UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
Departamento de Genética

Daniel Macedo de Melo Jorge

Busca *in silico* de inibidores de fosfolipase A2 de *Apis mellifera* com validação *in vitro* e *in vivo*.

Ribeirão Preto - SP

2013

Daniel Macedo de Melo Jorge

Busca *in silico* de inibidores de fosfolipase A2 de *Apis mellifera* com validação *in vitro* e *in vivo*.

Tese de doutorado apresentada à
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
da Universidade de São Paulo, para
obtenção do título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Genética.

Orientador: Profa. Dra. Silvana Giuliatti

Ribeirão Preto - SP

2013

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Jorge, Daniel Macedo de Melo

Busca *in silico* de inibidores de fosfolipase A2 de *Apis mellifera* com validação *in vitro* e *in vivo*. Orientador: Silvana Giuliatti, Ribeirão Preto, 2013.

162 p. : il. ; 30 cm

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo, 2013.

1. Fosfolipase A2. 2. Inibidores sintéticos. 3. Triagem virtual. 4. Atividade fosfolipásica.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Daniel Macedo de Melo Jorge

Busca *in silico* de inibidores de fosfolipase A2 de *Apis mellifera* com validação *in vitro* e *in vivo*.

Tese apresentada à Faculdade de Medicina
de Ribeirão Preto da Universidade de São
Paulo, para obtenção do título de Doutor em
Ciências.

Área de concentração: Genética

Aprovada em:

Banca examinadora

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Dedicatória

Luquesio e Katia

Eu tenho uma grande admiração por vocês e tenho muito orgulho de vocês. Vocês são exemplos para mim. Eu amo vocês. Essa tese é fruto de todo o apoio e amor incondicional que recebi de vocês. Esse trabalho é dedicado a vocês!

Leonardo e Karina

A minha querida irmã mais velha! Sempre exemplo para mim e ao seu marido e meu irmão eu dedico esse trabalho a vocês!

Leticia e Kaua

Aos meus sobrinhos que eu tenho muito carinho e amor Que fazem muita falta no meu dia a dia por causa da distância. Eu dedico esse trabalho a vocês!

Felipe

Ao meu irmão mais novo! O caçula da casa. Sempre foi companheiro no dia a dia e participou de muita coisa na minha vida eu dedico esse trabalho a você!

Murilo e Beatriz

(Por me aceitarem como filho)

Aos meus novos pais não com laços de sangue, mas com laços de amor, agradeço pelo apoio, ajuda e todo o carinho. Eu dedico a vocês essa tese

Rodrigo

Ao meu novo irmão, companheiro, amigo e parceiro em todos os momentos. Eu dedico esse trabalho a você!

Luiza

A minha querida, amada e dedicada esposa. Você é meu grande amor, amiga, conselheira e companheira. Sempre presente em todos os momentos da minha vida. Sempre serei grato por toda a ajuda, apoio, paciência e carinho. Quero você sempre na minha vida. Eu dedico esse trabalho a você e termino com as palavras de Dom Marcos Barbosa:

Nossos caminhos são agora um só caminho,
nossas almas, uma só alma.

Já não preciso estender a mão para alcançar-te,
já não precisas falar para que eu te escute...

Agradecimentos

Primeiramente a DEUS, por tudo!

Em especial a Profa. Dra. Silvana Juliatti, pela orientação, grande paciência, companheirismo, apoio e por ter me proporcionado as condições para desenvolver esse trabalho;

Aos membros da banca examinadora da minha tese pela atenção, discussão e sugestões que enriqueceram este trabalho;

Profa. Dra. Eliane Candiani Arantes Braga pela orientação, pelo apoio e por permitir a realização dos experimentos em seu laboratório;

À Profa. Dra. Elza Tiemi Sakamoto Hojo pela amizade, orientação, apoio e por permitir a realização dos experimentos em seu laboratório;

Ao CNPq pela concessão bolsa de doutorado, sem o qual seria impossível a realização desta pesquisa;

A Karla de Castro Figueiredo Bordon pelo companheirismo, pelo auxílio, ajuda e apoio durante todos os experimentos no Laboratório de Toxinas Animais, sua ajuda foi imprescindível para realização dos experimentos;

Aos grandes colegas Ana Paula de Lima Montaldi e Leonardo Pereira Franchi pela amizade e companheirismo, pelo auxílio, ajuda e apoio durante todos os experimentos no Laboratório de Citogenética e Mutagenese, a ajuda de vocês foi imprescindível para realização dos experimentos;

Ao Curso de pós-graduação em Genética da FMRP – USP, na pessoa de seus Professores e Funcionários pelos ensinamentos e pela convivência;

Às secretárias da pós-graduação Susie Adriana Penha Nalon e Maria Aparecida Oliveira Silva Elias, pela eficiência, pelo permanente apoio, amizade e orientação durante todo o período do doutorado;

Ao Professor Dr. Ademilson Espencer Egea Soares pela amizade, ajuda, apoio e orientação nas diversas comissões em que participei. Sempre motivando os alunos e apoiando em todas as atividades;

À Profa. Dra. Catarina Satie Takahashi pela amizade, ajuda e apoio em todas as atividades realizadas no departamento;

Aos Prof. Dr. Benedito Antonio Lopes da Fonseca e Prof. Dr. Eurico de Arruda Neto pela amizade, apoio, conversas e discussões científicas.

Aos amigos Nilson e Mariana pelo apoio, conversas, discussões científicas e o excelente tempo de convivência nesse tempo de doutorado;

Aos membros atuais de laboratório que fazem parte do grupo de Bioinformática: Iuliana, Gabriela, Beatriz e Pablo

Aos amigos que trabalharam no grupo de Bioinformática: Luciano, Gabi e Fernando. As outras pessoas que também já passaram pelo nosso laboratório;

Às grandes amigas Ana Claudia Teixeira e Aline Poersch por toda conversas, discussões, brincadeiras, mas sempre apoiando e presentes em todos os momentos;

A todos os colegas do Laboratório de Toxinas Animais Felipe, Manuela, Johara, Francielle, Fernando, Fernanda e Priscila.

Aos grandes colegas do Bloco G: Paulo Roberto, Danilo Jordão, Giovana da Silva, Paula Takahashi, Veronica, Tiago, Andres, Willian, Fernanda, Junior e Sueli;

Ao grandes amigos Andre Breve e Juliane pelo apoio, conversas, amizade, companheirismo, sempre presente, amigos para todos os momentos;

Ao amigo Renato pela amizade, companheirismo, apoio e tanta ajuda em muitos momentos.

Aos amigos Saulo e Lara pela amizade, companheirismo, apoio e ajuda em tudo.

Ao amigo e companheiro Cristiano pela amizade, ajuda e ajuda em vários momentos.

Ao Andre Markon pela amizade, conhecimento compartilhado e companheirismo.

Ao pessoal do Biergarten: Gabi, Marcelo, Anamaria, Gustavo (G1), Tadeu, Osvaldo, João, Gustavo (G2), Juliana, Fabio e Ana Paula pela amizade e companheirismo, aprendizado sobre cerveja e momentos de muita alegria;

Aos meus grandes amigos de Fortaleza, que apesar da distância continuam ser grandes amigos: Joel, Luciana, Igor e tantos outros que sempre fizeram parte da minha vida;

Aos grandes colegas Virologistas: Emiliana, Mariana, Alberto, Liz, Vanessa, Miriã, Zé, Gustavo, Analu, Taline, Fernanda, Danillo e Flavio

Epígrafe

“Estamos na situação de uma criancinha que entra em uma imensa biblioteca, repleta de livros em muitas línguas. A criança sabe que alguém deve ter escrito aqueles livros, mas não sabe como. Não compreende as línguas em que foram escritos. Tem uma pálida suspeita de que a disposição dos livros obedece a uma ordem misteriosa, mas não sabe qual ela é”.

(Albert Einstein)

RESUMO

JORGE, D. M. M. **Busca *in silico* de inibidores de fosfolipase A2 de *Apis mellifera* com validação *in vitro* e *in vivo*.** 2013. 162 f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2013.

A *Apis mellifera* é um inseto pertencente à ordem Himenóptera, família Apidae, possui ocorrência cosmopolita e grande importância ecológica, econômica e médica. As subespécies híbridas que ocorrem no Brasil possuem características predominantemente africanas e passaram a ser conhecidas como abelhas africanizadas. As principais características das abelhas africanizadas são o comportamento agressivo, boa resistência a doenças, alta produção de mel e o aumento da frequência de enxameamentos, que tem causado preocupação por estar acompanhado, de aumento no número de acidentes. A agressividade e o aumento da frequência do enxameamento fazem com que elas estejam repetidamente envolvidas em ataques massivos a humanos e animais, tornando esse tipo de envenenamento um problema de saúde pública. A busca de tratamento para o envenenamento tem sido alvo de diversas pesquisas. De uma forma geral, os tratamentos atuam sobre os efeitos causados pelo veneno (medicamentos) ou sobre os componentes do veneno (soros e inibidores). Os principais componentes do veneno são a fosfolipase A2 (PLA2) e a melitina. A PLA2 é uma das principais proteínas do veneno, que degrada a membrana plasmática das células e tem o seu efeito potencializado pela presença da melitina. A PLA2 da *Apis mellifera* possui a estrutura protéica determinada e sítio ativo identificado. Essas características qualificam a PLA2 como potencial alvo de estudos de planejamento de fármacos. A estratégia de planejamento de fármacos tem como objetivo acelerar o processo de identificação de ligantes, contribuindo para o processo da descoberta de fármacos. Este trabalho teve como objetivo identificar *in silico* potenciais inibidores contra a PLA2 de *Apis mellifera*, avaliar *in vitro* e *in vivo* a potencial atividade inibitória dos compostos selecionados e identificar a citotoxicidade *in vitro* dos compostos. A estrutura da PLA2 foi obtida da base de dados (PDB) e a busca de compostos feita das bibliotecas Maybridge e Chembridge. A triagem virtual foi realizada com o auxílio do programa GOLD. Os compostos identificados (22 da Maybridge e 68 da Chembridge) pelos programas GOLD foram filtrados com o uso das ferramentas computacionais para seleção dos compostos com melhores interações no sítio ativo. Os parâmetros utilizados como filtros foram as análises das ligações químicas e os campos de interação molecular. Os compostos selecionados (20 da Maybridge e 29 da Chembridge) foram submetidos a um grupo de programas computacionais para predição de características físico-químicas (*drug-like*), toxicidade e atividade biológica dos ligantes. Os resultados das predições sugeriram que os compostos da Chembridge fossem utilizados nas análises experimentais. Os compostos da biblioteca Chembridge foram adquiridos (29 do total de 49 compostos). Os compostos tiveram as suas potenciais atividades inibitórias avaliadas *in vitro* e *in vivo*. A atividade fosfolipásica foi avaliada para os 29 compostos e 11 apresentaram atividade inibitória contra PLA2. Os 11 compostos foram avaliados *in vivo* com o experimento de indução de edema e 5 compostos conseguiram reduzir o edema. Os compostos foram avaliados em relação a citotoxicidade que poderiam causar. A citotoxicidade *in vitro* foi calculada para 3 compostos dos 5 inibidores obtidos. O resultado do experimento identificou 2 compostos como citotóxicos e 1 com menor citotoxicidade. Apesar da citotoxicidade identificada, mais estudos devem ser realizados para determinar a concentração inibitória não tóxica. Portanto, o trabalho identificou 5 potenciais inibidores específicos contra a PLA2 de *Apis mellifera*.

Palavras-Chaves: Fosfolipase A2, Inibidores sintéticos, Triagem virtual, atividade fosfolipásica.

ABSTRACT

JORGE, D. M. M. ***In silico* search of Phospholipase A2 inhibitors of *Apis mellifera* with *in vitro* and *in vivo* validation.** 2013. 162 f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2013.

Apis mellifera is a member of Hymenoptera order, Apidae family, and have a worldwide distribution with ecological, economical and medical importance. The Brazilian subspecies have predominance of African behavior. They are more aggressive, have better illness resistance, a higher production of honey and higher swarming. The aggressiveness and the higher swarming have caused concern about the increasing of bee accidents, that could become a health problem. The search of treatment to bee accident has been the target of several studies. The treatment may act on the effects caused by the poisoning (treat with medicine) or against bee venom components (serum or inhibitors). The major components of bee venom are phospholipase A2 (PLA2) and melittin. PLA2 is an enzyme with action in the phospholipid membrane and has its effect enhanced with melittin. The PLA2 has the 3D structure achieved and active site identified. All this information support PLA2 as a potential target to study of computer-aided drug design. The strategy of computer-aided drug design helps to accelerate the process of compound's identification to drug discovery. This work aims to identify *in silico* potential inhibitors against PLA2 of *Apis mellifera*, evaluate *in vitro* and *in vivo* the potential inhibitory activity and identify compound's cytotoxicity *in vitro*. The PLA2 structure was obtained from PDB and Chembridge and Maybridge database were used in the virtual screening. The virtual screening was performed with GOLD software. The selected compounds (22 of Maybridge and 68 of Chembridge) were filtered with programs that evaluate the interaction between compounds and active site. The parameters used as filter were evaluation of interaction bonds and molecular interaction fields. The new selected compounds (20 of Maybridge and 29 of Chembridge) were evaluated with a group of programs that predicts physico-chemical characteristics (drug-like), toxicity and biological activity. All selected compounds were kept in the analysis (20 of Maybridge and 29 of Chembridge). The 29 selected compounds (Chembridge) of 49 were acquired because of availability and time to delivery. The phospholipase activities were evaluated for the 29 compounds and 11 had inhibitory activity against PLA2. The 11 compounds were evaluated *in vivo* edema induction and 5 compounds decreased edema. The *in vitro* cytotoxicity was calculated for 3 of 5 selected inhibitors. The results retrieved 2 compounds as cytotoxic and 1 with less cytotoxicity. Despite of cytotoxicity recognized, more studies should be done to estimate a non-toxic inhibitory dose. Therefore this work identified 5 potential specific inhibitors against PLA2 of *Apis mellifera*.

Keywords: Phospholipase A2, Synthetic inhibitors, Virtual Screen, Phospholipase activity

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 O local de hidrólise na fosfatidilcolina (fosfolípido) pela ação da fosfolipase A2. R1 e R2 são ácidos graxos de cadeia longa em R1 (geralmente, saturados) e R2 (insaturado) (Fonte: Roldan, 1998).	12
Figura 2 Esquema com as atividades realizadas no projeto. As atividades em verde foram realizadas no Grupo de Bioinformática (GBi) sob a coordenação da Profa. Dra. Silvana Giuliatti (FMRP); em lilás, sob a coordenação da Profa. Dra. Eliane Candiani Arantes (FCFRP) e, em laranja, sob a coordenação da Profa. Dra. Elza Tiemi Sakamoto Hojo PG (FMRP).	21
Figura 3 Visualização da estrutura tridimensional da proteína fosfolipase A2 da base de dados PDB sob o código 1POC.	32
Figura 4 Visualização da estrutura tridimensional das proteínas fosfolipase A2 e em amarelo o local do sítio ativo obtido com o uso do serviço web <i>Q-Sitefinder</i> . A cor amarela representa o espaço que pode ser ocupado pelo composto. A cor lilás são os aminoácidos da proteína que podem interagir com o composto.	33
Figura 5 Visualização da estrutura tridimensional da proteína fosfolipase A2. Em azul, a superfície da cavidade ocupada pelo sítio ativo (sítio 0) com uso da ferramenta web <i>DoGSiteScorer</i> . Em amarelo, um dos ligantes obtidos com as análises de docagem molecular. .	35
Figura 6 Distribuição das regiões hidrofóbicas (marrom) e hidrofílicas (azul) na superfície do sítio ativo da PLA2. Gerado pelo programa <i>Discovery Studio visualizer</i> . Na parte A pode-se observar a distribuição das regiões hidrofóbicas e hidrofílicas no sítio ativo. As cadeias químicas do sítio ativo da PLA2 podem ser visualizadas. Na parte B é representada somente a região hidrofóbica e hidrofílica sem a PLA2. A escala da hidrofobicidade varia de marrom, mais hidrofóbica (3) ao azul mais hidrofílico (-3).	37
Figura 7 Distribuição das regiões receptoras (verde) e doadoras (rosa) de hidrogênio na superfície do sítio ativo da PLA2. Gerado pelo programa <i>Discovery Studio visualizer</i> . Na parte A pode-se observar a distribuição das regiões receptoras e doadoras no sítio ativo. As cadeias químicas do sítio ativo da PLA2 podem ser visualizadas. Na parte B é representada somente a região receptora e doadora sem a PLA2. A escala das ligações químicas varia de rosa região doadora a verde região receptora.	38

