11):115 – 153.

[9] OGAWA T, et al. Molecular diversity and accelerated evolution of Ctype lectin-like proteins from snake venom. Toxicon. 2005;45:1 – 14.

[10] FRY B. Structure-function properties of venom components from Australian elapids. Toxicon. 1999;37:11 – 32.

[11] MUNAWAR A, et al. Elapidic snake venom analyses show the specificity of the peptide composition at the level of genera Naja and Notechis. Toxins. 2014;6:850 – 868.

[12] CISCOTTO P, et al. Venomic analysis and evaluation of antivenom cross-reactivity of South American Micrurus species. J Proteomics. 2011;74:1810 – 1825.

[13] SILVA JD. Phylogeny of South American Triad Coral Snakes (Elapidae: Micrurus) Based on Molecular Characters. *Herpetologica*. 2001;57(1):1 – 22.

[14] SCHWEITZ H, et. al.. MIT1, a black mamba toxin with a new and highly potent activity on intestinal contraction. *FEBS Lett*. 1999;461:183 – 188.

[15] HERRERA M et. al. Comparative proteomic analysis of the venom of the taipan snake, *Oxyuranus scutellatus*, from Papua New Guinea and Australia: role of neurotoxic and procoagulant effects in venom toxicity. *J Proteomics*. 2012;75:2128 – 2140.

[16] HILL RE, MACKESSY SP. Characterization of the venom (Duvernoy's secretion) of twelve species of collubrid snakes and partial sequence of four venom proteins. *Toxicon*. 2000 dezembro;38(12):1663 – 1687.

*CAPÍTULO 21*  
**TOXINAS DE TRÊS-DÍGITOS (“THREE-FINGERS  
TOXINS”) DE SERPENTES ELAPIDAE**

Micheline Freire Donato;  
Luana Moreira Resende.

**Sumário**

Grande parte das toxinas que compõem as peçonhas das serpentes elapídicas (cobras, kraits, mambas e corais) são do tipo “*three-fingers toxins*” ou toxinas de três dígitos (3-Ftx), correspondem a uma família de polipeptídeos não-enzimáticos, com 60-74 resíduos de aminoácidos e massa molecular (MM) entre 6-9 KDa. Essas toxinas possuem domínios conservados entre as suas alças, porém com um considerável número de isoformas que garantem uma espetacular diversidade farmacológica, atuando com alta especificidade e em sua maioria, com seletividade ao receptor alvo. Nesse capítulo iremos abordar

características evolutivas, estruturais e farmacológicas dessa classe de toxinas.

**Palavras-chave:** Toxinas de três dígitos (3-Ftx). Elapidae. Serpentes *Micrurus* sp. (coral verdadeira).

### **Histórico e evolução das toxinas 3-FTx**

A peçonha das serpentes elapídicas é conhecida por sua potente neurotoxicidade, principalmente devido a presença de toxinas 3-Ftx, e por causarem acidentes ofídicos que geram risco de vida <sup>(1)</sup>.

Do ponto de vista evolutivo, as serpente Elapidae são consideradas um grupo monofilético jovem, com menos de 40 milhões de anos e subdividido em dois grupos: elapídicas do Velho Mundo e Novo Mundo. Estudos indicam que as linhagens mais basais tiveram origem asiática do provável ancestral comum dos elapideos <sup>(1; 2)</sup>. Nas Américas o gênero *Micrurus* é o que apresenta maior número de espécies, sendo 85 registradas no Reptile Database <sup>(3)</sup>, considerado um gênero monofilético,

endêmico nas Américas e distribuído do sudeste dos Estados Unidos até o norte da Argentina <sup>(4)</sup>. As peçonhas das *Micrurus* apresentam uma dicotomia fenotípica intrigante, na qual espécies agrupadas no clado de cauda longa apresentam peçonhas com predominância em PLA2 (algumas denominadas de  $\beta$ -neurotoxinas pré-sinápticas), enquanto que as de cauda curta apresentam predominância de 3-FTx (neurotoxinas, em geral pós-sinápticas) apontando uma condição mais basal <sup>(3; 4)</sup>.

### **Estrutura das toxinas 3FTx**

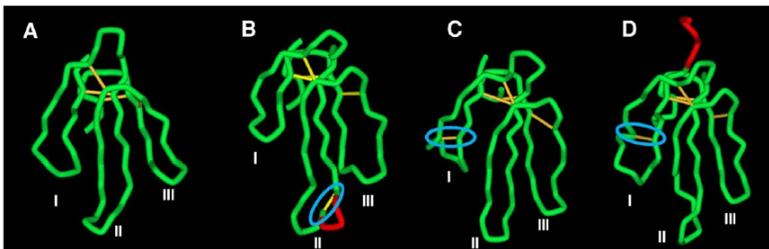
As 3-Ftx constituem moléculas planas, apresentando um núcleo hidrofóbico pequeno e globular de onde projetam-se três alças adjacentes, e assim assemelham-se a três dedos esticados da mão. O núcleo hidrofóbico contém quatro pontes dissulfeto formando uma espécie de “amarração”. Entre as três alças formam-se cinco folhas  $\beta$ , antiparalelas, que juntas constituem uma grande folha  $\beta$ -pregueada <sup>(5)</sup>. São ricas em resíduos de cisteína, apresentando

quatro ou cinco pontes dissulfeto<sup>(6)</sup>. Dos oito resíduos de cisteína conservados, quatro são na região do poro e constituem resíduos aromáticos (Tyr25 ou Phe27), importantes para a modelagem e estabilidade da folha antiparalela  $\beta$ -pregueada <sup>(7)</sup>. As toxinas com quatro pontes dissulfeto representam as neurotoxinas de cadeia curta (figura 1-A) <sup>(6)</sup>.

Algumas 3-Ftx apresentam a quinta ponte dissulfeto na alça I ou II. A presença dessa ponte adicional na primeira alça causa torções na molécula e empurra a ponta da mesma para uma posição ortogonal (figura 1C-D). As toxinas caracterizadas nessa categoria demonstram fraca toxicidade, sendo então denominadas de “*weak neurotoxins*” ou “3-Ftx não-convencionais”<sup>(8)</sup>. A quinta ponte dissulfeto ligada na segunda alça, introduz uma volta e a formação de um segmento curto helicoidal (figura 1-B) em neurotoxinas (NTXs) de cadeia longa e  $\kappa$ -neurotoxinas <sup>(6)</sup>. Essas toxinas são capazes de se ligar aos receptores colinérgicos nicotínicos (nAChR)  $\alpha 7$ , específicos de neurônios <sup>(9)</sup>.

Algumas 3-Ftx possuem um N-terminal longo e uma extensão do C-terminal. Todas as NTXs de cadeia longa apresentam de 2 a 9 resíduos de aminoácidos adicionais no C-terminal, que se estende do topo da molécula. Como exemplo, a toxina hannalgesina (isolada de *O. hannah*), com um papel importante para atividade analgésica<sup>(6)</sup>.

Figura 1: Estrutura tridimensional de toxinas de três-dígitos (3-Ftx) mostrando as alças (dígitos) e as pontes dissulfeto. A) Erabutoxina, 3-Ftx de cadeia curta; B)  $\delta$ -bungarotoxina, 3-Ftx de cadeia longa com a quinta ponte dissulfeto na segunda alça; C) Candoxina, 3-Ftx não convencional; D) Denmotoxina, 3-Ftx não convencional com o N-terminal extenso em vermelho

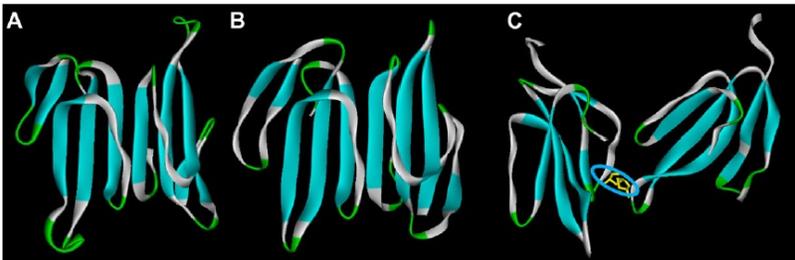


Fonte: (6).

Outras modificações estruturais são a glicosilação (uma modificação pós-traducional) que

ocorre em uma citotoxina do tipo 3 de *Naja kauthia*<sup>(10)</sup>; a formação de dímeros não-covalentes, como observado com as  $\kappa$ -bungarotoxinas<sup>(11)</sup>, (figura 2-A) ou covalentes, como homodímeros de  $\alpha$ -cobrotoxina e heterodímeros de  $\alpha$ -cobrotoxina e citotoxinas<sup>(12)</sup>, o que mostra a versatilidade estrutural e consequentemente funcional dessas moléculas.

Figura 2: Modelagem molecular de toxinas three-fingers que formam dímeros. Em A e B, toxinas formando dímeros não-covalentes, com as subunidades anti-paralelas, sendo A)  $\kappa$ -bungarotoxina e B) haditoxina. Em C a irditoxina, formando dímero covalente



Fonte: (6).

## Farmacologia e bioprospecção das 3FTx

Os membros dessa família de toxinas incluem as **neurotoxinas**, que atuam interferindo na

transmissão colinérgica em vários sítios pós-sinápticos do SNP e SNC <sup>(13)</sup>. Baseada na seletividade aos seus receptores, elas podem ser classificadas como curaremiméticas ou  $\alpha$ -neurotoxinas ( $\alpha$ -NTX), que funcionam como antagonistas dos nAChR  $\alpha 1$  muscular<sup>(5; 13)</sup>. Nesse grupo das  $\alpha$ -NTXs fazem parte duas classes: com 60-62 resíduos de aminoácidos, as “toxinas de cadeia-curta” (*short-chain toxins*), com quatro pontes dissulfeto; com 70-74 resíduos de aminoácidos, “toxinas de cadeia-longa” (*long-chain toxins*), com cinco pontes dissulfeto <sup>(14)</sup>. As  $\alpha$ -NTXs de cadeia longa ainda podem ser ligar aos nAChR  $\alpha 7$ , neuronais<sup>(9)</sup>.

NTXs de diferentes serpentes elapídicas têm sido promissoras na medicina. Algumas toxinas isoladas das peçonhas de *Naja* sp., como a cobrotoxina ( $\alpha$ -NTX de cadeia curta) e  $\alpha$ -cobratoxina ( $\alpha$ -NTX de cadeia longa) apresentaram efeito analgésico em modelo animal <sup>(15)</sup>. Outras são as  $\kappa$ -toxinas, que se ligam especificamente ao nAChR  $\alpha 3\beta 4$  ou aos  $\alpha 4\beta 2$  neuronais, e possuem cinco pontes

dissulfeto) <sup>(16)</sup>. O último componente do grupo das NTXs são as toxinas muscarínicas (MTs), que se ligam com alta especificidade aos mAChR <sup>(17)</sup>. As MTs têm sido isoladas principalmente das peçonhas elapídicas africanas e australianas, apresentam uma variedade de funções farmacológicas no sistema colinérgico muscarínico atuando como antagonistas competitivos, moduladores alostéricos ou agonistas, além de possuírem alta afinidade aos subtipos distintos de mAChR <sup>(17; 18)</sup>. As toxinas MT $\alpha$ = 7.543,2 Da e MT $\beta$ = 7.336,7 Da <sup>(17; 19)</sup> apresentaram grande relevância na compreensão de alguns mecanismos farmacológicos associados à Doença de Alzheimer <sup>(20)</sup>.

As **fasciculinas**, outra classe, isoladas das serpentes *Dendroaspis* sp. (mambas), inibem a atividade da enzima acetilcolinesterase <sup>(21)</sup> na junção neuromuscular, provocam a fasciculação no músculo.

A segunda maior classe de 3-Ftx compreende a das **cardiotoxinas** com 59 a 62 resíduos de aminoácidos e quatro pontes dissulfeto<sup>(22; 23)</sup>, em baixas concentrações aumentam os batimentos

cardíacos, enquanto que altas concentrações geram parada cardíaca, causando a morte <sup>(23)</sup>. Um grande número de toxinas dessa classe também causa toxicidade por formar poros na membrana, e dessa forma, recebendo a denominação de **citotoxinas** <sup>(22)</sup>.

As  **$\beta$ -cardiotoxinas**, uma nova classe de 3-Ftx isolada de *O. hannah*, geram bradicardia de modo concentração-dependente, além de apresentarem baixa toxicidade. Apresentam como alvo farmacológico os receptores  $\beta_1$  e  $\beta_2$  adrenérgicos <sup>(24)</sup>. Essa classe é muito promissora para a bioprospecção de fármacos. Outras são as **calciseptinas**, que bloqueiam seletivamente os canais para cálcio dependente de voltagem do tipo-L <sup>(25; 26)</sup>. Duas 3-Ftx constituem uma classe de toxinas que inibem a agregação plaquetária. A **dendroaspina** ou **mambina**, isolada de *D. jamensoni*, envolvida na adesão de algumas proteínas <sup>(27)</sup>.

Vários estudos com 3-Ftx isoladas das serpentes *Micrurus* sp. presentes no Brasil mostraram atividades farmacológicas promissoras (quadro 1).

Quadro 1. Farmacologia e bioprospecção de toxinas 3-FTXs de algumas espécies de *Micrurus* brasileiras.

Espécies de <i>Micrurus</i>	Distribuição	Toxina	Alvo farmacológico	MM
<i>M. altirostris</i>	Brasil, Uruguai, NE Argentina e Paraguai	$\alpha$ -NTx Tipo I	nAChR	
<i>M. corallinus</i>	Brasil, NE Argentina e Paraguai	$\alpha$ - NTx subfamília XIX	nAChR	
<i>M. frontalis</i>	Brasil (RS), Paraguai, NE Argentina	FTx I-III (cadeia curta) FTx IV e V (cadeia longa).	nAChRs musculares ( $\alpha$ - 1) e neuronais ( $\alpha$ -7).	6.548; 7.032; 7.411; 7.166; 7.327 Da
<i>M. ibiboboca</i>	E Brasil	Mic6c7NTX	Nav	7.047 Da
<i>M. lemniscatus</i>	N Bolívia, Brasil, Colômbia e E Equador	MT-Ml $\alpha$ ; Ml6435 e Ml6504; Ml7297	mAChR; promastigotas de <i>Leishmania l. amazonensis</i> ; <i>iGluR de NMDA e AMPA</i>	7.048 Da; 6435 e 6504; 7.297
<i>M. mipartitus</i>	Costa Rica, E Panama, Colômbia e Brasil	Mipartoxin-I (cadeia curta) MmTX1, MmTX2,	efeito modulador no receptor GABAA	7,030 7,205 7,186 Da
<i>M. paraensis</i>	Brasil (MG/PA) e Suriname	DN85432, DN86421 e DN85120	não convencionais	
<i>M. surinamensis</i>	Guiana Francesa, Guiana, Colômbia, Equador, Peru, Brasil e Bolívia.	$\alpha$ -NTXs: Ms 1, 3 e 11 (cadeia curta) Ms 2, 4 e 5 (cadeia longa)	nAChR	6.553; 7.299; 6.938; 7.303; 7.178; 6.671 Da

Fonte: adaptado de: 28; 30; 32; 33; 34; 35; 36.

Novas classes de 3-Ftx de serpentes americanas *Micrurus*, agem em **canais iônicos**, tais como uma toxina de *M. ibiboboca* em canais do tipo para sódio dependente de voltagem ( $\text{Na}_v$ ) e no potencial de ação composto <sup>(28)</sup>; uma de *M. tener* em canal iônico sensível a ácido (ASIC1) <sup>(29)</sup>. E ainda, pela primeira vez uma 3-Ftx pré-sináptica é isoladas de *M. lemniscatus*, atuando em **receptores ionotrópicos glutamatérgicos** do tipo de NMDA e AMPA <sup>(30; 31)</sup>.

### **Considerações Finais**

Os estudos com toxinas 3-Ftx têm contribuído para a compreensão dos mecanismos de toxicidade, ainda pouco esclarecidos, ocasionados pelo envenenamento de diferentes espécies de serpentes elapídicas, em especial as *Micrurus* sp. Além da diversidade ser uma rica fonte para a prospecção de novos fármacos. Contudo, mesmo mostrando-se promissora a prospecção dessa classe de proteínas 3-Ftx poucos trabalhos envolvendo estudos farmacológicos têm sido desenvolvido, tendo em vista

a alta complexidade para a purificação dessas moléculas associação ao baixo rendimento proteico e dificuldade de síntese e expressão por causa das pontes de sulfeto formadas com os resíduos de cisteína.

### **Referências**

1. DASHEVSKY, D., FRY, B. G., (2018). Ancient Diversification of Three-Finger Toxins in *Micrurus* Coral Snakes. *Journal of Molecular Evolution*, 86, pp. 58-67.
2. LEE, M. S. Y., SANDERS, K. L., KING, B., PALCI, A. (2016). Diversification rates and phenotypic evolution in venomous snakes (Elapidae). *R. Soc. open sci*, pp. 1-11.
3. LOMONTE, B. et al. (2016). Venoms of *Micrurus* coral snakes: evolutionary trends in 2 compositional patterns emerging from proteomic analyses. *Toxicon*, 122, pp. 7-25.
4. SANZ, L. (2019). New insights into the phylogeographic distribution of the 3FTx/PLA2 venom dichotomy across genus *Micrurus* in South America. *Journal of Proteomics*, 200, pp. 90-101.

5. BARBER, C., ISBISTER, G., & HODGSON, W. (2013). Alpha neurotoxins. *Toxicon*, 66, pp. 47-58.
6. KINI, R., & DOLEY, R. (2010). Structure, function, and evolution of three-fingers toxins: mini proteins with multiple targets. *Toxicon*, 56, pp. 855-67.
7. TORRES, A., KINI, R., SELVANAYAGAM, N., & KUCHEL, P. (2001). NMR structure of bucandin, a neurotoxin from the venom of the Malayan krait (*Bungarus candidus*). *Biochem. J.*, 360, pp. 539-48.
8. NIRTHANAN, S., CHARPANTIER, E., GOPALAKRISHNAKONE, P., GWEE, M., KHOO, H., CHEAH, L., . . . KINI, R. (2002). Cadoxin, a novel toxin from *Bungarus candidus*, is a reversible antagonist of muscle ( $\alpha$ 7) but a poorly reversible antagonist of neuronal  $\alpha$ -7 nAChR. *J. Biol. Chem.*, 277, pp. 17811-20.
9. SERVENT, D., WINCKLER, D. V., HU, H., KESSLER, P., DREVET, P., BERTRAND, D., & MENEZ, A. (1997). Only snake curaremimetic toxins with a fifth disulphide bond have high affinity for the neuronal  $\alpha$  7 nAChR. *J. Biol. Chem.*, 272, pp. 24279-86.
10. OSIPOV, A., STAPOVA, M., TSETLIN, V., & UTKIN, Y. (2004). The first representation of glycosylated three-fingers toxins. Cytotoxin from the

Naja kaouthia cobra venom. *European J. Biochem.*, 271, pp. 2018-27.

11. CHIAPPINELLI, V. (1983). Kappa-bungarotoxin: a probe for the neuronal nicotinic receptor in the avian ciliary ganglion. *Brain Research*, 277, pp. 9-22.
12. OSIPOV, A., KASHEVEROV, I., MAKAROVA, Y., STARKOV, V., VORONTSOVA, O., ZIGANSHIN, R., . . . UTKIN, Y. (2008). Naturally occurring disulphide-bond dimers of three-fingered toxins: a paradigm of biological activity diversification. *J. Biol. Chem.*, 283, pp. 14571-580.
13. CHANGEUX, J. (1990). The nicotinic acetylcholine receptor. An allosteric protein prototype of ligand-gated ion channels. *Trends Pharmacology*, 11, pp. 485-92.
14. TSETLIN, V., & HUCHO, F. (2004). Snake and snail toxins acting on nicotinic acetylcholine receptors: fundamental aspects and medical applications. *FEBS Letters*, 557, pp. 9-13.
15. CHEN, Z., ZHANG, H., GU, Z., CHEN, B., HAN, R., REID, P., & al., e. (2006). A long-form alpha-neurotoxin from cobra venom produces potent opioid-independent

analgesia. *Acta Pharmacological Sinica*, 27, pp. 402-08.

16. KINI, R. (2002). Molecular moulds with multiple missions: functional sites in three-finger toxins. *Clinical Experimental Pharmacology and Physiology*, 29, pp. 815-22.

17. KARLSSON, D., JOLKKONEN, M., MULUGETA, E., ONALI, P., & ADEM, A. (2000). Snake toxins with high selectivity for subtypes of muscarinic acetylcholine receptors. *Biochimie*, 82, pp. 793-806.

18. SERVENT, D., & FRUCHART-GAILLARD, C. (2009). Muscarinic toxins: tools for the study of the pharmacological and functional properties of muscarinic receptors. *J. of Neurochemistry*, 109, pp. 1193-202.

19. JOLKKONEN, M., VAN GIERSBERGEN, P., HELLMAN, U., WERNSTEDT, C., ORAS, A., SATYAPAN, N. A., & KARLSSON, E. (1995). Muscarinic toxins from the black mamba *Dendroaspis polylepis*. *Journal of Biochemistry*, 234, pp. 579-85.

20. MULUGUETA, E., KARLSSON, E., ISLAM, A., KALARI, R., MANGAT, H., WINBLAD, B., & ADEM, A. (2003). loss

of muscarinic M4 receptors in hippocampus of Alzheimer patients. *Brain Research*, 960, pp. 259-62.

21. MARCHOT, P., PROWSE, C., KANTER, J., CAMP, S., ALKERMANN, E., RADIC, Z., . . . TAYLOR, P. (1997). Expression and activity of mutants of fasciculin, a peptidic acetylcholinesterase inhibitor from Mamba venom. *The Jour. of Biol. Chemisty*, 272, pp. 3502-10.
22. BILWES, A., REES, B., MORAS, D., MENEZ, R., & MENEZ, A. (1994). X-ray structure at 1.55 Å of toxin gamma a cardiotoxin from *Naja nigricollis* venom. Crystal packing reveals a model for insertion into membranes. *J. Mol. Biol.*, 239, pp. 122-36.
23. DUFTON, M., & HIDER, R. (1988). Structure and pharmacology of elapid cytotoxins. *Pharmacol. Ther.*, 36, pp. 1-40.
24. RAJAGOPALAN, N., PUNG, Y., WONG, P., KUMAK, P., & KINI, R. (2007). Beta-cardiotoxin: a new three-finger toxin from *Ophiophagus hannah* (king cobra) venom with betha-blocker activity. *FASEB J.*, 21, pp. 3685-95.
25. De WEILLE, J., SCHWEITZ, H., MAES, P., TATAR, A., & LAZDUNSKI, M. (1991). Calciseptine, a peptide isolated from black mamba venom, is a specific

blocker of the L-type calcium channel. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 88, pp. 2437-40.

26. YASUDA, O., MORIMOTO, S., CHEN, Y., JIANG, B., KIMURA, T., SAKAKIBARA, S., . . . OGIHARA, T. (1993). Calciseptine binding to a 1,4-dihydropyridine recognition site of the L-type calcium channel of rat synaptosomal membranes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 194, pp. 587-94.
  
27. McDOWELL, R., DENNIS, M., LOUIE, A., SHUSTER, M., MULKERRIN, M., & LAZARUS, R. (1992). Mambin, a potent glycoprotein IIb-IIIa antagonist and platelet aggregation inhibitor structurally related to the short neurotoxins. *Biochemistry*, 31, pp. 4766-72.
  
28. DONATO, M. (2008). Purificação, Caracterização Bioquímica e Eletrofisiológica da Toxina Mic6c7NTX da Peçonha da Serpente *Micrurus ibiboboca* (Merrem, 1820). Dissertação de Mestrado. 156f. João Pessoa, PB: UFPB, LTF, Programa de Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos.
  
29. BOHLEN, C., CHESLER, A., SHARIF-NAEINI, R., MEDZIHRADESKY, K., ZHOU, S., KING, D., . . . JULIUS, D. (2011). A heteromeric Texas coral snake toxin targets acid-sensing ion channels to produce pain. *Nature*, 479, pp. 410-14.

30. Freire Donato, M. Peçonha da serpente *Micrurus l. lemniscatus* (Roze, 1967) Caracterização Parcial das Propriedades Bioquímica e Farmacológicas: Neurotoxicidade e Atividade pré Sináptica de Toxinas Três-Dígitos. Ph.D. Thesis, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil, 2014.
31. AIRD, S. D. et al. (2017). Coralsnake Venomics: Analyses of Venom Gland Transcriptomes and Proteomes of Six Brazilian Taxa. *Toxins*, 9, 187, pp. 1-64.
32. OLAMENDI-PORTUGAL, T., BATISTA, C., RESTANO-CASSULINI, R., PANDO, V., VILLA-HERNANDEZ, O., ZAVALETA-MARTÍNEZ-VARGAS, A., . . . POSSANI, L. (2008). Proteomic analysis o the venom from the fish eating coral snake *Micrurus surinamensis*. Novel toxins, their function and phylogeny. *Proteomics*, 8, pp. 1919-32.
33. MOREIRA, K., PRATES, M., ANDRADE, F., SILVA, L., BEIRÃO, P., KUSHMERICK, C., . . . BLOCH JR, C. (2010). Frontoxins, three-finger toxins from *Micrurus frontalis* venom, decrease miniature endplate potential amplitude at frog neuromuscular junction. *Toxicon*, 56, pp. 55-63.

34. DA SILVA, D., DE MEDEIROS, W., BATISTA, I., LEBRUN, I., PIMENTA, D., ABDALLA, F., & SANDOVAL, M. (2011). Characterization of a new muscarinic toxin from the venom of the brazilian coral snake *Micrurus lemniscatus* in rat hippocampus. *Life Sciences*, 89, pp. 931-38.
35. CISCOTTO, P., RATES, B., SILVA, D., RICHARDSON, M., SILVA, L. P., ANDRADE, H., . . . PIMENTA, A. (2011). Venomic analysis and evaluation of antivenom cross-reactivity of South American *Micrurus* species. *J. Proteomics*, 74, pp. 1810-25.
36. Reptile DataBase. Disponível em: [http://reptile-database.reptarium.cz/advanced\\_search?taxon=Elapidae&submit=Search](http://reptile-database.reptarium.cz/advanced_search?taxon=Elapidae&submit=Search). Acesso em: 2 de junho de 2020.

## CAPÍTULO 22

### ATIVIDADE FARMACOLÓGICA DE FOSFOLIPASES A<sub>2</sub> DE SERPENTES ELAPIDAE

Allan Leal

Bruna Trindade Borges

Carlos Gabriel M. de Almeida

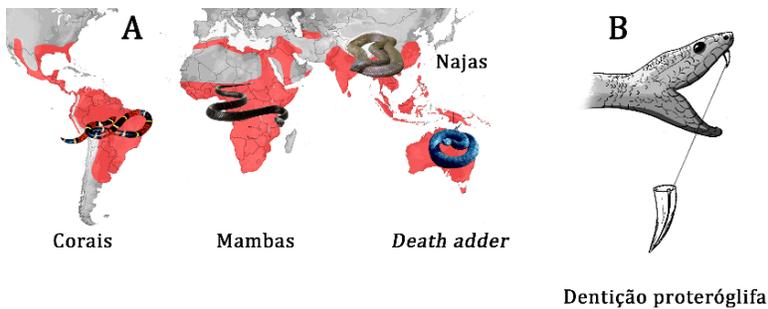
Cháriston André Dal Belo

#### **As Serpentes Elapidae**

As serpentes são uma subordem de répteis escamados pertencentes à ordem Squamata. Atualmente a subordem serpentes possui 29 famílias divididas em 523 gêneros, englobando um total de 3686 espécies descritas <sup>1</sup>. A família Elapidae é encontrada, na maioria dos casos, em regiões tropicais e subtropicais do planeta (**Fig. 1A**). Composta por 56 gêneros, seus membros mais conhecidos incluem Najas, Mambas, Corais, serpentes do mar e as “cobras da morte”, tradução não literal do inglês (death adder) (**Fig. 1A**). Apesar dos gêneros que compõem a família Elapidae possuem

características próprias peculiares, apresentam em comum presas ocas e fixas usadas para inoculação de peçonha (**Fig. 1B**).

**Figura 1:** Distribuição global da família Elapidae e padrão de dentição característico. Em **A**, está representado a distribuição dos principais gêneros que compõem a família elapidae<sup>2</sup>. Em **B**, ilustração da dentição proteróglifa, típica de uma serpente Elapidae.



Fonte: Autoral

## Composição da peçonha de Elapídeos

As peçonhas da família Elapidae são compostas por misturas diversas de componentes orgânicos e inorgânicos<sup>3</sup>(Íons). A porção orgânica é formada por proteínas e enzimas, como as PLA2s (do inglês phospholipase A<sub>2</sub>) e as toxinas do tipo three-finger (3FTxs), que sozinhas representam cerca de 75% da composição total da peçonha, dentre outros componentes minoritários<sup>4</sup> (**Fig. 2**).

Figura 2. Relação de compostos orgânicos e inorgânicos encontrados nas peçonhas de serpentes da família Elapidae<sup>3,5</sup>

Composição da peçonha de elapídeos	
Compostos orgânicos	Compostos inorgânicos
Serinoproteases de peçonha de serpentes (SVSPs)	<b>Íons</b>
Metaloproteases de peçonha de serpentes (SVMPs)	- Cálcio
L-aminoácido oxidase (LAAO)	- Cobre
Peptídeo Kunitz (KUN)	- Ferro
Proteínas secretórias ricas em cisteína (CRiSP)	- Potássio
Peptídeos natriuréticos (NP)	- Magnésio
Fator de crescimento endotelial vascular (VEGF)	- Sódio
Fator de crescimento de nervo (NGF)	- Fósforo
	- Cobalto
	- Zinco

## **Manifestações clínicas do envenenamento elapídico**

Acidentes por serpentes em geral, são classificados pela OMS como doenças tropicais negligenciadas<sup>6</sup>. O envenenamento provocado por picadas de serpentes da família Elapidae, apesar de potencialmente letal, não provoca alteração importante no local da picada. As manifestações do envenenamento elapídico caracterizam-se por dor de intensidade variável, visão borrada ou dupla, pálpebras caídas e aspecto sonolento (**Fig. 2**)<sup>7</sup>. Óbitos, estão relacionados à paralisia dos músculos respiratórios<sup>8</sup>.

## **Fosfolipases A<sub>2</sub>**

As PLA<sub>2</sub> fazem parte de uma superfamília enzimática (fosfolipases), cuja principal atividade é catalisar a hidrólise de fosfolipídeos, gerando como resultado ácidos graxos e lisofosfolipídeos. Existem diferentes tipos de fosfolipases, que nesse capítulo serão classificadas de acordo com seu sítio de ação e

semelhanças entre suas cadeias polipeptídicas. As PLA2 exercem atividade sobre a ligação éster do carbono 2 dos fosfolipídeos, sendo essa uma reação dependente de cálcio<sup>9</sup>.

Formas extracelulares de PLA2 são necessárias para a manutenção da homeostase do organismo sendo também importantes para uma série de processos fisiológicos como a geração de leucotrienos, prostaglandinas (PG) e a contração muscular. Por outro lado, essa enzima também é amplamente encontrada durante processos inflamatórios<sup>10-15</sup>. Dessa forma, as PLA2s podem ser encontradas em diversos fluídos biológicos, células e tecidos (plaquetas, leucócitos, tecido cardíaco, de pulmão, baço, fígado e pâncreas). As PLA2 de peçonhas de serpentes (svPLA2) já foram associadas com diversos efeitos farmacológicos distintos, sendo que em elapídeos, os principais efeitos estão relacionados à miotoxicidade e neurotoxicidade (Floriano et al., 2019; <sup>16-18</sup>.

## **Fosfolipases A<sub>2</sub> e o seu papel no envenenamento elapídico**

As svPLA<sub>2</sub> de elapídeos (**Fig. 3A**) provocam paralisia muscular, geralmente afetando o elemento pré-sináptico da junção neuromuscular (JNM), sendo esse o efeito mais relevante decorrente do envenenamento por elapídeos (**Fig. 3B**). Geralmente, essas toxinas provocam morte da presa por parada respiratória atuando no terminal pré-sináptico da placa motora (**Fig. 3B**), similarmente às beta( $\beta$ )-neurotoxinas<sup>19</sup>. Dessa forma, por não serem capazes de atravessar a barreira hematoencefálica, as  $\beta$ -neurotoxinas afetam principalmente o sistema nervoso periférico<sup>20</sup>. A principal manifestação clínica de seus efeitos neurotóxicos é a fraqueza aguda do sistema muscular esquelético e envolvimento respiratório<sup>8</sup> (**Fig. 3B**).

As PLA<sub>2</sub> neurotóxicas de Elapídeos, tais como a  $\beta$ -bungarotoxina, taipoxina, textilitoxina, dentre outras, possuem diferentes alvos sobre o terminal nervoso motor. Normalmente essas toxinas causam

alterações na membrana plasmática dos neurônios levando a um aumento na concentração de cálcio citosólico, o que favorece a degeneração celular. Essas toxinas também atuam sobre receptores de membrana, sendo que o efeito dependerá das propriedades fisiológicas intrínsecas específicas das células afetadas, pois o mecanismo de ação não difere

18.

A notexina é um exemplo de PLA2 altamente seletiva para células musculares, não afetando nem mesmo mioblastos (células precursoras das fibras musculares). Em tecido muscular esquelético, a notexina causa normalmente dano extensivo e irreversível, podendo causar até miotoxicidade sistêmica<sup>20</sup>.

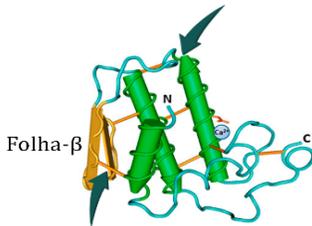
**Figura 3:** Aspectos bioquímicos e fisiopatologia do envenenamento. Em **A**, estrutura tridimensional adaptada de Tonello e colaboradores<sup>21</sup>. Em **B**, Infográfico destacando os principais órgãos do corpo humano que são alvos da toxicidade das fosfolipases A<sub>2</sub> secretadas de peçonhas de serpentes Elapídicas (svPLA2). Destaque para a neurotoxicidade como

efeito predominante e mais relevante do ponto de vista clínico.

A

#### PLA2 - svPLA2

As PLA2 presentes no grupo I (elapídeos) possuem uma extensão de 2-3 aminoácidos que formam um *loop* na estrutura da enzima.



As PLA2 de elapídeos (grupo I) possuem pontes dissulfeto em sua estrutura.

B

#### Neurotoxicidade

Afetando neurônios pré-sinápticos, as svPLA2 podem ocasionar bloqueio da junção neuromuscular.



#### Miotoxicidade seguido de parada respiratória

Danos aos músculos esqueléticos ocasionam morte do indivíduo por parada respiratória

## Mecanismos propostos para a ação tóxica das fosfolipases de Elapídios

O mecanismo de ação neurotóxico das PLA2 de venenos Elapídicos (**Fig. 4**), ainda não foi completamente esclarecido e carece de maiores investigações. Nesse sentido, Vulfius e colaboradores<sup>22</sup> sugerem algumas hipóteses, as quais corresponderiam a uma sucessão de eventos:

1) Dano à membrana plasmática do neurônio pré-sináptico, em decorrência da atividade enzimática, potencializando a fusão de vesículas de acetilcolina com a membrana plasmática, esgotando assim o estoque do neurotransmissor;

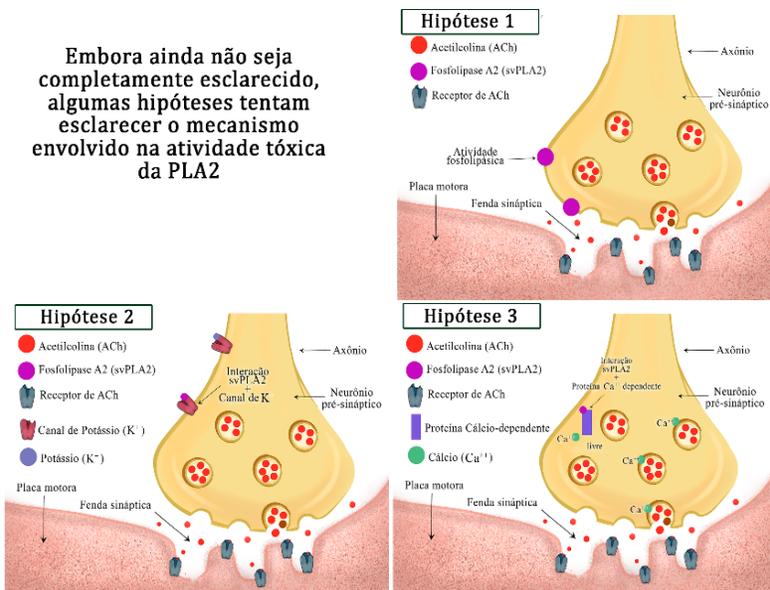
2) Interação das PLA2 com proteínas de membrana específicas (receptores), podendo provocar uma ação farmacológica na célula, independente da atividade enzimática. Um exemplo clássico pode ser encontrado no efeito da PLA2 do veneno de *Micrurus dumerilii carinicauda* (MiDCA1), que é capaz de interagir com canais iônicos de potássio voltagem-dependentes do tipo Kv 2.1<sup>23</sup>, de uma forma semelhante à toxina guanxitoxina, do veneno da tarântula *Plesiophrictus guangxiensis*, inibindo a abertura do canal iônico e impedindo a repolarização do neurônio pré-sináptico. Dessa forma o estoque de acetilcolina também é depletado;

3) Interação das PLA2 com proteínas intracelulares cálcio-dependentes após endocitose ou penetração através do próprio dano causado à membrana

plasmática, em decorrência da atividade fosfolipásica. A presença de lisofosfolípidos na membrana plasmática provoca aumento na concentração de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular e o colapso do potencial de membrana mitocondrial das células nervosas.

Figura 4. Hipóteses conceituais para descrever o mecanismo de neurotoxicidade induzido pelas svPLA2 elapídicas sobre o terminal nervoso motor. A **hipótese 1** é baseada na ação enzimática da neurotoxina lesando a membrana do neurônio pré-sináptico. A **hipótese 2**, estabelece o bloqueio dos canais de potássio voltagem-dependentes, inibindo a repolarização do neurônio pré-sináptico que culmina com a liberação exacerbada de vesículas de ACh e a conseqüente exaustão do terminal nervoso. Na **hipótese 3**, existe a provável interação da PLA2 com proteínas dependentes de  $\text{Ca}^{2+}$ , que podem ativar diversas cascatas bioquímicas intracelulares potencialmente envolvidas na depleção da ACh ou mesmo induzindo apoptose celular.

Embora ainda não seja completamente esclarecido, algumas hipóteses tentam esclarecer o mecanismo envolvido na atividade tóxica da PLA2



## Referências

- 1 McDiarmid, R. W. *Serpentes Linnaeus, 1758* 2019
- 2 Midtgaard, R. (2019)

- 3 Bieber, A. L. in *Snake Venoms* (ed. Lee, C.-Y.) 295–306 (Springer Berlin Heidelberg, 1979)

- 4 Lomonte, B. *et al. Toxicon* 122, 7–25 (2016)

- 5 Tasoulis, T. *et al. Toxins (Basel)*. 9, (2017)

6 Williams, D. J. *et al.* *PLoS Negl. Trop. Dis.* 13, (2019)

7 Saúde, M. da. *Acidentes por animais peçonhentos Serpentes*

8 Bolon, I. *et al.* *PLoS One* 15, e0229989–e0229989 (2020)

9 Floriano, R. S. *et al.* *Arch. Toxicol.* 93, 2065–2086 (2019)

10 Kim, K. P. *et al.* *J. Biol. Chem.* 276, 11126–11134 (2001)

11 Santos-Filho, N. A. *et al.* *Toxicon* 52, 908–917(2008)

12 Yamada, H. *et al.* *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 217, 203–210 (1995)

13 Rostelato-Ferreira, S. *et al.* *J. Venom Res.* 1, 54 (2010)

14 De Freitas Oliveira, C. *et al.* *Toxicon* 53, 560–569 (2009)

15 Sales, T. A. *et al.* *Curr. Med. Chem.* 27, 477–497 (2020)

16 Triggiani, M. *et al.* *J. Allergy Clin. Immunol.* 116, 1000–1006 (2005)

17 Soares, A. M. *et al.* *Toxicon* 42, 855–868 (2003)

18 Tonello, F. *et al.* in (eds. Inagaki, H., Vogel, C.-W., Mukherjee, A. K. & Rahmy, T. R.) 49–65 (Springer Netherlands, 2017)

19 Rey-Suárez, P. *et al.* *J. Proteomics* 136, 262–273 (2016)

20 Montecucco, C. *et al.* *Cell. Mol. Life Sci.* 65, 2897–2912 (2008)

21 Tonello, F. *et al.* in *Snake Venoms* 1–14 (2017)

22 Vulfius, C. A. *et al.* *PLoS One* 12, (2017)

23 Shutter, J. D. *et al.* *Atmos. Meas. Tech. Discuss.* 1–15 (2019).

CAPÍTULO 23  
**VENENOS E TOXINAS NAS TERMINAÇÕES  
NERVOSAS E NEUROMUSCULARES**

Anita de Oliveira Silva  
Éder Ricardo de Moraes

**Terminações nervosas e junções neuromusculares**

As terminações nervosas em indivíduos multicelulares, tais como os vertebrados, formam o elo entre o sistema nervoso central e os ambientes (interno e externo). Especificamente através das sinapses químicas, por intermédio dos neurotransmissores, as terminações nervosas e as junções neuromusculares (JNM) realizam suas funções primordiais: a transmissão de um estímulo elétrico entre células excitáveis.

Pelo fato de as sinapses se organizarem como estruturas cruciais sob o ponto de vista da transmissão de informações, substâncias que agem

nas sinapses, interferindo no seu funcionamento, são tão interessantes para os cientistas ao redor do mundo. Por este motivo, o grande interesse no estudo da ação dos venenos e toxinas animais, bem como extratos vegetais, reside exatamente nos efeitos das toxinas em propriedades biofísicas e farmacológicas das membranas celulares e, mais especificamente, nos canais iônicos pré- e pós-sinápticos<sup>(1,2)</sup>.

### **Canais iônicos das terminações nervosas e junções neuromusculares como alvos de venenos e toxinas**

As características biofísicas, farmacológicas, estruturais e fisiológicas dos canais para íons (sódio, potássio e cálcio) ativados por voltagem de mamíferos têm sido largamente pesquisadas em estudos dos efeitos de venenos e toxinas de plantas e animais, tais como insetos, peixes, caramujos, anfíbios, escorpiões, aranhas e serpentes. Todavia, canais ativados por outros estímulos, como é o caso dos canais iônicos ativados por ácidos (ASIC), canais mecanossensíveis,

receptores ligados à proteína G, e  $N^+/K^+$ -ATPase, entre outros, surgem como novos alvos de pesquisa.

### **Mecanismo da Junção Neuromuscular e possíveis sítios de atuação das toxinas**

A Junção Neuromuscular é uma complexa estrutura composta por três porções: (1) a célula nervosa pré-sináptica; (2) a fibra muscular pós-sináptica; e (3) a fenda sináptica localizada entre as duas unidades anteriores<sup>(3)</sup>.

Quando o terminal pré-sináptico é ativado eletricamente, libera, em quantidades restritas, na fenda sináptica, parte de seu conteúdo de neurotransmissores. Nos vertebrados, especialmente nos mamíferos, o neurotransmissor da JNM é a acetilcolina (ACh), substância que se liga especificamente aos receptores nicotínicos da acetilcolina (nAChR), que por sua vez permitem o fluxo de íons sódio para interior da fibra muscular. A entrada do sódio faz com que a membrana muscular se torne cada vez mais despolarizada, estimulando a liberação de íons cálcio dos estoques intracelulares musculares, o que desencadeia a contração muscular. O relaxamento muscular se inicia

quando a ACh se desconecta dos receptores específicos e é hidrolisada pela enzima acetilcolinesterase, a fibra muscular tende à repolarização, os íons cálcio são recaptados para dentro dos estoques intracelulares e o músculo, então, relaxa<sup>(3,4)</sup>. Toxinas neurotóxicas, vegetais e animais, agem em sinapses de forma a interferir no funcionamento sináptico e, por conseguinte, na liberação e no efeito dos neurotransmissores.

## **Toxinas que agem em Junção Neuromuscular**

### **- Toxinas de plantas**

As toxinas oriundas de plantas com efeitos em receptores de acetilcolina têm o curare como o seu maior expoente. A família curare é endêmica das florestas das Américas do Sul e Central e estudos descrevem que o nervo motor se torna incapaz de excitar o músculo através da placa motora, por impedir que haja ligação entre o neurotransmissor e o receptor, gerando redução da força, e conseqüente relaxamento muscular<sup>(5)</sup>.

## - Toxinas animais

### 1) Serpentes:

As alfa-neurotoxinas representam ingredientes ativos dos venenos de serpentes que agem no funcionamento de nervos periféricos. Causam paralisia muscular aguda e ampla, que, se não tratada, pode levar a insuficiência respiratória e morte por asfixia. As toxinas oriundas de serpentes da família *Elapidae* (corais, najas, mambas, kraits e serpentes marinhas) são as alfa-bungarotoxinas, que inibem as contrações musculares por interação direta da toxina com o nAChR, na célula pós-sináptica, impedindo que o neurotransmissor se ligue ao receptor específico. Esse mecanismo de ação qualifica tais neurotoxinas como curarimiméticas; no entanto, diferentemente dos efeitos reversíveis do curare, as neurotoxinas mostram uma variedade de interações, incluindo interações reversíveis, pseudo-irreversíveis e irreversíveis<sup>(6)</sup>.

Beta e gama-neurotoxinas das serpentes *Elapidae* agem, provavelmente, impedindo que a ACh

seja liberada na fenda sináptica, seja por inibição da captação de colina, seja pela diminuição do influxo de cálcio para dentro dos terminais pré-sinápticos, de forma irreversível<sup>(7)</sup>.

Por outro lado, as fasciculinas, oriundas do veneno de mambas africanas (*Dendroaspis sp.*), possuem efeitos inibitórios seletivos e potentes na Acetilcolinesterase, impedindo a degradação da ACh, acumulando o neurotransmissor nas fendas sinápticas, aumentando o tônus colinérgico por indução de liberação acetilcolina por exocitose através da membrana do neurônio pré-sináptico, o que leva à paralisia plástica<sup>(8)</sup>.

## II) Peixes, Moluscos e Crustáceos

As saxitoxinas (STX) são oriundas de crustáceos e moluscos marinhos, que causam intoxicação alimentar em humanos por ingestão de frutos do mar contaminados pela toxina produzida por dinoflagelados e cianobactérias. Grupos guanidínicos das saxitoxinas carregados positivamente interagem com grupos carboxila carregados

negativamente pertencentes aos canais para sódio ativados por voltagem das células musculares, bloqueando-os e impedindo-os de deflagrar potenciais de ação, com consequente interrupção do mecanismo de excitação-contração. A tetrodotoxina (TTX), presente no peixe baiacu, compõe, juntamente com a saxitoxina, um grupo de alcaloides naturais com excepcional afinidade por canais para sódio ativados por voltagem (Nav). Em ambos os casos há bloqueio do influxo de sódio tanto nos elementos pré- como nos elementos pós-sinápticos nas JNM. Essas toxinas impedem a geração e propagação de potenciais de ação, causando paralisia. Ambos os grupos de toxinas são altamente potentes, com a dose letal para seres humanos na faixa de miligramas, qualificando-os entre os venenos naturais mais potentes da natureza<sup>(9)</sup>.

### III) Caramujos

As alfa-conotoxinas são produzidas por organismos do gênero *Conus*, que habitam as águas tropicais e subtropicais do Ásia e da Oceania. A

ligação dessas alfa-conotoxinas bloqueia os nAChR, impedindo a ligação da ACh e, por conseguinte, o influxo de cátions nas fibras musculares pós-sinápticas<sup>(5,10)</sup>.

#### IV) Anfíbios

A batracotoxina (BTX), oriunda do sapo do gênero dos *Phyllobates*, é uma potente ativadora dos canais para sódio ativados por voltagem e sua ação é mediada pela ligação aos canais iônicos no estado aberto, mantendo-o persistentemente aberto, mesmo em potenciais negativos, impedindo a inativação e o potencial de repouso. Por fim, a ligação da BTX causa perda de seletividade dos canais para sódio ativados por voltagem, facilitando a permeabilidade de íons maiores através do poro do canal<sup>(11)</sup>.

#### V) Escorpiões

Toxinas escorpiônicas (caribdotoxina, agitoxina 2, LqTx, Ts3, entre outras) apresentam afinidade por canais para sódio, para cálcio e para potássio ativados por voltagem, agindo especificamente como bloqueadores de poro,

impedindo o fluxo iônico ou nos sensores de voltagem, impedindo o livre movimento destas partículas essenciais ao pleno funcionamento destes canais iônicos<sup>(12)</sup>.

#### VI) Aranhas

As alfa-neurotoxinas de aranhas resultam em aumento excessivo dos íons cálcio no interior das células pré-sinápticas, deflagrando uma massiva exocitose de neurotransmissores e, em seguida, a degeneração dos terminais nervosos<sup>(13)</sup>.

### **Considerações finais**

Pesquisadores ao redor do mundo têm se dedicado ao estudo de toxinas animais e vegetais na ação em terminações nervosas, bem como nas junções neuromusculares. As toxinas animais e vegetais se mostram muito úteis exatamente pela habilidade de se ligarem a sítios específicos, explicitando mecanismos complexos da ação sináptica. O esforço envolvido na pesquisa de toxinas inéditas justifica-se pela necessidade de compreender como tais

substâncias podem auxiliar no entendimento de condições fisiológicas e fisiopatologias. Como consequência, estudos farmacológicos podem ser realizados com maior eficiência, alcançando melhores resultados terapêuticos e com menores efeitos adversos.

### **Referências**

1. Zhang Y (2015). Why do we study animal toxins? *Zoological research*, 36(4), 183–222.
2. Kalia J, Milescu M, Salvatierra J, Wagner J, Klint JK, King GF, et al. (2015). From foe to friend: using animal toxins to investigate ion channel function. *Journal of molecular biology*, 427(1), 158–175.
3. Afshar Bakooshli M, Lippmann ES, Mulcahy B, Iyer N, Nguyen CT, Tung K, et al. (2019). A 3D culture model of innervated human skeletal muscle enables studies of the adult neuromuscular junction. *eLife*, 8, e44530.
4. Slater CR. (2017). The Structure of Human Neuromuscular Junctions: Some Unanswered Molecular Questions. *International journal of molecular sciences*, 18(10), 2183.

5. Ayvazyan NM, O'Leary VB, Dolly JO, Ovsepian SV. (2019). Neurobiology and therapeutic utility of neurotoxins targeting postsynaptic mechanisms of neuromuscular transmission. *Drug discovery today*, ISSN: 1878-5832, Vol: 24, Issue: 10, Page: 1968-1984.
  
6. Duregotti E, Zanetti G, Scorzeto M, Megighian A, Montecucco C, Pirazzini M, Rigoni M. (2015). Snake and Spider Toxins Induce a Rapid Recovery of Function of Botulinum Neurotoxin Paralysed Neuromuscular Junction. *Toxins*, 7(12), 5322–5336.
  
7. Mohamed Abd El-Aziz T, Garcia Soares A, Stockand JD. (2019). Snake Venoms in Drug Discovery: Valuable Therapeutic Tools for Life Saving. *Toxins*, 11(10), 564.
  
8. Silva A, Hodgson WC, Isbister GK. (2017). Antivenom for Neuromuscular Paralysis Resulting from Snake Envenoming. *Toxins*, 9(4), 143.
  
9. Durán-Riveroll LM, Cembella AD. (2017). Guanidinium Toxins and Their Interactions with Voltage-Gated Sodium Ion Channels. *Marine drugs*, 15(10), 303.