Figura 8 Os 10 compostos selecionados e os números de identificação da biblioteca Maybridge <i>Hitfinder</i> . Os compostos mostrados são: 11, 569, 969, 1252, 1926, 5796, 6875, 7188, 7626 e 13549.	44
Figura 9 Ligações químicas formadas entre os compostos (11, 569, 969, 1926, 1926 e 1252) e o sítio ativo. Os compostos apresentados na figura fazem parte da biblioteca Maybridge <i>Hitfinder</i> . Os círculos rosa representam resíduos envolvidos nas ligações de hidrogênio ; os círculos verdes representam resíduos envolvidos em interações de van der Waals ; a linha tracejada em verde representa interações de ligação de hidrogênio com a cadeia primária de aminoácidos ; a linha tracejada em azul representa interações de ligação de hidrogênio com a cadeia lateral dos aminoácidos. As setas laranja indicam interações do tipo Pi.	45
Figura 10 Ligações químicas formadas entre os compostos (13549, 6875, 7626, 7188 e 5796) e o sítio ativo. Os compostos apresentados na figura fazem parte da biblioteca Maybridge <i>Hitfinder</i> . Os círculos rosa representam resíduos envolvidos nas ligações de hidrogênio ; os círculos verdes representam resíduos envolvidos em interações de van der Waals ; a linha tracejada em verde representa interações de ligação de hidrogênio com a cadeia primária de aminoácidos ; a linha tracejada em azul representa interações de ligação de hidrogênio com a cadeia lateral dos aminoácidos. As setas laranja indicam interações do tipo Pi.	46
Figura 11 Os 12 compostos selecionados e os números de identificação da biblioteca Maybridge <i>Screening Collection</i> . Os compostos mostrados são: 223, 4442, 6909, 7659, 25797, 25798, 26255, 30116, 30566, 54457, 54673 e 57023.	49
Figura 12 Ligações químicas formadas entre os compostos (223, 26255, 7659, 4442 e 25798) e o sítio ativo. Os compostos apresentados na figura fazem parte da biblioteca Maybridge <i>Screening Collection</i> . Os círculos rosa representam resíduos envolvidos nas ligações de hidrogênio ; os círculos verdes representam resíduos envolvidos em interações de van der Waals ; a linha tracejada em verde representa interações de ligação de hidrogênio com a cadeia primária de aminoácidos; a linha tracejada em azul representa interações de ligação de hidrogênio com a cadeia lateral dos aminoácidos. As setas laranja indicam interações do tipo Pi.	50
Figura 13 Ligações químicas formadas entre os compostos (30566, 54673, 30116, 57023 e 54457) e o sítio ativo. Os compostos apresentados na figura fazem parte da biblioteca Maybridge <i>Screening Collection</i> . Os círculos rosa representam resíduos envolvidos nas ligações de hidrogênio; os círculos verdes representam resíduos envolvidos em interações de van der Waals ;	

a linha tracejada em verde representa interações de ligação de hidrogênio com a cadeia primária de aminoácidos; a linha tracejada em azul representa interações de ligação de hidrogênio com a cadeia lateral dos aminoácidos. As setas laranja indicam interações do tipo Pi.	51
Figura 14 Os 10 compostos selecionados e os números de identificação da biblioteca Chembridge <i>CNS-set</i> . Os compostos mostrados são: 24257, 24261, 24324, 24429, 24462, 24479, 24990, 30641, 41933 e 42459.	54
Figura 15 Ligações químicas formadas entre os compostos (42459, 41933, 24324, 30641, 24257 e 24990) e o sítio ativo. Os compostos apresentados na figura fazem parte da biblioteca Chembridge <i>CNS-set</i> . Os círculos rosa representam resíduos envolvi dos nas ligações de hidrogênio; os círculos verdes representam resíduos envolvidos em interações de van der Waals ; a linha tracejada em verde representa interações de ligação de hidrogênio com a cadeia primária de aminoácidos; a linha tracejada em azul representa interações de ligação de hidrogênio com a cadeia lateral dos aminoácidos. As setas laranja indicam interações do tipo Pi.	55
Figura 16 Os 10 compostos selecionados e os números de identificação da biblioteca Chembridge <i>Diverset</i> . Os compostos mostrados são: 22148, 23364, 24922, 24951, 24959, 26456, 27110, 31280, 31711 e 46727.	57
Figura 17 Ligações químicas formadas entre os compostos (24951, 24959, 46727, 27110, 24922 e 31711) e o sítio ativo. Os compostos apresentados na figura fazem parte da biblioteca Chembridge <i>Diverset</i> . Os círculos rosa representam resíduos envolvidos nas ligações de hidrogênio; os círculos verdes representam resíduos envolvidos em interações de van der Waa ls; a linha tracejada em verde representa interações de ligação de hidrogênio com a cadeia primária de aminoácidos; a linha tracejada em azul representa interações de ligação de hidrogênio com a cadeia lateral dos aminoácidos. As setas laranja indicam interações do tipo Pi.	58
Figura 18 Ligações químicas formadas entre os compostos (23364, 22148 e 26456) e o sítio ativo. Os compostos apresentados na figura fazem parte da biblioteca Chembridge <i>Diverset</i> . Os círculos rosa re apresentam resíduos envolvidos nas ligações de hidrogênio ; os círculos verdes representam resíduos envolvidos em interações de van der Waals ; a linha tracejada em verde representa interações de ligação de hidrogênio com a cadeia primária de aminoá cidos; a linha tracejada em azul representa interações de ligação de hidrogênio com a cadeia lateral dos aminoácidos. As setas laranja indicam interações do tipo Pi.	59

Figura 19 Os 10 compostos selecionados e os números de identificação da biblioteca Chembridge <i>Express Pick</i> . Os compostos mostrados são: 5710, 7304, 8544, 46509, 75659, 75968, 128014, 160209, 254410 e 273561.	62
Figura 20 Ligações químicas formadas entre os compostos (273561, 128014, 254410, 160209 e 75659) e o sítio ativo. Os compostos apresentados na figura fazem parte da biblioteca Chembridge <i>Express Pick</i> . Os círculos rosa representam resíduos envolvidos nas ligações de hidrogênio; os círculos verdes representam resíduos envolvidos em interações de van der Waals ; a linha tracejada em verde representa interações de ligação de hidrogênio com a cadeia primária de aminoácidos; a linha tracejada em azul representa interações de ligação de hidrogênio com a cadeia lateral dos aminoácidos. As setas laranja indicam interações do tipo Pi.	63
Figura 21 Os 18 compostos selecionados e os números de identificação da biblioteca Chembridge <i>MicroFormat</i> . Os compostos mostrados são: 28949, 33554, 59964, 71271, 82245, 111331, 130315, 130638, 153158, 153635, 154336, 166045, 169545, 170676, 171831, 171908, 172356 e 182310.	66
Figura 22 Ligações químicas formadas entre os compostos (111331, 170676, 171831, 33554, 130638 e 172356) e o sítio ativo. Os compostos apresentados na figura fazem parte da biblioteca Chembridge <i>MicroFormat</i> . . Os círculos rosa representam resíduos envolvidos nas ligações de hidrogênio; os círculos verdes representam resíduos envolvidos em interações de van der Waals ; a linha tracejada em verde representa interações de ligação de hidrogênio com a cadeia primária de aminoácidos; a linha tracejada em azul representa interações de ligação de hidrogênio com a cadeia lateral dos aminoácidos. As setas laranja indicam interações do tipo Pi.	67
Figura 23 Os 10 compostos selecionados e os números de identificação da biblioteca Chembridge MW. Os compostos mostrados são: 16644, 16704, 16793, 18560, 18768, 20665, 21410, 23125, 27004 e 27082.	69
Figura 24 Ligações químicas formadas entre os compostos (27082, 21410 e 18768) e o sítio ativo. Os compostos apresentados na figura fazem parte da biblioteca Chembridge MW . Os círculos rosa representam resíduos envolvidos nas ligações de hidrogênio ; os círculos verdes representam resíduos envolvidos em interações de van der Waals ; a linha tracejada em verde representa interações de ligação de hidrogênio com a cadeia primária de aminoácidos ; a linha tracejada em azul representa interações de ligação de hidrogênio com a cadeia lateral dos aminoácidos. As setas laranja indicam interações do tipo Pi.	70

Figura 25 Os 10 compostos selecionados e os números de identificação da biblioteca Chembridge NOVACore PHARMACophore. Os compostos mostrados são: 27110, 42812, 61564, 92274, 104143, 111362, 123047, 127110, 141312 e 150454.	72
Figura 26 Gráfico da atividade fosfolipásica (medido em cm). São avaliados todos os inibidores combinados com a PLA2. Foram usados como controle a PLA2 (DMSO), o PBS e a combinação de PBS-DMSO. Os tempos para a leitura da placa foram 16 e 54 horas. Os resultados mostrados representam a média da duplicata $\pm$ desvio padrão.	93
Figura 27 Gráfico da atividade fosfolipásica (medido em cm). Foram avaliados a PLA2 em dissolvida em PBS combinada ou não com DMSO, o composto 2 combinado com PBS e alguns compostos (1, 17, 24, 27, 28, 29) com a adição da PLA2 em PBS. Os tempos para a leitura da placa foram 16 e 54 horas. Os resultados apresentados estão em unicata.	94
Figura 28 Gráfico da atividade fosfolipásica (medido em cm). São avaliados PLA2 na concentração de 0,5 Ui/mL dissolvida em DMSO combinado com alguns compostos (1, 3, 4, 5, 6, 12, 17, 21, 24, 27, 28 e 29). Os tempos para a leitura das placas foram 20 e 40 horas. Os resultados mostrados representam a média da duplicata $\pm$ desvio padrão.	96
Figura 29 Gráfico da atividade fosfolipásica (medido em cm). São avaliados PLA2 na concentração de 1,0 Ui/mL dissolvida em DMSO combinado com alguns compostos (1, 3, 4, 5, 6, 12, 17, 21, 24, 27, 28 e 29). Os tempos para a leitura das placas foram 20 e 40 horas. Os resultados mostrados representam a média da duplicata $\pm$ desvio padrão.	97
Figura 30 Gráfico da atividade fosfolipásica (medido em cm). São avaliados PLA2 na concentração de 2,0 Ui/mL dissolvida em DMSO combinado com alguns compostos (1, 3, 4, 5, 6, 12, 17, 21, 24, 27, 28 e 29). Os tempos para a leitura das placas foram 20 e 40 horas. Os resultados mostrados representam a média da duplicata $\pm$ desvio padrão.	98
Figura 31 Gráfico da atividade fosfolipásica (medido em cm). São avaliados PLA2 na concentração de 4,0 Ui/mL dissolvida em DMSO combinado com alguns compostos (1, 3, 4, 5, 6, 12, 17, 21, 24, 27, 28 e 29). Os tempos para a leitura das placas foram 20 e 40 horas. Os resultados mostrados representam a média da duplicata $\pm$ desvio padrão.	99
Figura 32 Gráfico da atividade fosfolipásica (medido em cm). São avaliados PLA2 na concentração de 8,0 Ui/mL dissolvida em DMSO combinado com alguns compostos (1, 3, 4, 5, 6, 12, 17, 21, 24, 27, 28 e 29). Os tempos para a leitura das placas foram 20 e 40 horas.	100

Figura 33 Gráfico da atividade fosfolipásica (medido em cm). São avaliados PLA2 na concentração de 17,5 Ui/mL dissolvida em DMSO combinado com alguns compostos (1, 3, 4, 5, 6, 12, 17, 21, 24, 27, 28 e 29). Os tempos para a leitura das placas foram 20 e 40 horas. Os resultados mostrados representam a média da duplicata $\pm$ desvio padrão.	101
Figura 34 Gráfico da atividade fosfolipásica (medido em cm). São avaliados PLA2 na concentração de 0,5 Ui/mL dissolvida em DMSO combinado com alguns compostos (2,3, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 13, 14, 15, 16, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 25, 26, 27 e 28). Os tempos para a leitura das placas foram 20 e 40 horas. Os resultados mostrados representam a média da triplicata $\pm$ desvio padrão.	102
Figura 35 Gráfico da atividade fosfolipásica (medido em cm). São avaliados PLA2 na concentração de 2,0 Ui/mL dissolvida em DMSO combinado com alguns compostos (2,3, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 13, 14, 15, 16, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 25, 26, 27 e 28). Os tempos para a leitura das placas foram 20 e 40 horas. Os resultados mostrados representam a média da triplicata $\pm$ desvio padrão.	103
Figura 36 Gráfico da atividade fosfolipásica (medido em cm). São avaliados PLA2 na concentração de 8,0 Ui/mL dissolvida em DMSO combinado com alguns compostos (2,3, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 13, 14, 15, 16, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 25, 26, 27 e 28). Os tempos para a leitura das placas foram 20 e 40 horas. Os resultados mostrados representam a média da triplicata $\pm$ desvio padrão.	104
Figura 37 Gráfico da atividade fosfolipásica (medido em cm). São avaliados PLA2 na concentração de 0,5 Ui/mL dissolvida em DMSO combinado com o composto 3 nas concentrações 0,1; 0,2; 0,4; 0,8; 1; 2; 4; 8 e 10 mg/mL. Os tempos para a leitura das placas foram 20 e 40 horas. Os resultados mostrados representam a média da duplicata $\pm$ desvio padrão.....	105
Figura 38 Gráfico da atividade fosfolipásica (medido em cm). São avaliados PLA2 na concentração de 0,5 Ui/mL dissolvida em DMSO combinado com o composto 4 nas concentrações 0,1; 0,2; 0,4; 0,8; 1; 2; 4; 8 e 10 mg/mL. Os tempos para a leitura das placas foram 20 e 40 horas. Os resultados mostrados representam a média da duplicata $\pm$ desvio padrão.....	106
Figura 39 Gráfico da atividade fosfolipásica (medido em cm). São avaliados PLA2 na concentração de 0,5 Ui/mL dissolvida em DMSO combinado com o composto 5 nas concentrações 0,1; 0,2; 0,4; 0,8; 1; 2 e 4 mg/mL. Os tempos para a leitura das placas foram 20 e 40 horas. Os resultados mostrados representam a média da duplicata $\pm$ desvio padrão.	107

Figura 40 Gráfico da atividade fosfolipásica (medido em cm). São avaliados PLA2 na concentração de 0,5 Ui/mL dissolvida em DMSO combinado com o composto 6 nas concentrações 0,1; 0,2; 0,4; 0,8; 1; 2 e 4 mg/mL. Os tempos para a leitura das placas foram 20 e 40 horas. Os resultados mostrados representam a média da duplicata $\pm$ desvio padrão. 108

Figura 41 Gráfico da atividade fosfolipásica (medido em cm). São avaliados PLA2 na concentração de 0,5 Ui/mL dissolvida em DMSO combinado com o composto 16 nas concentrações 0,1; 0,2; 0,4; 0,8; 1; 2; 4; 8 e 10 mg/mL. Os tempos para a leitura das placas foram 20 e 40 horas. Os resultados mostrados representam a média da duplicata $\pm$ desvio padrão..... 109

Figura 42 Gráfico da atividade fosfolipásica (medido em cm). São avaliados PLA2 na concentração de 0,5 Ui/mL dissolvida em DMSO combinado com o composto 18 nas concentrações 0,1; 0,2; 0,4; 0,8; 1; 2; 4; 8 e 10 mg/mL. Os tempos para a leitura das placas foram 20 e 40 horas. Os resultados mostrados representam a média da duplicata $\pm$ desvio padrão..... 110

Figura 43 Gráfico da atividade fosfolipásica (medido em cm). São avaliados PLA2 na concentração de 0,5 Ui/mL dissolvida em DMSO combinado com o composto 19 nas concentrações 0,1; 0,2; 0,4; 0,8; 1; 2; 4; 8 e 10 mg/mL. Os tempos para a leitura das placas foram 20 e 40 horas. Os resultados mostrados representam a média da duplicata $\pm$ desvio padrão..... 111

Figura 44 Gráfico da atividade fosfolipásica (medido em cm). São avaliados PLA2 na concentração de 0,5 Ui/mL dissolvida em DMSO combinado com o composto 20 nas concentrações 0,1; 0,2; 0,4; 0,8; 1; 2; 4; 8 e 10 mg/mL. Os tempos para a leitura das placas foram 20 e 40 horas. Os resultados mostrados representam a média da duplicata $\pm$ desvio padrão..... 112

Figura 45 Gráfico da atividade fosfolipásica (medido em cm). São avaliados PLA2 na concentração de 0,5 Ui/mL dissolvida em DMSO combinado com o composto 23 nas concentrações 0,1; 0,2; 0,4; 0,8; 1; 2; 4; 8 e 10 mg/mL. Os tempos para a leitura das placas foram 20 e 40 horas. Os resultados mostrados representam a média da duplicata $\pm$ desvio padrão..... 113

Figura 46 Gráfico da atividade fosfolipásica (medido em cm). São avaliados PLA2 na concentração de 0,5 Ui/mL dissolvida em DMSO combinado com o composto 25 nas concentrações 0,1; 0,2; 0,4; 0,8; 1; 2; 4; 8 e 10 mg/mL. Os tempos para a leitura das placas foram 20 e 40 horas. Os resultados mostrados representam a média da duplicata $\pm$ desvio padrão..... 114

Figura 47 Gráfico da atividade fosfolipásica (medido em cm). São avaliados PLA2 na concentração de 0,5 Ui/mL dissolvida em DMSO combinado com o composto 28 nas

concentrações 0,1; 0,2; 0,4; 0,8; 1; 2; 4; 8 e 10 mg/mL. Os tempos para a leitura das placas foram 20 e 40 horas. Os resultados mostrados representam a média da duplicata $\pm$ desvio padrão.....	115
Figura 48 Gráfico da atividade fosfolipásica (medido em cm). São avaliados PLA2 na concentração de 0,25 Ui/mL dissolvida em DMSO combinado com alguns compostos (3, 4, 5, 6, 16, 18, 19, 20, 23, 25, e 28) nas concentrações de 0,5 mg/mL. Os tempos para a leitura das placas foram 20 e 40 horas.	116
Figura 49 Gráfico da atividade fosfolipásica (medido em cm). São avaliados PLA2 na concentração de 1,0 Ui/mL dissolvida em DMSO combinado com alguns compostos (3, 4, 5, 6, 16, 18, 19, 20, 23, 25, e 28) nas concentrações de 2,0 mg/mL. Os tempos para a leitura das placas foram 20 e 40 horas.	117
Figura 50 Gráfico da atividade fosfolipásica (medido em cm). São avaliados PLA2 na concentração de 0,5 Ui/mL dissolvida em DMSO combinado com alguns compostos (3, 4, 5, 6, 16, 18, 19, 20, 23, 25, e 28) nas concentrações de 10 mg/mL. Os tempos para a leitura das placas foram 20 e 40 horas.	118
Figura 51 Gráfico com os resultados da indução a edema. Foram usados como controle o DMSO e a PLA2 (0,5 Ui/mL) isolada em DMSO e PBS. Os compostos foram usados na concentração de 1 mg/mL combinados com a PLA2. A leitura dos resultados foram realizadas nos tempos 30, 60, 120, 180, 240, 300 e 360 minutos.....	120
Figura 52 Gráfico com os resultados da indução a edema. Foram usados como controle o DMSO e a PLA2 (0,5 Ui/mL) isolada em DMSO. Os compostos foram usados na concentração de 10 mg/mL combinados com a PLA2. As leituras dos resultados foram realizadas nos tempos 30, 60, 120, 180, 240, 300 e 360 minutos. Os resultados mostrados representam a média da triplicata $\pm$ desvio padrão.....	121
Figura 53 Gráfico do ensaio de viabilidade celular. Os valores dos resultados são referentes a porcentagem de células viáveis. Foram usados controle somente com o meio (CO), controle com DMSO, a PLA2 e os compostos (3, 4 e 5) isolados e combinados com a PLA2. A concentração da PLA2 é de 0,25 Ui/mL e dos compostos é de 0,5 mg/mL. O tempo para a leitura da placa foi de 20 horas.....	129
Figura 54 Gráfico do ensaio de viabilidade celular. Os valores dos resultados são referentes a porcentagem de células viáveis. Foram usados controle somente com o meio (CO), controle com DMSO, a PLA2 e os compostos (3, 4 e 5) isolados e combinados com a PLA2. A concentração	

da PLA2 é de 0,125 Ui/mL e dos compostos é de 0,25 mg/mL. O tempo para a leitura da placa foi de 20 horas..... 130