10. Gao B, Peng C, Yang J, Yi Y, Zhang J, Shi Q. (2017). Cone Snails: A Big Store of Conotoxins for Novel Drug Discovery. *Toxins*, 9(12), 397.
11. Tarvin RD, Santos JC, O'Connell L, Zakon HH, Cannatella DC. (2016). Convergent Substitutions in a Sodium Channel Suggest Multiple Origins of Toxin Resistance in Poison Frogs, *Molecular Biology and Evolution*, Volume 33, Issue 4, April 2016, Pages 1068–1080.
12. Dittrich M, Homan AE, Meriney SD. (2018). Presynaptic mechanisms controlling calcium-triggered transmitter release at the neuromuscular junction. *Current opinion in physiology*, 4, 15–24.
13. Duregotti E, Zanetti G, Scorzeto M, Megighian A, Montecucco C, Pirazzini M, Rigoni M. (2015). Snake and Spider Toxins Induce a Rapid Recovery of Function of Botulinum Neurotoxin Paralyzed Neuromuscular Junction. *Toxins*, 7(12), 5322–5336.

## CAPÍTULO 24

### **PEPTÍDEOS ANTIMICROBIANOS EM ARTRÓPODES**

Daniel Moreira dos Santos

Pablo Victor dos Reis

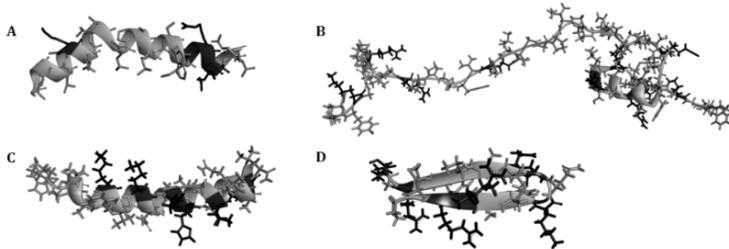
As doenças infecciosas estão entre as principais causas de morte da população humana. Esse fato é causado, em grande parte, pelo surgimento de microrganismos resistentes a maior parte dos antibióticos. Dessa forma, o uso de novas tecnologias para o desenvolvimento de drogas mais eficazes constitui uma estratégia promissora no campo da biotecnologia.

Uma classe promissora de antibióticos são os peptídeos antimicrobianos (PAM). PAMs são antigas ferramentas evolutivas de defesa contra patógenos, amplamente encontrados na natureza em bactérias, fungos, protozoários, plantas e animais <sup>(1)</sup>. Atualmente mais de 1000 moléculas com estas propriedades foram isoladas de diversos organismos <sup>(2)</sup>. Tais

moléculas compartilham características em comum como baixa massa molecular (~ 5 kDa), em geral são carregadas positivamente em pH fisiológico e são, na grande maioria, anfipáticas e podem apresentar na sua estrutura secundária fitas  $\beta$ , alfa-hélices e pontes dissulfeto. (Fig. 1).

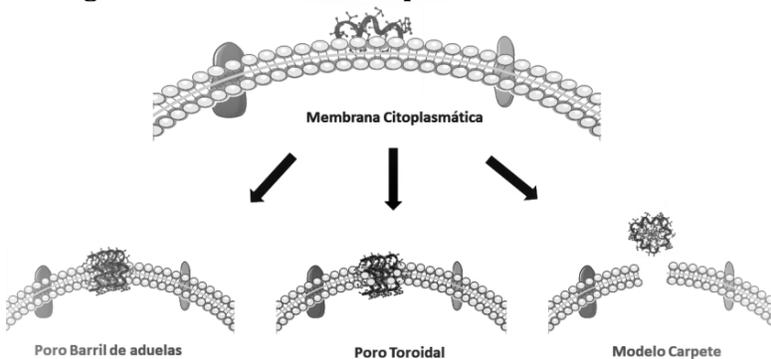
Acreditasse que o seu modo de ação principal seja através da permeabilização da membrana, formando poros na forma Barril ou Toroidal, ou através do mecanismo Carpete (Fig. 2). Além da ação de lise da membrana, foram descritos vários alvos intracelulares prováveis para estes peptídeos, por exemplo, agindo diretamente na transcrição ou replicação do DNA, ativando ou inibindo enzimas, alterando vias de sinalização celular, dentre outros <sup>(1)</sup>. Um das principais fontes de peptídeos antimicrobianos para a pesquisa são os artrópodes, onde mais de 560 peptídeos foram identificados (Fig. 3).

Figura 1. Estrutura de peptídeos antimicrobianos de artrópodes. Em preto estão os aminoácidos positivos. **(A)** Melittina (PDB: 2MLT); **(B)** Penaeidina-3 (PDB: 1UEO); **(C)** LyeTx I <sup>(13)</sup> **(D)** Gomesina (1KFP).



Artrópodes é um filo com grande sucesso evolutivo, alcançando quase todos os habitats possíveis. Apresenta morfologia muito diversificada. Como características principais temos o corpo e apêndices segmentados, exoesqueleto e simetria bilateral. Possuem mais de um milhão de espécies descritas distribuídas em 4 subfilos: Hexapoda (insetos), Crustacea (crustáceos), Chelicerata (aracnídeos) e Myriapoda (centípedes). Apresentam grande importância econômica e médica.

Figura 2. Modo de ação de peptídeos antimicrobianos sobre membranas biológicas. Inicialmente as cargas positivas do peptídeos interagem com as cabeças positivas dos fosfolípides por atração eletrostática, em seguida o peptídeo é internalizado e pode apresentar três mecanismos de permeabilização distintos. Modelo Barril: É formado um poro com suas paredes formadas apenas pelos PAMs. Modelo Toroidal: As paredes do poro são formadas tanto pelos peptídeos quanto pelos lipídeos. Modelo Carpete: os peptídeos têm ação semelhante a um detergente, causando o rompimento da membrana.



Como estes animais não possuem sistema imune adaptativo desenvolvido a sua resposta inata precisa apresentar alta eficiência, desta forma os PAMs são uma peça fundamental de sua defesa imunológica <sup>(3)</sup>. Estes são encontrados principalmente na sua

hemolinfa, mas temos diversas toxinas com características de PAMs sendo identificadas em suas peçonhas, apesar de sua função neste local ainda não ser completamente compreendida. Como os PAMs de artrópodes apresentam uma grande variedade estrutural e funcional com várias origens evolutivas possíveis, descreveremos a atividade e estrutura de alguns grupos desses peptídeos com características marcantes.

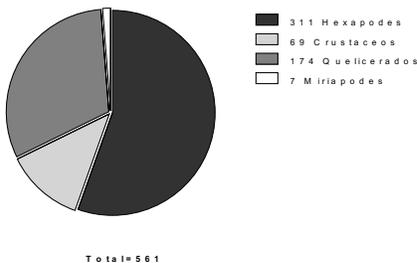


Figura 3. Peptídeos antimicrobianos em insetos. Dados de 22/04/2020<sup>(3)</sup>. Fonte autoral.

### **PAMs em Hexapoda**

Atualmente temos 311 PAMs descritos em insetos (Fig. 3)<sup>(3)</sup>. Podem ser divididos em 3 grupos baseados em sua sequência peptídica e em sua estrutura:

Cecropinas são peptídeos lineares que formam  $\alpha$ -hélice sem a presença de resíduos de cisteína; Defensinas que apresentam de 3 ou 4 pontes dissulfeto e por 3 domínios que constituem o loop flexível de sua região *N*-terminal; peptídeos com uma quantidade alta de resíduos de prolina e ou glicina, esse grupo contém as Attacinas, Lebocinas, Drosocinas, Dipterocinas, Metchnikowinas, Ponerocinas, Jelleines, Apisiminas, Pyrrhocoricinas, Persulcatusinas e as Melitinas. Com atividades antimicrobianas em bactérias Gram-positivas e e/ou em Gram-negativas. Os PAMs de insetos têm o seu IC<sub>50</sub> na casa dos micro molar <sup>(4)</sup>.

Destacamos a Melitina, é uma toxina peptídica encontrada na peçonha da abelha *Apis mellifera*, com 26 resíduos de aminoácidos (Fig. 1a). Além de uma ampla atividade antibacteriana, incluindo bactérias Gram-positivas e Gram-negativas <sup>(5)</sup> a melitina tem atividade em *Xanthomonas oryzae pv. Oryzae*, uma bacteriose que afeta o arroz demonstrando um grande potencial desse peptídeo no uso como

proteção de plantas <sup>(6)</sup>. Assim como outros peptídeos antimicrobianos, a Melittina se liga a membrana por meio da interação com as cargas negativas dos fosfolipídios formando poros que em seguida induzem uma ruptura da membrana causando lise celular <sup>(7)</sup>. Nos estudos de Akbari e colaboradores <sup>(8)</sup> demonstrou-se um efeito sinérgico da melitina com antibióticos convencionais contra isolados de bactérias resistentes tais como *Acinetobacter baumannii* e *Pseudomonas aeruginosa*. Nesse estudo eles demonstraram que ao utilizar melitina com doripenem reduziram a concentração inibitória mínima (CIM) de 61,5µg/mL para 51,5 µg/mL em isolados de *A. baumannii*.

### **PAMs em Miriápodes**

Os peptídeos antimicrobianos de Myriapoda assim como os de insetos começaram com estudos a partir de sua hemolinfa. Chaparro e da Silva Junior <sup>(9)</sup> isolaram e caracterizaram a partir da hemolinfa da lacraia *Scolopendra viridicornis*, a Lacrain. Com uma

sequência de 9 resíduos de aminoácidos (RYPAVGYT) esse peptídeo demonstrou atividade somente em bactérias Gram-negativas sem apresentar atividade hemolítica contra eritrócitos humanos.

### **PAMs em Crustáceos**

Os crustáceos possuem grande importância econômica pela pesca e consumo humano. Devido a isto tem sido alvo de vários estudos, se destacando a presença de PAMs especialmente na sua hemolinfa.

Os primeiros PAMs caracterizados em crustáceos foram as Penaeidinas, isoladas do camarão *Litopenaeus vannamei*. Desde então diversas Penaeidinas tem sido caracterizadas <sup>(10)</sup>. Diversos testes têm demonstrado sua atividade contra Bactérias Gram-positivas, Gram-Negativas e fungos. Elas possuem de 60 a 90 aminoácidos formando uma estrutura única entre os PAMs, com dois domínios distintos, apresentando um *N*-terminal rico em prolinas e uma região *C*-terminal rica em cisteínas (Fig. 1b). Alguns tipos de Penaeidinas podem promover a agregação de

bactérias através de sua ligação aos seus polissacarídeos, facilitando a sua fagocitose.

Crustinas são proteínas antimicrobianas encontradas em diversos grupos de crustáceos. Apresentam um domínio WAP (Do inglês “Whey Acidic Protein”, proteína ácida de soro de leite) com sua massa molecular variando de 6-22 kDa. São encontrados 4 subtipos de crustinas (I a IV) <sup>(11)</sup>, cada qual apresentando grande variação estrutural e funcional, podendo ter atividade contra bactérias Gram-positivas, Gram-negativas, fungos e atividade anti-proteolítica.

### **PAMs em chelicerados**

A primeira atividade antimicrobiana descrita em quelicerados foi encontrado por Xu e colaboradores, na aranha *Lycosa singoriensis* (1989)<sup>(12)</sup> desde então 174 novos peptídeos foram depositados em bancos de dados (Fig. 3). Estes têm sido encontrados principalmente nas suas peçonhas e em sua hemolinfa. Apresentam uma grande diversidade

estrutural, se destacando os peptídeos em alfa-hélice e os peptídeos ricos em ponte dissulfeto.

A peçonha das tarântulas da família Lycosidae tem se mostrado uma rica fonte de PAMs com diversas moléculas apresentando atividade contra bactérias Gram-positivas, Gram-negativas e fungos <sup>(13)</sup>. São peptídeos pequenos, apresentando de 16 a 31 aminoácidos, com estrutura em alfa-hélice anfipática (Fig 2c). A sua estrutura tem sido modificada tanto para acentuar a atividade antimicrobiana como inseticida apresentando resultados expressivos após a sua expressão em plantas <sup>(13)</sup>, indicando o seu potencial biotecnológico.

O PAM Gomesina foi purificado a partir de hemócitos da caranguejeira *Acanthoscurria gomesiana*. A sua atividade se baseia principalmente na permeabilização da membrana plasmática, mas também já foi verificada que ela apresenta modulação do sistema imune. A sua estrutura é semelhante a defensinas, apresentando duas fitas betas estabilizadas por duas pontes dissulfeto (Fig. 2d.).

Este peptídeo apresenta com um amplo espectro de ação, tendo atividade sobre bactérias, fungos, anti-malária e anti-Leishmania <sup>(14)</sup>.

### **Potencial biotecnológico**

PAMs apresentam amplos espectros de ação em bactérias, fungos e em vírus e é notório que a coevolução desses componentes da imunidade inata ofereça uma alternativa como um protótipo de novos fármacos ao combate de microrganismo resistentes aos antimicrobianos comerciais. Atualmente 7 PAMs foram aprovados pelo Food and Drug Administration (FDA) e estão sendo comercializados, em sua maioria, como medicamentos de uso tópico, e alguns casos, de forma injetável para o tratamento de infecções bacterianas. Dos 7 PAMs aprovados 5 são peptídeos ativos em membranas e dentre desses destacamos a Colistina que forma poros ao interagir com a membrana citoplasmática causando conseqüentemente uma lise celular <sup>(15)</sup>. Uma alternativa ao uso é a expressão de AMPs em vegetais,

o peptídeo Lycotoxina I modificado <sup>(16)</sup>, após a sua expressão em plantas de tabaco, reduziu o ataque de suas folhas por bactérias e insetos.

### **Considerações finais**

Com o surgimento de bactérias multirresistentes e a diminuição de custo produção de peptídeos sintéticos, AMPs de artrópodes tem se mostrado uma interessante alternativa terapêutica, especialmente devido a sua grande variedade de atividades e estruturas e a sua baixa indução de resistência em patógenos.

### **Referências**

(1) Raheem N, Straus SK. Mechanisms of Action for Antimicrobial Peptides With Antibacterial and Antibiofilm Functions. *Front Microbiol.* 2019 Dec 12;10:2866.

(2) Rolff J, Schmid-Hempel P. Perspectives on the evolutionary ecology of arthropod antimicrobial peptides. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2016 May 26;371(1695). pii: 20150297.

(3) UNMC. Antimicrobial Peptide Database.  
Disponível em: <http://aps.unmc.edu/AP/main.php>.  
Acessado em 21 de abr. de 2020.

(4) WU, Q.; PATOČKA, J.; KUČA, K. Insect  
Antimicrobial Peptides, a Mini Review. In: *Toxins*  
(Basel), 2018. v. 10.

(5) Picoli, T.; Peter, C.M.; Zani, J.L.; Waller, S.B.; *et al.*  
Melittin and its potential in the destruction and  
inhibition of the biofilm formation by *Staphylococcus*  
*aureus*, *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*  
isolated from bovine milk. *Microb. Pathog.* 2017, 112,  
57–62.

(6) Shi, W.; Li, C.; Li, M.; Zong, X. *et al.* Antimicrobial  
peptide melittin against *Xanthomonas oryzae* pv.  
*oryzae*, the bacterial leaf blight pathogen in rice. *Appl.*  
*Microbiol. Biotechnol.* 2016, 100, 5059–5067.

(7) Rady, I.; Siddiqui, I.A.; Rady, M.; Mukhtar, H.  
Melittin, a major peptide component of bee venom,  
and its conjugates in cancer therapy. *Cancer Lett.*  
2017, 402, 16–31.

(8) Akbari, R.; Hakemi Vala, M.; Pashaie, F.; Bevalian, P. et al. Highly synergistic effects of melittin with conventional antibiotics against multidrug-resistant isolates of *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Microb. Drug Resist.* 2018.

(9) Chaparro. E.; da Silva PI Junior. Lacrain: the first antimicrobial peptide from the body extract of the Brazilian centipede *Scolopendra viridicornis*. *Int J Antimicrob Agents.* 2016 Sep;48(3):277-85.

(10) Cuthbertson BJ, Deterding LJ, Williams JG, Tomer KB, *et al.* Diversity in penaeidin antimicrobial peptide form and function. *Fish Shellfish Immunol.* 2019 Mar;86:82-92.

(11) Destoumieux D, Muñoz M, Cosseau C, Rodriguez J, *et al.* Penaeidins, antimicrobial peptides with chitin-binding activity, are produced and stored in shrimp granulocytes and released after microbial challenge. *J Cell Sci.* 2000 Feb;113(3):461-9.

(12) Xu, K.; Ji, Y.; Qu, X. Purification and Characterization of an Antibacterial Peptide from Venom of *Lycosa Singoriensis*. *Acta Zool. Sin.* 1989, 35 (3), 300-305

(13) Melo-Braga MN, Almeida FM, Dos Santos DM, de Avelar Júnior JT, *et al.* Antimicrobial Peptides From Lycosidae (Sundevall, 1833) Spiders. *Curr Protein Pept Sci.* 2020 Jan 15. [Epub ahead of print]

(14) Tanner JD, Deplazes E, Mancera RL. The Biological and Biophysical Properties of the Spider Peptide Gomesin. *Molecules.* 2018 Jul 16;23(7).

(15) Chen, C.H., Lu, T.K. Development and Challenges of Antimicrobial Peptides for Therapeutic Applications. *Antibiotics (Basel).* 2020 Jan 13;9(1)

(16) Johnson ET, Dowd PF, Hughes SR. Expression of a wolf spider toxin in tobacco inhibits the growth of microbes and insects. *Biotechnol Lett.* 2014 Aug;36(8):1735-42.

## CAPÍTULO 25

# **PNPP-19, PEPTÍDEO SINTÉTICO DERIVADO DE UMA TOXINA DA ARANHA *PHONEUTRIA* *NIGRIVENTER*, COMO POTENCIAL FÁRMACO PARA O TRATAMENTO DA DISFUNÇÃO ERÉTIL.**

Carolina Nunes da Silva

Maria Elena de Lima

### **Disfunção erétil como um problema de saúde**

Disfunção erétil (DE) é uma condição multifatorial, corriqueira e se estabelece quando há uma constante incapacidade para atingir ou manter uma ereção suficiente para um desempenho sexual satisfatório (National Institutes of Health - NHI). Calcula-se que 10% a 20% dos adultos do sexo masculino no mundo sofram com DE (1). No Brasil, cerca de 45,1% dos homens adultos apresentam algum grau de dificuldade de ereção (2). Apesar de não ser letal, a DE afeta a qualidade de vida e o bem

estar não só de homens, como também de suas parceiras (3).

O principal fator de risco associado a disfunção erétil é a idade (4), mas também está ligado a várias comorbidades, incluindo doenças crônicas como depressão, doenças cardíacas, hipertensão e *diabetes mellitus* (5). Os homens que têm estas doenças, geralmente, apresentam disfunção erétil moderada a grave e são os menos responsivos à principal farmacoterapia atual (6).

O tratamento de primeira linha para disfunção erétil envolve o uso dos fármacos orais inibidores da fosodiesterase-5 (7). Estes fármacos atuam na via do óxido nítrico e monofosfato de guanosina cíclico (NO/GMPc) promovendo relaxamento da musculatura lisa do corpo cavernoso peniano. Contudo, a eficácia destes inibidores diminui quando a síntese de óxido nítrico é prejudicada (8), evidenciando a necessidade de novas moléculas e alvos terapêuticos (9).

Nesse contexto, estudos com toxinas animais que promovem um relaxamento da musculatura lisa

do corpo cavernoso e ereção do pênis, podem representar novas alternativas para o tratamento da disfunção erétil.

### **A aranha *Phoneutria nigriventer* e o priapismo**

A aranha *Phoneutria nigriventer* foi descrita por Keyserling em 1891 e é uma das espécies mais envolvidas em envenenamento humano no Brasil (10–12)(Figura 1). Aranhas desta espécie, possuem hábitos noturnos, são solitárias, agressivas e os sintomas do envenenamento, em indivíduos jovens, decorrentes da picadura incluem priapismo (13).

O priapismo é uma ereção peniana persistente, dolorosa, independente de estímulo sexual sendo um dos sintomas observados em acidentes graves.

- Toxinas da peçonha da aranha *P. nigriventer* que causam priapismo.

O priapismo e a ereção experimental em ratos e camundongos, foram descritos após a injeção de duas toxinas purificadas da peçonha desta aranha, PnTx2-5 e PnTx2-6 também conhecidas como  $\delta$ -

CNTX-Pn2b e  $\delta$ - CNTX-Pn2a, respectivamente (14,15). Desde então, muitos estudos têm sido publicados buscando-se entender a ação dessas toxinas, no mecanismo da ereção.

Figura 1- Aranha *Phoneutria nigriventer*. (Fotografada por Daniel Moreira Santos, Universidade Federal de São João del-Rey, Divinópolis, Minas Gerais, Brasil).



Essas duas toxinas atuam nos canais para sódio dependentes de voltagem (Nav) e induzem a liberação de óxido nítrico (14,16,17). Propõe-se que o NO liberado aja no músculo liso, aumentando o relaxamento, culminando na ereção.

- Toxina PnTx2-6 ( $\delta$ - CNTX-Pn2a)

A toxina PnTx2-6 quando testada *in vivo*, potencializou a função erétil em animais normotensos, reverteu a disfunção erétil em ratos hipertensos (DOCA-salt) (15), bem como melhorou a função erétil em ratos idosos (69-70 semanas) (18). Quando testada *in vitro*, aumentou o relaxamento de tiras de corpo cavernoso de animais normotensos, de camundongos diabéticos e nocautes para óxido nítrico sintase (NOS) endotelial (19). Além disso, esta toxina modificou a expressão de alguns genes envolvidos na via do óxido nítrico no tecido erétil de camundongos (20). Portanto, PnTx2-6 mostrou-se como uma excelente ferramenta farmacológica para estudar a função erétil.

Contudo, o fato de PnTx2-6 ser altamente tóxica apresentando vários efeitos colaterais, tais como: intensa congestão vascular nos rins, fígado, pulmões, miocárdio, discreto edema cerebral, prolongada dor em diferentes modelos animais e morte (13,21) impossibilita seu uso como um fármaco. Além disso, a obtenção de grandes

quantidades dessa toxina também é um fator limitante, sua expressão em sistema heterólogo é possível (22), entretanto, esta é uma técnica cara e sua síntese química é complexa, dificultando a obtenção de maiores quantidades e dos estudos com a mesma.

### **PnPP-19, peptídeo sintético derivado de PnTx2-6**

Na tentativa de contornar tais limitações, nosso grupo optou por estudar a ação de um peptídeo sintético mais simples que a toxina e que representasse o sítio ativo da mesma. Assim, um peptídeo já desenhado *in silico* a partir da toxina PnTx2-6, para fins de estudos de imunologia e representando sua região mais exposta, como um epítopo descontínuo (16,23), foi sintetizado com algumas modificações na sua sequência e foi denominado PnPP-19 (*Phoneutria nigriventer* Peptídeo Potencializador, com 19 resíduos de aminoácidos), após verificarmos sua ação na função erétil (24).

PnPP-19 é facilmente sintetizado, é estável e potencializou a função erétil de murinos, induzindo irrelevante imunogenicidade e sem sinais de toxicidade evidentes. Além do mais, o peptídeo não foi hiperalgésico, ao contrário induziu antinocicepção (25) e, surpreendentemente, não agiu nos canais Nav, porém atuou modulando a expressão das enzimas NOS (24).

PnPP-19 mostrou-se como um potencial e promissor candidato a fármaco, não só como potencializador da função erétil, mas também para reverter o fenótipo de DE em animais diabéticos e hipertensos (26). O modo de ação deste peptídeo é o seu grande diferencial em relação à atual farmacoterapia, uma vez que PnPP-19 aumenta a produção de NO/GMPc sem elicitar efeitos secundários. Além disso, o peptídeo não exerceu ação sobre o coração de ratos e possui um efeito sinérgico com inibidores da fosfodiesterase-5, podendo ser um modelo alternativo para o tratamento da DE, especialmente para aqueles pacientes que não

respondem ao tratamento de primeira linha (24,26). PnPP-19 foi capaz de atravessar a pele, o que permite seu uso em formulação para aplicação tópica (26,27), tendência atual, uma vez que é esperado que o fármaco para tratamento da DE, apresente um tempo aceitável de eficácia, seja de fácil administração e com minimização de possíveis efeitos adversos. O quadro 1 resume os estudos obtidos até o momento com a toxina e o peptídeo sintético.

**Quadro 1. Ações da toxina PnTx2-6 e do peptídeo sintético PnPP-19.**

Ações	PnTx2-6	PnPP-19
Potencializa a função erétil <i>in vivo e in vitro</i> em diferentes modelos animais.	SIM	SIM
Reverte o quadro de DE em animais hipertensos e diabéticos.	SIM	SIM
Atua nos canais Navs.	SIM	NÃO
Atua no coração isolado de ratos.	SIM	NÃO
Efeitos adversos, como: intensa congestão vascular nos rins, fígado, pulmões, miocárdio, discreto edema cerebral e hiperalgesia.	SIM	NÃO
Imunogenicidade.	NT*	BAIXA
Liberação de óxido nítrico via modulação das enzima NOS.	SIM	SIM
Permeia a pele humana e de ratos	NT*	SIM

\*NT – Não testado

## **Considerações finais**

Estes dados ilustram a importância dos estudos com as toxinas animais, uma vez que as pesquisas com a toxina PnTx2-6 permitiram compreender o seu modo de ação e serviram como base para a proposição de um peptídeo sintético e para os testes farmacológicos com o mesmo. Portanto, PnPP-19 mostra-se como um candidato promissor para a obtenção de um fármaco alternativo para o tratamento de disfunção erétil.

## **Agradecimentos**

Nossos projetos foram apoiados pelas agências de fomento: CNPq, CAPES e FAPEMIG.

## **Referências**

1. Derogatis LR, Burnett AL. The epidemiology of sexual dysfunctions. *Journal of Sexual Medicine*. 2008.
2. Abdo CHN, et. al. Erectile dysfunction: Results of the Brazilian sexual life study. *Rev Assoc Med*

- Bras. 2006.
3. Chevret-méasson M, Lavallée E, Troy S, Arnould B, Oudin S, Cuzin B. Improvement in quality of sexual life in female partners of men with erectile dysfunction treated with sildenafil citrate: Findings of the index of sexual life (ISL) in a couple study. *J Sex Med.* 2009.
  4. Johannes CB, Araujo AB, Feldman HA, Derby CA, Kleinman KP, McKinlay JB. Incidence of erectile dysfunction in men 40 to 69 years old: Longitudinal results from the Massachusetts male aging study. *J Urol.* 2000.
  5. Albersen M, Mwamukonda KB, Shindel AW, Lue TF. Evaluation and treatment of erectile dysfunction. *Med Clin North Am* [Internet]. 2011;95(1):201–12. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.mcna.2010.08.016>
  6. Yohannes E, Chang J, Tar MT, Davies KP, Chance MR. Molecular targets for diabetes mellitus-associated erectile dysfunction. *Mol Cell Proteomics.* 2010;
  7. Hatzimouratidis K, et al. Guidelines on male sexual dysfunction: erectile dysfunction and

- premature ejaculation. Eur Urol. 2010;
8. Kalsi JS, et al. A nitric oxide-releasing PDE5 inhibitor relaxes human corpus cavernosum in the absence of endogenous nitric oxide. J Sex Med. 2005;
  9. Stallmann-Jorgensen I, Webb R. Emerging Molecular Targets for Treatment of Erectile Dysfunction: Vascular and Regenerative Therapies on the Horizon. Curr Drug Targets. 2015.
  10. Lucas S. Spiders in Brazil. Toxicon. 1988.
  11. Bucaretychi F, Mello SM, Vieira RJ, Mamoni RL, Blotta MHSL, Antunes E, et al. Systemic envenomation caused by the wandering spider *Phoneutria nigriventer*, with quantification of circulating venom. Clin Toxicol. 2008;46(9):885–9.
  12. Peigneur S, de Lima ME, Tytgat J. *Phoneutria nigriventer* venom: A pharmacological treasure. Toxicon. 2018.

13. Cordeiro M do N, et. al.,. The purification and amino acid sequences of four Tx2 neurotoxins from the venom of the Brazilian “armed” spider *Phoneutria nigriventer* (Keys). *FEBS Lett.* 1992;
14. Yonamine CM. Blockade of neuronal nitric oxide synthase abolishes the toxic effects of Tx2-5, a lethal *Phoneutria nigriventer* spider toxin. *Toxicon.* 2004;
15. Nunes KP, et al. Tx2-6 toxin of the *Phoneutria nigriventer* spider potentiates rat erectile function. *Toxicon.* 2008;51(7):1197–206.
16. Matavel A, et al. Structure and activity analysis of two spider toxins that alter sodium channel inactivation kinetics. *Biochemistry.* 2009;48(14):3078–88.
17. Nunes KP, et al. Nitric oxide-induced vasorelaxation in response to pntx2-6 toxin from *phoneutria nigriventer* spider in rat cavernosal tissue. *J Sex Med.* 2010;7(12):3879–88.
18. Nunes KP, et. al. Erectile Function Is Improved in Aged Rats by PnTx2-6, a Toxin from

Phoneutria nigriventer Spider Venom. J Sex Med. 2012;9(10):2574–81.

19. Nunes KP, et al. Increased cavernosal relaxation by Phoneutria nigriventer toxin, PnTx2-6, via activation at NO/cGMP signaling. Int J Impot Res. 2012;
20. Villanova FE, et. al., . Erection induced by Tx2-6 toxin of Phoneutria nigriventer spider: Expression profile of genes in the nitric oxide pathway of penile tissue of mice. Toxicon. 2009;54(6):793–801.
21. Leite KRM, et.al. Phoneutria nigriventer spider toxin tx2-6 causes priapism and death: A histopathological investigation in mice. Toxicon. 2012;60(5):797–801.
22. Torres FS, et. al.,. Functional expression of a recombinant toxin - rPnTx2-6 - active in erectile function in rat. Toxicon. 2010;
23. Fleury C. Bioinformatics tools dedicated to the study of the structure-function-antigenicity relationship in animal peptide toxins.

Universidade Federal de Minas Gerais; 2009.

24. Silva CN, et. al., PnPP-19, a Synthetic and Nontoxic Peptide Designed from a Phoneutria nigriventer Toxin, Potentiates Erectile Function via NO/cGMP. *J Urol*. 2015;
25. Freitas ACN, et. al. PnPP-19, a spider toxin peptide, induces peripheral antinociception through opioid and cannabinoid receptors and inhibition of neutral endopeptidase. *Br J Pharmacol*. 2016;173(9):1491–501.
26. Nunes da Silva C, et al. PnPP-19 Peptide Restores Erectile Function in Hypertensive and Diabetic Animals Through Intravenous and Topical Administration. *J Sex Med* [Internet]. 2019;16(3):365–74. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jsxm.2019.01.004>
27. De Marco Almeida F, et al. Physicochemical Characterization and Skin Permeation of Cationic Transfersomes Containing the Synthetic Peptide PnPP-19. *Curr Drug Deliv*. 2018;15(7):1064–71.

CAPÍTULO 26

**TOXINAS E PEPTÍDEOS DE ARANHA E VESPA COM  
ATIVIDADE NEUROPROTETORA**

Wagner Ferreira dos Santos

**Introdução**

As aranhas e vespas têm evoluído por 305 e 100 milhões de anos, respectivamente. Suas peçonhas têm sido usados na pesquisa básica e como modelo de novas drogas, para mitigar diversas neuropatologias, principalmente nos países desenvolvidos. Entretanto, estes países não possuem uma rica biodiversidade como a nossa. Não obstante, no Brasil os estudos em toxinologia são negligenciados por fundações de apoio a pesquisa. Além de serem foco importante de estudos acadêmicos e de medicina translacional, são fonte de riqueza para o país. Por exemplo, o captopril, usado para o controle da hipertensão, é um análogo de um peptídeo da peçonha da serpente *B. jararaca*,

que é comercializada pela Bristol-Myers Squibb, com um faturamento anual estimado em US\$ 5 bilhões.

**Palavras-chave:** aranhas, vespas, neuroproteção, GABA, *L*-Glutamato

### **Toxinas de aranhas com atividade neuroprotetora**

Os trabalhos pioneiros com as acil-poliaminas, da aranha *Argiope lobata*, mostraram propriedades anticonvulsivante e neuroprotetora.

As culturas primárias de células cerebelares de rato foram usadas para avaliar os potenciais efeitos neuroprotetores da argiotoxina-636 (ArgTX-636), isolada da peçonha de *A. lobata*. É potente antagonista dos receptores ionotrópicos de L-Glu e paralisante de insetos. A ArgTX-636 diminuiu a concentração intracelular do Ca<sup>2+</sup>, causada pelo NMDA. A ArgTX-636 protegeu neuronios contra o NMDA, foi sintetizada e patenteada.

No Japão estudaram a peçonha da aranha “Joro” (*Trichonephila clavata*). A JSTX isolada da aranha “Joro” suprimiu seletivamente os potenciais

pós-sinápticos excitatórios (EPSPS) de lagosta. Em alta dose a JSTX bloqueou irreversivelmente os EPSPS. A JSTX bloqueou o potencial de L-Glu na membrana pós-sináptica. A peçonha desta aranha contém bloqueadores específicos dos receptores de L-Glu, nas junções neuromusculares dos crustáceos e de vertebrados.

Na preparação de fatias de cérebro de ratos a JSTX suprimiu respostas sensitivas em neurônios piramidais hipocampais, das CA1 e CA3. O L-Glu media estes dois sistemas, mostrando que a sua inibição colaboraria para o controle de alterações no sistema excitatório de invertebrados e mamíferos, em situações normais e em neuropatologias, com potencial atividade neuroprotetora.

Os efeitos da JSTX e o análogo, 1-naftil acetilpermina (Naspm) foram verificados em fatias da CA1 do hipocampo de gerbil. A Naspm deprimiu as correntes pós-sinápticas excitatórias (EPSCs) mediadas por canais de receptores não NMDA. A Naspm bloqueou as correntes de canal único dos

neurônios isquêmicos da CA1. Como as EPSCs nos neurônios da CA1 após isquemia são mediados por condutâncias mediadas por receptores não NMDA permeáveis a  $Ca^{2+}$ . A Naspim e JSTX são eficazes no bloqueio de EPSCs anormais, que podem induzir o acúmulo de  $Ca^{2+}$ , inibindo a morte neuronal.

A seletividade da morte celular induzida pelo AC dos neurônios motores na ELA, em comparação com os neurônios do corno dorsal, sugere que esse mecanismo possa realmente contribuir para a vulnerabilidade seletiva dos neurônios motores na ELA. A JSTX também inibiu a morte destes neuronios *in vitro*, induzida por AC<sup>(1)</sup>.

A peçonha e componentes da aranha *Parawixia bistriata*, tem sido um modelo de estudo em neurofarmacologia, medicina translacional e como bioinseticida. Esta foi a primeira aranha social descrita que possui compostos, em uma mesma peçonha, que afetam os transportes de GABA e L-Glu.

A parawixina2 (antiga FrPbAII) isolada da peçonha de *P. bistriata* foi injetada na Substancia

Nigra Pars Reticulata (SNPr) de ratos, ela evitou convulsões por bicuculina induzidas pelo bloqueio GABAérgico da Área tempestas. Sua ação é sobre transportadores glicinérgicos e GABAérgicos. Este composto é um ponto de partida para desenvolver moléculas que possam mitigar alterações nessa neurotransmissão.

A parawixina2 inibe a captação sinaptosômica de GABA, em ratos, de maneira dependente da dose. A parawixina2 é capaz de atravessar a barreira hematoretiniana e proteger as camadas da retina submetidas a condições de isquêmica-reperfusão. Esses estudos fornecem uma melhor compreensão dos mecanismos neuroquímicos envolvidos na função cerebral GABAérgica e para desenvolvimento de novas ferramentas terapêuticas.

A parawixina2 inibiu convulsões induzidas pela pilocarpina, PIC, AC e PTZ, em ratos. Quando ensaiada para deficiências cognitivas no labirinto aquático de Morris, não alterou as latências de escape dos animais tratados. Injeções sistêmicas de PTZ i.c.v,

em ratos, a cada 48 horas, por 28 dias, induziu convulsões tônicas-clônicas. Os ratos foram tratados i.c.v. com diferentes doses de Parawixina2. A injeção diária de Parawixin2 inibiu o início das crises, dependente da dose.

A parawixina2 também foi estudada em modelo de epilepsia do lobo temporal (ELT). Os ratos foram submetidos a ELT, usando pilocarpina e lítio. A parawixina2 reduziu a frequência de convulsões espontâneas recorrentes. Os animais tratados com a parawixina2 tiveram proteção neuronal na CA3 e hilus e inibiu a perda de células parvalbuminérgicas, nas camadas do DG<sup>(2)</sup>.

Na peçonha de *P. bistriata* também tem sido estudada a parawixina1 (antiga PbTx1.2.3). Ela estimulou seletivamente a captação de L-Glu em sinaptossomas de ratos. A captação de L-Glu, ocorre quando os receptores ionotrópicos de L-Glu ou canais de sódio e cálcio dependentes de voltagem são completamente inibidos. No modelo de lesão retiniana experimental, a parawixina1 foi

neuroprotetora das camadas nucleares externa e interna e de células ganglionares<sup>(3)</sup>.

Além das compostos neuroativos Parawixina 1 e 2, a Parawixina10 (Pwx10) foi isolada da peconha de *P. bistriata*, a qual inibiu convulsões induzidas por ácido cainico, NMDA e PTZ de maneira dependente da dose, em ratos. Houve aumentos na captação de L-[<sup>3</sup>H]Glu e de [<sup>3</sup>H]glicina, em sinaptosomas de ratos. Os resultados demonstram que este composto foi anticonvulsivante e neuroprotetor<sup>(4)</sup>.

A Pwx10 mostrou efeito neuroprotetor, quando ratos foram submetidos a crises convulsivas induzidas por NMDA, sendo mais pronunciado quando o composto foi administrado uma hora após o NMDA, nas áreas CA1, CA3 e hilus.

Quando a RT10 foi pré-incubada em cultura de neurônio e glia, antes dos insultos do L-Glu foi neuroprotetora. Tanto a fração isolada Pwx10, quanto seu análogo sintético potenciaram a atividade dos transportadores EAAT1 e EAAT2, expressos em células COS-7, aumentando a captação do L-Glu.

Foram neuroprotetoras *in vitro*, contra a excitotoxicidade em culturas primárias de glia, também aumentando a captação do L-Glu.

Mais de 50 estruturas químicas de moléculas presentes na peçonha da *P. bistriata* foram descritas. Uma estrutura química da parawixina2 foi sugerida. Um análogo (L-2-Amino-5-ureidopentanamida) é comercializado por duas empresas farmaceuticas dos EUA.

## **Peptídeos de aranhas com atividade neuroprotetora**

A peçonha de *Phoneutria nigriventer* contém neurotoxinas potentes que atuam em canais iônicos<sup>(5)</sup>. Ainda existe uma grande diversidade de novas moléculas, com diferentes alvos e atividades biológicas nessa peçonha.

A PnTx4-5-5 é um polipeptídeo da peçonha de *P. nigriventer* que inibe o rNMDA. O PnTx4-5-5 reduz a amplitude de EPSCs mediadas por rNMDA, em fatias do hipocampo. Ainda, foram utilizados neurônios

corticostriatais de cultura primária de camundongos, do tipo selvagem (WT), bem como em um modelo de camundongo, da doença de Huntington (BACHD). A PnTx4-5-5 foi neuroprotetora de neurônios WT e BACHD, contra L-Glu. Esse peptídeo também foi neuroprotetora dos neurônios WT contra o peptídeo  $\beta$ -amilóide  $\beta^{(6)}$ .

A PhTx3, de *P. nigiventer* é neuroprotetora contra danos neuronais induzidos pela privação de oxigênio e baixa concentração de glicose (ODLG), em fatias de hipocampo de rato<sup>(28)</sup>. As PnTx3-3 e PnTx3-4 são neuroprotetoras, inibindo indiretamente o aumento do L-Glu, pela inibição dos canais de Cav do tipo N e P/Q. Neuroproteção semelhante foi observada para estas toxinas em um modelo *in vitro* de isquemia cerebral. Utilizando eletrofisiologia e o ensaio de liberação de L-Glu em fatias do hipocampo de rato, observou-se que tanto a PnTx3-3 quanto a PnTx3-4 bloquearam a liberação do L-Glu<sup>(7)</sup>.

Em fatias de retinas isquêmicas de ratos por baixa concentração de glicose e sem oxigênio por 45

minutos foram tratadas com PhTx3, Tx3-3 e Tx3-4. Houve diminuição da morte celular para os tres peptídios após isquemia.

O peptideo Hi1a isolado da peçonha de *Hadronyche infensa* é neuroprotetor celular, em um modelo focal de acidente vascular cerebral (AVC) isquêmico. A administração i.c.v em ratos de Hi1a, até 8 horas após a indução do AVC, por oclusão da artéria cerebral média reduziu acentuadamente o tamanho do infarto. A função neurológica e motora foram melhoradas, bem como a preservação da arquitetura neuronal dos ratos.

A administração sistêmica do peptídeo psalmotoxina1 (PcTx1), isolado da peçonha de *Psalmopeous cambridgei* é um inibidor seletivo de canal ASIC1a. A função locomotora em ratos após SCI (lesão da medula espinhal) torácica foi melhorada. Esta melhora correlacionou-se com o grau de neuroproteção do tecido nos tratos descendentes da substância branca, envolvidos na locomoção dos ratos<sup>(8)</sup>.

A injeção de PcTx1, 20 minutos antes da hipóxia protegeu os neurônios estriatonigrais e estriatopálidais no putâmen de leitões recém-nascidos, submetidos a parada cardíaca. A inibição do canal ASIC1a foi verificada com a PcTx1, após AVC induzido em ratos espontaneamente hipertensos (SHR), administrando endotelina-1 à artéria cerebral média<sup>(9)</sup>.

O bloqueio específico de ASIC1a por PcTX1 por via i.c.v, devido a oclusão transitória da artéria cerebral média (MCAO), em camundongo reduziu o volume de infarto. Também houve proteção após MCAO permanente. A administração pós-isquêmica de um bloqueador ASIC1a pode ser uma estratégia neuroprotetora eficaz para pacientes com AVC<sup>(10)</sup>.

O peptídeo  $\omega$ -Aga-IVA isolada da aranha *A. aperta* é um potente inibidor da entrada de íons cálcio em sinaptossomas do cérebro de ratos. O  $\omega$ -Aga-IVA auxiliou na caracterização dos canais de cálcio cerebrais resistentes aos bloqueadores de canais<sup>(11)</sup>.

A eficácia neuroprotetora do  $\omega$ -Aga-IVA no hipocampo de rato, sugere que os canais de ions de  $\text{Ca}^{2+}$  sensíveis ao  $\omega$ -Aga-IVA participam da morte neuronal isquêmica e constituem um alvo potencial da intervenção terapêutica neuroprotetora.

O  $\omega$ -Aga-IVA inibiu o tamanho do infarto determinado após 24 h de reperfusão, após 1 h de oclusão da artéria cerebral média (MCA) em ratos. Estes resultados sugeriram que os canais de ions de  $\text{Ca}^{2+}$  do tipo P/Q podem estar envolvidos no desenvolvimento de lesão cerebral isquêmica focal e os bloqueadores desses canais podem ser terapeuticamente úteis contra lesões isquêmicas<sup>(12)</sup>.

A Huwentoxin-I (HWTX-I) foi isolada da peçonha da aranha *Ornithoctonus huwena*. Ela bloqueia seletivamente o canal de ions de  $\text{Ca}^{2+}$ , dependente de voltagem do tipo N, em modelo de lesão global isquêmica e reperfusão cerebral, em ratos. A HWTX-I mantém a estabilidade morfológica de células piramidais. Reduziu o nível de expressão de fatores relacionados as vias apoptóticas e TNF<sup>(13)</sup>.

A HWTX-I foi injetada i.v. em camundongo submetido a isquemia cerebral crônica (ICC). A HWTX-I ativou a via de transdução de sinal *Notch* no tecido cerebral. Houve expressão do mRNA da sinaptofisina, regulada positivamente por exercício aeróbico. Esses resultados demonstraram que o exercício aeróbico, e a HWTX-I diminuíram a lesão neuronal induzida pela ICC, via *Notch* e promove a regeneração sináptica<sup>(14)</sup>.

### **Toxinas e peptídeos de vespas com atividade neuroprotetora**

O Dr. Tom Piek em Amsterdam, foi o pioneiro em isolar e estudar as filantotoxinas (PhTx), da peçonha da vespa solitária *Philanthus triangulum*.

Culturas primárias de células cerebelares de rato foram usadas para avaliar os efeitos neuroprotetores das filantotoxinas, as quais são potentes antagonistas dos receptores ionotrópicos de L-Glu. A PhTX-343 diminuiu a concentração intracelular de  $Ca^{2+}$ , que foram estimulados pelo NMDA. Quando adicionada 5 minutos antes e durante

a exposição ao agonista protegeu as células. Alguns análogos estruturais da PhTX-343 são mais potentes que ela, tanto em termos de antagonismo dos aumentos de ions de  $Ca^{2+}$  e neuroproteção, estimulados por NMDA<sup>(15)</sup>.

A peçonha desnaturada da vespa social *Polybia occidentalis* inibiu a convulsão da bicuculina (BIC), picrotoxina (PIC) e ácido cainico (AC). Ainda reduziu a atividade locomotora espontânea nas doses anticonvulsivantes. Esses achados indicam que a peçonha desnaturada possui atividade anticonvulsivante e compostos com pouca propensão a causar efeitos colaterais neurológicos em roedores.

A peçonha desnaturada da vespa social *P. ignobilis* inibiu convulsões agudas induzidas pela injeção i.c.v. de BIC, PIC e AC, em ratos. Inibiu a ligação do L-Glu e GABA em seus receptores específicos. Esses efeitos podem ser responsáveis pelos efeitos anticonvulsivantes, os quais levam a peçonha de *P. ignobilis* como uma fonte potencial de drogas anticonvulsivantes e neuroprotetoras.

Injeções i.c.v de fração de baixa massa molecular da peçonha da vespa *P. paulista*, foi anticonvulsivante, dependente da dose e apresentou potente atividade ansiolítica. Esta fração é composta por peptídeos neuroativos, que podem ser utilizados como modelo na pesquisa de drogas anticonvulsivantes, ansiolíticas e neuroprotetoras. Dessa peçonha isolaram o Ppnp7 e a neuropolibina, que mostraram um efeito anti-convulsivo em ratos e camundongos, respectivamente. As curvas de proteção contra a convulsão máxima para ambos os peptídeos, e os registros de EEG demonstraram que a neuropolibina protegeu 80% dos animais das convulsões tônico-clônicas. Estes peptídeos podem ser considerados ferramentas terapêuticas e biotecnológicas valiosas para o estudo e tratamento futuro de distúrbios epiléticos<sup>(16)</sup>.

## Referências

1. Van Den Bosch L, et. al.. Ca(2+)-permeable AMPA receptors and selective vulnerability of motor

neurons. *J Neurol Sci.* 2000 Nov 1;180(1-2):29-34. doi: 10.1016/s0022-510x(00)00414-7.

2. Liberato JL, et. al. Parawixin2 Protects Hippocampal Cells in Experimental Temporal Lobe Epilepsy. *Toxins (Basel).* 2018 Nov 22;10(12):486. doi: 10.3390/toxins10120486.

3. Fontana AC, et. al. Purification of a neuroprotective component of *Parawixia bistriata* spider venom that enhances glutamate uptake. *Br J Pharmacol.* 2003 Aug;139(7):1297-309. doi: 10.1038/sj.bjp.0705352.

4. Fachim HA, et. al. Neurobiological activity of Parawixin 10, a novel anticonvulsant compound isolated from *Parawixia bistriata* spider venom (Araneidae: Araneae). *Epilepsy Behav.* 2011 Oct;22(2):158-64. doi: 10.1016/j.yebeh.2011.05.008.

5. Peigneur S, et. al. Phoneutria nigriventer Spider Toxin PnTx2-1 ( $\delta$ -Ctenitoxin-Pn1a) Is a Modulator of Sodium Channel Gating. *Toxins (Basel).* 2018 Aug 21;10(9):337. doi: 10.3390/toxins10090337.

6. Chassagnon IR, et. al. Potent neuroprotection after stroke afforded by a double-knot spider-venom peptide that inhibits acid-sensing ion channel 1a. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2017 Apr 4;114(14):3750-3755. doi: 10.1073/pnas.1614728114.

7. Pinheiro AC, et. al. Neuroprotective effect on brain injury by neurotoxins from the spider *Phoneutria nigriventer*. *Neurochem Int.* 2006 Oct;49(5):543-7. doi: 10.1016/j.neuint.2006.04.009.

8. Pinheiro AC, et. al. Phoneutria spider toxins block ischemia-induced glutamate release, neuronal death, and loss of neurotransmission in hippocampus. *Hippocampus.* 2009 Nov;19(11):1123-9. doi: 10.1002/hipo.20580.

9. Koehn LM, et. al. Selective inhibition of ASIC1a confers functional and morphological neuroprotection following traumatic spinal cord injury. *Version 2. F1000Res.* 2016 Jul 26; 5:1822. doi: 10.12688/f1000research.9094.2.

10. Cristofori-Armstrong B, et. al. The modulation of acid-sensing ion channel 1 by PcTx1 is pH-, subtype- and species-dependent: Importance of interactions at the channel subunit interface and potential for engineering selective analogues. *Biochem Pharmacol.* 2019 May; 163: 381-390. doi: 10.1016/j.bcp.2019.03.004.

11. Pignataro G, Simon RP, Xiong ZG. Prolonged activation of ASIC1a and the time window for neuroprotection in cerebral ischaemia. *Brain*. 2007 Jan;130(Pt 1):151-8. doi: 10.1093/brain/awl325.

38. Sitges M, Chiu LM. omega-Aga IVA selectively inhibits the calcium-dependent fraction of the evoked release of [3H]GABA from synaptosomes. *Neurochem Res*. 1995 Sep;20(9):1065-71. doi: 10.1007/BF00995561.

12. Asakura K, et. al. M. P/Q-type Ca<sup>2+</sup> channel blocker omega-agatoxin IVA protects against brain injury after focal ischemia in rats. *Brain Res*. 1997 Nov 21;776(1-2):140-5. doi: 10.1016/s0006-8993(97)00975-x.

13. Wang YR, et. al. Effect of Huwentoxin-I on the Fas and TNF apoptosis pathway in the hippocampus of rat with global cerebral ischemia. *Toxicon*. 2007 Dec 15;50(8):1085-94. doi: 10.1016/j.toxicon.2007.07.020.

14. Mao HF, et. al. Aerobic exercise combined with huwentoxin-I mitigates chronic cerebral ischemia injury. *Neural Regen Res*. 2017 Apr;12(4):596-602. doi: 10.4103/1673-5374.205099.

16. Green AC, Nakanishi K, Usherwood PN. Polyamine amides are neuroprotective in cerebellar granule cell cultures challenged with excitatory amino acids. *Brain Res.* 1996 Apr 22;717(1-2):135-46. doi: 10.1016/0006-8993(96)00042-x.

45. Juliana Castro E Silva, et. al.. Neuropolybin: A New Antiseizure Peptide Obtained From Wasp Venom. *Biochem Pharmacol.* 2020 Jun 23;114:119. doi: 10.1016/j.bcp.2020.114119.

### Seção 3: INOVAÇÃO TECNOLÓGICA, DRUG DISCOVERY E PRÓTIPOS DE FÁRMACOS.

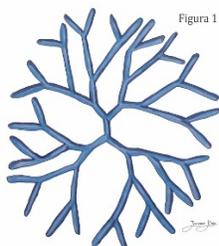


Figura 1

Figura 1  
Nanopartícula Dendrimerico  
Ilustração: Caneta nanquim e lápis.

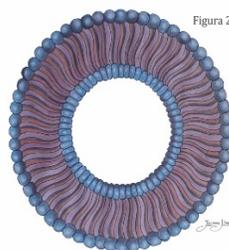


Figura 2

Figura 2  
Nanopartícula Lipossomo  
Ilustração: Caneta nanquim e lápis.



Figura 3

Figura 3  
Tecnologia e química dos elementos  
Ilustração: Caneta nanquim e aquarela.