Figura 55 Gráfico do ensaio de viabilidade celular. Os valores dos resultados são referentes a porcentagem de células viáveis. Foram usado controle somente com o meio (CO), controle com DMSO, a PLA2 e os compostos (3, 4 e 5) isolados e combinados com a PLA2. A concentração da PLA2 é de 0,25 Ui/mL e dos compostos é de 0,5 mg/mL. O tempo para a leitura da placa foi de 40 horas..... 131

Figura 56 Gráfico do ensaio de viabilidade celular. Os valores dos resultados são referentes a porcentagem de células viáveis. Foram usado controle somente com o meio (CO), controle com DMSO, a PLA2 e os compostos (3, 4 e 5) isolados e combinados com a PLA2. A concentração da PLA2 é de 0,125 Ui/mL e dos compostos é de 0,25 mg/mL. O tempo para a leitura da placa foi de 40 horas..... 132

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Número de internações causadas por contato com abelhas vespas e vespões. Os dados encontram-se divididos por ano segundo local de residência (região e unidade da federação) no período: 1998 – Nov/2012.....	4
Tabela 2 Distribuição dos acidentes por abelhas, coeficiente de incidência, óbitos e porcentagem de letalidade segundo ano de ocorrência no estado de São Paulo no período de 1998 a 2012*	5
Tabela 3 Morbidade Hospitalar do SUS causada por contato com abelhas, vespas e vespões. Os dados encontram-se divididos por ano segundo local de residência (região e unidade da federação) no período: 1998 – Nov/2012	6
Tabela 4 Distribuição do número de acidentes com abelhas por município no estado de São Paulo, período de 2009 - 2012*	8
Tabela 5 Classificação das reações locais e sistêmicas alérgicas a picada de abelhas, sintomas e conduta clínica desejável.	10
Tabela 6 Lista dos descritores avaliados pelo programa FAF-Drugs2 (Moby@RPBS).	25
Tabela 7 Resultado da busca com a ferramenta <i>DoGSiteScorer</i> . Os resultados apresentados são relacionados às características físicas e químicas do sítio ativo. O sítio 0 representa o sítio utilizado na análise.	34
Tabela 8 Resultado da busca com a ferramenta <i>DoGSiteScorer</i> . Os tipos de ligações químicas que podem ocorrer no sítio ativo (sítio 0) encontram-se apresentados.	36
Tabela 9 Resultado da busca com a ferramenta <i>DoGSiteScorer</i> . Os elementos químicos que compõem o sítio ativo (sítio 0) encontram-se apresentados.....	39
Tabela 10 Resultado da busca com a ferramenta <i>DoGSiteScorer</i> . Os resultados apresentados são os tipos de aminoácidos que compõem o sítio ativo (sítio 0).....	39
Tabela 11 Resultado da busca com a ferramenta <i>DoGSiteScorer</i> . Os resultados apresentados são os aminoácidos do sítio ativo (sítio 0).....	40
Tabela 12 Lista das bibliotecas de ligantes avaliadas.....	41
Tabela 13 Resultado da busca de docagem molecular com o programa GOLD. Os 10 melhores compostos obtidos da biblioteca Maybridge <i>Hitfinder</i> com o uso do programa GOLD ordenados pelo valor do score. O algoritmo de busca do GOLD utilizado foi o GoldScore. Os valores de	

peso molecular, receptores de hidrogênio, doadores de hidrogênio, TPSA, Log P e violações de Lipinski são gerados pela ferramenta web Molinspiration.....	43
Tabela 14 Resultado da busca de docagem molecular com o programa GOLD. Os 12 melhores compostos obtidos da biblioteca Maybridge <i>Screening Collection</i> com o uso do programa GOLD ordenados pelo valor do score. O algoritmo de busca do GOLD utilizado foi o GoldScore. Os valores de peso molecular, receptores de hidrogênio, doadores de hidrogênio, TPSA, Log P e violações de Lipinski são gerados pela ferramenta web Molinspiration.....	47
Tabela 15 Resultado da busca de docagem molecular com o programa GOLD. Os 10 melhores compostos obtidos da biblioteca Chembridge <i>CNS-set</i> com o uso do programa GOLD ordenados pelo valor do score. O algoritmo de busca do GOLD utilizado foi o GoldScore. Os valores de peso molecular, receptores de hidrogênio, doadores de hidrogênio, TPSA, Log P e violações de Lipinski são gerados pela ferramenta web Molinspiration.....	53
Tabela 16 Resultado da busca de docagem molecular com o programa GOLD. Os 10 melhores compostos obtidos da biblioteca Chembridge <i>Diverset</i> com o uso do programa GOLD ordenados pelo valor do score. O algoritmo de busca do GOLD utilizado foi o GoldScore. Os valores de peso molecular, receptores de hidrogênio, doadores de hidrogênio, TPSA, Log P e violações de Lipinski são gerados pela ferramenta web Molinspiration.....	56
Tabela 17 Resultado da busca de docagem molecular com o programa GOLD. Os 10 melhores compostos obtidos da biblioteca Chembridge <i>Express Pick</i> com o uso do programa GOLD ordenados pelo valor do score. O algoritmo de busca do GOLD utilizado foi o GoldScore. Os valores de peso molecular, receptores de hidrogênio, doadores de hidrogênio, TPSA, Log P e violações de Lipinski são gerados pela ferramenta web Molinspiration.....	60
Tabela 18 Resultado da busca de docagem molecular com o programa GOLD. Os 18 melhores compostos obtidos da biblioteca Chembridge <i>MicroFormat</i> com o uso do programa GOLD ordenados pelo valor do score. O algoritmo de busca do GOLD utilizado foi o GoldScore. Os valores de peso molecular, receptores de hidrogênio, doadores de hidrogênio, TPSA, Log P e violações de Lipinski são gerados pela ferramenta web Molinspiration.....	64
Tabela 19 Resultado da busca de docagem molecular com o programa GOLD. Os 10 melhores compostos obtidos da biblioteca Chembridge MW com o uso do programa GOLD ordenados pelo valor do score. O algoritmo de busca do GOLD utilizado foi o GoldScore. Os valores de peso	

molecular, recptores de hidrogênio, doadores de hidrogênio, TPSA, Log P e violações de Lipinski são gerados pela ferramenta web Molinspiration.	68
Tabela 20 Resultado da busca de docagem molecular com o programa GOLD. Os 10 melhores compostos obtidos da biblioteca Chembridge <i>NOVACore PHARMACophore</i> com o uso do programa GOLD ordenados pelo valor do escore. O algoritmo de busca do GOLD utilizado foi o GoldScore. Os valores de peso molecular, receptores de hidrogênio, doadores de hidrogênio, TPSA, Log P e violações de Lipinski são gerados pela ferramenta web Molinspiration.....	71
Tabela 21 Listas dos compostos selecionados a partir das bases de dados Maybridge e Chembridge. Foram selecionados 20 compostos da tabela Maybridge e 29 compostos da tabela Chembridge. A tabela apresenta o número de identificação na base de dados, a base de dado do compostos, identificação do composto na empresa e empresa a que o composto pertence.	74
Tabela 22 Lista dos 7 descritores avaliados pela ferramenta web Mobyle@RPBS. Os ligantes avaliados foram da biblioteca Maybridge. No total foram avaliados 20 compostos. A tabela apresenta os resultados do ID, número de ligações rotacionáveis, número de ligações de H, solubilidade (mg/l), Veber, Egan, <i>Traffic Lights</i> e estado.....	77
Tabela 23 Lista dos 7 descritores avaliados pela ferramenta web Mobyle@RPBS. Os ligantes avaliados foram da biblioteca Chembridge. No total foram avaliados 29 compostos. A tabela apresenta os resultados do ID, número de ligações rotacionáveis, número de ligações de H, solubilidade (mg/l), Veber, Egan, <i>Traffic Lights</i> e estado.....	79
Tabela 24 Resultado da busca da toxicidade dos compostos da base de dados Maybridge em humanos e mamíferos. O programa usado na análise foi o Derek. Foram avaliados os compostos 11, 223, 569, 969, 1252, 1926, 4442, 5796, 6875, 7188, 7626, 7659 e 13549	81
Tabela 25 Resultado da busca da toxicidade dos compostos da base de dados Maybridge em humanos e mamíferos. O programa usado na análise foi o Derek. Foram avaliados os compostos 25798, 26255, 30116, 30566, 54457, 54673 e 57023.	82
Tabela 26 Resultado da busca da toxicidade dos compostos da base de dados Chembridge em humanos e mamíferos. O programa usado na análise foi o Derek. Os compostos que apresentaram potencial dano foram 33554, 160209, 111331, 254410, 24257, 24324, 24990, 273561, 170676, 171831, 22148, 172356, 23364, 24922, 24951, 24959, 27082, 26456 e 41933.	83
Tabela 27 Resultado da predição da atividade biológica com a ferramenta web Molinspiration. Os compostos da biblioteca Maybridge foram avaliados. O resultado apresenta a atividade biológica	

sugerida e o valor do escore. Os compostos apresentados na tabela são: 11, 223, 569, 1252, 1926, 4442, 5796, 7188, 7659, 13549, 25798, 26255, 54457 e 57023.	85
Tabela 28 Resultado da predição da atividade biológica com a ferramenta web PASS. Os compostos avaliados foram da biblioteca Maybridge. O resultado apresenta a atividade biológica sugerida e os valores de Pa e Pi. Os compostos apresentados na tabela são: 969, 6875, 7626, 7659, 13549, 25798, 26255, 30566, 54673 e 57023.	86
Tabela 29 Resultado da predição da atividade biológica com a ferramenta web Molinspiration. Os compostos da biblioteca Chembridge foram avaliados. A atividade biológica sugerida e o valor do escore são apresentados. Os compostos avaliados foram: 33554, 24257, 24324, 171831, 22148, 172356, 23364, 30641, 18768, 24951, 24959, 26456, 31711 e 46727.	87
Tabela 30 Resultado da predição da atividade biológica com a ferramenta web PASS. Os compostos avaliados foram da biblioteca Chembridge. O resultado apresenta a atividade biológica sugerida e os valores de Pa e Pi. Os compostos avaliados nas análises foram: 33554, 75659, 160209, 111331, 130638, 254410, 24257, 24324, 24990, 22148, 30641, 24951 e 41933.	89
Tabela 31 Lista dos 29 compostos adquiridos a partir da base de dado Chembridge. A tabela apresenta o número de identificação na base de dados dos compostos, a identificação da base de dado do composto, identificação do composto na empresa e a identificação do composto nos experimentos.....	91
Tabela 32 Resultado da busca no Meteror dos metabólitos prováveis e plausíveis de 1º geração e resultado da busca de toxicidade com o Derek para o composto 3 da base de dados do Chembridge. O resultado apresenta o nome dos compostos de 1º geração, a predição do Meteor, o dano potencial e o grupo químico identificado pelo Derek.....	123
Tabela 33 Resultado da busca no Meteror dos metabólitos prováveis e plausíveis de 1º geração e resultado da busca de toxicidade com o Derek para o composto 4 da base de dados do Chembridge. O resultado apresenta o nome dos compostos de 1º geração, a predição do Meteor, o dano potencial e o grupo químico identificado pelo Derek.....	124
Tabela 34 Resultado da busca no Meteror dos metabólitos prováveis e plausíveis de 1º geração e resultado da busca de toxicidade com o Derek para o composto 5 da base de dados do Chembridge. O resultado apresenta o nome dos compostos de 1º geração, a predição do Meteor, o dano potencial e o grupo químico identificado pelo Derek.....	125

Tabela 35 Resultado da busca no Meteror dos metabólitos prováveis e plausíveis de 1º geração e resultado da busca de toxicidade com o Derek para o composto 5 da base de dados do Chembridge. O resultado apresenta o nome dos compostos de 1º geração, a predição do Meteor, o dano potencial e o grupo químico identificado pelo Derek.....	126
Tabela 36 Resultado da busca no Meteror dos metabólitos prováveis e plausíveis de 1º geração e resultado da busca de toxicidade com o Derek para o composto 20 da base de dados do Chembridge. O resultado apresenta o nome dos compostos de 1º geração, a predição do Meteor, o dano potencial e o grupo químico identificado pelo Derek.....	127

Sumario

1	INTRODUÇÃO	2
1.1	Acidentes com abelhas	3
1.2	Ação do veneno	9
1.3	Composição do veneno.....	10
1.4	Fosfolipase A2.....	11
1.5	Inibidores de fosfolipase A2.....	13
1.6	Química medicinal no desenvolvimento de fármacos <i>in silico</i>	14
2	Objetivos.....	19
2.1	Objetivo Geral:	19
2.2	Objetivos Específicos:	19
2.2.1	Buscar e avaliar inibidores sintéticos contra a proteína fosfolipase A2 do veneno de <i>Apis mellifera</i> , por meio de ferramentas de docagem molecular.	19
2.2.2	Analisar a toxicidade e o efeito no metabolismo humano <i>in silico</i> dos ligantes selecionados:.....	19
2.2.3	Avaliar, por ensaios laboratoriais, o efeito inibitório <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> , a citotoxicidade e sobrevivência celular dos ligantes selecionados:	19
3	Metodologia	21
3.1	Analises <i>in silico</i>	22
3.1.1	Busca da fosfolipase A2.....	22
3.1.2	Banco de inibidores.....	22
3.1.3	Simulações de Docagem Molecular.....	23
3.1.4	Rescore.....	23
3.1.5	Campos de Interação Molecular.....	24
3.1.6	Visualização da PLA2 e compostos	24
3.1.7	Predição <i>in silico</i> das propriedades físico-químicas	24
3.1.8	Toxicidade <i>in silico</i> e Predição de metabolismo	25
3.1.9	Predição da atividade biológica <i>in silico</i>	25

3.2	Análise <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>	26
3.2.1	Materiais/Compostos avaliados.....	26
3.2.2	Animais	26
3.2.3	Linhagem celular.....	26
3.2.4	Atividade fosfolipásica.....	26
3.2.5	Indução de Edema:	27
3.2.6	Predição de metabolismo e Toxicidade <i>in silico</i>	28
3.2.7	Avaliação de citotoxicidade <i>in vitro</i>	28
4	Resultados e Discussão	31
4.1	Análise <i>in silico</i>	31
4.1.1	Busca da fosfolipase A2.....	31
4.1.2	Simulações de docagem molecular	40
4.1.3	Predição <i>in silico</i> das propriedades físico-químicas e ADMET	75
4.1.4	Toxicidade <i>in silico</i>	80
4.1.5	Predição da Atividade Biológica.....	84
4.2	Ensaio Laboratoriais	90
4.2.1	Compostos adquiridos.....	90
4.2.2	Atividade fosfolipásica.....	91
4.2.3	Indução de Edema	118
4.2.4	Predição de metabolismo e Toxicidade <i>in silico</i>	122
4.2.5	Avaliação de citotoxicidade <i>in vitro</i>	127
5	Conclusões	134
6	Referências Bibliográficas	136
7	Anexos	147
8	Apêndice	150

1. Introdução

1 INTRODUÇÃO

A *Apis mellifera* é um inseto pertencente à ordem Himenóptera, família Apidae e possui ocorrência cosmopolita (Silveira, Melo e Almeida, 2002). As abelhas do gênero *Apis* possuem grande importância ecológica, econômica e médica (Camargo & Stort, 1973; Kato, 1997; Maia, 2002; D'Avila & Marchini, 2005; Costa Neto & Pacheco, 2005). A espécie *Apis mellifera* está dividida em aproximadamente 26 subespécies, baseada em diferenças morfológicas e moleculares. No Brasil, as subespécies mais comuns usadas para produção de mel são híbridos resultantes dos cruzamentos entre a *Apis mellifera scutellata* (abelha africana), *Apis mellifera mellifera* (abelha européia) e outras subespécies (Mitchell, 2006).

As subespécies híbridas que ocorrem no Brasil possuem características predominantemente africanas e passaram a ser conhecidas como abelhas africanizadas. As principais características oriundas das abelhas africanas são o comportamento agressivo, boa resistência a doenças e alta produção de mel. Outras características importantes são a capacidade de voar longas distâncias, maior frequência de enxameamento anual, além da utilização de grande variedade de locais para nidificar (Winston, 1994; Schumacher & Egen, 1995). O enxameamento da abelha africanizada pode ocorrer de 6 a 12 vezes por ano, muito mais frequente que na *Apis mellifera mellifera* que enxameia 2 a 3 vezes por ano (Mitchell, 2006).

A frequência de enxameamentos tem causado preocupação, uma vez que vem acompanhada de aumento no número de acidentes. A existência de uma grande variedade de abrigos em áreas urbanas aumenta o contato entre o inseto e a população. Além do enxameamento excessivo, outra característica que tem causado preocupação é a sua agressividade. As abelhas africanizadas reagem, aproximadamente, 2 vezes mais rápido que as abelhas europeias e podem perseguir as suas vítimas por até 400 m de distância (Winston, 1992; Sherman, 1995). A colônia de abelhas ao ser perturbada pode permanecer agitada e pronta para defesa por até 24 hs (Winston, 1994; Abramson & Aquino, 2002; Kaplan, 2006).

O comportamento das abelhas africanizadas são uma das causas que faz com que elas estejam repetidamente envolvidas em ataques massivos a humanos e animais, tornando esse tipo de envenenamento um problema de saúde pública. Outros fatores que agravam os acidentes com abelhas são o tamanho dos enxames (50 a 60 mil abelhas em média) e o fato de liberarem ferormônios, que estimulam ainda mais a sua agressividade.

1.1 Acidentes com abelhas

As abelhas estão incluídas nas estatísticas brasileiras de envenenamentos e acidentes com animais peçonhentos. As ocorrências de acidentes são notificadas pelos hospitais e postos de saúde aos órgãos responsáveis (nacionais ou estaduais). Os centros responsáveis coletam, organizam e disponibilizam os dados de forma gratuita. O número de acidentes foram consultados nas bases de dados do DATASUS (Tabela 1 e 3) (<http://www2.datasus.gov.br/DATASUS/index.php>) do Ministério da Saúde e do Centro de Vigilância Epidemiológica “Alexandre Vranjac” (CVE) do estado de São Paulo (Tabela 2 e 4).

Os dados obtidos do DATASUS mostram o número de internações (Tabela 1) e óbitos (Tabela 3) que ocorreram por local de residência nos estados brasileiros no período de 1998 e nov/2012. Os envenenamentos registrados pelo DATASUS não são exclusivamente de acidentes com abelhas foram acrescentados os envenenamentos com vespas e vespões. Já os dados obtidos pelo CVE são referentes a número de acidentes no estado de São Paulo, exclusivamente, com abelhas e o número desses acidentes que levaram a óbito no período de 1998 a 2012 (Tabela 2). A tabela 4 também apresenta dados obtidos pelo CVE, onde pode ser observado o número de acidentes, exclusivamente, com abelhas distribuídos por municípios do estado de São Paulo entre os anos de 2009 e 2012.

Os dois centros responsáveis pelos dados levam em consideração informações diferentes, o DATASUS usa como informação as internações (Tabela 1) e o CVE usa como informação o número de acidentes (Tabela 2) por essa razão os valores são tão diferentes. Já o número de óbitos da tabela 2 e 3 permitem que possam ser feitas comparações entre os dados para compreender a problemática de envenenamentos por abelhas no Brasil. No período de 1998 a 2012 segundo dados do DATASUS o contato com abelhas, vespas e vespões levaram a óbito 7 pessoas. Já segundo dados do CVE no mesmo período o contato com abelhas levaram a óbito 28 pessoas. Dessa forma, os dados indicam que não existiria troca de informações entre os dois centros de processamento de acidentes com abelhas e os dados nacionais podem estar subnotificados.

Tabela 1 Número de internações causadas por contato com abelhas vespas e vespões. Os dados encontram-se divididos por ano segundo local de residência (região e unidade da federação) no período: 1998 – Nov/2012.

Região/UF	1998	1999	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	Total
Região Norte	12	13	18	22	29	12	18	10	8	7	10	16	15	18	21	229
Rondônia	1	2	1	2	-	1	1	-	1	3	1	5	2	-	4	24
Acre	-	-	-	-	-	1	2	1	1	-	1	1	-	2	-	9
Amazonas	4	-	-	-	-	1	1	1	-	-	3	1	2	-	2	15
Roraima	1	-	7	-	-	-	-	-	-	1	-	3	-	1	-	13
Pará	6	10	4	7	2	5	8	6	4	3	4	4	7	11	13	94
Amapá	-	-	1	2	1	-	-	1	-	-	1	-	-	-	-	6
Tocantins	-	1	5	11	26	4	6	1	2	-	-	2	4	4	2	68
Região Nordeste	38	20	73	49	39	20	35	20	31	28	17	39	41	58	37	545
Maranhão	10	-	1	2	3	-	-	-	2	3	-	5	2	2	2	32
Piauí	-	-	1	-	-	1	2	1	1	1	2	2	3	5	1	20
Ceará	4	3	14	3	4	4	5	3	-	3	2	4	4	8	4	65
Rio Grande do Norte	-	-	2	1	1	1	1	-	-	-	-	1	-	6	2	15
Paraíba	3	-	19	12	4	3	4	1	1	1	2	8	7	4	4	73
Pernambuco	-	-	-	2	-	-	-	-	-	1	-	2	1	1	1	8
Alagoas	1	1	1	-	3	1	-	2	-	1	-	-	-	2	-	12
Sergipe	1	2	-	2	2	1	-	-	-	-	-	1	-	1	-	10
Bahia	19	14	35	27	22	9	23	13	27	18	11	16	24	29	23	310
Região Sudeste	89	72	96	103	82	80	74	65	47	55	38	56	67	48	42	1014
Minas Gerais	26	24	38	45	43	38	31	32	24	25	18	24	35	18	23	444
Espírito Santo	4	1	2	6	3	2	3	5	3	-	1	4	8	1	4	47
Rio de Janeiro	3	5	1	5	-	5	2	1	-	2	1	3	-	2	2	32
São Paulo	56	42	55	47	36	35	38	27	20	28	18	25	24	27	13	491
Região Sul	18	42	47	46	28	23	28	19	26	13	27	23	22	21	101	484
Paraná	11	16	21	19	5	13	11	11	9	3	15	17	14	12	83	260
Santa Catarina	6	13	12	10	11	5	6	5	9	3	3	1	6	7	6	103
Rio Grande do Sul	1	13	14	17	12	5	11	3	8	7	9	5	2	2	12	121
Região Centro-Oeste	10	10	22	18	12	11	21	8	5	5	10	16	12	12	4	176
Mato Grosso do Sul	3	4	2	-	6	3	6	3	1	-	2	3	1	6	1	41
Mato Grosso	-	1	3	-	1	4	11	2	-	2	-	2	3	3	1	33
Goiás	5	5	15	16	4	4	3	3	3	3	7	10	8	3	1	90
Distrito Federal	2	-	2	2	1	-	1	-	1	-	1	1	-	-	1	12
TOTAL	167	157	256	238	190	146	176	122	117	108	102	150	157	157	205	2448

Fonte: Ministério da Saúde - Sistema de Informações Hospitalares do SUS (SIH/SUS)

Notas: 1. Situação da base de dados nacional em 27/12/2012.

2. Dados de 2012 (até novembro) sujeitos a retificação.

Tabela 2 Distribuição dos acidentes por abelhas, coeficiente de incidência, óbitos e porcentagem de letalidade segundo ano de ocorrência no estado de São Paulo no período de 1998 a 2012*

Ano	Numero de casos	Coeficiente de Incidência.	Óbitos	Letalidade
1998	600	1,70	1	0,16
1999	688	1,92	2	0,29
2000	779	2,10	1	0,12
2001	900	2,39	1	0,11
2002	1.024	2,68	0	0,00
2003	1.083	2,80	2	0,18
2004	1.471	3,75	2	0,13
2005	1.691	4,18	3	0,17
2006	1.357	3,31	1	0,07
2007	1.399	3,35	1	0,07
2008	1.629	3,97	0	0,00
2009	1.557	3,76	2	0,12
2010	1.876	4,54	4	0,30
2011	2.080	5,03	3	0,25
2012	2.050	4,89	5	0,24
Total	20.184	-	28	-

Fonte: Divisão de Zoonoses /CVE Sinanw e Sinan Net

*Dados provisórios até 20/12/2012

Por 100.000 habitantes

Pop. DATASUS

Tabela 3 Morbidade Hospitalar do SUS causada por contato com abelhas, vespas e vespões. Os dados encontram-se divididos por ano segundo local de residência (região e unidade da federação) no período: 1998 – Nov/2012

Região/UF	1998	1999	2000	2001	2002	2003	2004	2007	2008	2009	2010	2011	2012	Total
Região Norte	-	-	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2
Pará	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
Tocantins	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
Região Nordeste	-	1	2	1	1	-	1	2	-	2	1	2	1	14
Rio Grande do Norte	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	1
Paraíba	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	1	-	-	2
Pernambuco	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	1	2
Sergipe	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	1
Bahia	-	1	2	-	-	-	1	2	-	1	-	1	-	8
Região Sudeste	2	2	1	2	-	1	2	-	-	1	2	3	-	16
Minas Gerais	2	-	-	1	-	-	2	-	-	-	1	-	-	6
Espírito Santo	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	2
Rio de Janeiro	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
São Paulo	-	-	1	1	-	1	-	-	-	1	-	3	-	7
Região Sul	-	-	-	1	-	-	-	1	1	1	-	1	3	8
Paraná	-	-	-	1	-	-	-	-	1	1	-	1	-	4
Santa Catarina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1
Rio Grande do Sul	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	2	3
Região Centro-Oeste	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	1
Mato Grosso do Sul	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	1
TOTAL	2	3	4	5	1	2	3	3	1	4	3	6	4	41

Fonte: Ministério da Saúde - Sistema de Informações Hospitalares do SUS (SIH/SUS)

Notas: 1. Situação da base de dados nacional em 27/12/2012.

2. Dados de 2012 (até novembro) sujeitos a retificação.

Os dados do DATASUS e CVE oferecem algumas informações relevantes em relação aos acidentes com abelhas como um problema de saúde pública. As tabelas indicam um aumento no número de casos a partir do ano de 2009 e por consequência, poderiam levar a um aumento no número de internações e óbitos. Por exemplo, levando em consideração os anos de 2011 e 2012 foram internadas 157 e 205 pessoas, respectivamente. Em alguns casos as internações levaram a óbito, por exemplo: no ano de 2011 foram 6 óbitos e no ano de 2012 4 óbitos, demonstrando a importância do desenvolvimento de compostos antiveneno. Os dados do DATASUS mostram que, também nos anos de 2011 e 2012, a região sudeste ficou em segundo lugar em número de internações e número de óbitos.

A distribuição dos acidentes com abelhas no estado de São Paulo varia de acordo com o município (Tabela 4). Segundo os dados do CVE, nos últimos 4 anos, as três cidades com maior número de acidentes foram: Campinas (1.301 acidentes), Piracicaba (1.178 acidentes) e Araraquara (1.010). Esses dados mostram a problemática dos acidentes com abelha no estado e podem auxiliar em ações de prevenção e preparação para evitar os acidentes com abelhas. Entretanto, mais estudos são necessários para um melhor entendimento do período em que acontece os acidentes, números de exames retirados e a gravidade dos acidentes.

Tabela 4 Distribuição do número de acidentes com abelhas por município no estado de São Paulo, período de 2009 - 2012*

Ano	2009	2010	2011	2012	Total
GVE Notificação	Nº Caso	Nº Caso	Nº Caso	Nº Caso	Nº Caso
GVE 1 Capital	7	4	11	48	70
GVE 7 Santo Andre	8	14	25	28	75
GVE 8 Mogi Das Cruzes	13	5	5	24	47
GVE 9 Franco da Rocha	19	23	57	61	160
GVE 10 Osasco	39	20	23	40	122
GVE 11 Aracatuba	83	79	109	80	351
GVE 12 Araraquara	303	306	235	166	1010
GVE 13 Assis	0	0	0	0	0
GVE 14 Barretos	37	29	76	59	201
GVE 15 Bauru	34	51	41	36	162
GVE 16 Botucatu	88	119	161	193	561
GVE 17 Campinas	269	271	408	353	1301
GVE 18 Franca	2	3	9	1	15
GVE 19 Marilia	57	61	85	67	270
GVE 20 Piracicaba	183	271	315	409	1178
GVE 21 Presidente Prudente	29	26	24	22	101
GVE 22 Presidente Venceslau	5	16	22	15	58
GVE 23 Registro	7	2	11	9	29
GVE24 Ribeirao Preto	43	35	31	29	138
GVE 25 Santos	0	1	5	14	20
GVE 26 São João da Boa Vista	113	114	164	164	555
GVE 27 São Jose dos Campos	10	10	28	9	57
GVE 28 Caragatatuba	6	0	1	1	8
GVE 29 São Jose do Rio Preto	15	47	60	59	181
GVE 30 Jales	18	32	34	22	106
GVE 31 Sorocaba	133	74	58	73	338
GVE 32 Itapeva	2	7	23	16	48
GVE 33 Taubate	34	24	59	52	169
Total	1557	1644	2080	2050	7331

Fonte: Divisão de Zoonoses / CVE / Sinan Net

* Dados provisórios até 20/12/2012

População: DATASUS

A presença dos exames dentro das cidades pode levar a um problema de saúde pública, por isso, o governo deve ter estratégias eficientes de manejo e orientação à população. Mello e colaboradores (2003) avaliaram relatórios de campo do Centro de Controle de Zoonoses do Município de São Paulo para retirada de colmeias e de enxames de abelhas africanizadas do período de 1994 a 1997. Os locais mais frequentes de instalação das colônias foram identificados e os dados climáticos foram associados ao número de solicitações de remoção das colônias. Os locais mais frequentes de instalação de colônias foram o forro de casas (29,0%) e o interior de

paredes (22,5%), demonstrado que as abelhas estão se adaptando às condições impostas pelas cidades (poucas áreas verdes e muitas edificações). Houve uma correlação entre número de solicitações para retirada de colônias e temperatura média nos 4 anos estudados. Entretanto, são necessários mais estudos sobre a presença da abelha africanizada nas cidades, para um melhor entendimento e identificação de melhores estratégias para o manejo e orientação da população, a fim de evitar ou diminuir o número de acidentes.

1.2 Ação do veneno

Os acidentes causados por picadas de abelhas apresentam manifestações clínicas distintas, dependendo do número de picadas e da sensibilidade do indivíduo ao veneno. Um acidente com abelhas pode agravar-se por dois motivos: o grande tamanho das colônias (muitas abelhas) e por sinais químicos (ferormônios) que são liberados do local da picada após a ferroadada. Estes ferormônios estimulam a agressividade de outras abelhas, indicando onde atacar. Após a ferroadada o aparelho de ferroar fica preso na pele da vítima e com isso todo o veneno é injetado (1-10 μ L), na maioria dos casos, ocorre uma ruptura do abdômen da abelha após a ferroadada levando a morte da abelha (Schumacher, et al., 1994). Ainda na pele, o aparelho de ferroar continua se contraindo (30 a 60 segundos) para injetar todo veneno e liberando os sinais químicos (ferormônios) para o ataque de outras abelhas (Winston, 1994).

Um pequeno número de ferroadadas de abelhas em geral causa dor intensa localizada, pequeno edema e eritema imediato (Ewan, 1998). Entretanto reações alérgicas podem ocorrer com uma única ferroadada ou algumas ferroadadas no caso de pacientes sensibilizados (Ewan, 1998). As classificações das reações alérgicas podem ser imediatas ou tardias, e locais ou sistêmicas.

As reações localizadas causam prurido intenso e edema em algumas horas. Em alguns casos pode levar a infecções secundárias (Sherman, 1995; Ewan, 1998; Steen, et al., 2005).

As reações sistêmicas são divididas em três graus de gravidade: leve, moderada ou grave. Os sintomas, tratamento e a terapia das reações sistêmicas estão descritos na tabela 4 (Ewan, 1998). Caso o paciente seja sensibilizado ao veneno, a reação sistêmica pode levar o paciente ao óbito e pode ser causada por aproximadamente 50 ferroadadas. A dose considerada letal para crianças é de 500 ferroadadas, enquanto que para adultos é de 1.100. Entretanto existem casos de pessoas que sobreviveram a mais de 1.000 ferroadadas (Sherman, 1995; Schumacher, 1990). Quando ocorre uma ferroadada de abelha, os componentes do veneno agem de forma sinérgica produzindo

desconforto físico na vítima da ferroada que deve procurar atendimento o quanto antes (Costa et al, 1996).

Tabela 5 Classificação das reações locais e sistêmicas alérgicas a picada de abelhas, sintomas e conduta clínica desejável.

Tipo de reação		Sintomas	Tratamentos	Imunoterapia
Local		Eritema, prurido e edema	Anti histamínico (oral)	Não
Sistêmica	Leve	Eritema, prurido, urticária, angio edema, rinite e náusea	Anti histamínico (oral e intramuscular)	Não
	Moderada	Angio edema, asma leve e náusea	Anti histamínico (intramuscular), hidrocortisona (intramuscular), agonista β_2 inalatória (se asma), epinefrina inalatória	Alguns casos, usualmente não
	Severa	Hipotensão severa, dificuldade respiratória (edema de laringe) e perda da consciência	Epinefrina (intramuscular) hidrocortisona (intramuscular ou endovenosa); Clorfenamina (intramuscular ou endovenosa)	Sim

Modificado e adaptado de Ewan, PW (1998)

1.3 Composição do veneno

O veneno da abelha africanizada (*Apis mellifera*) é composto por uma mistura complexa de substâncias bioativas de aminas, peptídeos e proteínas. As diferentes espécies de *Apis* possuem composição similar de veneno; entretanto, pode-se observar diferenças quantitativas de seus componentes (Vetter et al., 1999). A concentração dos componentes do veneno da *Apis mellifera* pode ainda sofrer variações de acordo com as estações climáticas (Abreu, 1996).

As principais aminas são: histamina, dopamina e norepinefrina. Os principais peptídeos são melitina, apamina e o peptídeo degranulador de mastócitos (MCD). Os principais componentes protéicos do veneno são: a fosfolipase A2 (PLA2) e a hialuronidase, fosfatase ácida. Entretanto, existem ainda outros componentes que estão presentes em baixas concentrações no veneno.

Atualmente, novos compostos têm sido identificados na composição do veneno com utilização de tecnologias de proteômica, dentre eles podemos citar: PDGF (fator de crescimento derivado de plaquetas) VEGF (fator de crescimento endotelial vascular) e uma proteína hipotética similar a MRJP (*Major Royal jelly protein*) (Peiren et al., 2005).

Dentre os diversos componentes do veneno, a fosfolipase A2 e a melitina apresentam maior importância. Esse fato deve-se a alta concentração presente no veneno total, aproximadamente 60% (melitina 50% e PLA2 10%), e também por atuarem de forma sinérgica sobre as membranas plasmáticas (Habermann, 1972; Vetter et al., 1999; Peiren et al., 2005).

As principais aminas possuem ações diversas no veneno. A histamina (0,1-1,5% do peso seco do veneno), por exemplo, atua na cascata de indução a dor e auxilia na difusão do veneno por aumentar a permeabilidade capilar sanguínea (Smith et al., 1985; Dotimas e Hider, 1987). A melitina possui 26 aminoácidos e é um dos componentes majoritários do veneno, apresentando atividade hemolítica e auxiliando na difusão do veneno (Tosteson et al., 1985). A apamina possui 18 aminoácidos e é o menor peptídeo neurotóxico conhecido. O peptídeo degranulador de mastócitos possui 22 aminoácidos e, devido à presença de duas pontes de dissulfídicas, apresenta uma estrutura similar à da apamina. Uma das funções do peptídeo degranulador de mastócitos é induzir a liberação de histamina (Habermann, 1972). A hialuronidase, que é um dos componentes proteicos, atua degradando o ácido hialurônico do tecido conjuntivo e facilita a difusão dos componentes do veneno. A proteína fosfatase ácida atua rompendo os basófilos humanos e liberando histamina. Pode atuar, também, induzindo a formação de pústulas (Barboni et al., 1987).

1.4 Fosfolipase A2

A proteína fosfolipase A2 (PLA2) (10 -12% do peso seco do veneno) é a proteína mais estudada e com maior importância entre os componentes do veneno da abelha, devido a sua grande concentração no veneno total. Apresenta o maior potencial imunogênico dentre as proteínas do veneno, sendo amplamente utilizada para imunização e dessensibilização (Jones et al., 1999; Vetter et al., 1999). A ação catalítica da PLA2 é potencializada pela melitina e pode contribuir para a toxicidade generalizada que ocorre durante o envenenamento (Mingarro et al., 1995).