CAPÍTULO 27

**ESTUDOS *in silico* ADMET NA BIOPROSPECÇÃO DE  
FÁRMACOS**

Heloísa Mara Batista Fernandes de Oliveira

Aleson Pereira de Sousa

Abrahão Alves de Oliveira Filho

**Introdução**

As inovações científicas e tecnológicas na área da química farmacêutica têm guiado inúmeras transformações nas atividades de pesquisa de candidatos à fármacos para o desenvolvimento de novos medicamentos pela indústria farmacêutica, resultando em melhorias na qualidade de vida das mais diferentes populações do mundo.<sup>(1)</sup>

Muitos recursos são empregados durante a descoberta e o desenvolvimento de um novo medicamento, envolvendo um longo período de tempo, bem como, altos custos, podendo alcançar valores superiores a US\$ 1,2 bilhões<sup>(2)</sup>. Neste contexto, tornou-se habitual avaliar precocemente a

semelhança do novo medicamento com outros já disponíveis no mercado, bem como, as suas propriedades físico-químicas, farmacocinéticas e farmacodinâmicas com a finalidade de se reduzir custos.<sup>(1, 3)</sup>

O estudo das propriedades físico-químicas dos candidatos à fármacos pode ser realizado por meio de estudos computacionais conhecidos como estudos *in silico*, que utilizam softwares e fazem uso de modelos matemáticos e estatísticos, com eficácia comprovada, a fim de prever as prováveis características biológicas e farmacológicas de uma molécula em um período curto de tempo, tornando o processo mais rápido e menos oneroso.<sup>(4, 5)</sup>

### **Estudos *in silico* ADMET**

A utilização de técnicas computacionais no desenvolvimento e descoberta de fármacos tem rapidamente ganhado popularidade, implementação e apreciação.<sup>(6)</sup> Indústrias farmacêuticas têm ampliado seus testes com um arsenal de drogas mais robusto

que utiliza da predição de atividades biológicas dos candidatos a novos fármacos. A expressão *in silico* tem sido usada para significar “realizada no computador” ou através de simulação em computador, tendo sido utilizada pela primeira vez em 1989. Na área da Química Medicinal, os estudos *in silico* constituem um importante meio para auxiliar em projetos de pesquisa e desenvolvimento de fármacos. (7)

Os modelos *in silico* vem sendo empregados nos estágios iniciais de pesquisas e desenvolvimento de moléculas para análise de potencial atividade terapêutica. Esses modelos são usados de forma crescente como apoio pré-screening e devem ser associados aos estudos *in vitro* e *in vivo*, visando diminuir a quantidade de moléculas avaliadas e otimizar a identificação de novas entidades químicas, além de diminuir a utilização de animais, os custos exorbitantemente menores, um menor tempo de análise, a reprodutibilidade, a rapidez e a exatidão. (8,9,10)

Além disso, a determinação das propriedades farmacocinéticas de absorção, distribuição, metabolismo, excreção e toxicidade (ADMET), essenciais no estudo dos candidatos a novos fármacos, têm sido amplamente estudadas por técnicas computacionais.<sup>(11)</sup>

Os parâmetros ADMET (absorção, distribuição, metabolismo, excreção e toxicidade) têm um papel importante em definir a disponibilidade *in vivo* e os efeitos tóxicos de uma molécula, ao auxiliar na redução do tempo e do custo do processo de pesquisa e desenvolvimento de novos fármacos.<sup>(12)</sup> Já que aproximadamente 50% das razões que levam ao fracasso no desenvolvimento de um fármaco são associadas ao perfil farmacocinético e toxicológico.<sup>(13)</sup> Dessa forma, quando há análise do potencial bioativo, boa disponibilidade, baixo risco de efeitos tóxicos, tornam o fármaco alvo de estudo mais promissor a ser submetido a investigação de etapas subsequentes na pesquisa.

O estudo dessas propriedades pode ser realizado através de diferentes ferramentas, tais como: Molinspiration, ALOGPS 2.1, ToxPredict e OSIRIS Property Explorer. As informações obtidas por estas ferramentas podem ser utilizadas para avaliar o potencial de novos candidatos à fármacos.<sup>(14)</sup>

Levando em consideração os parâmetros de ADMET, uma boa biodisponibilidade oral também é um dos atributos mais almejados para um novo fármaco, pois viabiliza o uso de doses menores e menos frequentes, proporciona melhor adesão do paciente ao tratamento e diminui o custo/consumo do fármaco.<sup>(15)</sup> A predição da biodisponibilidade oral envolve uma série de fatores biológicos e físico-químicos como dissolução no trato gastrointestinal, permeação pelas membranas intestinais e metabolismo de primeira passagem intestinal e hepático.<sup>(16)</sup>

Com base nestas informações, Lipinski et al., (2001)<sup>(17)</sup> propuseram regras que avaliam teoricamente a biodisponibilidade oral das novas

moléculas com potenciais terapêuticos. Esta predição é conhecida como “regra dos cinco de Lipinski” que tem como definição um conjunto de parâmetros capazes de identificar compostos com problemas de absorção e permeabilidade. Um banco de dados de aproximadamente 2500 fármacos comerciais oralmente ativos foi usado para elaborar diretrizes gerais que pudessem ser utilizadas pelos químicos medicinais para estimar o potencial de permeabilidade e de solubilidade de um composto.<sup>(16)</sup>

De acordo com esta regra uma molécula apresenta boa absorção e permeabilidade quando segue pelo menos três das características: possuir o número de grupos aceptores de ligação hidrogênio menor ou igual a 10, o número de grupos doadores de ligação hidrogênio menor ou igual a 5, peso molecular menor ou igual a 500 Da e Log P calculado menor ou igual a 5.<sup>(18)</sup> Além disso, uma regra adicional, proposta por Veber, diz que o número de ligações rotacionáveis (NLR) não deve ser superior a 10, visto que a molécula deve adotar uma conformação fixa

para interagir com o alvo, passar pelas membranas, e ao mesmo tempo adotar a conformação ativa.<sup>(19)</sup>

Vários são os estudos já divulgados na literatura sobre as análises *in silico* dos parâmetros ADMET de produtos naturais bioativos, como por exemplo o estudo de Oliveira et al., (2018)<sup>(20)</sup> investigou as propriedades *in silico* do flavonoide 5-hidroxi-4', 7-dimetoxiflavona e observou que este produto natural apresentou uma boa disponibilidade oral teórica, por meio dos dados obtidos pelo software Molinspiration, como pode ser visto na tabela 1, além de revelar uma baixa toxicidade teórica, por meio dos resultados do software *admetSAR* descrito na tabela 2.

**Tabela 1** - Análise *in silico* do flavonoide 5-hidroxi- 4', 7-dimetoxiflavona com o software *Molinspiration*. Fonte: Oliveira et al. (2018)

Comp.	miLog P	MM	nAL H	nDL H	nviolações	TPS A	nrot b
Flavonoide	3.54	298.29	5	1	0	68.91	3

**Comp.** - composto; **miLogP** - coeficiente de partição octanol/água; **nALH** - número de grupos aceptores de ligação de hidrogênio; **nDLH** - número de grupos doadores de ligação de hidrogênio; **nviolações** - número de violações; **TPSA** - área superficial polar topológica; **nrotb** - número de bandas rotáveis.

**Tabela 2** - Toxicidade *in silico* do flavonoide 5-hidroxi- 4', 7-dimetoxiflavona calculada no software admetSAR

Tipo de toxicidade	Toxicidade AMES	Carcinogênico	Toxicidade oral aguda
5-hidroxi- 4', 7-dimetoxiflavona	NT	NC	III

**NT** - não tóxico; **NC** - não carcinogênico.

Fonte: Oliveira et al. (2018)

Outro estudo interessante foi o desenvolvido por Palmeira et al., (2019) <sup>(21)</sup> e avaliou as propriedades *in silico* do composto cis-calameneno, um composto químico de maior prevalência contida no óleo essencial da *Vitex Gardneriana* Schauer (Jaramataia), este produto natural demonstrou uma biodisponibilidade oral teórica, por meio dos dados obtidos pelo software Molinspiration, como pode ser visto na tabela 3.

**Tabela 3 - Biodisponibilidade oral *in silico* do Cis-calameneno..**

Comp.	miLogP	MM	nALH	nDLH	nviolações	TPSA	nrotb
Cis-calameneno	4.31	202.34	0	0	0	00.00	1

**Comp.** – composto; **miLogP** – coeficiente de partição octanol/água; **nALH** – número de grupos aceptores de ligação de hidrogênio; **nDLH** – número de grupos doadores de ligação de hidrogênio; **nviolações** – número de violações; **TPSA** – área superficial polar topológica; **nrotb** – número de bandas rotáveis.

Fonte: Palmeira et al. (2019)

## Considerações finais

Portanto, pode-se concluir que a utilização dos softwares para os estudos *in silico* dos parâmetros ADMET contribui para o avanço tecnológico da indústria farmacêutica, bem como, para a redução do tempo e dos custos para a bioprospecção de novos fármacos. Uma vez que as análises teóricas apontam para moléculas com maiores chances de desempenhar efeitos farmacológicos promissores.

## Referências

(1) SANTOS, R. B., VALE, W. F. S., COSTA, C. L. S. Planejamento estrutural, desenvolvimento e análise

de propriedades farmacocinéticas in silico de análogos do ácido salicílico para fins cosméticos. **Estação Científica (UNIFAP)**, v. 7, n. 1, p. 103-112, 2017.

(2) AKKARI, A. C. S., MUNHOZ, I. P., TOMIOKA, J., SANTOS, N. M. B. F. D., SANTOS, R. F. D. Inovação tecnológica na indústria farmacêutica: diferenças entre a Europa, os EUA e os países farmaemergentes. **Gestão & Produção**, v. 23, n. 2, p. 365-380, 2016.

(3) DIMASI, J. A., HANSEN, R. W., GRABOWSKI, H. G. The price of innovation: new estimates of drug development costs. **Journal of health economics**, v. 22, n. 2, p. 151-185, 2003.

(4) HODGSON, J. ADMET—turning chemicals into drugs. **Nature Biotechnology**, v. 19, n. 8, p. 722-726, 2001.

(5) TOROPOVA, M. A. Drug metabolism as an object of computational analysis by the Monte Carlo method. **Current drug metabolism**, v. 18, n. 12, p. 1123-1131, 2017.

(6) KAPETANOVIC, I. M. Computer-aided drug discovery and development (CADD): in silico-chemico-biological approach. **Chemico-biological interactions**, v. 171, n. 2, p. 165-176, 2008.

(7) SILVA, D. A. D. **Screening de produtos naturais com potencialidade para tratamento de doenças ocasionadas por helicobacter pylori: um estudo in vitro e in silico**. 2015. Trabalho de Conclusão de Curso. Universidade Tecnológica Federal do Paraná.

(8) SRINIVAS, N., et. al. In vitro cytotoxic evaluation and detoxification of monocrotaline (Mct) alkaloid: an in silico approach. **Int. Inv. J. Biochem. Bioinform**, v. 2, n. 3, p. 20-29, 2014.

(9) GOMES, J. N. S. **Estudo in silico de derivados acridínicos com potencial atividade antitumoral**. 2019. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Farmácia) - Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande-PB.

(10) FERREIRA, L. F. G. R. **Novas estratégias para métodos in silico na inovação terapêutica utilizando computação distribuída: GriDoMol**. 2017. Tese (doutorado) – Universidade Federal de

Pernambuco. Centro de Biociências. Inovação Terapêutica, Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica.

(11) TONIN, L. T. D. **Síntese e avaliação da atividade antiprotozoário, antitumoral e antimicrobiana de 1-fenilsubstituído- $\beta$ -carbolicinas contendo os grupos n-alkylcarboxamida, 1,2,4-triazol e 1,3,4-tiadiazol na posição-3.** 2009. Tese (Doutorado em Química), Universidade Estadual de Maringá.

(12) HANSCH, C., LEO, A., MEKAPATI, S. B., KURUP, A. Qsar and Adme. **Bioorganic & medicinal chemistry**, v. 12, n. 12, p. 3391-3400, 2004.

(13) MODA, T. L. (2007). **Desenvolvimento de modelos in silico de propriedades de ADME para a triagem de novos candidatos a fármacos.** 2007. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

(14) KUMAR M. M., RAJAGOPAL, S. Antioxidant, antimicrobial, antiproliferative activities and in silico drug likeness prediction of purified MHH compound, isolated from *Millingtonia hortensis* Linn. 2015.

(15) PEREIRA, D. G. The importance of metabolism in drug design. **Quim Nova**, v. 30, p. 171-177, 2007.

(16) GERALDO, R. B. **Inibidores plaquetários de origens sintética e animal: estudo de moléculas com potencial para o tratamento de neuropatias vasculares**. 2009. Dissertação – (Mestrado em Neuroimunologia) – Universidade Federal Fluminense.

(17) LIPINSKI, C. A., LOMBARDO, F., DOMINY, B. W., FEENEY, P. J. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. **Advanced drug delivery reviews**, v. 23, n. 1-3, p. 3-25, 1997.

(18) VEBER, D. F., et. al. Molecular properties that influence the oral bioavailability of drug candidates. **Journal of medicinal chemistry**, v. 45, n. 12, p. 2615-2623, 2002.

(19) OLIVEIRAL, V. F., et. al. Análise farmacológica e toxicológica in silico do flavonoide 5-hidroxi-4', 7-dimetoxiflavona. **Journal of Medicine and Health Promotion**, v. 3, n. 1, p. 913-921, 2018.

(20) PALMEIRA, J. T., et. al. Análise das propriedades do cis-calameneno relacionada à odontologia: estudo *in silico*. **REVISTA UNINGÁ**, v. 56, n. S5, p. 87-97, 2019.

## *CAPÍTULO 28*

# **TRANSCRIPTOMA DE VENENOS E TOXINAS RECOMBINANTES**

Luciana Souza de Oliveira;

Valéria Gonçalves de Alvarenga.

### **Transcriptoma de venenos**

O transcriptoma consiste no conjunto de transcritos (RNA) de um determinado organismo, órgão, tecido ou conjunto de células em um determinado tempo. Na transcrição do DNA pela enzima RNA polimerase são gerados inúmeros tipos de RNAs, como RNA mensageiro, RNA ribossomal, RNA transportador, microRNA e RNA não codificante. Para o estudo do transcriptoma de veneno, geralmente pretende-se trabalhar com o RNA mensageiro.

O estudo do transcriptoma de venenos contribui para a quantificação da expressão, a identificação de sequências de aminoácidos de dada proteína, o entendimento do metabolismo, a descoberta de novos

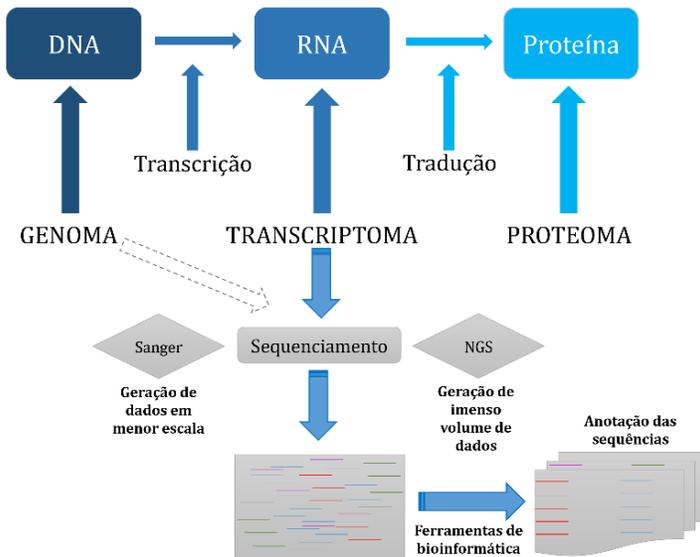
genes, o estudo de comparação entre padrões de expressão, o entendimento de diferentes fases do desenvolvimento e identificação de espécies.

Algumas metodologias utilizadas para análise do transcriptoma como SAGE (*Serial Analysis of gene expression*) e Microarray são úteis, principalmente, para análise quantitativa de expressão de genes<sup>(1)</sup>. Contudo, a construção de bibliotecas de cDNA e o sequenciamento de DNA são metodologias que permitem um conhecimento mais abrangente do conteúdo das sequências dos transcritos<sup>(1)</sup> (Figura 1).

A primeira técnica de sequenciamento de DNA foi descrito por Sanger e seus colaboradores em 1977, porém, somente com o surgimento da nova geração de sequenciamento (NGS – *Next generationsequencing*), foi possível fazer o sequenciamento direto e massivo de milhões de moléculas de DNA<sup>(2)</sup>, com isso muitos transcriptomas relacionados a venenos tem sido descritos. De 2002 até o momento, 620 artigos foram depositados em

repositórios de banco de dados públicos, contendo as palavras combinadas “*Venom Transcriptome*”.

Figura 01. Fluxo de trabalho para estudo de transcriptomas de veneno.



Fonte: Valéria G. Alvarenga, 2020

Com a magnitude de dados produzidos, tornaram-se necessários computadores mais robustos e formação multiprofissional (biologia e informática) para organizá-los e analisá-los. Assim, os transcritos que codificam as proteínas do veneno são montados a

partir dos milhões de dados produzidos pelos novos sequenciadores<sup>(3)</sup>.

A montagem das sequências é realizada por meio de algoritmos que fazem uma montagem “*De novo*”, onde não existe um transcriptoma ou genoma de referência para nortear as montagens, ou uma montagem “com referência” usando um transcriptoma ou genoma já montado para comparar e montar os transcritos. A montagem “*De novo*” tem sido bastante utilizada para os trabalhos com transcriptomas de animais peçonhentos os quais em sua maioria não possuem dados de genomas disponíveis.

A fase de anotação dos dados é onde os transcritos que codificam as proteínas do veneno serão identificados e descritos. Nesta fase, o alinhamento entre sequências é muito utilizado para comparar duas ou mais sequências entre si ou em repositórios de bancos de dados extremamente úteis para caracterização dos transcritos.

O avanço da tecnologia de sequenciamento e análise dos dados de transcriptomas têm auxiliado imensamente no estudo dos processos envolvidos na produção do veneno, na identificação e caracterização dos componentes do veneno, no descobrimento de novas proteínas e peptídeos e mesmo para o desenvolvimento de novas estratégias para o tratamento do envenenamento.

### **Toxinas recombinantes**

O veneno possui peptídeos e proteínas com inestimáveis valores biotecnológicos e o estudo do transcriptoma é uma das ferramentas para explorá-los. Entretanto, a aplicação biotecnológica dessas toxinas requer a purificação em maiores quantidades. Para alguns tipos de animais, a extração do veneno é laboriosa e rende pouquíssima quantidade. Além disso, algumas proteínas estão presentes em baixa abundância no veneno. Assim, a produção de proteínas recombinantes é um passo importante para a aplicação biotecnológica das toxinas.

Utilizando a tecnologia do DNA recombinante é possível produzir proteínas quiméricas, isto é, com uma sequência de outra proteína fusionada, que podem dar novas funcionalidades ou aprimorar a expressão e purificação. Como exemplo, temos a adição de uma cauda de histidina na sequência da proteína (His tag) que facilita a purificação da forma recombinante, e diferentes tags que são adicionadas para aumentar a solubilidade e estabilidade das proteínas expressas principalmente em sistemas bacterianos (tags de tioredoxina - Trx, de proteína de ligação a maltose - MBP, de glutatona S-transferase - GST e de pequenos modificadores relacionados à ubiquitina - SUMO).

Existem diversos sistemas para expressão de proteínas recombinantes que incluem sistemas bacterianos, leveduras, células de mamíferos, células de insetos e plantas transgênicas. Os sistemas bacterianos são os mais amplamente utilizados, pois são fáceis de cultivar, crescem rápido, tem alta produtividade e com baixo custo de produção.

Entretanto, este sistema tem a desvantagem de não reproduzir algumas modificações pós-traducionais, geralmente presentes nas toxinas, como glicosilação e pontes dissulfeto. Essas modificações pós-traducionais podem ocorrer nos sistemas de expressão em levedura, entretanto, é comum observar hiper-glicosilação nas proteínas expressas neste sistema. Os sistemas de expressão em células eucarióticas são os que melhor reproduzem a complexidade estrutural das toxinas, porém este sistema tem a desvantagem de ser mais difícil de cultivar, com baixo rendimento e um custo mais alto de produção<sup>(4)</sup>.

Na tabela 1, listamos alguns exemplos de toxinas animais recombinantes.

**Tabela 1. Exemplos de toxinas animais recombinantes**

<b>Toxina</b>	<b>Espécie</b>	<b>Sistema de expressão</b>	<b>Ref.</b>
BmKBTx e BmNaL-3SS2	Escorpião ( <i>Buthus martensii Karsch</i> )	<i>Escherichia coli</i> (bacteria)	(5)
Fosfolipase D	Aranha ( <i>Loxocelés gaucho</i> )	<i>E. coli</i>	(6)
Desintegrina	Serpente ( <i>Bothrops</i> )	<i>E. coli</i>	(6)

<i>insulares)</i>			
TFT-AF e TFT-VN (Toxinas 3-fingers)	Serpentes ( <i>Azemiops feae</i> e <i>Vipera nikolskii</i> )	<i>E. coli</i>	(7)
HF3 (SVMP-PIII)	Serpente ( <i>Bothrops jararaca</i> )	Sistema <i>in vitro</i> livre de células baseado em <i>E. coli</i>	(8)
Albolamin (SVMP-PIIa)	Serpente ( <i>Cryptelytrops albolabris</i> )	<i>Pichia pastoris</i> (levedura)	(9)

Fonte: autoral

### **Considerações finais:**

A otimização das condições de crescimento do sistema de expressão é um passo importante para aumentar a produção da proteína recombinante. Após alcançar a melhor produção em pequena escala, é necessário passar para a produção em grande escala. Em maior quantidade, as toxinas recombinantes podem ser utilizadas em ensaios de caracterização funcional das diferentes classes de proteínas presentes nos venenos, em diagnósticos e como agente terapêutico.

## Referências

1. MELOUANE, Aicha et al. Differential gene expression analysis in ageing muscle and drug discovery perspectives. *Ageing Research Reviews*, [s.l.], v. 41, p. 53-63, jan. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.arr.2017.10.006>.

2. BRUIJNS, Brigitte; TIGGELAAR, Roald; GARDENIERS, Han. Massively parallel sequencing techniques for forensics: a review. : A review. *Electrophoresis*, [s.l.], v. 39, n. 21, p. 2642-2654, 22 ago. 2018. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/elps.201800082>.

3. LANGENEGGER, Nicolas, et. al. Spider Venom: components, modes of action, and novel strategies in transcriptomic and proteomic analyses. : Components, Modes of Action, and Novel Strategies in Transcriptomic and Proteomic Analyses. *Toxins*, [s.l.], v. 11, n. 10, p. 611-645, 22 out. 2019. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/toxins11100611>.

4. TRIPATHI, NageshK.. Production and Purification of Recombinant Proteins from *Escherichia coli*. *Chembioeng Reviews*, [s.l.], v. 3, n. 3, p. 116-133, 12 maio 2016. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/cben.201600002>.

5 -LIN, Shengguo et al. Recombinant Expression, Functional Characterization of Two Scorpion Venom Toxins with Three Disulfide Bridges from the Chinese Scorpion *Buthusmartensii*Karsch. *Protein & Peptide Letters*, [s.l.], v. 24, n. 3, p. 235-240, 27 jan. 2017. Bentham Science Publishers Ltd..  
<http://dx.doi.org/10.2174/0929866524666170117142404>.

6. SHIMOKAWA-FALCÃO, Lhira et al. Toxin Fused with SUMO Tag: a new expression vector strategy to obtain recombinant venom toxins with easy tag removal inside the bacteria. : A New Expression Vector Strategy to Obtain Recombinant Venom Toxins with Easy Tag Removal inside the Bacteria. *Toxins*, [s.l.], v. 9, n. 3, p. 82-99, 27 fev. 2017. MDPI AG.  
<http://dx.doi.org/10.3390/toxins9030082>.

7. MAKAROVA, Ya. V. et al. The First Recombinant Viper Three-Finger Toxins: inhibition of muscle and neuronal nicotinic acetylcholine receptors. : Inhibition of Muscle and Neuronal Nicotinic Acetylcholine Receptors. *Doklady Biochemistry And Biophysics*, [s.l.], v. 479, n. 1, p. 127-130, mar. 2018. Pleiades Publishing Ltd.  
<http://dx.doi.org/10.1134/s1607672918020205>

8. MENEZES, Milene C. et al. Recombinant expression of the precursor of the hemorrhagic metalloproteinase HF3 and its non-catalytic domains using a cell-free synthesis system. *Amino Acids*, [s.l.], v. 48, n. 9, p. 2205-2214, 21 maio 2016. Springer Science and Business Media LLC.  
<http://dx.doi.org/10.1007/s00726-016-2255-7>.

9. JANGPRASERT, Panchalee; ROJNUCKARIN, Ponlapat. Molecular cloning, expression and characterization of albolamin: a type p-ii snake venom metalloproteinase from green pit viper (cryptelytrops albolabris). : A type P-IIa snake venom metalloproteinase from green pit viper (Cryptelytrops albolabris). *Toxicon*, [s.l.], v. 79, p. 19-27, mar. 2014. Elsevier BV.  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.toxicon.2013.12.005>.

CAPÍTULO 29

**TECNOLOGIAS APLICADAS À DESCOBERTA DE  
FÁRMACOS**

Ellen Gonçalves de Oliveira;

João Paulo L. Velloso;

Rubens L. do Monte-Neto.

**Resumo**

Neste capítulo, são abordados alvos terapêuticos e suas implicações na descoberta e desenvolvimento de fármacos, considerando abordagens interdisciplinares, incluindo métodos de predição computacionais, banco de dados públicos e estratégias colaborativas.