A PLA2 possui ampla distribuição entre os organismos, podendo ser encontrada em bactérias, plantas, venenos de insetos, répteis, mamíferos e até em vírus (Schaloske; Dennis, 2006). Além disso, atua em diversos processos biológicos e sua ação possui diferentes efeitos farmacológicos e fisiopatológicos nos organismos vivos. A PLA2 também está associada a envenenamentos, pois está presente em venenos de abelhas e serpentes, o que levaria a PLA2 a ser alvo de diversos estudos médico-científicos (Van den Bosch, 1980; Verheij; Slotboom; de Haas, 1981; Dennis, 1994; Nevalainen et al., 2004; Soares; Fontes; Giglio, 2004).

A classificação das fosfolipases A2 é feita de acordo com sua sequência de aminoácidos (domínios), mecanismos catalíticos e outras características bioquímicas adicionais, como por

exemplo, o peso molecular e o padrão de pontes dissulfeto (Dennis, 1994; Schaloske; Dennis, 2006). A fosfolipase A2 está agrupada em uma superfamília de proteínas que apresenta 15 grupos diferentes. Estes grupos apresentam cinco tipos de enzimas diferentes: PLA2 secretada dependente de cálcio (sPLA2s), PLA2 secretada independente de cálcio (iPLA2s), PLA2 citosólica (cPLA2s), acetil-hidrolases (PAF-AH) e a PLA2 lisossomal (Schaloske; Dennis, 2006).

A fosfolipase A2 de abelhas (bvPLA2) faz parte do grupo III, que é composto por PLA2 de mamíferos, lagartos e abelhas. O grupo III de PLA2 é denominado como fosfolipases A2 secretadas (sPLA2) que possuem massa molecular relativa (Mr) entre 14 e 18 kDa, e 5 a 8 pontes dissulfeto. Além disso, a PLA2 possui uma histidina no sítio ativo e requer a presença do íon Ca^{2+} para a realização de catálise (Schaloske; Dennis, 2006).

A fosfolipase A2 (PLA2) atua no metabolismo de lipídios, catalisando hidrólise na posição sn-2 dos fosfolipídios das membranas celulares, liberando ácidos graxos (ácido araquidônico) e lisofosfolipídios (Kudo; Murakami, 2002) (Figura 1). O ácido araquidônico (AA) é um precursor de lipídios bioativos, assim como prostaglandinas, leucotrienos e tromboxanos, que podem estar envolvidos em diversas funções biológicas, tais como regulação da resposta imune, inflamação e percepção da dor (Schaloske; Dennis, 2006).

Figura 1 O local de hidrólise na fosfatidilcolina (fosfolipídio) pela ação da fosfolipase A2. R1 e R2 são ácidos graxos de cadeia longa em R1 (geralmente, saturados) e R2 (insaturado) (Fonte: Roldan, 1998).

1.5 Inibidores de fosfolipase A2

A busca de tratamento para o envenenamento tem sido alvo de diversas pesquisas. Entretanto, ao ser realizado um levantamento na literatura não foi encontrado no mercado um produto para ser utilizado na rotina dos hospitais públicos e redes privadas. O estado de São Paulo e o Brasil possuem uma grande demanda por um inibidor devido ao grande número de notificações de acidentes com abelhas.

De uma forma geral, no atendimento de pessoas que foram ferroadas por abelha, o tratamento atua sobre os sintomas causados pelo veneno e não diretamente contra as proteínas do veneno. Entre os medicamentos utilizados pode ser citado a administração de antihistamínicos, corticosteróides, broncodilatadores, vasodilatadores, bicarbonato, manitol, adrenalina e ventilação mecânica, além de sessões de hemodiálise (França et al., 1994; Ewan, 1998). Entretanto alguns pacientes acabam indo a óbito entre 22 e 72 horas após o envenenamento devido a sintomas graves, como falha renal aguda, necrose hepatocelular, necrose tubular aguda, necrose focal subendocardial e coagulação intravascular disseminada (França et al., 1994).

Outra forma de tratamento de envenenamentos por abelhas é a utilização de antiveneno, produzida a partir de animais imunizados como cavalo ou ovelha, que apresenta anticorpos de neutralização da peçonha (Warrell, 1996). O desenvolvimento de anticorpos neutralizantes contra o veneno de abelha tem sido alvo de muitas pesquisas.

Jones et al (1999) produziram, com a imunização de carneiros, um soro com anticorpos neutralizantes contra veneno de abelhas africanizadas para acidentes com enxames. No Brasil, foi realizado o trabalho de Santos (2008) para determinação da proporção mínima do anticorpo que causa neutralização do veneno. O anticorpo utilizado foi produzido e cedido pela Fundação Butantã com a imunização de cavalos. Entretanto, os anticorpos produzidos em animais podem levar a reações de hipersensibilidade, que ocorrem, geralmente, em 5 a 33% dos casos. Apesar da possibilidade de reação de hipersensibilidade esse tratamento pode ser usado em casos de envenenamento sistêmico (Karalliedde, 1995). Funayama et al (2011) produziram soro com utilização de uma tecnologia *Phage display*, que produz fragmentos de anticorpos a partir de anticorpos humanos. Com isso pode-se evitar alguns problemas relacionados com as reações de hipersensibilidade.

Contudo, a soroterapia possui pouca eficiência no caso de um paciente com envenenamento sistêmico tardio, sendo bastante difícil a neutralização ou reversão do quadro clínico do paciente.

Dessa forma, é importante identificar diferentes inibidores das proteínas do veneno, sintéticos ou naturais, que possam ter uma ação que complemente as antipeçonhas nos tecidos (Borges et al., 2000). Além dos anticorpos monoclonais e/ou policlonais outras moléculas podem ter ação contra os componentes do veneno, entre elas pode-se citar agentes químicos, sintéticos e naturais de origem animal e vegetal (Borges et al., 2001; Lizano; Domont e Perales, 2003; Soares et al., 2004; Oliveira et al., 2005; Marcussi et al., 2007; Jorge, 2008). As plantas medicinais podem ser excelentes alvos para a busca de inibidores contra o veneno de abelha. Jorge (2008) usou alguns extratos e isolados de plantas medicinais para identificação de inibidores com o de experimentos *in vitro* e *in vivo*. O trabalho resultou na identificação de extratos que apresentam potencial para inibir a PLA2.

As pesquisas que buscam identificar novos compostos contra as proteínas do veneno são de grande importância, pois podem ser usados de forma conjunta com os anticorpos ou de forma isolada permitindo uma melhor recuperação do paciente. O alvo das pesquisas de novos inibidores tem usado como fonte: plantas, animais, microorganismos e bases de inibidores (isolados). Uma das formas de buscar de novos inibidores é a utilização da química medicinal para o desenvolvimento de fármacos. Essa metodologia pode iniciar *in silico*, com o uso de ferramentas computacionais ou pode começar *in vitro* ou *in vivo*, com o isolamento dos compostos ou utilização dos compostos em experimentos.

1.6 Química medicinal no desenvolvimento de fármacos *in silico*

A química medicinal possui um caráter multidisciplinar que envolve ciências biológicas, ciências farmacêuticas, química orgânica, bioquímica e computação. O alvo da química medicinal é o planejamento, descoberta, identificação, preparação e compreensão do funcionamento da ação molecular de compostos biologicamente ativos (Zoete et al., 2009). A química medicinal também leva em consideração o metabolismo, a estrutura química e a atividade farmacológica (Wermuth, 2003).

A utilização de ferramentas computacionais trouxe mais velocidade e eficiência no desenvolvimento de novos fármacos. O processo de descoberta de fármacos *in silico* envolve a identificação do alvo de interesse (estrutura do receptor), a escolha dos compostos a partir das bases de inibidores, avaliação da interação da proteína com os possíveis inibidores e cálculo das propriedades farmacocinéticas e farmacodinâmicas dos possíveis inibidores (Zoete et al., 2009).

O processo de descoberta de novos fármacos pode ser baseado na estrutura do receptor (*structure-based drug design*, SBDD) ou na estrutura do ligante (*ligand-based drug design*, LBDD) (Andricopulo et al., 2009). O SBDD tem como requisito a estrutura tridimensional (3D) do receptor completa ou parcial (sítio ativo ou sítio de interação) e leva em consideração as informações (complementaridade estérica, hidrofóbica e eletrostática) presentes na estrutura do receptor para seleção dos melhores compostos que interagem no sítio ativo. O LBDD tem como requisito a estrutura 3D dos ligantes bioativos, que podem ser usados como moldes, e as informações químicas dos ligantes levam ao desenho de novos ligantes.

A partir da identificação da estrutura 3D do receptor, podem ser usadas diferentes metodologias de busca e identificação de potenciais ligantes com o uso das técnicas de docagem molecular (*molecular docking*). O SBDD, uma das principais técnicas de docagem molecular, busca selecionar os melhores ligantes que interagem com o sítio ativo da proteína. Para isso, leva em consideração as possíveis conformações que o ligante pode assumir e as funções de energia (parâmetros eletrostáticos, de van der Waals, de ligações de hidrogênio e hidrofóbicos). O resultado da busca gera os ligantes categorizados de acordo com as funções de energia nas melhores conformações dentro do sítio ativo (Kitchen et al, 2004).

A busca virtual ou triagem virtual (*structure-based virtual screening*) é uma das aplicações das diferentes metodologias de docagem molecular. Os algoritmos e diversos parâmetros de busca virtual utilizados podem variar de acordo com o programa utilizado, podendo ser divididos em sistemáticos, aleatórios e baseados em simulação (Rodrigues et al, 2012). Os principais programas são FlexX (Kramer et al, 1999), DOCK (Ewing et al, 2001), GLIDE (Friesner et al, 2004), AutoDock (Goodsell et al, 1996) e GOLD (Verdonk et al, 2003).

O programa GOLD (*Genetic Optimisation for Ligand Docking*) é um dos programas mais difundidos no meio científico sendo bastante utilizado, o algoritmo do GOLD é uma variação do algoritmo genética, que leva em consideração a flexibilidade do ligante (diedros dos ligantes e geometria de anéis) e as cadeias laterais do sítio alvo (Verdonk et al., 2003). O GOLD possui cinco funções de pontuação distintas: GoldScore, ChemScore, ASP, CHEMPLP e uma que permite ser modificada. O GoldScore é a função de pontuação original do programa e que é utilizada como padrão, que leva em consideração a energia de ligação e campos de força. O ChemScore que é baseado em um método de pontuação empírica, que usa a energia total quando ocorre a ligação. As duas funções podem apresentar resultados diferentes devido à possível

variação do cálculo de ganho ou perda de entalpia da interação do ligante e o sítio alvo (Xing et al, 2004).

Após a busca da melhor conformação do ligante no sítio ativo, existem diversas ferramentas computacionais que podem ser usadas para avaliar a interação entre o ligante e o sítio alvo, dentre elas pode-se citar os campos de interação molecular (*Molecular Interaction Field*, MIF) e a dinâmica molecular.

O campo de interação molecular avalia as variações da energia de interação entre o ligante e o grupo químico de prova utilizado. As regiões de interesse (sítio ativo) são mapeadas por completo, para verificar quais conformações dos ligantes estariam em posições mais prováveis (Carosati et al, 2004). O grupo químico de prova é escolhido de acordo com as características químicas esperadas para os ligantes ideais. Os principais programas são o Grid (Wade & Goodford, 1993; Carosati et al, 2004) e o Almond (Pastor et al., 2000).

A simulação de dinâmica molecular pode ser usada como uma ferramenta para validação dos resultados encontrados com os programas docagem molecular. A dinâmica molecular é uma metodologia onde se calcula a posição atômica para cada átomo do sistema ligante e proteína em um ambiente aquoso ao longo de um determinado tempo. As coordenadas do núcleo de cada átomo mostram como está a trajetória completa do sistema, ao longo do tempo. Os programas mais utilizados são NAMD (Phillips et al, 2005.) e Gromacs (Hess et al. 2008).

As ferramentas de avaliação da interação ajudam a selecionar os melhores ligantes que interagem com o sítio alvo. Após seleção dos melhores compostos existem diversos programas computacionais que predizem aspectos diferentes dos ligantes (propriedades farmacocinéticas, farmacodinâmicas e *drug-like*). Esses programas auxiliam a filtrar os ligantes e obter as melhores características de um possível fármaco. As principais predições realizadas são: predição das propriedades *drug-like*, predição da atividade biológica, predições de toxicidade e predições de metabolismo.

A predição das características *drug-like* identifica os compostos com características similares à de um possível fármaco. Uma das formas de avaliar essas características é utilizando a regra dos 5 (RO5) de Lipinski (Lipinski et al, 2001). A regra do 5 tem como objetivo selecionar os compostos com biodisponibilidade por via oral. Para isso, devem apresentar algumas características específicas que são: peso molecular menor igual a 500 dalton (D), Log P menor ou igual a 5, número de grupos de doadores de ligações de hidrogênio menor ou igual a 5 e o

número de receptores de ligações de hidrogênio menor ou igual a 10 (Lipinski et al, 2001). Outras características químicas também têm sido avaliadas nos ligantes, como: o número de ligações rotacionáveis, que não deve ser maior que 8, e a área de superfície polar (TPSA) que deve ser menor ou igual a 140 Å (Marshall, 2004).

A predição de atividade biológica auxilia a compreender as possíveis funções biológicas que os compostos selecionados podem ter no organismo. Dessa forma, podem também ser identificadas algumas ações que os compostos podem ter no organismo. O principal programa para predição da atividade biológica é o PASS (*Prediction of Activity Spectra for Substances*) que pode predizer até 3.500 atividades biológicas diferentes (Lagunin et al, 2000).

As predições de ADMET (absorção, distribuição, metabolismo, excreção e toxicidade) utilizam métodos estatísticos para análise que ajudam a selecionar os melhores compostos (Testa et al, 2005). O principal programa para predição da toxicidade é o Derek (Sanderson & Earnshaw, 1991; Ridings et al, 1996) e para predição de metabolismo é o Meteor (Testa et al, 2005).

As predições *in silico* auxiliam a selecionar os melhores compostos, mas para a confirmação dos resultados *in silico*, os compostos devem ser avaliados *in vitro* e *in vivo* para confirmar a atividade predita. Os dados experimentais complementam os dados obtidos *in silico* e as ferramentas computacionais diminuem o tempo necessário para o desenvolvimento de novos fármacos. A identificação mais rápida de potenciais inibidores poderia suprir a demanda de compostos antiveneno contra o veneno de abelha, pois permitiria identificar mais rapidamente os potenciais compostos e os experimentos biológicos permitiriam confirmar a atividade predita.. Essa grande demanda tem sido causada pelo aumento do número de acidentes com abelhas. Os inibidores devem ser específicos e causarem um mínimo de reações adversas aos pacientes. Dessa forma, o paciente teria um ganho na reabilitação dos danos causados pelo veneno.

2. Objetivos

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral:

Buscar inibidores sintéticos contra a proteína fosfolipase A2 do veneno de *Apis mellifera*.

2.2 Objetivos Específicos:

2.2.1 Buscar e avaliar inibidores sintéticos contra a proteína fosfolipase A2 do veneno de *Apis mellifera*, por meio de ferramentas de docagem molecular.

Avaliar a interação entre a estrutura proteica da fosfolipase A2 do veneno da *Apis mellifera* e os compostos químicos sintéticos. Analisar a interação entre a proteína e o composto com o uso de campos de interação molecular e dinâmica molecular para compreender o modo de ligação.

2.2.2 Analisar a toxicidade e o efeito no metabolismo humano *in silico* dos ligantes selecionados:

Avaliar *in silico* os ligantes selecionados em relação à citotoxicidade, genotoxicidade, potencial mutagênico e estimar a formação de metabólitos no metabolismo humano. Predizer a atividade biológica em que o ligante poderia estar envolvido.

2.2.3 Avaliar, por ensaios laboratoriais, o efeito inibitório *in vitro* e *in vivo*, a citotoxicidade e sobrevivência celular dos ligantes selecionados:

Triagem dos inibidores selecionados *in silico* com as atividades: avaliação da inibição da atividade fosfolipásica dos ligantes *in vitro* com os experimentos de hemólise e *in vivo* com a indução ao edema. Analisar por meio de teste *in vitro* a citotoxicidade e sobrevivência celular.

3. Materiais e Métodos

3 METODOLOGIA

A metodologia utilizada no trabalho está dividida em duas partes: a primeira parte foi realizada por meio de análises *in silico* e a segunda parte foi realizada por experimentos *in vitro* e *in vivo*. O esquema resumido encontra-se na figura 2.

Figura 2 Esquema com as atividades realizadas no projeto. As atividades em verde foram realizadas no Grupo de Bioinformática (GBi) sob a coordenação da Profa. Dra. Silvana Giuliatti (FMRP); em lilás, sob a coordenação da Profa. Dra. Eliane Candiani Arantes (FCFRP) e, em laranja, sob a coordenação da Profa. Dra. Elza Tiemi Sakamoto Hojo PG (FMRP).

As análises *in silico* (docagem molecular, análise do modo de ligação e a análise *in silico* dos ligantes) foram realizadas no laboratório do Grupo de Bioinformática (GBi) sob a coordenação da Profa. Dra. Silvana Giuliatti.

Os ensaios laboratoriais foram realizados no laboratório de Toxinas Animais do Departamento de Física e Química, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – USP sob a coordenação do Profa. Dra. Eliane Candiani Arantes e no laboratório de Citogenética e Mutagênese do Departamento de Genética, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP sob a coordenação da Profa. Dra. Elza Tiemi Sakamoto Hojo.

3.1 Analises *in silico*

3.1.1 Busca da fosfolipase A2

A base de dados do *Protein Data Bank* (PDB) (Berman et al, 2000) foi utilizada para realizar a busca para obtenção da estrutura da fosfolipase A2 (PLA2). A fosfolipase A2 de *Apis mellifera* está depositada no PDB com o código 1POC (*Crystal structure of bee-venom phospholipase A2 in a complex with a transition-state analogue*) e foi gerada por cristalografia por raio X com resolução de 2 Å e valor de R de 0,192. Para confirmar o sítio ativo foram realizadas buscas na literatura e foi utilizada a ferramenta *Q-Sitefinder* (Laurie & Jackson, 2005). A cavidade do sítio ativo e a capacidade de interagir com o ligante foram avaliadas com a ferramenta o *DoGSiteScorer* (Volkamer et al, 2012).