**Considerações sobre alvos terapêuticos**

Algo atualmente definido como passo essencial na descoberta de tratamentos é a definição das bases moleculares para a doença em questão <sup>(1)</sup>. Esses complexos são definidos como alvos terapêuticos, ou seja, estruturas celulares ou moleculares envolvidas em algum processo fisiológico, que podem estar

envolvidas em quadros patológicos. Estima-se que existam quase 700 proteínas codificadas pelo genoma humano que servem como alvos terapêuticos para mais de 1500 fármacos aprovados pelo FDA <sup>(2)</sup>. A maioria dos alvos descritos são receptores acoplados à proteína G – receptores metabotrópicos (12 %), canais iônicos – receptores iônótropicos (19 %), receptores nucleares (3 %) e cinases (10%) <sup>(2)</sup>.

### **Vantagens e limitações na busca por fármacos de origem natural**

Produtos naturais e/ou seus derivados sintéticos/semi-sintéticos perfazem 42% dos princípios ativos em uso atualmente <sup>(3)</sup>. Dentre as principais vantagens para utilização de fármacos de origem natural, estão: (I) a exploração e seleção de princípios ativos alicerçados em estudos etnofarmacológicos; onde os efeitos colaterais do fármaco são mais bem conhecidos em decorrência do seu uso popular e (II) a utilização de estruturas que sirvam de inspiração ou como base para a síntese de

novas moléculas. Como desvantagens podemos apontar o fato de que nem todas as moléculas de origem natural são passíveis de síntese completa, o que torna o processo de produção dependente das fontes naturais. Além disso, no Brasil, moléculas obtidas de fontes naturais não são patenteáveis, o que pode gerar alguma dificuldade comercial, dependendo do tipo de aplicação. Muitas vezes essas moléculas apresentam níveis de complexidade estrutural que podem impactar negativamente na síntese/semisíntese e em modelos de triagem de fármacos que envolvam, por exemplo, a aplicação das regras de Lipinski. Geralmente, moléculas isoladas de fontes naturais não seguem esses critérios, ainda que sejam bioativas. Variações sazonais podem atuar limitando a produção de metabólitos, impactando nos rendimentos dessas moléculas. Muitos antibióticos têm sua origem de fontes naturais, explicado pelo fato de que microorganismos competem evolutivamente por um determinado microambiente e lançam mão de toxinas como forma de defesa natural na eliminação

de outros microorganismos. Muitos desses compostos foram obtidos de microorganismos cultiváveis em condições axênicas e a grande maioria foi descoberta até a década de 1960. No entanto, a reemergência de superbactérias resistentes a múltiplos antibióticos e a limitações de estratégias inovadoras e investimento na busca por novas moléculas ativas, anunciam uma fase crítica, de ameaça à saúde pública que enfrentamos <sup>(4)</sup>. Nesse contexto, bactérias não cultiváveis podem se configurar como fonte abundante de novos antibióticos. Uma das alternativas tecnológicas para prospectar moléculas ativas *in situ*, é cultivar esses microorganismos em seus próprios ambientes. Foi dessa forma que Ling e cols. (2015), utilizaram um dispositivo, chamado de iChip, para cultivar bactérias no solo e isolaram um peptídeo de *Eleftheria terrae*, denominado de teixobactina. Trata-se de um novo antibiótico ativo inclusive contra *S. aureus* resistente à metilcolina (MRSA) e sem evidências de seleção de cepas resistentes ao composto <sup>(5)</sup>. Portanto, percebemos que

é necessário resiliência, criatividade, sustentabilidade e investimento na busca por novas alternativas de origem natural como fonte (quase) inesgotável de fármacos.

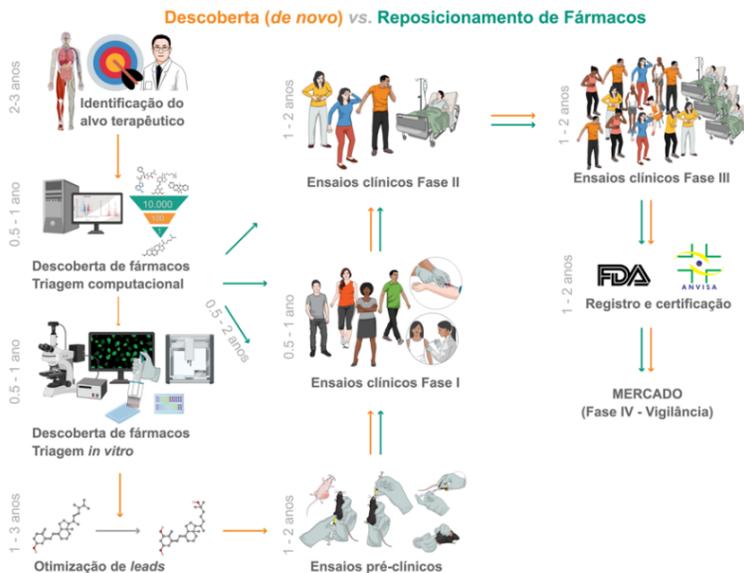
### **Farmacologia clássica vs. reversa e reposicionamento na descoberta de fármacos**

Muitos estudos alimentam diariamente bancos de dados com moléculas candidatas a fármacos, mas muito pouco se conhece sobre seu modo e mecanismo(s) de ação. Testes *in vitro* em cultura de células e ensaios pré-clínicos, com a utilização de animais de experimentação, envolvem a caracterização fenotípica, do efeito desejado como foco de campanhas de triagem de fármacos. Esse processo é também chamado de abordagem clássica ou farmacologia clássica. Avanços na farmacologia levaram à caracterização de receptores, permitindo o desenvolvimento racional de fármacos, chamada de farmacologia reversa ou baseada no alvo <sup>(6)</sup>. Nesse processo, um alvo candidato envolvido com a

fisiopatologia de uma dada manifestação clínica, é selecionado e são realizados ensaios para a descoberta de moléculas capazes de interagir com esse determinado alvo, de forma a mitigar os efeitos da doença. O reposicionamento é conhecido como uma alternativa mais rápida e de menor custo quando comparada à descoberta e desenvolvimento completo de um novo fármaco até sua disponibilização no Mercado (Figura 1). Um processo tradicional deve passar pela descoberta, fase pré-clínica realizada em laboratórios, fase clínica (que visa a avaliação de eficácia e segurança) e submissão às autoridades e vigilância pós comercialização, processo também conhecido como farmacovigilância. Para o reposicionamento, este processo é reduzido, dispensando algumas etapas da fase clínica. Ao longo dos anos, fármacos como Minoxidil, Cetoconazol, Talidomida, Aspirina e o Viagra se tornaram exemplos de sucesso a partir desta abordagem. Neste contexto, ferramentas de computacionais se tornam grandes

aliadas na redução deste tempo, levando de 1 a 2 anos para identificação destes compostos (7).

**Figura 1: Etapas envolvidas no processo de descoberta de fármacos (*de novo*) em comparação com estratégias de reposicionamento.** O processo tradicional completo para a chegada de um medicamento à prateleira da farmácia, desde a identificação do seu princípio ativo, pode levar de 10 a 17 anos (setas laranja). Já o processo de reposicionamento de fármacos apresenta vantagens como redução de custos e menor tempo até estar disponível no mercado para o novo fim (setas verdes).



Fonte: autor Rubens Lima do Monte Neto

## Ferramentas computacionais e banco de dados

As plataformas para análise computacional que auxiliam nos estudos de descoberta e reposicionamento de fármacos levam em consideração suas diferentes formas de abordagem, sendo elas: o fármaco ou molécula candidata e sua estrutura química, a fisiopatologia da doença e os mecanismos moleculares nela envolvidos em relação ao seu alvo. A quimioterapia por sua vez pode interferir em diferentes vias bioquímicas, envolvidas ou não com o mecanismo de ação e efeitos desejados, levando também a efeitos colaterais (9). Nesse sentido, ferramentas computacionais podem atuar como aliadas com alto poder preditivo sobre, por exemplo, efeitos indesejados e guiar a descoberta e desenvolvimento de fármacos. Um ótimo exemplo desse tipo de abordagem é o preditor pkCSM (<http://biosig.unimelb.edu.au/pkcsm>) uma poderosa ferramenta que usa aprendizado de máquina (*machine learning*), sendo capaz de prever propriedades farmacocinéticas de potenciais ligantes

com base na teoria de grafos e suportado por assinaturas moleculares oriundas de dados experimentais <sup>(10)</sup>. Dessa forma, é possível filtrar características indesejadas e prever comportamentos dos fármacos candidatos nas fases de absorção, distribuição, metabolismo, excreção e toxicidade (ADMET).

Ferramentas preditivas contribuem e trazem resultados promissores, um exemplo é o estudo de reposicionamento do Mebendazol, um anti-helmíntico, como potencial fármaco antitumoral que foi realizado a partir de análises de ancoragem molecular 2D e 3D. <sup>(12)</sup>. Um dos exemplos mais atuais da aplicação de soluções computacionais para a busca massiva de alternativas quimioterápicas são os projetos de utilização remota de computadores particulares para executarem a busca por novas moléculas ativas contra o novo coronavírus (SARS-CoV-2) ou na elucidação estrutural de potenciais alvos “drogáveis”

<https://foldingathome.org/2020/05/28/the-covid->

[moonshot](#); [www.ibm.org/OpenPandemics](http://www.ibm.org/OpenPandemics)). Uma estratégia para acelerar o processo de descoberta de um medicamento no enfrentamento à pandemia de COVID-19. Outros tipos de consórcio como o da Atomwise (<https://www.atomwise.com>) utilizam inteligência artificial e, de forma colaborativa, integra análise computacional, validação experimental e produção de hits na descoberta e desenvolvimento de fármacos.

## **Bancos de dados**

Bancos de dados são fontes para mineração estratégica cujos estudos podem ser guiados por redes de interação proteína-proteína (biologia de sistemas); podem conter informações não apenas estruturais, mas também de sequência gênicas e serem utilizados em abordagens de quimiogenômica, associando dados de sequenciamento e função biológica na elucidação de mecanismos (Tabela 1).

Tabela 1. Principais bancos de dados úteis na descoberta e desenvolvimento de fármacos

<b>Categoria</b>	<b>Banco de dados</b>	<b>Informações</b>
Fármaco e estrutura	PubCHEM <a href="https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/">https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/</a>	Substância, estrutura química e atividade biológica
	ChEMBL <a href="https://www.ebi.ac.uk/chembl/">https://www.ebi.ac.uk/chembl/</a>	
	SEA ( <i>Similarity Ensemble Approach</i> ) <a href="http://sea.bkslab.org/">http://sea.bkslab.org/</a>	Comparação estrutural entre uma nova molécula e um fármaco conhecido
Interações fármaco-alvo	DrugBank <a href="https://www.drugbank.ca/">https://www.drugbank.ca/</a>	Mecanismos relacionados a fármacos Interação proteínas alvo e pequenas moléculas
	STITCH ( <i>Search Tool for Interacting Chemicals</i> ) <a href="http://stitch.embl.de/">http://stitch.embl.de/</a>	Vias metabólicas, estruturas cristalográficas, análise receptor-alvo
<b>Transcriptômica, Proteômica e Metabolômica</b>	Binding DB <a href="https://www.bindingdb.org/">https://www.bindingdb.org/</a>	Proteínas alvo e pequenas moléculas similares a fármacos
	cMAP ( <i>The Connectivity Map</i> ) <a href="https://cmap.ihmc.us/">https://cmap.ihmc.us/</a>	Mapas metabólicos, relação entre genes e proteínas alvos.
	KEGG ( <i>Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes</i> ) <a href="https://www.genome.jp/kegg/">https://www.genome.jp/kegg/</a>	

Fonte: Autor

Processos computacionais utilizados na busca de novas moléculas e no reposicionamento de fármacos, podem ser divididos em duas classes: baseadas no alvo ou baseados no ligantes. A 1ª utiliza informações estruturais disponíveis do alvo, tanto obtidas por meio de experimentação (RMN, cristalografia de raios-x) como previstas por modelos gerados *in silico* (geralmente métodos comparativos). A partir dessas informações estruturais, se identifica a porção de interação com ligantes e se busca moléculas capazes de interagirem considerando características de complementaridade (geométricas e físico químicas). Podemos citar dentro deste espectro de ferramentas, a ancoragem molecular (ou *docking*) screening virtual e dinâmica molecular. As técnicas baseadas em ligantes se fundamentam na identificação de caracteres comuns em ligantes já conhecidos para determinado alvo.

*Técnicas baseadas no alvo* - A determinação estrutural de uma proteína e seu padrão de dobras ou

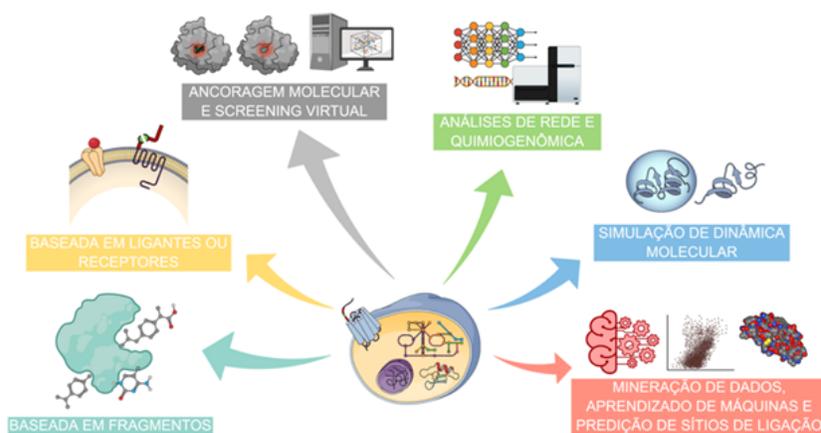
enovelamento provêm informações importantes, como a provável função biológica, e são fundamentais para a descoberta de novos ligantes. A determinação estrutural pode ser realizada de forma experimental e por meio de métodos teóricos, incluindo métodos *ab initio* <sup>(13)</sup> e baseados em molde <sup>(14)</sup>. A partir da estrutura é possível realizar estudos envolvendo *docking*. Os métodos de busca consideram complementaridade geométrica, flexibilidade das moléculas e interações interatômicas <sup>(15)</sup>. Como resultado são obtidas várias orientações de predição que são ranqueadas de acordo com energia livre de ligação e afinidade. A dinâmica molecular é uma técnica computacional que simula o comportamento dinâmico dos sistemas moleculares em função do tempo, tratando todas as entidades em uma caixa de simulação (ligante, proteína, águas). É possível elucidar conformações estruturais de sistemas moleculares e a dinâmica entre esses componentes moleculares.

*Técnicas baseadas nos ligantes* - A abordagem que mais se destaca nessa classificação são os estudos de relações estrutura-atividade quantitativas (QSAR) que apresenta alta taxa de acerto. Essas técnicas se iniciam a partir da coleta de ligantes já conhecidos para determinado alvo, com atividade biológica. A partir dessa seleção inicial são obtidas características físico-químicas, presença ou ausência de grupos funcionais e várias outras. A partir dessa codificação é possível determinar a semelhança entre duas moléculas, encontrar correspondências com uma subestrutura de consulta.

*Descoberta de fármacos baseadas em fragmentos* - A descoberta de fármacos baseadas em fragmentos (ou FBDD, do inglês “*fragment-based drug discovery*”) tem como objetivo a identificação de pequenos fragmentos de moléculas “ligantes”, de baixo peso molecular (< 150 Da) que sejam capazes de interagirem com uma macromolécula biológica alvo em diferentes partes do sítio de ligação e na combinação deles para criar uma molécula com maior

afinidade. Os ensaios que avaliam os determinantes dessa ligação, envolvem a utilização de técnicas como cristalografia de raios-x ou espectroscopia de ressonância magnética nuclear <sup>(18,19)</sup>. Por meio dessa estratégia, é possível explorar um maior espectro químico de moléculas em comparação com a triagem tradicional <sup>(18)</sup>.

Figura 2. Estratégias computacionais para descoberta e desenvolvimento de fármacos



Fonte: autor Rubens Lima do Monte Neto

## Considerações finais

Num mundo globalizado que requer ainda mais colaboração da comunidade e a manutenção da democracia e dos direitos humanos; não fica diferente para a descoberta de fármacos. O avanço tecnológico nos permitiu atingir um nível de evolução nunca antes experimentado, especialmente no fluxo da informação, num momento que o 5G bate à porta. Atualmente, capanhas colaborativas são essenciais para o avanço na descoberta de novas moléculas ativas e esforços multidisciplinares são cada vez mais presentes nessas frentes. Bancos gratuitos e soluções de fonte aberta (*hardware* ou *software*) são de grande apoio na evolução dos estudos preditivos e experimentais na descoberta e desenvolvimento de fármacos. A ciência aberta não pode ser mais uma tendência, mas ao contrário disso, alicerçar o avanço de tecnologias e do conhecimento para o bem global. É preciso de cientistas corajosos e bastante apoio na divulgação científica do conhecimento e muito cuidado ao adentrar na seara negacionista. Não é diferente de outras ciências, é preciso apoio político e

financeiro e mais do que isso, a compreensão da comunidade de que o conhecimento é capaz de gerar soluções, como a descoberta de fármacos, para nos tirar de situações como a que o mundo vive hoje, sob a ameaça de um vírus que mede aproximadamente 50 – 200 nm, o SARS-CoV-2. Além de ficar em casa, podemos emprestar o poder computacional dos nossos PCs para capacitar especialistas em buscar soluções quimioterápicas que resultam no bem estar da população mundial.

## **Referências**

1. Van den Broeck WMM. Chapter 3 - Drug Targets, Target Identification, Validation, and Screening. In: Wermuth CG, Aldous D, Raboisson P, Rognan D, organizadores. The Practice of Medicinal Chemistry (Fourth Edition) [Internet]. San Diego: Academic Press; 2015 [citado 24 de maio de 2020]. p. 45–70. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780124172050000031>
2. Santos R, Ursu O, Gaulton A, Bento AP, Donadi RS, Bologa CG, et al. A comprehensive map of

molecular drug targets. *Nat Rev Drug Discov.* janeiro de 2017;16(1):19–34.

3. Newman DJ, Cragg GM. Natural Products as Sources of New Drugs over the Nearly Four Decades from 01/1981 to 09/2019. *J Nat Prod.* 27 de março de 2020;83(3):770–803.

4. Lack of new antibiotics threatens global efforts to contain drug-resistant infections [Internet]. [citado 28 de maio de 2020]. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/detail/17-01-2020-lack-of-new-antibiotics-threatens-global-efforts-to-contain-drug-resistant-infections>.

5. Ling LL, Schneider T, Peoples AJ, Spoering AL, Engels I, Conlon BP, et al. A new antibiotic kills pathogens without detectable resistance. *Nature.* janeiro de 2015;517(7535):455–9.

6. Takenaka T. Classical vs reverse pharmacology in drug discovery. *BJU International.* 1º de setembro de 2001;88(s2):7–10.

8. Pushpakom S, Iorio F, Eyers PA, Escott KJ, Hopper S, Wells A, et al. Drug repurposing: progress,

challenges and recommendations. *Nature Reviews Drug Discovery*. janeiro de 2019;18(1):41–58.

9. Kumar S, Kumar S. Chapter 6 - Molecular Docking: A Structure-Based Approach for Drug Repurposing. In: Roy K, organizador. *In Silico Drug Design* [Internet]. Academic Press; 2019 [citado 24 de maio de 2020]. p. 161–89. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128161258000067>

10. Pires DEV, Blundell TL, Ascher DB. pkCSM: Predicting Small-Molecule Pharmacokinetic and Toxicity Properties Using Graph-Based Signatures. *J Med Chem*. 14 de maio de 2015;58(9):4066–72.

12. Guerini AE, Triggiani L, Maddalo M, Bonù ML, Frassine F, Baiguini A, et al. Mebendazole as a Candidate for Drug Repurposing in Oncology: An Extensive Review of Current Literature. *Cancers*. setembro de 2019;11(9):1284.

13. Rigden DJ. *From Protein Structure to Function with Bioinformatics*. Springer; 2017. 509 p.

14. Sali A, Blundell TL. Comparative protein modelling by satisfaction of spatial restraints. *J Mol Biol.* 5 de dezembro de 1993;234(3):779–815.
  
15. de Azevedo WF, Dias R. Experimental approaches to evaluate the thermodynamics of protein-drug interactions. *Curr Drug Targets.* dezembro de 2008;9(12):1071–6.
  
16. Murray CW, Rees DC. The rise of fragment-based drug discovery. *Nature Chemistry.* junho de 2009;1(3):187–92.
  
17. Erlanson DA, Davis BJ, Jahnke W. Fragment-Based Drug Discovery: Advancing Fragments in the Absence of Crystal Structures. *Cell Chemical Biology.* janeiro de 2019;26(1):9–15.
  
18. van Montfort RLM, Workman P, Price AJ, Howard S, Cons BD. Fragment-based drug discovery and its application to challenging drug targets. *Essays Biochem.* 8 de novembro de 2017;61(5):475–84.

## *CAPÍTULO 30*

### **TECHNOLOGICAL INNOVATION AND DELIVERY SYSTEM BIOPROSPECTING THE NATURAL PRODUCTS**

**(Inovação tecnológica e sistema de entrega na  
bioprospecção de produtos naturais)**

Ana Letícia Braz

Innovative materials and technologies applied to biomedical studies have been developed along the last 20 years varying their delivery systems. Devices, implants, microneedles, transdermal and mucoadhesive patches, scaffolds, micro and nanoparticles have received considerable attention for their controlled and sustained release system applied to wide range of diseases. These biomedical materials can carry drugs and other molecules to target specific sites whilst protect them from physiological environment, improve their efficacy of conventional dosage forms and patients compliance,

reduce toxicity and side effects (1, 2). Furthermore, the applicability of these materials are related with their stability, efficiency, biocompatibility and functionality in the clinical trials as well as their degradation rate and excretion routes (*i.e.* via hydrolysis or enzymatic routes) (2, 3).

The drug delivery systems and administration routes including oral, nasal, ocular, topical and/or local (*i.e.* skin ointments and patches) and systemic delivery (*i.e.* intravenous injection) have been investigated for wide range of diseases. According with the literature, oral delivery is the most used administration route for small-molecules and pharmaceutical formulations due the non-invasive nature (4-6) and it includes solid and liquid forms (*e.g.* pharmaceutical capsules, tablets and syrups). Oral delivery system dominates the therapeutic landscape and exhibits some advantages such as improve the therapeutic adherence and patients compliance, controlled release formulations and limited dosing frequency (4, 7). It is well known that

the non-toxic, biocompatible and immunological inert materials have been developed to facilitate the oral delivery of small molecules and macroscopic systems (6, 7) which include natural, synthetic, cationic and anionic polymers. However, they can show some indirect drawbacks from mucoadhesive and non-adhesive materials including potential dislodgment of materials from mucosal lining due the mucus regeneration or physical disruption and low permeation of molecules across the intestinal epithelium (8).

Other delivery routes can offer highly vascularized and permeable surface (*e.g.* nasal airway) (9, 10), eliminate the first pass effect (*e.g.* ocular delivery), avoid gastrointestinal side effects (*e.g.* skin delivery) (11) and improve therapeutic efficacy by systemic delivery (12) in order to overcome the issues related with the oral delivery system. The nasal delivery route can avoid first pass metabolism and improve patients therapeutic adherence due the needle-free treatments and it has

established novel treatments for wide range of diseases along the last few years including asthma and lung cancer (10, 13).

Despite the several advantages of nasal treatments by inhalation, some lung barriers such as columnar epithelial cells, mucus and macrophages cells need to be overcome before the therapy reaches the target site otherwise the insoluble particles and macroscopic compounds deposited in the lung and alveoli can be swept from the tissue (13). Other limitations of nasal delivery can compromise the drug absorption and bioavailability as soon as the molecules were deposited in the lung (10, 14). Therapeutic strategies such as carriers, targeted therapies with cell penetrating capabilities (9, 10) and alternative routes for therapy delivery have been developed in order to overcome the issues of conventional inhalation therapies (13).

The ocular delivery consisted of lachrymal glands, upper and lower eyelids, the conjunctival sac, lachrymal puncta and ducts is used as non-invasive

delivery method and can produce a rapid and short-live entry of aqueous solution into the systemic circulation (15). Additionally, a second option of topical drug delivery include the use of materials through the skin which exhibits minimal invasive materials to improve the transdermal drug availability by the significant amount of therapy locally and patients compliance, avoid gastrointestinal side effects and relieve symptomatic pain after one-dose medication (6, 11, 16), however some patches applied in the skin surface has not been fully elucidated until the present moment (11, 16). In the contrary, the microneedles are the most widely used technology for the transdermal delivery of therapies in clinical trials (4, 17). Their applications have expanded significantly along the last few years across a variety of tissue types and show some advantages including minimal discomfort, rapid repair of epithelial disruption (6) and can be applied by the patients themselves thereby their compliance and convenience (18, 19).

Other delivery systems also include the development of micro and nanoparticles from natural and synthetic sources (2, 6, 13, 20-23) and they can vary from few nanometres to microscopic size range. They have been used as an alternative choice for gene delivery (13), cancer therapy (24), diabetes (*i.e.* insulin encapsulation), hormone (*i.e.* calcitonin and gonadorelin), immunosuppressant (*i.e.* cyclosporine) delivery (6) and it can exhibit some advantages such as low toxicity and immunogenicity, biocompatible, biodegradable, minimize side effects, high stability, easy scalability, reproducibility (6, 12, 13, 25) and molecules protection against biological degradation. However nano size carriers can be adjusted up to 100 nm with a narrow distribution which show great structural stability, can be easily delivered via blood stream and improve the therapeutic efficacy (12, 13).

The colloidal particles (*e.g.* liposomes) are used as carriers which consists one or more concentric shells of phospholipid bilayers and their structure mainly held together due the hydrophobic interaction

between the layers. Unfortunately, few researches combining the development of technologies (*e.g.* carriers), phytochemicals and natural products have been found until the present moment including encapsulation of curcumin (26, 27),  $\beta$ -carotene (27, 28), lutein (27, 29), lycopene (27), vitamins (27, 30), resveratrol (27) and essential oils (31, 32).

## **Conclusions**

It is well known, that some phytochemical compounds have been applied to food, cosmetic and pharma company exploring their therapeutic potentials. However, the development of new technologies using natural sources varying their delivery systems still behind compared to technologies using synthetic materials (*i.e.* devices and nanoparticles). The few researches published until the present moment demonstrate the importance to push the boundaries of the scientific knowledge regarding the use of natural sources to target biological sites and improve patients

compliance.

## References

1. Pandey SK, Patel DK, Thakur R, Mishra DP, Maiti P, Haldar C. Anti-cancer evaluation of quercetin embedded PLA nanoparticles synthesized by emulsified nanoprecipitation. *International journal of biological macromolecules*. 2015;75:521-9.
2. Braz AL, Ahmed I. Manufacturing processes for polymeric micro and nanoparticles and their biomedical applications. *AIMS Bioengineering*. 2017;4(1):46.
3. Rescignano N, Fortunati E, Armentano I, Hernandez R, Mijangos C, Pasquino R, et al. Use of alginate, chitosan and cellulose nanocrystals as emulsion stabilizers in the synthesis of biodegradable polymeric nanoparticles. *Journal of colloid and interface science*. 2015;445:31-9.
4. Anselmo AC, Gokarn Y, Mitragotri S. Non-invasive delivery strategies for biologics. *Nature Reviews Drug Discovery*. 2018.

5. Food U, Administration D. Novel drug approvals for 2018. 2018. 2018.
6. Brown TD, Whitehead KA, Mitragotri S. Materials for oral delivery of proteins and peptides. *Nature Reviews Materials*. 2019:1-22.
7. Lamson NG, Berger A, Fein KC, Whitehead KA. Anionic nanoparticles enable the oral delivery of proteins by enhancing intestinal permeability. *Nature Biomedical Engineering*. 2020;4(1):84-96.
8. Sadeghi S, Lee WK, Kong SN, Shetty A, Drum CL. Oral administration of protein nanoparticles: An emerging route to disease treatment. *Pharmacological Research*. 2020:104685.
9. Marasini N, Skwarczynski M, Toth I. Intranasal delivery of nanoparticle-based vaccines. *Therapeutic delivery*. 2017;8(3):151-67.
10. Mato YL. Nasal route for vaccine and drug delivery: features and current opportunities. *International journal of pharmaceutics*. 2019:118813.
11. Liu C, Guan Y, Tian Q, Shi X, Fang L. Transdermal enhancement strategy of ketoprofen and

teriflunomide: The effect of enhanced drug-drug intermolecular interaction by permeation enhancer on drug release of compound transdermal patch. *International journal of pharmaceutics*. 2019;572:118800.

12. Zheng Y, Li Z, Chen H, Gao Y. Nanoparticle-based drug delivery systems for controllable photodynamic cancer therapy. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2020:105213.

13. Abdelaziz HM, Gaber M, Abd-Elwakil MM, Mabrouk MT, Elgohary MM, Kamel NM, et al. Inhalable particulate drug delivery systems for lung cancer therapy: Nanoparticles, microparticles, nanocomposites and nanoaggregates. *journal of Controlled Release*. 2018;269:374-92.

14. Karavasili C, Fatouros DG. Smart materials: in situ gel-forming systems for nasal delivery. *Drug discovery today*. 2016;21(1):157-66.

15. Bertens CJ, Martino C, van Osch MC, Lataster A, Dias AJ, van den Biggelaar FJ, et al. Design of the ocular coil, a new device for non-invasive drug delivery. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2020.

16. Wang W, Song T, Wan X, Liu C, Zhao H, Fang L. Investigate the control release effect of ion-pair in the development of escitalopram transdermal patch using FT-IR spectroscopy, molecular modeling and thermal analysis. *International journal of pharmaceutics*. 2017;529(1-2):391-400.
  
17. Morales JO, Fathe KR, Brunaugh A, Ferrati S, Li S, Montenegro-Nicolini M, et al. Challenges and future prospects for the delivery of biologics: oral mucosal, pulmonary, and transdermal routes. *The AAPS journal*. 2017;19(3):652-68.
  
18. Abramson A, Caffarel-Salvador E, Khang M, Dellal D, Silverstein D, Gao Y, et al. An ingestible self-orienting system for oral delivery of macromolecules. *Science*. 2019;363(6427):611-5.
  
19. Brayden DJ, Hill T, Fairlie D, Maher S, Mrsny R. Systemic delivery of peptides by the oral route: Formulation and medicinal chemistry approaches. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2020.
  
20. Amirthalingam E, Rodrigues M, Casal-Dujat L, Calpena AC, Amabilino DB, Ramos-López D, et al. Macrocylic imidazolium-based amphiphiles for the

synthesis of gold nanoparticles and delivery of anionic drugs. *Journal of colloid and interface science*. 2015;437:132-9.

21. Deng W, Wang H, Wu B, Zhang X. Selenium-layered nanoparticles serving for oral delivery of phytomedicines with hypoglycemic activity to synergistically potentiate the antidiabetic effect. *Acta pharmaceutica sinica B*. 2019;9(1):74-86.

22. Deng W, Xie Q, Wang H, Ma Z, Wu B, Zhang X. Selenium nanoparticles as versatile carriers for oral delivery of insulin: insight into the synergic antidiabetic effect and mechanism. *Nanomedicine: nanotechnology, biology and medicine*. 2017;13(6):1965-74.

23. Florek J, Caillard R, Kleitz F. Evaluation of mesoporous silica nanoparticles for oral drug delivery—current status and perspective of MSNs drug carriers. *Nanoscale*. 2017;9(40):15252-77.

24. Soleymani S, Yari F, Bolhassani A, Bakhshandeh H. Platelet microparticles: An effective delivery system for anti-viral drugs. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*. 2019;51:290-6.

25. Nisini R, Poerio N, Mariotti S, De Santis F, Fraziano M. The multirole of liposomes in therapy and prevention of infectious diseases. *Frontiers in immunology*. 2018;9:155.
  
26. Nguyen TA, Tang QD, Doan DCT, Dang MC. Micro and nano liposome vesicles containing curcumin for a drug delivery system. *Advances in Natural Sciences: Nanoscience and Nanotechnology*. 2016;7(3):035003.
  
27. McClements DJ. Advances in nanoparticle and microparticle delivery systems for increasing the dispersibility, stability, and bioactivity of phytochemicals. *Biotechnology advances*. 2020;38:107287.
  
28. Michelon M, Mantovani RA, Sinigaglia-Coimbra R, de la Torre LG, Cunha RL. Structural characterization of  $\beta$ -carotene-incorporated nanovesicles produced with non-purified phospholipids. *Food research international*. 2016;79:95-105.
  
29. Zhao L, Temelli F, Curtis JM, Chen L. Encapsulation of lutein in liposomes using

supercritical carbon dioxide. Food research international. 2017;100:168-79.

30. Bochicchio S, Barba AA, Grassi G, Lamberti G. Vitamin delivery: Carriers based on nanoliposomes produced via ultrasonic irradiation. LWT-Food Science and Technology. 2016;69:9-16.

31. Lopes PQ, Carneiro FB, de Sousa ALB, Santos SG, Oliveira EE, Soares LAL. Technological evaluation of emulsions containing the volatile oil from leaves of *Plectranthus Amboinicus* Lour. Pharmacognosy magazine. 2017;13(49):159.

32. Dora CL, Costa Silva LF, Mazzarino L, Siqueira JM, Fernandes D, Pacheco LK, et al. Oral delivery of a high quercetin payload nanosized emulsion: in vitro and in vivo activity against B16-F10 melanoma. Journal of nanoscience and nanotechnology. 2016;16(2):1275-81.

## CAPÍTULO 31

# BIOMATERIAIS COMO NOVAS POSSIBILIDADES DE TRATAMENTO E DIAGNÓSTICO EM ODONTOLOGIA

Lilia van der Linden;  
Caroline Uchôa Souza Carvalho;  
Kalinka Zuleika da Silva Dias;  
Mysrayn Yargo de Freitas Araújo Reis;  
Fabio Correia Sampaio.

### **Introdução**

Biomateriais são definidos como *“qualquer substância ou combinação de substâncias de origem sintética ou natural que possa substituir parcialmente ou totalmente qualquer tecido, órgão ou função do corpo por um período de tempo suficiente para melhorar a qualidade de vida de um indivíduo”*<sup>(1)</sup>. O termo tem conceito amplo e pode gerar confusão. Definições mais restritas ou amplas e associadas à “biocompatibilidade” ou “biotolerância” do hospedeiro são cada vez mais frequentes. O fato é que

os biomateriais já são uma realidade da prática médica e odontológica e estão presentes em materiais da indústria, na reconstrução ou regeneração tecidual, em cirurgias, em equipamentos médicos, materiais restauradores e até mesmo em aplicações tecnológicas para diagnóstico<sup>(2,3)</sup>.

O objetivo do presente capítulo é apresentar o estado da arte e o potencial biotecnológico dos biomateriais na Odontologia. Nesse contexto, é importante ressaltar que a cavidade bucal é um ambiente desafiador para qualquer biomaterial: tem umidade constante dada pela saliva que é rica em enzimas, proteínas e eletrólitos, tem grande variação de pH ao longo do dia, exposição constante aos alimentos ácidos e alcalinos, líquidos e por vezes abrasivos. E mais, a boca é ambiente propício para o desenvolvimento de biofilmes microbianos que podem aderir aos dentes, e certamente aos próprios biomateriais quando incorporado em materiais restauradores e próteses<sup>(2,3)</sup>. Enfim, é nesse ambiente que podemos colocar à prova as potencialidades dos

biomateriais assim como compreender também as limitações dos mesmos.

## **Biomateriais em Odontologia**

A maioria dos biomateriais odontológicos é classificado como dispositivos gerais, que incluem: implantes, materiais restauradores (cerâmicas, cimentos, agentes de união, polímeros), fio de sutura, materiais para ortodontia (movimentação dentária), mas há também formas farmacêuticas específicas como enxaguatórios, cremes dentais e formas inovadores de “*drug delivery*” menos conhecidas como lâminas, adesivos, membranas. Atualmente, em uma perspectiva mais ampla, um biomaterial pode ser considerado como *“qualquer substância ou combinação de substâncias que não sejam fármacos (de origem natural ou sintética) que aumente ou substitui parcial ou totalmente qualquer tecido, órgão ou função do corpo, a fim de manter ou melhorar a qualidade de vida do indivíduo”*<sup>(4)</sup>. Dessa forma, um fármaco por si só não é um biomaterial, mas quando

incorporado a uma matriz de suporte esse sistema pode ser considerado um biomaterial.

A classificação mais abrangente dos biomateriais divide esses sistemas em dois grupos principais (Quadro 1) <sup>(5, 6)</sup>.

Quadro 1. Classificação dos biomateriais

1) Composição química		2) Resposta biológica
Biológicos	- Autógenos	Bioinertes
	- Alógenos	
	- Xenógenos	Bioreabsorvíveis
Sintéticos	- Metais	Biativos
	- Cerâmicos	
	- Polímeros	

Fonte: Adaptado de Sinhoreti *et al.*, 2013 e Ahuja *et al.*, 2015.

Os biomateriais do tipo autógeno (provenientes do próprio paciente) são considerados o biomateriais padrão ouro por serem materiais osteocondutores, osteoindutores e osteogênicos. Quando provenientes de indivíduos geneticamente diferentes, porém da mesma espécie são chamados de alógenos; e quando provenientes de doadores de espécies distintas (a exemplo de ossos bovinos ou suínos) se chamam de xenógenos<sup>(6, 7,8)</sup>. Os

biomateriais sintéticos também são muito valorizados. Na busca por biomateriais de alta resistência, os sintéticos da classe dos metais assumem importante papel na odontologia. Nesse grupo se destacam os implantes de titânio. Os metais conferem resistência à fratura e fadiga e contribuem para excelente desempenho mecânico. No entanto, a escolha clínica por vezes é justamente por um produto “*metal-free*” com menor risco de processo alérgico. Um exemplo desse caso são os implantes com dióxido de zircônio ou zircônia (ZrO<sub>2</sub>). Trata-se de material cerâmico “livre” de metais e, portanto, com baixo risco de provocar reações alérgicas no organismo, biocompatível e classificado como bioinerte.

Os biomateriais denominados bioinertes são todos aqueles que desencadeiam uma reação mínima com o tecido circundante. Importante entender que metais como aço inoxidável pode ser classificado como bioinerte. Assim como alumina e zircônio parcialmente estabilizado e polietileno de peso

molecular ultra-alto. De modo contrário, os biomateriais que reagem com tecidos e ossos circundantes levando a formação de uma camada de tecido fibroso entre o material e o tecido biológico, são denominados bioativos como ocorre com hidroxiapatita sintética, vitrocerâmica de apatita-volastonita e bioglass®. Uma terceira classificação refere-se aos bioreabsorvíveis, que agem a partir da dissolução inicial do biomaterial no local de ação com consequente reabsorção após o avanço do tecido alvo. Como exemplos de materiais bioabsorvíveis podem ser citados o tricálcio fosfato, copolímeros do ácido polilático-poliglicólico e outros mais comumente utilizados, tais como, carbonato de cálcio e gesso<sup>(5,6)</sup>.

## **Biomateriais inovando o diagnóstico em Odontologia**

No conceito amplo de biomateriais, esses também são definidos como dispositivos de diagnóstico<sup>(9)</sup>. Nessa perspectiva, é notório o uso de saliva como fluido de diagnóstico para uma variedade de doenças

(bacterianas, autoimunes, virais) e enfermidades malignas como o carcinoma de células escamosas e o câncer de mama <sup>(10)</sup>.

As vantagens no uso da saliva como fluido de diagnóstico são conhecidas: coleta não-invasiva de baixa complexidade, pouca concentração de proteína e com menor interferentes que o plasma. No entanto, há ainda algumas barreiras tecnológicas a enfrentar dependendo do analito ou molécula/microrganismo alvo a ser investigado: degradação rápida da amostra pode exigir refrigeração, baixa concentração de substâncias alvo, variação circadiana e risco de contaminação externa comparada com sangue e plasma<sup>(11)</sup>.

Alguns biomateriais de suporte tem facilitado o diagnóstico de várias doenças pela saliva. Nesse contexto merece destaque a urgência em se desenvolver testes rápidos de vírus pela saliva como no momento atual da pandemia provocada pelo SARS-CoV-2 (covid-19). Kits de diagnóstico com tecnologia  $\mu$ PAD (*microfluidic paper-based analytical devices* )

são fortes candidatos para esse fim. Basicamente, o teste consiste de um papel de natureza hidrofílica que permite demarcações hidrofóbicas com vários tipos de polímeros. O padrão de imagem obtido pode ser lido por um celular e enviado para uma central analítica<sup>(11)</sup>. No entanto, essas tecnologias ainda estão em provas de conceito ou fase pré-analítica e precisam atingir segurança, sensibilidade e especificidade para serem comercializadas.

### **Biomateriais no tratamento odontológico**

Os tratamentos odontológicos que utilizam os biomateriais vão desde procedimentos restauradores aos mais complexos como os cirúrgicos. A função de um material restaurador em odontologia é substituir a harmonia biológica, funcional e estética de estruturas dentárias perdidas <sup>(12,13)</sup>. Os cimentos de ionômero de vidro (CIVs) aderem quimicamente ao esmalte e à dentina, tem baixo coeficiente de expansão térmica e compatibilidade com estruturas dentárias e capacidade de liberar íons de flúor. No

entanto, esses materiais têm baixa resistência ao desgaste e fraturas. Uma alternativa encontrada para potencializar a eficácia dos biomateriais, a exemplo dos cimentos de ionômero de vidro (CIV) e das cerâmicas, é modificá-los com substâncias biocompatíveis<sup>(14,15)</sup>.

Os CIVs reforçados com zircônia tem mais resistência à compressão e microdureza. Os vidros bio-ativos (VB) podem favorecer ainda mais a remineralização das lesões de cárie quando incorporados aos CIVs. E extrato etanólico da própolis vermelha uma vez adicionado ao CIV melhora as propriedades antimicrobianas do mesmo<sup>(16)</sup>.

Em se tratando de biomateriais cerâmicos eles têm sem sua composição o fosfato de cálcio e/ou silicato de cálcio que confere biocompatibilidade de implante, substituindo alguns tecidos mineralizados. Já na endodontia, os biomateriais cerâmicos se apresentam como alternativa, principalmente, como cimento reparador<sup>(17) (18)</sup>.

## Quadro 2. Biomateriais e aplicações em Odontologia.

<b>CAMPO DE ATUAÇÃO: BIOMATERIAIS</b>	<b>APLICAÇÕES E VANTAGENS</b>
<b>Dentística</b> : CIVs + Zircônia ; CIVs + Vidros Bioativos (VB)	Melhora restaurações dentárias e remineralização. (14) (15)
<b>Endodontia</b> : Biomateriais cerâmicos à base de silicato tricálcico (cimento reparador); Cimentos endodônticos à base de hidroxiapatita (HA) e agregado de trióxido mineral (MTA); Biomateriais Sintéticos Polímeros: Gutta-percha	Melhora a qualidade físico-química e biológica dos cimentos para obturação dos canais tratados endodonticamente. (5) (16)
<b>Ortodontia</b> : CIVs + Própolis vermelha (EEPV); Resina ortodôntica enriquecida com Extrato de Própolis.	Atividades antimicrobianas. (16) (19)
<b>Periodontia</b> : Proteínas procedentes da matriz do esmalte (PDME)	Induz o reparo na regeneração tecidual guiada (14)
<b>Implantodontia</b> : Biomateriais cerâmicos constituídos de fosfato de cálcio e/ou silicato de cálcio ;Biomateriais Sintéticos Metais: Parafusos e placas de titânio	Bio-compatibilidade; Fixação óssea(5) (17)
<b>Cirurgia e Prótese</b> : Biomateriais Biocerâmicos; Polímeros (Fios de Sutura); Biomateriais Metálicos; Cerâmicos (de alumina, zircônia e leucita) e Poliméricos (silicone).	Reparação óssea; Restaurações e próteses dentárias; aceleração do processo de cicatricial. (5)

Fonte: Próprios autores

Na ortodontia, há estudos que estimularam a fabricação de arcos ortodônticos a partir de matrizes poliméricas reforçadas com fibras que associam a vantagem estética com as necessidades biomecânicas. Os fios de sutura antimicrobianos com propriedade de serem reabsorvíveis são também importantes para recuperação tecidual sem contaminação. Nas cirurgias odontológicas a recuperação tecidual de mucosas e de base óssea pode ser toda guiada por biomateriais<sup>(19)</sup>.

### **Considerações finais e perspectivas futuras**

Nos últimos 20 anos, os biomateriais deram um grande salto evolutivo a ponto de se questionar a própria definição sobre o que é ser um biomaterial. A evolução tecnológica nesse campo continua acelerada. Novas propriedades como biomimetismo, memória espacial e funcional já estão sendo incorporadas aos novos biomateriais<sup>(19)</sup>. A engenharia de regeneração tecidual com células-tronco de dentes decíduos do próprio paciente já é uma realidade e ao mesmo tempo um desafio para algumas especialidades a

exemplo da periodontia e implantodontia. Por fim, o que se sabe atualmente é que a pesquisa com biomateriais é um campo aberto apesar dos saltos tecnológicos já realizados.

### **Referências**

(1) Galletti PM, Boretos JW. Report on the Consensus Development Conference on “Clinical Applications of Biomaterials,”. J Biomed Mater Res. 1983; 17(3):539-55.

(2) Galletti PM. Biomaterials: Facts and Fiction. In: Akutsu T., Koyanagi H. (eds) Heart Replacement (pp. 103-109). Springer: Tokyo; 1998.

(3) Khurshid Z, Naseem M, Zafar MS, Najeeb S, Zohaib S. Propolis: A natural biomaterial for dental and oral healthcare. J Dent Res Dent Clin Dent Prospects. 2017;11(4):265-274.

(4) Bandeira M, Conde N, Toda C, Casaroto A, Lima G, Vasconcellos M, et al. Biopharmaceutical Products and Biomaterials of the Amazon Region Used in Dentistry. Biomater Regen Med. 2018.

- (5) Sinhorette MAC, Vitti RP, Correr-Sobrinho L. Biomateriais na Odontologia: panorama atual e perspectivas futuras. *Rev Assoc Paul Cir Dent.* 2013; 67(4): 256-261.
- (6) Ahuja A, Ahuja V, Singh KS. Current concepts of regenerative biomaterials in implant dentistry. *J Int Clin Dent Res Organ.* 2015; 7(3): 34-9.
- (7) Wang W, Yeung KWK. Bone grafts and biomaterials substitutes for bone defect repair: A review. *Bioact Mater.* 2017; 2(4): 224-247.
- (8) Pires ALR, Bierhalz ACK, Moraes ÂM. Biomateriais: tipos, aplicações e mercado. *Quim Nova.* 2015; 38(7): 957-71.
- (9) de Lima MP, Dantas RVF, Mendes JL, Costa Neto RE, Lima Júnior JA, Ximenes de Souza SL. Biomarcadores salivares en el diagnóstico y monitoreo de enfermedades bucales y sistémicas. *Rev Cubana Estomatol.* 2020; 57(1): 2139.
- (10) Soares Nunes LA, Mussavira S, Bindhu OS. Clinical and diagnostic utility of saliva as a non-

invasive diagnostic fluid: a systematic review. *Biochem Med.* 2015; 25(2): 177-92.

(11) Sher M, Zhuang R, Demirci U, Asghar W. based analytical devices for clinical diagnosis: recent advances in the fabrication techniques and sensing mechanisms. *Expert Rev Mol Diagn.* 2017; 17(4): 351-66.

(12) Abdulsamee N, Elkhadem AH. Zirconomer and Zirconomer Improved (White Amalgams): Restorative Materials for the Future. Review. *EC Dent Sci.* 2017; 15(4): 134-150.

(13) Melo TMTTC, de Oliveira IR, Brandim AS, Soares LES. Properties of zirconia-containing glass-ionomer cement. *Cerâmica.* 2019; 65(375): 394-399.

(14) Mendes ACB. Adição de vidros bioativos em cimento de ionômero de vidro: propriedades físicas, mecânicas e microbiológicas. Araraquara: Faculdade de Odontologia de Araraquara da Universidade Estadual Paulista – UNESP, 2019. Tese de Doutorado em Odontopediatria.

(15) Aouada LF, Silva BB. Efeito antimicrobiano de cimento de ionômero de vidro modificado com

própolis vermelha brasileira. Revista Saúde-UNG-Ser. 2019; 12(1): 14.

(16) Batista HA. Síntese por reação de combustão de hidroxiapatita para desenvolvimento de cimento endodôntico com característica radiopacificadora. Campina Grande: Universidade Federal de Campina Grande – UFCG, 2020. Tese de Doutorado em Ciência e Engenharia de Materiais.

(17) Xuereb M, Sorrentino F, Damidot D, Camilleri J. Development of novel tricalcium silicate-based endodontic cements with sintered radiopacifier phase. Clin Oral Invest. 2016; 20: 967–982.

(18) Da SILVA CR. Caracterização e estabilidade de resina ortodôntica associada a nanomateriais e enriquecida com própolis. Maceió: Universidade Federal de Alagoas – UFAL, 2018. Tese de Doutorado em Biotecnologia.

(19) Qasim SSB, Zafar MS, Niazi FH, Alshahwan M, Omar H, Daood U. Functionally graded biomimetic biomaterials in dentistry: an evidence-based update., J Biomater Sci Polym Ed. 2020; 31(9): 1144-11.

*CAPÍTULO 32*

**CULTIVOS CELULARES E SUAS APLICAÇÕES  
BIOTECNOLÓGICAS NA INDÚSTRIA  
FARMACÊUTICA**

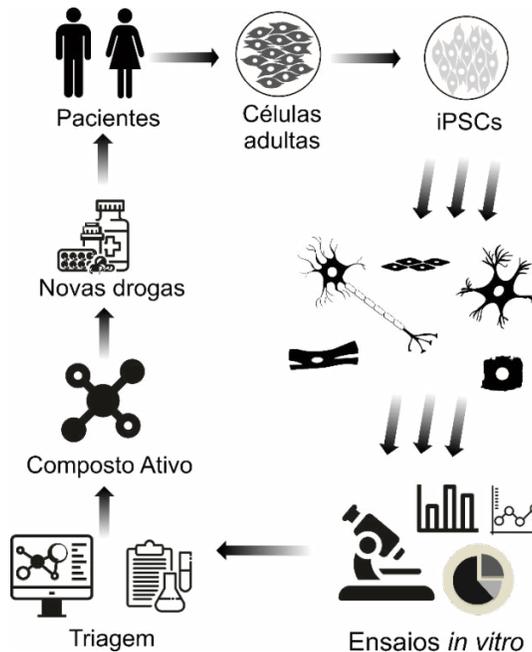
Sérgio Ricardo Aluotto Scalzo;  
Anderson Kenedy Santos.

**Introdução**

O *screening* de drogas hoje permite testar produtos naturais bem como frações destes diretamente, ou através da identificação dos princípios ativos, que podem ser modificados quimicamente a fim de maximizar a resposta biológica. Estes compostos precisam passar por fases de testes *in vitro*, antes de serem testados em modelos animais e por fim no ser humano (Figura 1).

Figura 1: Screening de drogas a partir de iPSCs. iPSCs são obtidas de pacientes, diferenciadas e submetidas aos compostos-testes, que podem ser otimizados e

refinados a fim de se obter compostos ativos eficientes capazes de gerarem novas drogas.



Fonte: Autoral

Neste contexto, as utilizações do cultivo celular, demonstram uma alta versatilidade de aplicações por permitir a utilização de diversos tipos de células *in vitro*, mimetizando a resposta *in vivo*. Neste capítulo nós abordaremos a capacidade de utilizar a cultura celular na descoberta de compostos biologicamente

ativos, de forma que seja possível identificar novos compostos dentre uma gama enorme de outros compostos que produtos naturais podem nos oferecer.

### **Células-tronco**

As células-tronco são células em estado indiferenciado, ou seja, ainda não possuem características e funções das células especializadas encontradas no tecido adulto, e possuem como características fundamentais a capacidade de autorrenovação, proliferação e diferenciação quando recebem estímulos específicos. Possuem duas características fundamentais: a capacidade de, sem senescência celular replicativa, promoverem sua autorrenovação de maneira ilimitada; e a capacidade de diferenciação em um ou mais tipos celulares de maneira terminal (6).

## - Células-tronco pluripotentes

As células-tronco podem ser de origem embrionária ou em nichos no tecido adulto. As ESC (*Embryonic stem cells*, células-tronco embrionárias) isoladas de blastocistos - são um tipo celular responsável pela geração de todos os tipos celulares encontradas no indivíduo adulto.