3.1.2 Banco de inibidores

As bases de dados utilizadas para a triagem virtual foram a Maybridge (<http://www.maybridge.com/>) e Chembridge (<http://www.chembridge.com/>) que possuem diversas estruturas de moléculas de fármacos, substâncias ativas e/ou moléculas com propriedades *drug-like*.

A base de dados Maybridge está subdividida em duas bases de dados: *Maybridge Screening collection* e *HitFinder Collection*, que possuem respectivamente, 56.000 e 14.400 estruturas moleculares virtuais de fármacos ou substâncias ativas clássicas.

A base de dados Chembridge está subdividida em seis bases de dados: *Diverset*, *Molecular Weightset* (MW), *MicroFormat*, *CNS-set*, *NOVACore PHARMACophore* e *Express Pick*. A *Diverset* possui, aproximadamente, 50.000 estruturas de moléculas pequenas com propriedades *drug-like*, abrangendo diversas características farmacofóricas espaciais relevantes para a manutenção de interações com os mais diversos alvos moleculares. A *Molecular Weightset* contém, aproximadamente, 30.000 estruturas com características *drug-like* que se dispõem em ordem crescente de peso molecular na base de dados. A *CNS-set* contém 50.000 estruturas e é composta de estruturas submetidas a diversas análises computacionais, havendo alta probabilidade de encontrar protótipos com biodisponibilidade por via oral e capacidade de penetrar a barreira hematoencefálica (BHE). A *NOVACore PHARMACophore* possui 10.000

moléculas com estruturas diferentes. A *MicroFormat* contém 180.000 estruturas. A mesma é composta por moléculas *drug-like* com grande diversidade estrutural. A *Express Pick* possui aproximadamente 500.000 estruturas diferentes com características *drug-like* baseada em um levantamento as estruturas existentes durante duas décadas pela Chembridge.

3.1.3 Simulações de Docagem Molecular

A metodologia de triagem virtual foi realizada com o programa GOLD 5.1 (Verdonk et al, 2003) para a proteína PLA2 (código 1POC) com objetivo de encontrar a melhor orientação e conformação de um ligante no seu sítio receptor. Além disso, propor um modo de ligação com os ligantes, auxiliando no planejamento e desenvolvimento de novos fármacos.

O programa GOLD realiza uma docagem flexível utilizando um algoritmo genético. A busca foi realizada com todos os ligantes utilizando as configurações do algoritmo genético para triagem virtual com a finalidade de selecionar os melhores compostos. Os cálculos da docagem foram realizados dentro de uma esfera de raio de 12 Å, tendo como centro o átomo de carbono ϵ 1 do aminoácido tirosina 87 (TYR87).

Os 90 melhores compostos em suas melhores orientações foram escolhidos de acordo com o maior escore e as ligações formadas dentro do sítio para estabilizar o ligante. A função de pontuação do GoldScore foi utilizada na busca dos melhores ligantes e foram escolhidos os melhores compostos que apresentassem estrutura química diversa. Os compostos com estruturas muito similares quimicamente (poucos grupos químicas diferentes) foram descartados nas análises.

3.1.4 Rescore

Uma nova docagem molecular foi realizada com os ligantes selecionados usando as configurações do algoritmo padrão para seleção da melhor conformação, com o objetivo de auxiliar na identificação do modo de ligação dos compostos. Os cálculos da docagem foram realizados dentro de uma esfera de raio de 12 Å, tendo como centro o átomo de carbono ϵ 1 do aminoácido tirosina 87 (TYR87), conforme utilizado anteriormente na primeira docagem.

As orientações geradas de cada composto foram avaliadas por sobreposição observando se poderiam ocorrer alterações no modo de ligação, torções nos ângulos de ligação e mudanças espaciais na estrutura.

3.1.5 Campos de Interação Molecular

O programa HotspotX 0.61 (Neudert & Klebe, 2011) foi utilizado para gerar os campos de interação molecular da PLA2 e os ligantes. Os grupos de prova utilizados foram: carbono aromático, grupo água, oxigênio de carbonila e grupo do nitrogênio. Os resultados foram avaliados visualmente levando em conta os grupos químicos avaliados. Para a visualização dos campos de interação foi utilizado o programa Pymol (*The PyMOL Molecular Graphics System*, Version 1.3 Schrödinger, LLC).

3.1.6 Visualização da PLA2 e compostos

As imagens geradas durante as análises foram obtidas com a utilização dos programas *Discovery Studio visualizer 3.5* (Accelrys Software Inc., Discovery Studio Modeling Environment, Release 3.5, San Diego: Accelrys Software Inc., 2012.) e Pymol 1.3 (*The PyMOL Molecular Graphics System*, Version 1.3.0.4 Schrödinger, LLC)

3.1.7 Predição *in silico* das propriedades físico-químicas

Os compostos selecionados tiveram as propriedades físicas, químicas e parte do ADMET preditas *in silico* com o uso da ferramenta web Mobyly@RPBS (Néron et al, 2009) e o pacote FAF-Drugs2 (Lagorce et al, 2011). O programa analisa 23 descritores diferentes e para as análises foram selecionados 9 descritores. Os descritores analisados foram: número de regiões doadoras e receptoras de hidrogênio, número de ligações rotacionáveis, solubilidade, regras de Veber, regras de Egan, escore físico-químico oral e estado final do composto (Tabela 6). As propriedades avaliadas permitem predizer *in silico* a biodisponibilidade dos ligantes.

Tabela 6 Lista dos descritores avaliados pelo programa FAF-Drugs2 (Mobyle@RPBS).

Descritores	Identificação
Número de ligações rotacionáveis	Ligações rotacionáveis
Doadores e aceptores de ligação de hidrogênio	Ligações de H
Solubilidade	Solubilidade (mg/l)
Regras de Veber	Veber
Regras de Egan	Egan
Escore físico-químico oral	<i>Traffic Lights</i>
Estado final do composto	Estado

3.1.8 Toxicidade *in silico* e Predição de metabolismo

Os compostos selecionados foram analisados para predição da toxicidade *in silico* com o programa Derek (Lhasa, 2007). O programa Derek avalia o risco potencial de envolvimento dos compostos com carcinogenicidade, mutagenicidade, genotoxicidade, sensibilização de pele, teratogenicidade, irritação das vias aéreas, hepatotoxicidade, neurotoxicidade, dano cromossômico, bloqueio de canais iônicos hERG e toxicidade ocular.

A metodologia de busca do Derek utiliza modelos baseados nas estruturas químicas dos compostos, correlacionando com os possíveis riscos de toxicidade. Os grupos toxicofóricos são identificados nos compostos por meio de um sistema *knowledge-based* usando uma base de dados construída com dados da literatura (Sanderson & Earnshaw, 1991; Ridings et al, 1996; Greene et al, 1999).

3.1.9 Predição da atividade biológica *in silico*

As atividades biológicas dos compostos foram preditas utilizando as bases de dados PASS (Lagunin et al, 2000) e Molinspiration (<http://www.molinspiration.com/>). As duas bases de dados levam em consideração informações da literatura de experimentos realizados *in vitro* e *in vivo* para sugerir possíveis atividades biológicas. As estruturas dos compostos são comparadas com as estruturas existentes nas bases de dados e, por similaridade das estruturas, pode-se sugerir a atividade biológica. O objetivo foi verificar se os compostos possuíam atividade como inibidor de fosfolipase e avaliar outras atividades que os compostos poderiam apresentar no metabolismo humano.

3.2 Análise *in vitro* e *in vivo*

3.2.1 Materiais/Compostos avaliados

A fosfolipase A2 de *Apis mellifera* foi obtida isolada da empresa Sigma-Aldrich (<http://www.sigmaaldrich.com>). Os compostos foram escolhidos a partir da base de dados de compostos Chembridge usando a ferramenta Hit2lead (<https://www.hit2lead.com/>). Os compostos foram obtidos com o peso de 10 a 25 mg (Tabela 7) e foram dissolvidos em dimetilsulfóxido (DMSO).

O plasma utilizado foi obtido de voluntários saudáveis doados, de acordo com as normas éticas do Comitê de Ética em Pesquisa da FCFRP (CEP) (Certificado nº 33/2010) (Anexos 2).

3.2.2 Animais

Foram utilizados nos ensaios biológicos camundongos machos da linhagem Swiss (18 a 22 g) fornecidos pelo biotério central da Universidade de São Paulo, campus de Ribeirão Preto-SP. Os animais foram mantidos agrupados em caixas de polipropileno em temperatura ambiente constante. Os experimentos foram realizados de acordo com o regimento e as normas éticas estabelecidas pelo Comitê de Ética em Pesquisa no Uso de Animais (CEUA; certificado número nº 107/2007), (Anexos 1).

3.2.3 Linhagem celular

Para os experimentos de citotoxicidade foi utilizada a linhagem celular de fibroblastos humanos primários (GM07492A), adquiridas do banco *Coriell Cell Repository* (CCR, <http://ccr.coriell.org/>). A linhagem celular, previamente mantida congelada em nitrogênio líquido, foi cultivada em monocamada, em meio completo [HAM-F10 + DEM e 10% de soro bovino fetal (SBF)], 1% de antibióticos, a 5% de CO₂ e a 37°C, até atingirem o estado de semiconfluência para serem subcultivadas e preparadas para os experimentos. Para a realização dos experimentos as linhagens estavam entre a 3ª e 8ª passagem celular.

3.2.4 Atividade fosfolipásica

A atividade fosfolipásica foi determinada por hemólise indireta por gel de agarose contendo hemácias humanas e usando emulsão de gema de ovo como substrato, conforme descrito por

Gutiérrez (1988). Cerca de 0,3 mL de eritrócitos humanos foram lavados quatro vezes com tampão fosfato em salina (PBS) e foram adicionados juntamente com 0,3 mL de gema de ovo (diluída 1:4 em solução salina) e 0,25 de CaCl_2 0,01M a 25 mL de agarose 1% dissolvida em salina tamponada com fosfato pH 8,1. A mistura foi colocada em placas de petri (150 por 15 mm) para solidificar o gel.

Posteriormente, orifícios de, aproximadamente, 0,5 mm de diâmetro foram feitos e preenchidos com 10 μL das soluções de fosfolipase A2 e compostos. As placas foram incubadas a 37° C e a leitura dos resultados foram realizadas nos tempos de 20 e 40 h de incubação. O diâmetro dos halos de hemólise foram medidos com régua.

Como controle, foram utilizados 10 μL de DMSO, fosfolipase A2 ou apenas compostos. Os experimentos foram feitos em triplicata, tendo sido utilizado diferentes proporções de venenos e compostos. Os ensaios de inibição foram realizados por incubação prévia dos venenos com os inibidores por 20 h e posterior aplicação no gel de hemólise e incubação.

Os compostos avaliados na inibição da atividade fosfolipásica são apresentados na tabela 7. Os gráficos foram gerados com o programa Prism versão 6.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, USA), utilizando o valor médio obtido e desvio padrão. A análise estatística dos dados foi realizada por meio da Análise de Variância (ANOVA) com dois fatores e a comparação dos grupos experimentais com o controle foi realizada pelo teste de Dunnett. O nível de significância adotado foi $\alpha=0,05$.

3.2.5 Indução de Edema:

Grupos de 3 camundongos Swiss machos (18-22g) foram injetados via intradérmica (i.d) na região subplatar da pata direita posterior com 20 μL de soluções contendo diferentes quantidades de fosfolipase A2 e compostos, dissolvidos em DMSO. Os controles utilizados foram DMSO, PLA2 diluída em solução tampão fosfato-salino (PBS) e DMSO. A PLA2 foi, previamente, incubada com os compostos por 20 h a 37° C, em diferentes proporções e injetados nos animais. A mensuração da espessura das patas foi realizada, antes da inoculação das amostras (tempo 0 min). Em seguida, a mensuração das patas foi efetuada em diferentes intervalos de tempo após as administrações: 30, 60, 120, 180, 240, 300 e 360 minutos. Os valores obtidos foram subtraídos dos valores aferidos no tempo 0. O aumento do volume na pata dos camundongos foi medido com um paquímetro de baixa pressão 0.01 mm (Mytutoyo, Japão).

A indução de edema foi calculada em porcentagem utilizando a equação:

$$\% \text{ edema} = 100 \times (e_t - e_0) / e_0$$

Onde e_t é a espessura da pata em um determinado intervalo de tempo e e_0 é a espessura da pata no tempo de 0 minuto. Consequentemente, se após a injeção a pata tiver o dobro da espessura apresentada no tempo 0 minuto, é considerado um edema de 100%. Os gráficos foram gerados com o programa Prism versão 6.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, USA), utilizando o valor médio da porcentagem de edema induzido e erro padrão médio. A análise estatística dos dados foi realizada por meio da Análise de Variância (ANOVA) com dois fatores e a comparação dos grupos experimentais com o controle foi realizada pelo teste de Dunnett. O nível de significância adotado foi $\alpha=0,05$.

3.2.6 Predição de metabolismo e Toxicidade *in silico*

Os compostos que inibiram a PLA2 *in vivo* nos experimentos de indução ao edema foram selecionados e tiveram as biotransformações preditas com o uso do programa Meteor (Testa et al, 2005; Lhasa, 2007). As análises compreenderam reações de biotransformação de fases I e II processadas até a 3ª geração de metabólitos, pois parte das moléculas teriam capacidade de serem excretadas por serem hidrofílicas. A análise das biotransformações foi realizada usando a base de dados de reações metabólicas de mamíferos. Os metabólitos gerados da 1ª geração das reações de biotransformação dos compostos foram avaliados com o programa Derek para predição da toxicidade.

3.2.7 Avaliação de citotoxicidade *in vitro*

A avaliação da citotoxicidade foi determinada por um teste de viabilidade e sobrevivência celular com kit *Cell Proliferation Kit II* (XTT) da Roche. A técnica é baseada na clivagem do sal amarelo tetrazolium XTT por células metabolicamente ativas formando um corante formazan alaranjado. Dessa forma, essa conversão ocorre somente nas células viáveis. O resultado desse experimento permite determinar a quantidade de células sobreviventes após o tratamento com várias concentrações da PLA2 e dos compostos. Os controles utilizados foram o DMSO, PLA2 e um controle negativo (branco).

As células de fibroblasto (GM07492A) foram semeadas em placas de cultura de 96 poços, com 3×10^4 células por poço. O tratamento foi realizado 24 h após essa semeadura. A exposição

ocorreu por um período de 20 h a duas concentrações de PLA2 (0,125 e 0,25 $\mu\text{g/mL}$) e dos compostos (0,25 e 0,5 mg/mL). No tempo de 20 h após o tratamento, avaliou-se a viabilidade celular e no tempo de 40 h após o tratamento avaliou-se a sobrevivência celular. O meio foi retirado e as células foram lavadas com PBS e imediatamente foi adicionado o meio DMEM sem fenol vermelho. A solução XTT/electron (na proporção de 50:1) permanece na cultura por aproximadamente 120 minutos. Após a mudança de coloração, foi realizada a leitura colorimétrica das placas em um espectrofotômetro. O resultado da absorbância, medida em 450nm com filtro de referência de 650nm, é diretamente proporcional ao número de células viáveis em cada tratamento.

A viabilidade e sobrevivência celular foram calculadas em porcentagem utilizando a equação:

$$V(\%) = 100 \times (DO_{mt} / DO_{cc})$$

Onde DO_{mt} é a densidade ótica do material testado e DO_{cc} é a densidade ótica do controle celular. Foram usados nas análises, como controle celular para a viabilidade e sobrevivência celular, o DMSO e a PLA2. Os gráficos foram gerados com o programa Prism versão 6.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, USA), utilizando o valor médio da porcentagem de edema induzido e erro padrão médio. A análise estatística dos dados foi realizada por meio da Análise de Variância (ANOVA) com dois fatores e a comparação dos grupos experimentais com o controle foi realizada pelo teste de Dunnett. O nível de significância adotado foi $\alpha=0,05$.

5. Conclusões

5 CONCLUSÕES

A proteína PLA2 de *Apis mellifera* é um atrativo alvo molecular para estudos de planejamento e desenvolvimento de fármacos. Isto deve-se ao aumento no número de envenenamentos com abelhas, que cria uma demanda por inibidores contra as proteínas do veneno.

Alguns outros pontos importantes são que a PLA2 já possui a sua estrutura definida, sítio ativo conhecido, função conhecida e metodologia experimental bem difundida, por exemplo: ensaios de inibição. As características da PLA2 permitem usá-la como um modelo de estudo de proteína-inibidor *in silico* e *in vitro*.

A metodologia computacional utilizada na busca de ligantes já é bem definida e identificou com sucesso um grupo de 90 compostos com potencial de atividade inibitória. As interações entre PLA2 e os compostos auxiliaram a refinar os 49 melhores compostos. As ferramentas de predição da ajudaram a filtrar os 29 compostos selecionados.

Os compostos adquiridos foram avaliados *in vitro* e *in vivo*. Os ensaios *in vitro* confirmaram atividade contra a PLA2 para 11 compostos. Os experimentos *in vitro* permitiram avaliar de forma isolada a PLA2, sem outras proteínas que poderiam interferir na análise (sistema biológico). Após o resultado *in vitro*, os compostos foram então avaliados *in vivo*. O ambiente *in vivo* insere na análise outras moléculas e proteínas, que também podem competir com os compostos. A dosagem dos compostos teve de ser aumentada para que fosse verificada a mesma inibição encontrada *in vitro*. Os ensaios *in vivo* confirmaram atividade contra a PLA2 para 5 compostos.

Os ensaios de citotoxicidade *in vitro* foram realizados com para avaliar possíveis efeitos adversos dos compostos em cultura de células humanas. Três dos 5 compostos que apresentaram atividade contra a PLA2 *in vitro* e *in vivo* foram selecionados para estas análises. O experimento de citotoxicidade *in vitro* sugeriu efeito citotóxico para 2 dos 3 compostos. A citotoxicidade *in vitro* sugere uma maior cautela com os compostos, entretanto mais estudos devem ser realizados para determinar a concentração inibitória não tóxica.

Portanto, os resultados das análises permitiram indicar os compostos 3, 4, 5, 6 e 20 da Chembridge como possíveis inibidores para PLA2 de *Apis mellifera*.

6. Referências Bibliográficas

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abramson C., Aquino I. Behavioral studies of learning in the Africanized honeybee (*Apis mellifera* L.). **Brain Behav Evol.**; 59:68-86. 2002.

Abreu R.M.M. **Efeito de choques elétricos no comportamento das glândulas de veneno de operárias de *Apis mellifera* L. (Hymenoptera, Apidae)** UNESP:Rio Claro, SP: Dissertação de Mestrado 102 p. 1996.

Andricopulo A.D., Salum L.B., Abraham, D.J. Structure-based drug design strategies in medicinal chemistry. **Curr. Top. Med. Chem.**, v.9, n.9, p.771-90, 2009

Annand R.R., Kontoyianni M., Penzotti J.E., Dudler T., Lybrand T.P., Gelb M.H. Active Site of Bee Venom Phospholipase A2: The Role of Histidine-34, Aspartate-64 and Tyrosine-87. **Biochemistry**. 35, 4591-4601, 1996.

Barboni E., Kemeny D.M., Campos S., Vernon C.A. The purification of acid phosphatase from honeybee venom (*Apis mellifera*). **Toxicon**. 25:1097-104, 1987.

Berman H.M., Westbrook J., Feng Z., Gilliland G., Bhat T.N., Weissig H., Shindyalov I.N., Bourne P.E. The Protein Data Bank **Nucleic Acids Research**, 28: 235-242. 2000.

Borges M.H., Soares, A.M., Rodrigues V.M., Andrião-Escarso S.H., Diniz H., Hamaguchi A., Quintero A., Lizano S., Gutiérrez J. M., Giglio J. R., Homs-Brandeburgo M. I. Effects of aqueous extract of *Casearia sylvestris* (Flacourtiaceae) on actions of snake and bee venoms and on activity of phospholipase A2. **Comp. Biochem. Physiol. B**, v. 127, n. 1, p. 21-30, 2000.

Borges M.H., Soares A.M., Rodrigues V.M., Oliveira F., Fransheschi A.M., Rucavado A., Giglio J. R., Homs-Brandeburgo M. I. Neutralization of proteases from *Bothrops* snake venoms by the aqueous extract from *Casearia sylvestris* (Flacourtiaceae). **Toxicon**, v. 39, n. 12, p. 1863-1869, 2001.

Camargo, J.M.F., Stort A.C.. **A Abelha: *Apis mellifera* Linnaeus**. São Paulo, EDART. 1973.

Carosati E., Sciabola S., Cruciani G. Hydrogen bonding interactions of covalently bonded fluorine atoms: from crystallographic data to a new angular function in the GRID force Field. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 47, p. 5114-5125, 2004

Costa Neto E.M., Pacheco J.M. Utilização medicinal de insetos no povoado de Pedra Branca, Santa Terezinha, Bahia, Brasil. **Biotemas** 18(1): 113-133, 2005.

Costa S.K., Moreno H.Jr, Brain S.D., De Nucci G., Antunes E. The effect of *Phoneutria nigriventer* (armed spider) venom on arterial blood pressure of anaesthetised rats. **Eur J Pharmacol.**;298:113-20, 1996.

D'Ávila M., Marchini L.C.. Polinização realizada por abelhas em culturas de importância econômica no Brasil. **Boletim da Indústria Animal** 62(1): 79-90, 2005.

Dennis E.A. Diversity of group types, regulation, and function of phospholipase A2. **J. Biol. Chem.**, v. 269, p. 13057-60, 1994.

Derek for Windows and Meteor are developed by, and available from, Lhasa Limited, 22–23 Blenheim Terrace, Woodhouse Lane, Leeds LS2 9HD, United Kingdom.

Dotimas E.M., Hider R.C. Honeybee venom. **Bee world.**; 2: 51-71, 1987.

Ewan P.W. Venom allergy. **Bmj**, 316, 1365-1368, 1998.

Ewing T.J.A., Makino S., Skillman A.G., Kuntz I.D.J. DOCK 4.0: search strategies for automated molecular docking of flexible molecule databases. **Comput. Aided Mol. Des.**, 15, 411, 2001.

Egan W.J., Merz K.M., Baldwin J.J. Prediction of Drug Absorption Using Multivariate statistic. **J. Med. Chem.**, 43: 3867-3877, 2000.

França F.O., Benvenuti L.A., Fan H.W., Santos D.R., Hain S.H., Picchi-Martins F.R., Cardoso J.L., Kamiguti A.S., Theakston R.D., Warrell D.A. Severe and fatal mass attacks by 'killer' bees (Africanized honey bees - *Apis mellifera scutellata*) in Brazil: clinicopathological studies with measurement of serum venom concentrations. **Q J Med.**; 87: 269-82, 1994.

Friesner R.A., Banks J.L., Murphy R.B., Halgren T.A., Klicic J.J., Mainz D.T., Repasky M.P., Knoll E.H., Shelley M., Perry J.K., Shaw D.E., Francis P., Shenkin P.S. Glide: a new approach for rapid, accurate docking and scoring. 1. Method and assessment of docking accuracy **J. Med. Chem.**, 47, 1739, 2004.

Funayama J.C., Pucca M.B., Roncolato E.C., Bertolini T.B., Campos L.B., Barbosa J.E. Production of human antibody fragments binding to melittin and phospholipase A2 in Africanised bee venom: minimising venom toxicity. **Basic Clin Pharmacol Toxicol.** Mar;110(3):290-7, 2012.

Goodsell D.S., Morris G.M., Olson A.J. Automated docking of flexible ligands: applications of AutoDock. **J. Mol. Recognit.**, 9, 1, 1996.

Greene N., Judson P.N., Langowski J.J., Marchant C.A. Knowledge-based expert systems for toxicity and metabolism prediction: DEREK, STAR and METEOR. **SAR and QSAR in Environmental Research**, v. 10, p. 299-314, 1999.

Gutierrez J.M., Avila C., Rojas E., Cerdas L. An alternative in vitro method for testing the potency of the polyvalent antivenom produced in Costa Rica. **Toxicon** 26: 411-413, 1988.

Habermann E. Bee and wasp venoms. **Science** 177: 314-322, 1972.

Hess B., Kutzner C., Van der Spoel D., Lindahl E. GROMACS 4: Algorithms for highly efficient, load-balanced, and scalable molecular simulation. **Journal of Chemical Theory and Computation** 4(3): 435-447, 2008.

Jacob S.W., De La Torre J.C., Pharmacology of dimethyl sulfoxide in cardiac and CNS damage. **Pharmacol Rep.** Mar-Apr;61(2):225-35, 2009.

Jones R.G., Corteling R.L., Bhogal G., Landon J. A novel Fab-based antivenom for the treatment of mass bee attacks. **Am J Trop Med Hyg.**; 61:361-6, 1999.

Jorge D.M.M. **Busca de inibidores naturais contra o veneno de *Apis mellifera***, São Paulo. Dissertação de mestrado. Ribeirão Preto,. p. 142, 2008.

Kaplan J. What's buzzing with Africanized honeybees? **Agri Res.**; 4-8, 2006.

Karalliedde L. Animal Toxins. **Br. J. Anaesth.**, v. 74, n. 3, p. 319-327, 1995.

Kato E.C. **Polinização em melão (*Cucumis melo* L.) no Nordeste (campo aberto) e Sul (estufa) do Brasil, testando atrativo para *Apis mellifera***. Universidade Estadual Paulista:Jaboticabal: Monografia (Graduação em Zootecnia). 82 p. 1997.

Kitchen D.B., Decornez H., Furr J.R., Bajorath J. Docking and scoring in virtual screening for drug discovery: methods and applications. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 3, p. 935-949 , 2004.

Kramer B., Rarey M., Lengauer T. Evaluation of the FLEXX incremental construction algorithm for protein-ligand docking. **Proteins**, 37, 228, 1999.

Kudo I., Murakami M. Phospholipase A2 enzymes. **Prostag. Lipid. Mediat.**, v. 68-69, p. 3-58, 2002.

Lagorce D., Maupetit J., Baell J., Sperandio O., Tuffery P., Miteva M.A., Galons H., Villoutreix B.O. The FAF-Drugs2 server: a multistep engine to prepare electronic chemical compound collections. **Bioinformatics**. Jul 15;27(14):2018-20, 2011.

Lagunin A., Stepanchikova A., Filimonov D., Poroikov V. PASS: prediction of activity spectra for biologically active substances. **Bioinformatics**, 16 (8), 747-748, 2000.

Laurie A.T., Jackson R.M. Q-SiteFinder: an energy-based method for the prediction of protein-ligand binding sites. **Bioinformatics**, 21: 1908-1916, 2005.

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. **Adv Drug Deliv Rev.**, 46(1-3):3-26, 2001.

Lizano S., Domont G., Perales J. Natural phospholipase A2 myotoxin inhibitor proteins from snakes mammals and plants. **Toxicon**, v. 42, p. 963-77, 2003.

Lobell M, Hendrix M, Hinzen B, Keldenich J, Meier H, Schmeck C, Schohe-Loop R, Wunberg T, Hillisch A. In silico ADMET traffic lights as a tool for the prioritization of HTS hits. **ChemMedChem**. Nov;1(11):1229-36, 2006.

Maia A. B. O potencial terapêutico da apitoxina. **Mensagem Doce** 66: 15-22, 2002.

Marchant C.A., Briggs K.A., Long A. *In silico* tools for sharing data and knowledge on toxicity and metabolism: Derek for Windows, Meteor and Vitic, **Toxicol. Mech. Methods**, 18(2-3), 177-187, 2008.

Marcussi S., Sant'Ana C.D., Oliveira C.Z., Rueda A.Q., Menaldo D.L., Belebony R.O., Stábeli R.G., Giglio J.R., Fontes M.R.M., Soares A.M. Snake venom phospholipase A2 inhibitors: Medicinal Chemistry and Therapeutic Potential. **Curr. Top. Med. Chem.**, v 28, p. 743-56, 2007.

Marshall G.R. Introduction to chemoinformatics in drug discovery – A personal view. In: Oprea T.I. **Chemoinformatics in drug discovery**. Weinheim: Wiley-VHC, p. 1-22, 2004.

Mello M.H.S.H., Silva E.A., Natal D. Abelhas africanizadas em área metropolitana do Brasil: abrigos e influências climáticas. **Rev Saúde Pública** 37(2): 237-241, 2003.

Mingarro I., Perez-Paya E., Pinilla C., Appel J.R., Houghten R.A., Blondelle S.E. Activation of bee venom phospholipase A2 through a peptide-enzyme complex. **FEBS Lett**, **372**, 131-134, 1995.

Mitchell A. Africanized killer bees: a case study. **Critical Care Nurse**. 26: 23-32, 2006.

Nelson D.L., Cox M.M. **Princípios de Bioquímica de Lehninger**. Editora Artmed, 5 edição, 1273p., 2011.

Néron B., Ménager H., Maufrais C., Joly N., Maupetit J., Letort S., Carrere S., Tuffery P., Letondal C. Mobyle: a new full web bioinformatics framework. **Bioinformatics**. Nov 15; 25(22):3005-11, 2009.

Neudert G., Klebe G. DSX: a knowledge-based scoring function for the assessment of protein-ligand complexes. **Journal of chemical information and modeling**, v. 51, n. 10, p. 2731-45, 2011.

Nevalainen T.J., Peuravuori H.J., Quinn R.J., Llewellyn L.E., Benzie J.A.H., Fenner P.J., Winkel K.D. Phospholipase A2 in cnidária. **Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.**, v. 139, p. 731-5, 2004.

Oliveira C.Z., Maiorano V.A., Marcussi S., Sant`Ana C.D., Januário A.H., Lourenço M.V., Sampaio S.V., França S.C., Pereira P.S., Soares A.M. Anticoagulant and antifibrinolytic properties of the aqueous extract from *Bauhinia forficata* against snake venoms. **J. Ethnopharmacol.**, v. 98, p. 213-16, 2005.

Pastor M., Cruciani G., McLay I., Pickett S., Clementi S. GRID Independent Descriptors (GRIND): a novel class of alignment-independent three-dimensional descriptors. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 43, p. 3233-3243, 2000.

Peiren N., Vanrobaeys F., De Graaf D.C., Devreese B., Van Beeumen J., Jacobs F.J. The protein composition of honeybee venom reconsidered by a proteomic approach. **Biochim Biophys Acta**, **1752**, 1-5, 2005.

Phillips J.C., Braun R., Wang W., Gumbart J., Tajkhorshid E., Villa E., Chipot C., Skeel R.D., Kale L., Schulten K. Scalable molecular dynamics with NAMD. **Journal of Computational Chemistry**, 26:1781-1802, 2005.

Ridings J.E., Barratt M.D., Cary R., Earnshaw C.G., Eggington C.E., Ellis M.K., Judson P.N., Langowski J.J., Marchant C.A., Payne M.P., Watson W.P., Yih T.D. Computer prediction of possible toxic action from chemical structure: an update on the DEREK system. **Toxicology**, v. 106, p. 267-279, 1996.

Rodrigues R.P., Mantoani, S.P., Almeida J.R., Pinsetta F.R., Semighini E.P., Silva, V.B., Silva C.H.T.P. Estratégias de Triagem Virtual no Planejamento de Fármacos. **Rev. Virtual Quim.**, Vol 4, No. 6, 739-776, 2012.

Roldan E.R.S. Role of phospholipases during sperm acrosomal exocytosis. **Frontiers in Bioscience**, 3, d1109-1119, 1998.

Sanderson D.M., Earnshaw C.G. Computer prediction of possible toxic action from chemical structure: The DEREK system. **Human & Experimental Toxicology**, v. 10, p. 261-273, 1991.

Santos N.C., Figueira-Coelho J., Martins-Silva J., Saldanha C. Multidisciplinary utilization of dimethyl sulfoxide: pharmacological, cellular, and molecular aspects. **Biochem Pharmacol.** Apr 1;65(7):1035-41, 2003.

Santos K.S. **Identificação das proteínas do veneno de abelhas africanizadas (*Apis mellifera* L.) imunoreativas ao soro antiveneno por abordagem proteômica.** São Paulo, Tese de doutorado. 282 p, 2008.

Schaloske R.H., Dennis E.A. The phospholipase A2 superfamily and its group numbering system. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1761, p. 1246-59, 2006.

Schumacher M., Schmidt O., Egen N., Lowry E. Quantity, analysis, and lethality of European and Africanized honey bee venom. **Am J Trop Med Hyg.**; 43:79-86, 1990.

Schumacher M.J., Egen N.B. Significance of Africanized bees for public health. **Arch Intern Med.**; 155: 2038-43, 1995.

Scott D.L., Otwinowski Z., Gelb M.H., Sigler P.B. Crystal structure of bee-venom phospholipase A2 in a complex with a transition-state analogue. **Science** 250: 1563-1566, 1990.

Sherman R. What physicians should know about Africanized honeybees. **West J Med.**; 163:541-6, 1995.

Silveira F.A., Melo G.A., Almeida E.A.B.. **Abelhas Brasileiras: Sistemática e Identificação.** Belo Horizonte. 253p, 2002.

Soares A.M., Fontes M.R.M., Giglio J.R. Phospholipase A2 myotoxins from *Bothrops* snake venoms: structure-function relationship. **Curr. Org. Chem.**, v. 8, p. 1- 14, 2004.

Steen C.J., Janniger C.K., Schutzer S.E., Schwartz R.A. Insect sting reactions to bees, wasps, and ants. **Int J Dermatol**, **44**, 91-94, 2005.

Teixeira C.F., Landucci E.C., Antunes E., Chacur M., Cury Y. Inflammatory effects of snake venom myotoxic phospholipases A2. **Toxicon**, Oxford, v. 42, n. 8, p. 947-962, 2003.

Testa B., Balmat A., Long A., Judson P. Predicting drug metabolism – An evaluation of the expert system METEOR. **Chemistry & Biodiversity**, v. 02, p. 872-885, 2005.

The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.3 Schrödinger, LLC

Tosteson M.T., Holmes S.J., Razin M., Tosteson D.C. Melittin lysis of red cells. **J Membr Biol**, **87**, 35-44, 1985.

Toyama D.O., Marangoni S., Diz-Filho E.B., Oliveira S.C., Toyama M.H. Effect of umbelliferone (7-hydroxycoumarin, 7-HOC) on the enzymatic, edematogenic and necrotic activities of secretory phospholipase A2 (sPLA2) isolated from *Crotalus durissus collilineatus* venom. **Toxicon**, Oxford, v. 53, n. 4, p. 417-426, 2009.

Van de Bosch H. Intracellular phospholipases A. **Biochim. Biophys. Acta**, v.604, p. 191-246, 1980.

Veber D.F., Johnson S.R., Cheng H.Y., Smith B.R., Ward K.W., Kopple K.D. Molecular properties that influence the oral bioavailability of drug candidates. **J. Med. Chem.**, 45, 2615–2623, 2002.

Verdonk M.L., Cole J.C., Hartshorn M.J., Mulrray C.W., Taylor R.D. Improved protein-ligand docking using GOLD **Proteins**, 52, 609, 2003.

Verheij H.M., Slotboom A.J., De Haas G.H. Structure and function of phospholipase A2. **Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.**, v. 91, p. 91-203, 1981.

Vetter R.S., Visscher P.K., Camazine S. Mass envenomations by honey bees and wasps. **West J Med**, 170, 223-227, 1999.

Volkamer A., Kuhn D., Grombacher T., Rippmann F., Rarey M.. Combining global and local measures for structure-based druggability predictions. **J. Chem. Inf. Model.** 52,360-372, 2012.

Wade R.C., Goodford P.J. Further development of hydrogen bond functions for use in determining energetically favorable binding sites on molecules of known structure. 2. Ligand probe groups with the ability to form more than two hydrogen bonds. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 36, p. 148-156, 1993.

Warrell D. A. Clinical features of envenoming from snake bites. In: Bom, C., Goyffon, M. (Eds), **Envenomings and Their Treatments**. Editions Foundation Marcel Mérieux, Lyon, p. 67-227, 1996.

Wermuth C. G. **The practice of medicinal chemistry**. London: Academic Press. 2003

Winston M.L., The Biology and Management of Africanized Honey Bees **Annual Review of Entomology**, Vol. 37: 173-193, 1992.

Winston M.L. The Africanized “killer” bee: biology and public health. **Q J Med.** 87:263-67, 1994.