Em 2006 o grupo de Takahashi and Yamanaka (1), conseguiu conseguir gerar um tipo celular pluripotente, assim como ESCs, mas a partir de fibroblastos da pele humana. Pela indução dos fatores de transcrição OCT4, SOX2, KLF4 E c-MYC, as células são reprogramadas a um estado indiferenciado e altamente proliferativo - pluripotente como ESCs - podendo na sequência diferenciarem-se em qualquer célula do endoderma, ectoderma ou mesoderma. Estas células receberam o nome de iPSC (*induced-Pluripotent stem cells*, células-tronco pluripotentes induzidas) e desde então vários tipos celulares adultos foram usados para gerar iPSCs e sua utilização passou a ser amplamente utilizada em *screening* de drogas. As células utilizadas na triagem e descoberta

de compostos naturais podem ser derivadas de ESCs, iPSCs, ou linhagens celulares específicas.

Para iniciar a diferenciação, substitui-se os meios de pluripotência para meios com fatores mínimos inicialmente. Neste ponto podem ser formados os corpos embrioides. Esta é a matéria-prima para a obtenção de organoides, que utilizando fatores uma combinação de fatores, dentro de minirreatores, sem desagregar o aglomerado de células, formam-se estruturas tridimensionais similares às encontradas em órgãos (Tabela 1). Os organoides são considerados uma ferramenta muito promissora, por mimetizarem a função de todo um órgão, são considerados um modelo *in vitro* mais próximo dos modelos *in vivo* para a testagem de drogas.

Além dos ensaios gerais feitos em cultura de células, ensaios mais específicos ao tipo celular podem ser aplicados o que é o grande diferencial da utilização de iPSCs.

**Tabela 1. Células geradas a partir de iPSCs e aplicações de estudo possíveis**

<b>Célula</b>	<b>Ensaio possíveis</b>
Neurônio	Eletrofisiologia, neurotoxicidade, neurodegeneração e doenças psiquiátricas (i.e. autismo, esquizofrenia) (2)
Cardiomiócito	Contratilidade, ritmicidade e cardiotoxicidade (3)
Oligodendrócito	Mielinização, eletrofisiologia, doenças psiquiátricas (4)
Hepatócito	Metabolização e resistência à drogas, hepatotoxicidade (5)
Células endoteliais	Medidas de óxido nítrico, resistência tran-endotelial, vascularização (6)

<b>Organoide</b>	<b>Ensaio possíveis</b>
Cerebral	Metabolismo, neurotoxicidade, eletrofisiologia, neurodesenvolvimento, vascularização, doenças genéticas (7)
Cardíaco	Contratilidade, ritmicidade cardiotoxicidade, vascularização, <i>screening</i> de drogas, eletrofisiologia (3)
Hepático	Metabolização, fibrose, doenças genéticas, <i>screening</i> de drogas, danos a estrutura hepática (8)
Renal	Danos à estrutura renal, filtração, doenças genéticas, modulação de doenças renais (9)
Pancreático	Progressão de câncer, produção de insulina e glucagon, doenças genéticas (10)
Pulmonar	Desenvolvimento, doenças genéticas, modulação de doenças respiratórias (11)
Dérmico	Permeabilidade de drogas, <i>screening</i> de drogas, ensaios de cicatrização, reparo e engenharia de tecidos (12)

Fonte: autoral

## **Linhagens celulares**

As linhagens celulares garantem uma série de vantagens como alta proliferação e homogeneidade da população. As linhagens tumorais conservam parte das características do tecido original, podendo ser utilizadas para o *screening* inicial para tecidos específicos e para a descoberta quimioterápicos terapia anticâncer. Aqui se destacam linhagens humanas como HepG2 (hepatocarcinoma) U251MG, U373MG e U87MG (glioblastomas), Hela (câncer de cérvix), THP1 (leucemina monocítica), LnCAP (câncer de próstata), MCF7 (câncer de mama), dentre outras.

Algumas linhagens são altamente proliferativas, mas não são tumorais como a HEK293 (células de rim embrionário humanas) e HFF-1 (fibroblastos de prepúcio humano).

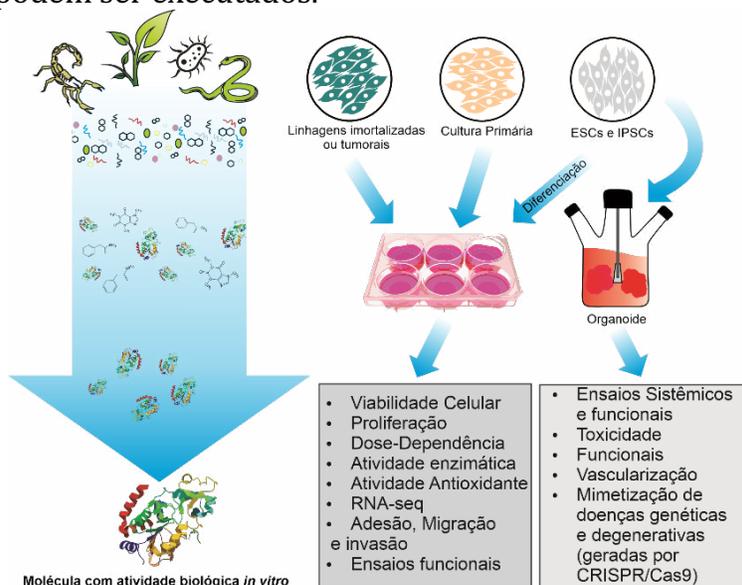
### - Ensaio utilizando culturas celulares

Os produtos naturais, como venenos animais, compostos advindos do metabolismo secundários de microrganismos e extratos vegetais, possuem uma alta complexidade de moléculas que podem contribuir

e anular uma atividade biológica de interesse. Por isso é necessário fracionar tais produtos, passando por várias etapas de enriquecimento e purificação para que seja possível relacionar a atividade biológica a um composto principal (Figura 2). Os compostos testados devem ser solubilizados em solventes compatíveis com soluções fisiológicas que não interfiram nos resultados *in vitro*. Solventes como DMSO e etanol devem ser evitados ou utilizados em baixíssimas concentrações e, em especial proteínas que passam por processos de purificação, traços de detergentes, sais precipitantes e solventes orgânicos devem ser devidamente retirados.

Inicialmente, os passos de fracionamento consistem em separação por classes, como por exemplo, compostos lipofílicos, proteínas/peptídeos, carboidratos e derivados, pequenas moléculas e grande moléculas hidrossolúveis. Com estas classes já é possível iniciar os ensaios em cultura e de acordo com a resposta, refinar ainda mais a purificação de tais compostos.

Figura 2. Em vários pontos do processo de fracionamento e purificação para obtenção de compostos bioativos, o cultivo celular pode ser utilizado e assim refinar, otimizar e direcionar todo o processo, dependendo do tipo celular, sua origem e sua correspondência in vivo, vários ensaios in vitro podem ser executados.



Fonte: Autoral

Os ensaios de viabilidade e proliferação celular são os principais experimentos a serem feitos com frações de produtos naturais. A viabilidade/proliferação pode ser usada como uma

excelente ferramenta para avaliar respostas de toxicidade de novos tipos de compostos naturais, compostos naturais. O método tradicional para testar a proliferação celular é medir a síntese de DNA avaliando a incorporação de um análogo ou precursor de DNA marcado. Para realização desses ensaios a cultura celular deve ser previamente incubada com compostos como BrdU (5-bromo-2'-desoxiuridina, um análogo da pirimidina, que são capazes de serem incorporados ao DNA recém-sintetizado e detectado por ELISA (13).

O MTT é um método também relacionado a viabilidade celular pela medição da atividade mitocondrial (14) . Porém os avanços nessa técnica permitiram a utilização de resazurina sendo reduzido em células viáveis, reproduzindo mais fielmente a viabilidade celular.

A instabilidade da membrana gerada por algum composto também é relacionada a viabilidade, para tanto pode-se detectar o aumento enzimático do LDH (lactato desidrogenase), que converte o lactato em

piruvato, pelo meio de cultura celular (15). O método da calceína-AM é também uma sonda usada em ensaios de viabilidade celular e apoptose (16).

O balanço redox também é muito relacionado a produtos de origem vegetal. Para verificar o poder antioxidante de compostos, a dosagem de proteínas redox bem como sondas fluorescentes e até mesmo MTT, incubados na presença do produto natural, são os mais indicados e utilizados para verificar a atividade antioxidante.

Existem ensaios mais específicos para determinados produtos naturais e por isso é necessário ter bastante conhecimento sobre a estrutura e a composição dos componentes do produto natural. Existem uma infinidade de testes envolvendo culturas celulares que podem ser realizados e utilizando as iPSCs em especial, é possível além de testes específicos para os produtos naturais, ensaios de viabilidade e proliferação, ensaios de adesão, migração e invasão celular, é possível verificar o papel de compostos durante a

diferenciação das células-tronco e assim inferir atividades relacionadas ao reparo celular e recuperação de função pós-lesões, grandes alvos para a medicina regenerativa.

### **Conclusões e perspectivas futuras**

A cultura celular permite mimetizar toda a arquitetura e função de uma célula ou órgão submetida a um composto de forma bastante fiel, beneficiando a população com novas drogas, produtos e terapias cada vez mais eficientes.

### **Referências**

1. Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*. 2006;126(4):663-76.
2. Hu Y, Qu ZY, Cao SY, Li Q, Ma L, Krencik R, et al. Directed differentiation of basal forebrain cholinergic neurons from human pluripotent stem cells. *J Neurosci Methods*. 2016;266:42-9.

3. Zwartsen A, de Korte T, Nacken P, de Lange DW, Westerink RHS, Hondebrink L. Cardiotoxicity screening of illicit drugs and new psychoactive substances (NPS) in human iPSC-derived cardiomyocytes using microelectrode array (MEA) recordings. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. 2019;136:102-12.
  
4. Russo FB, Brito A, de Freitas AM, Castanha A, de Freitas BC, Beltrão-Braga PCB. The use of iPSC technology for modeling Autism Spectrum Disorders. *Neurobiology of Disease*. 2019;130:104483.
  
5. Corbett JL, Duncan SA. iPSC-Derived Hepatocytes as a Platform for Disease Modeling and Drug Discovery. *Front Med (Lausanne)*. 2019;6:265-.
  
6. Rosa S, Praca C, Pitrez PR, Gouveia PJ, Aranguren XL, Ricotti L, et al. Functional characterization of iPSC-derived arterial- and venous-like endothelial cells. *Scientific reports*. 2019;9(1):3826.
  
7. McMurtrey RJ. Analytic Models of Oxygen and Nutrient Diffusion, Metabolism Dynamics, and Architecture Optimization in Three-Dimensional Tissue Constructs with Applications and Insights in

Cerebral Organoids. *Tissue engineering Part C, Methods*. 2016;22(3):221-49.

8. Leite SB, Roosens T, El Taghdouini A, Mannaerts I, Smout AJ, Najimi M, et al. Novel human hepatic organoid model enables testing of drug-induced liver fibrosis in vitro. *Biomaterials*. 2016;78:1-10.

9. Takasato M, Er PX, Chiu HS, Maier B, Baillie GJ, Ferguson C, et al. Kidney organoids from human iPS cells contain multiple lineages and model human nephrogenesis. *Nature*. 2015;526(7574):564-8.

10. Tsai S, McOlash L, Palen K, Johnson B, Duris C, Yang Q, et al. Development of primary human pancreatic cancer organoids, matched stromal and immune cells and 3D tumor microenvironment models. *BMC cancer*. 2018;18(1):335.

11. Nadkarni RR, Abed S, Draper JS. Organoids as a model system for studying human lung development and disease. *Biochemical and biophysical research communications*. 2016;473(3):675-82.

12. Klicks J, von Molitor E, Ertongur-Fauth T, Rudolf R, Hafner M. In vitro skin three-dimensional models and their applications. *Journal of Cellular Biotechnology*. 2017;3:21-39.
  
13. Maun HR, Jackman JK, Choy DF, Loyet KM, Staton TL, Jia G, et al. An Allosteric Anti-tryptase Antibody for the Treatment of Mast Cell-Mediated Severe Asthma. *Cell*. 2019;179(2):417-31.e19.
  
14. Vistica DT, Skehan P, Scudiero D, Monks A, Pittman A, Boyd MR. Tetrazolium-based Assays for Cellular Viability: A Critical Examination of Selected Parameters Affecting Formazan Production. *Cancer Research*. 1991;51(10):2515.
  
15. Kumar P, Nagarajan A, Uchil PD. Analysis of Cell Viability by the Lactate Dehydrogenase Assay. *Cold Spring Harbor protocols*. 2018;2018(6).
  
16. Wang XM, Terasaki PI, Rankin Jr GW, Chia D, Zhong HP, Hardy S. A new microcellular cytotoxicity test based on calcein AM release. *Human immunology*. 1993;37(4):264-70.

*CAPÍTULO 33*

**PATENTES E INOVAÇÃO TECNOLÓGICA A  
CAMINHO DE UM MEDICAMENTO**

Bruno Cabral de Lima Oliveira;  
Flávia De Marco Almeida;  
Rosângela da Silva Lomeo.

A inovação tecnológica pode ser entendida como o desenvolvimento de novos processos ou produtos que são aplicados em benefício da sociedade para melhora da qualidade de vida. Sociedades que investem em inovação tecnológica estarão à frente por diferentes motivos, como aumento de receitas, maior oferta de emprego associada à maior renda da população, competitividade no mercado internacional, entre outros<sup>(1)</sup>. Além disso, uma empresa que inova agrega valor aos seus produtos e serviços, conferindo destaque à sua marca e diferenciando-se no ambiente competitivo.

## Como ocorre o processo de inovação?

Tudo começa com a formulação de ideias, provenientes da observação e criatividade, que são aplicadas para a solução de algum problema ou melhoria de algo já existente. Quando ideias novas são aplicadas de forma concreta para um determinado objetivo, elas se tornam uma invenção. Entretanto, uma invenção, por si só, não é sinônimo de inovação, pois nem sempre se torna acessível à sociedade. Por exemplo, a invenção ou a descoberta de um composto com atividade farmacológica comprovada por testes *in vitro* e/ou *in vivo* não é suficiente para que este chegue à sociedade, sob a forma um novo medicamento. Ou seja, a ideia, que se transforma em invenção quando concretizada, precisa chegar à sociedade, resultando em inovação<sup>(2)</sup>.

Para que um novo medicamento seja disponibilizado para o uso da população em geral é necessário um longo caminho de pesquisas e testes rigorosos de qualidade e segurança. O desenvolvimento de um medicamento passa por diferentes fases, desde os estudos iniciais em

laboratório até testes em humanos e aprovação pelos órgãos regulatórios. Na fase exploratória ocorre o estudo da atividade biológica do composto, mecanismo de ação, testes de toxicidade, dentre outros, realizados *in vitro* e/ou *in silico*. A fase pré-clínica envolve estudos *in vivo*, com animais de laboratório, para confirmação dos resultados iniciais e análise de outros parâmetros, como toxicidade, farmacocinética, efeitos sistêmicos entre outros. Na fase clínica ocorrem os estudos em humanos, com a finalidade de confirmar a segurança e eficácia do medicamento. Essa fase é subdividida em 3, de acordo com o tamanho do grupo estudado (fase I, algumas dezenas de pessoas saudáveis; fase II, centenas de pacientes com a doença a ser tratada; fase III, milhares de pacientes). Uma vez finalizada a fase clínica, o medicamento poderá ser aprovado pelas agências reguladoras do país (no Brasil pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária, ANVISA), e disponibilizado para comercialização. Após a produção em larga escala e disponibilização para a

sociedade inicia-se a fase IV, quando a vigilância do medicamento em relação à segurança e eficácia prossegue indefinidamente. Cada etapa do desenvolvimento de um novo medicamento pode durar anos, o que faz com que o tempo total para sua chegada à sociedade possa alcançar mais de uma década<sup>(3)</sup>.

Em algumas situações, um fármaco já aprovado para um determinado uso pode ser reposicionado para tratamento de outra doença, não relacionada àquela para a qual foi desenvolvido. Nesses casos, o tempo para aprovação e disponibilização para a sociedade é reduzido, pois os testes toxicológicos e farmacocinéticos já foram realizados<sup>(4)</sup>. O reposicionamento de um fármaco também pode ser considerado uma invenção.

No processo de inovação farmacêutica, as instituições de pesquisa normalmente contribuem em suas fases iniciais, que envolvem a criação ou descoberta de um novo composto, a confirmação de sua atividade farmacológica e os testes pré-clínicos.

Portanto, torna-se de extrema relevância a parceria entre as instituições de pesquisa e a indústria durante o desenvolvimento de um novo medicamento, para permitir que uma invenção se torne, de fato, uma inovação, viabilizando sua aprovação, produção e distribuição em larga escala<sup>(5)</sup>.

Para resguardar os direitos de propriedade intelectual entre as instituições parceiras durante o desenvolvimento tecnológico, é imprescindível a utilização de dispositivos jurídicos, como convênios ou contratos, os quais devem delinear os direitos e deveres de cada parceiro. Nesse contexto, as patentes são instrumentos de grande valor, pois garantem aos investidores exclusividade para exploração comercial da invenção.

## **Patentes**

Um novo composto com atividade farmacológica ou um reposicionamento de fármaco, ou mesmo um processo novo para produção de um fármaco, ou um novo carreador ou novo veículo ou uma nova composição farmacêutica, quando apresentam os

requisitos que os permitem ser considerados como invenções, podem ser objetos de patente.

Patente é um título de propriedade intelectual outorgado pelo Estado que garante ao seu titular a exclusividade na exploração comercial de sua criação por um período de vinte anos<sup>(6)</sup>. As patentes estão inseridas no grupo dos direitos legais de Propriedade Industrial. Uma vez patenteada, a invenção está protegida, nos países em que foi concedida, contra o uso, venda e produção de terceiros sem o consentimento legal de seu titular<sup>(6)</sup>.

Um documento de patente deve estar devidamente fundamentado na lei que regulamenta a propriedade industrial do país no qual o documento será depositado, bem como nas normativas do órgão responsável por gerenciar a propriedade intelectual, o qual, no caso do Brasil, é o Instituto Nacional de Propriedade Industrial – INPI<sup>(6)</sup>.

As patentes no Brasil estão regulamentadas pela Lei nº 9.279 de 1996, a Lei de Propriedade Industrial (LPI) <sup>(6)</sup>. Segundo a LPI, para uma invenção ser

patenteável ela precisa apresentar três requisitos fundamentais: novidade, atividade inventiva e aplicação industrial. Uma invenção é considerada nova quando nenhuma outra tecnologia semelhante tenha sido anteriormente divulgada, por qualquer meio de informação, seja ele impresso ou oral. Em outras palavras, é nova a tecnologia que não está descrita no “Estado da Técnica”. Em alguns países, incluindo o Brasil, as tecnologias divulgadas há menos de 12 meses, pelos próprios autores, ainda podem ser patenteadas. Esse prazo de 12 meses para solicitação de patente após divulgação é denominado “Período de Graça”. Após esse período, a tecnologia passa a ser considerada como estado da técnica, de domínio público, não patenteável.

O requisito “atividade inventiva” é mais complexo e de interpretação mais subjetiva que o requisito “novidade”. A tecnologia é considerada inventiva quando não for considerada óbvia para um técnico no assunto, a partir das informações já disponíveis no estado da técnica. Por exemplo, se um novo composto

foi desenvolvido e caracterizado para tratamento de uma doença, sua atividade inventiva é avaliada a partir da análise de compostos com estrutura semelhante e atividade semelhante anteriormente descritos. Se o efeito do novo composto é previsível frente aos conhecimentos disponíveis no estado da técnica, tal composto, apesar de ser novo, pode estar destituído de atividade inventiva, não sendo, portanto, passível de patenteamento. Para ser inventivo, o novo composto deve apresentar um efeito surpreendente, não esperado diante dos conhecimentos disponíveis. A análise de atividade inventiva na área de biotecnologia não é tarefa fácil, pois o limiar entre o que é óbvio ou não, frente ao estado da técnica, é muitas vezes tênue<sup>(7)</sup>.

O terceiro requisito de patenteabilidade é a aplicação industrial, sendo passível de patenteamento apenas a tecnologia que possa ser utilizada ou produzida em uma indústria.

Além desses requisitos, um documento de patente deve descrever de forma clara e precisa como a

invenção pode ser concretizada, o que é determinante para sua aprovação, não sendo possível o patenteamento de ideias ou projetos que não apresentem suficiência descritiva. O quadro reivindicatório é o elemento mais importante do documento de patente, apresentando os aspectos da invenção que são considerados inovadores<sup>(8)</sup>.

### **Quando realizar o depósito de um pedido de patente?**

O momento para realizar o depósito de um pedido de patente deve ser analisado com cautela. Nem sempre a pressa para depositar o pedido será favorável. Da mesma forma, atrasar o depósito pode prejudicar a novidade ou a atividade inventiva da tecnologia, a qual pode vir a ser divulgada ou protegida por concorrentes.

Primeiramente, é essencial que o processo de desenvolvimento de uma tecnologia e os resultados obtidos sejam mantidos em sigilo, para que sua novidade seja garantida, até o momento do depósito. O pedido de patente só deve ser depositado quando

houver fundamentação técnica e descritiva suficientes, com dados que comprovem a eficácia e as vantagens da tecnologia frente ao estado da técnica.

Em segundo lugar, no caso de medicamentos, é necessário considerar o tempo entre a obtenção dos dados que permitem o patenteamento e a obtenção do produto final, após todos os ensaios necessários para sua aprovação. Um pedido de patente de medicamento, quando depositado por uma instituição de pesquisa, geralmente encontra-se em estágios iniciais de desenvolvimento e, para que o produto chegue ao mercado, a tecnologia precisa ser licenciada para a indústria, que se encarregará dos testes clínicos, aprovação pelas agências regulatórias e produção em larga escala. Dessa forma, o depósito do pedido de patente muito antes de seu licenciamento para a indústria pode fazer com que o mesmo tenha poucos anos de validade quando o produto chegar ao mercado.

Finalmente, é importante destacar que, para que uma patente confira de fato direitos exclusivos de

exploração, a mesma deve conter elementos que possam ser detectáveis, em caso de infração por terceiros. No caso de processos de produção, muitas vezes os mesmos podem ser utilizados por terceiros sem que o detentor da patente tenha conhecimento. Por essa razão alguns processos podem ser protegidos como segredo industrial, o qual também pode ser transferido de uma instituição de pesquisa para a indústria, através de instrumentos como o “*know how*”, e podem apresentar vantagens em relação às patentes, por não terem validade definida e pelo seu conteúdo não ser divulgado, diferente da patente, cujo conteúdo é publicado e pode ser acessado através dos bancos de dados de patentes.

### **A caminho de um medicamento**

Conforme abordado neste capítulo, para que um novo composto com atividade farmacológica se torne inovação, chegando à sociedade como um novo medicamento, é essencial que seus inventores, durante o processo de desenvolvimento, (i) mantenham o sigilo das informações até que haja

resultado suficiente para transferência para a indústria ou para patenteamento e posterior licenciamento; (ii) assegurem a proteção jurídica em relação aos direitos e deveres em casos de parcerias com outras instituições; (iii) analisem se a tecnologia atende os requisitos de patenteabilidade; e (iv) decidam sobre a melhor estratégia de proteção, considerando o tempo entre a invenção e a chegada da tecnologia à sociedade.

## **Referências**

- 1- Tohidi H, Jabbari MM. The importance of Innovation and its Crucial Role in Growth, Survival and Success of Organizations. *Procedia Technology*. 2012; 1: 535 – 538.
  
- 2- Epstein M. Inventive thinking in the humanities. *Common Knowledge*. 2017; 23 (1): 1–18.
  
- 3- Bataglia W, Alves FS, De-Carli E. Análise comparativa de políticas de regulamentação de ensaios clínicos. *Revista Panamericana de Salud Pública*, 2020, Vol.44: e3.

- 4- Pillaiyar T et al. A medicinal chemistry perspective of drug repositioning: Recent advances and challenges in drug discovery. Eur J Med Chem. 2020 Jun 1; 195: 112275.
  
- 5- Etzkowitz & Zhou. Hélice Tríplice: inovação e empreendedorismo universidade-indústria-governo. Estudos Avançados 31 (90), 2017.
  
- 6- Brasil. Lei nº 9.279, de 14 de maio de 1996. Lei de Propriedade Industrial; Código de Propriedade Industrial (1996); Lei de Patentes (1996).
  
- 7- Lomeo RS. Empreendedorismo Universitário: Propriedade Industrial e Transferência de Tecnologia Aplicada a Área de Biociências. 1ª Edição. Paco Editorial, 2019. BRASIL.
  
- 8- Brasil. Ministério da Economia - Instituto Nacional da Propriedade Industrial – Guia Básico. Disponível em: <https://www.gov.br/inpi/pt-br/servicos/patentes/guia-basico>. Acessado em 10/06/2020.

U

Este livro foi diagramado  
pela Editora UFPB  
em 2020

O livro “*Bioprospecção e Inovação Tecnológica de Produtos Naturais e Derivados de Plantas e Animais*” foi concebido a partir na necessidade de unir áreas aparentemente distintas, mas que cruzam seus estudos e aplicações acerca da prospecção de fármacos e medicamentos oriundos de produtos naturais, em especial da rica biodiversidade brasileira. A obra é composta por 34 capítulos e está dividida em três seções sendo a primeira, “Produtos Naturais e Derivados de Plantas”; a segunda, “Toxinologia: venenos, peçonhas e toxinas de animais”; a terceira, “Inovação tecnológica, *Drug Discovery*” e Protótipo de Fármacos”, tem como objetivo suprir algumas lacunas e atender as reais necessidades de alunos da Pós-graduação e Graduação das áreas da Saúde, Biológicas, Biotecnologia e Química Medicinal. Este livro traz temas selecionados e elaborados por especialistas jovens e sênior, e fornece ferramentas para fortalecer o processo de ensino-aprendizagem, formação intelectual e reflexão científica.

Micheline Donato, Ph.D & Reinaldo Almeida, Ph.D