Xing L., Hodgkin E., Liu Q., Sedlock D. Evaluation and application of multiple scoring functions for a virtual screening experiment. **J. Comput. Aided Mol. Des.**, v. 18, n. 5, p. 333-344, 2004

Zoete V., Grosdidier A., Michielin O. Docking, virtual high throughput screening *and in silico* fragment-based drug design. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**. v.13, n. 2, p. 238-248, 2009.

7. Anexos

7 ANEXOS

ANEXO A – Parecer do comitê de ética em pesquisa de experimentação animal.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

— Comissão de Ética em Experimentação Animal —

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo para Uso de Animais em Experimentação nº 107/2007, sobre o projeto intitulado “*Busca de inibidores naturais contra venenos de abelhas*”, sob a responsabilidade da **Professora Doutora Silvana Giuliatti**, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi **APROVADO** pela COMISSÃO DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CETEA) em reunião de **31 de março de 2008**.

(We certify that the protocol nº 107/2007, about “*Search for natural inhibitors against bee venom*”, agrees with the ETHICAL PRINCIPLES IN ANIMAL RESEARCH adopted by Brazilian College of Animal Experimentation (COBEA) and was approved by the COLLEGE OF MEDICINE OF RIBEIRÃO PRETO OF THE UNIVERSITY OF SÃO PAULO – ETHICAL COMMISSION OF ETHICS IN ANIMAL RESEARCH (CETEA) in 03/31/2008 meeting).

Ribeirão Preto, 1º de abril de 2008.

Prof. Dr. Eduardo Melani Rocha
Presidente da Comissão de Ética em
Experimentação Animal

ANEXO B – Parecer do comitê de ética em pesquisa de experimentação humana.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

Of. CEP/FCFRP nº. 33/2010
kms

Ribeirão Preto, 7 de julho de 2010.

Ilma. Sra.

PROF.^a DR.^a LUSÂNIA MARIA GREGGI ANTUNES

Pós-graduando DANIEL MACEDO DE MELO JORGE

Depto. de Análises Clínicas, Toxicológicas e Bromatológicas

FCFRP - USP

Assunto: **Aprovação de protocolo de pesquisa.**

Prezada Professora,

O Comitê de Ética em Pesquisa da FCFRP/USP aprovou, em sua 79ª Sessão Ordinária, realizada em 01/07/2010, o projeto de pesquisa intitulado "AVALIAÇÃO DE INIBIDORES SINTÉTICOS E NATURAIS CONTRA O VENENO DE APIS MELLIFERA", apresentado por Vossa Senhoria a este Comitê, Protocolo **CEP/FCFRP nº. 188**.

Em atendimento à Resolução 196/96, deverá ser encaminhado ao CEP o relatório final da pesquisa e a publicação de seu resultado, para acompanhamento, bem como comunicada qualquer intercorrência ou interrupção do mesmo.

Atenciosamente,

Prof.ª Dr.ª MARIA REGINA TORQUETI
Coordenadora do CEP - FCFRP/USP

8. Apêndice

8 APÊNDICE

APÊNDICE A – Manuscrito do artigo.

In silico screening for Phospholipase A2 of *Apis mellifera* with Maybridge Library

Daniel M. M. Jorge e Silvana Giuliatti

School of Medicine of Ribeirao Preto - USP, Ribeirao Preto, Sao Paulo, Brazil;

Abstract

Phospholipases A2 (PLA2s) are enzymes that catalyze the hydrolysis of the sn-2 acyl bond of glycerophospholipids. PLA2s have been isolated from a variety of sources, including reptile and insect venoms, pancreatic juices, platelets, and synovial fluid. The primary structure of the group III PLA2 present in *Apis mellifera* venom (bvPLA2), shows homology to other short PLA2s, except in the region of the catalytic histidine and aspartic acid residues, the calcium binding loop, and certain cysteine residues. Virtual screening is the use of high-performance computing to analyze large databases of chemical compounds in order to identify possible lead compounds. We predicted potential inhibitors against bvPLA2. Structure of bvPLA2 (1POC) was obtained from PDB database. Flexible docking was performed with GOLD 5.1 to propose novel potential inhibitors with the virtual collection of compounds of the Maybridge database. The top-ranked orientations for each of the best 22 compounds were selected. The virtual screening was accomplished in a simulation inside a sphere of 12 Å radius centered at the TYR87 carbon atom of group. The molecular interaction fields were obtained using the software HotspotX. The 'Rule of Five' parameters (RO5) was applied in these candidates. All compounds were evaluated by Derek and PASS predictions. PASS and Derek analysis helped to define the best compound to continue the experimental test. The best score compounds were 54673, 54457 and 7659. These three compounds could be used in further analysis to confirm *in vivo* or *in vitro* its potential to inhibit bvPLA2.

Keyword: Venom, *Apis mellifera*, Phospholipase A2, Docking, Maybridge.

Introduction

The phospholipase A2 (PLA2) is the major venom enzyme in the Hymenoptera, being the most studied in bee venom (1). PLA2s have been isolated from a variety of sources, including reptile and insect venoms, pancreatic juices, platelets, and synovial fluid. They have been assigned to groups I to XIV, based on similarities of sequence and properties (1,2). The primary structure of the group III PLA2 from honeybee (*Apis mellifera*) venom shows homology to other short PLA2s, except in the region of the catalytic histidine and aspartic acid residues, the calcium binding loop, and certain cysteine residues. PLA2 enzymes could be classified according to cellular location: cytosolic PLA2 (cPLA2), intracellular

PLA2 (iPLA2), and secretory PLA2 (sPLA2) (2), based in this classification bee's PLA2 is a secretory enzyme. The bee's PLA2 venom has a molecular weight of about 15.0-16.0 kDa and it is the main allergen and immunogen in the bee venom. It corresponds to almost 12% of the crude venom and it has the potential to be extremely alkaline (2). It has an important cleavage activity in biological membranes, this enzyme catalyzes the breaking down of phospholipids, resulting in the formation of fatty acids including arachidonic acid. It causes membrane perturbation, cellular lysis and inflammation processes (3,4,5,1). PLA2 could be responsible for a sequence of indirect pharmacological reactions (1). This enzyme has been considerably studied, and its action and kinetic activity has been demonstrated (6,2). Several studies have shown a synergistic reaction of phospholipase A2 with melittin in mammal erythrocyte lysis process (7,8). Melittin facilitates the exposure of membrane phospholipids to the catalytic site of the enzyme, by opening melittin-induced channels. The interaction between melittin and PLA2 cause most of effects of honeybee poisoning, therefore this two proteins could be good targets for inhibition.

The inflammation caused by Phospholipase A2 is based on the specific and critical phospholipids hydrolysis that could be blocked with inhibitors against Phospholipase A2 (9). To better understand and avoid the pathological process a few therapeutic drugs were developed to block PLA2 enzymatic activity. As a consequence of this kind of study the crystal structure of bee venom PLA2 was obtained and *in silico* studies could be done with the information of active site and three-dimensional structure. Thus *in silico* approaches have gained immense popularity and have become an integral part of the industrial and academic research, directing drug design and discovery

The experimental efforts to perform the biological screening of billions of compounds are significantly high, and therefore, computer-aided drug design approaches have become attractive alternatives. In recent years, virtual screening has reached a status of a dynamic and lucrative technology in probing for novel drug-like compounds in the pharmaceutical industry (10). Therefore, high-throughput virtual screening has been emerging as a complement to high-throughput screening in an attempt to discover novel potential lead compounds in the process of drug discovery (11). Thus, to identify new and effective compounds that inhibit the catalytic activity of bee venom PLA2, several computational tools as structure-based pharmacophore modeling and virtual screening could be considered as effective approaches. A large number of different database of compounds are available, each database has specific compounds with different characteristics. The Maybridge building block collection, these pharmacophorically rich intermediates are specifically designed for medicinal chemistry, allowing logical SAR development and Hit-to-Lead optimization.

In this study, we predicted potential inhibitors against bvPLA2 selected from one database by virtual screening. These novel compounds were investigated using computational strategies such as molecular docking, molecular interaction fields and drug-like properties. Three compounds were considered good for the inhibition of PLA2 from bee venom and could be tested *in vivo* and *in vitro*.

Material and Methods

The Phospholipase A2 (PDB code: 1POC) protein was retrieved from PDB (<http://www.pdb.org/pdb/home/home.do>) database. The software GOLD was used to carry out virtual screening simulations with the Ilibdiverse virtual collections of compounds (14). The docking simulations were performed inside a sphere of 12 Å radius centered at carbon CE1 of the Y87 side chain of the PLA2 structure. Hydrogen atoms were added to the protein structure after the removal of the ligand and crystallographic waters. The GOLD software executed flexible docking using a genetic algorithm, and it was originally optimized from a set of 305 complex structures with coordinates deposited in PDB. We used populations of 100 conformers, 100 000 operations, 95 mutations, and 95 crossovers. For virtual screening, the orientation of the highest score was selected by GOLD for each of the best 22 compounds. The molecules selected in the virtual screening simulations were assessed individually for rescoring and reranking.

After docking simulations, the inhibitors were filtered by virtual screening, to select the ten orientations with highest scores. These selections were made by the GoldScore function. This function was optimised for the prediction of ligand binding positions and takes into account factors such as H-bonding energy, van der Waals energy, metal interaction and ligand torsion strain. For the calculation of physical-chemical properties, we used FAF-Drugs web-server. The molecular interaction fields were obtained using the software HotspotX(15). Four prototypical probes have been used, aromatic carbon (representing hydrophobic interactions), carbonyl oxygen (representing hydrogen bonding acceptor groups), water (representing water interaction) nitrogen group (representing hydrogen bonding donors groups).

Toxicity predictions were performed with DEREK expert system software, (17) which identify potential toxicity by analyzing chemical toxicophoric groups present in a molecule. It uses a high-throughput screening strategy in a knowledge-based system to look for specific end points, including carcinogenicity, chromosome damage, genotoxicity, mutagenicity, neurotoxicity, hepatotoxicity, teratogenicity, irritancy, reproductive toxicity, respiratory sensitization, skin sensitization, and thyroid toxicity. PASS evaluates biological activity potential of a molecule of interest (18). Predictions are made using 2D QSAR-type models based on a large training set which includes over 250,000 substances. PASS predicts about 4000 different kinds of biological activities with a mean prediction accuracy of 85%. The list of predictable activities include main pharmacological effects, mechanisms of action and other effects of interest like toxicity, metabolism etc.

The biological activity spectrum of the query compound is estimated from the structure activity relationship knowledgebase (SARBase) and output in the form of probabilities of the compound being 'active' (Pa) or 'inactive' (Pi) for a biological activity. These probabilities are obtained by combining contributions made by groups of atoms in the compound, which favor or disfavor the particular activity as seen from a large structure-activity database at the backend of the software. Higher the values obtained for Pa-Pi, more the chances of the compound showing activity on a scale of 0-1. The net probability for activity of a compound can be estimated as the difference Pa-Pi.

Results and Discussion

Virtual screening simulations were carried out using the approach of high throughput flexible docking with GOLD software in order to select compounds that could interact with 1POC and that have therapeutic potential. For these simulations, the collection of compounds of maybridge was used. The Maybridge collection provides about 70,000 compounds with drug-like features, especially oral bioavailability and blood-brain barrier penetration (19). Ten compounds were selected in the virtual screening simulations. Figure 1 shows the structures of these selected molecules.

Figure 1 The 10 selected compounds and the identification numbers of the library Maybridge Hitfinder. The compounds shown are: 11, 569, 969, 1252, 1926, 5796, 6875, 7188, 7626 and 13549.

Figure 2 The 12 selected compounds and the identification numbers of the library Maybridge Screening Collection. The compounds shown are: 223, 4442, 6909, 7659, 25797, 25798, 26255, 30116, 30566, 54457, 54673 and 57023.

The interaction between the compounds and PLA2 active site was evaluated. The orientations of these compounds, suggested by rescoring in flexible docking simulations, appear to maintain the key interactions with 1POC observed for the reported inhibitors as well as our candidates previously described in this work. The best GoldScore values obtained for compounds were 72.05, 69.16 and 65.72 respectively to the compound 6909, 25798 and 54673. The twenty two best compounds results are shown in table 1 and 2.

Table 1. Parameters related to the Rule of Five for reported IPOC inhibitors selected by virtual screening simulations.

Candidate	Score	Molecular weight	Acceptors (nON)	Donors (nOHNH)	TPSA	miLog P	Lipinski violations
969	62,57	371,965	3	0	38,68	4,581	0
13549	59,69	486,109	5	3	70,22	5,148	1
7626	58,61	367,932	4	0	43,61	3,504	0
7188	58,23	379,959	2	1	29,10	4,976	0
6875	58,18	450,057	5	0	72,82	3,612	0
1926	58	432,419	3	1	46,17	5,353	1
11	57,84	429,57	4	3	68,01	5,185	1
5796	57,62	498,577	6	1	95,74	3,593	0
569	56,62	478,357	7	3	98,73	4,725	0
1252	56,02	492,047	6	2	80,32	4,011	0

Table 2. Parameters related to the Rule of Five for reported IPOC inhibitors selected by virtual screening simulations.

Candidate	Score	Molecular weight	Acceptors (nON)	Donors (nOHNH)	TPSA	miLog P	Lipinski violations
6909	72,05	899,446	7	0	91,831	10,54	2
25798	69,16	604,923	6	2	92,34	9,351	2
54673	65,72	465,572	3	0	49,58	6,308	1
54457	65,31	490,122	5	0	72,82	4,482	0
7659	64,47	426,472	9	4	149,86	0,048	0
30566	64,34	430,003	4	0	43,61	4,778	0
4442	63,87	580,639	9	3	117,48	4,864	1
57023	63,21	614,396	8	2	108,93	8,637	2
25797	62,84	618,906	7	2	109,41	9,179	2
26255	62,48	411,462	9	7	145,66	0,701	1
30116	61,25	463,053	5	1	59,816	5,441	1
223	61,23	403,551	7	2	97,393	2,216	0

We have identified, by virtual screening simulations, ten molecules that could show activity against this enzyme. In an attempt to design new potential IPOC inhibitors, the drug-like characteristics should be investigated in order to assess the efficiency of the new molecules. For the ten compounds selected in virtual screening, the parameters of the Lipinski's Rule of Five (RO5) were calculated (10). These

parameters are common to oral bioavailable drugs, for instance molecular weight lower than 500, log P lower than 5, the number of hydrogen bond acceptors equal to or less than 10, and the number of hydrogen bond donors equal to or less than 5. The RO5 values calculated for our molecules are shown in Table 1 and 2. All the molecules presented here showed good drug-like properties, in despite of two violation in the compounds 6909, 25798, 57023 and 25797, but more than one violation is necessary to discard them.

Molecular interaction fields (MIFs) were generated for the binding site of IPOC structure in order to support our findings. MIFs were obtained using four different probes, DRY (representing hydrophobic interactions), carbonyl oxygen (representing hydrogen bonding acceptor groups), water (representing water interaction) and carboxy oxygen (representing hydrogen bonding donors groups). The MIFs obtained with water and carboxy oxygen were not sufficient to identify the best compounds, because all compounds had similar interactions in that chemical group. The results obtained for the DRY probe defined the best proposal candidate. The molecules that presented the best agreement with the MIFs were compound 54673, 54457 and 7659. The orientations of these structures showed aromatic rings in a particular region of the IPOC active site that is relevant for hydrophobic interactions. MIFs obtained with the DRY probe were generated mainly by the influence of Y87 residue, which is located in a favorable region of interaction with inhibitors, just between other important residues (H34, F67, and C9)

The results obtained for the carbonyl oxygen probe are decisive to define the best compound. The molecules that presented the best agreement with the MIFs calculated with this probe were compound 54673 and compound 54457. The orientations of these two molecules indicate a hydroxyl group in the most relevant region defined by this chemical probe. In this region, the hydroxyl groups of the potential ligands can play a role as hydrogen bonding acceptor groups. MIFs were generated by the region composed of the triad of catalytic residues 87 that accommodate hydroxyl groups of compounds 54673 and 7659. Considering these two chemical probes analyzed in the molecular interaction fields studies, compound 54673, 54457 and 7659 seem to be the most promising IPOC inhibitor candidates.

Considering the twenty candidates compounds, the toxicity prediction performed with the DEREK. The table 3 show the results of potential damage and chemical groups involved in the toxicity of the compounds of Maybridge 20. The compounds evaluated 11, 223, 569, 969, 1252, 1926, 4442, 5796, 6875, 7188, 7626, 7659, 13549, 25798, 26255, 30116, 30566, 54457, 54673 and 57023.

All compounds showed Maybridge the predictions of toxicity (Table 3). The potential damage more common in accordance with the data was hepatotoxicity, which was found in 14 of 20 compounds. The most common chemical group is a thiazole or derivative thereof, which is related to hepatotoxicity. The compounds of Maybridge which showed only a prediction of toxicity were 11, 569, 969, 6875, 7188, 54457 and 57023. The compound had the highest number of predictions of toxicity was 26,255.

Compounds 569 (Table 3), 26 255 and 57 023 (Table 3) had damage to mammals and probable carcinogenicity to humans uncertain. Despite the uncertain value for humans, these compounds should be evaluated carefully before biological experiments and were considered potentially toxic.

The chemical groups responsible for the damage to be modified so they can be used in biological experiments. However, it should be taken into account the dose of compound which can cause damage because an inhibitory dose can be achieved without necessarily cause adverse effects.

The mechanism by which catechols induce structural aberrations may be related to their ability to oxidise to electrophilic semiquinones and quinones, either enzymatically or through other chemical pathways (28). For example, the quinones derived from catechol and dopamine have both been shown to form depurinating adducts with purine residues in DNA (29). Catechols have also been shown to induce oxidative DNA damage in the presence of copper ions through copper-catalysed redox cycling between catechol and o-benzoquinone (30). As copper ions have been reported to be bound to nuclear chromatin (31) it is possible that such redox cycling occurs in close proximity to DNA. Compounds 3 and 5 present chemical groups related with catechol should prevent to use them as medication. Derek analysis supported the choice of the candidates 1, 8 and 9 such as good possible inhibitors without toxicity. The candidate 5 even though had the best score in Gold analysis, it had the higher different risk chemical groups.

Table 3 Result obtained with the software Derek. Potential damage of each compound and the chemical group responsible for that action.

Candidate	Potential Damage (Derek)	Chemical group
11	Hepatotoxicity	Thiophene
	Ocular toxicity	Aryl sulphonamide
223	Hepatotoxicity	Thiazole or derivative
	Hepatotoxicity	Carbamate
569	Carcinogenicity	Polyhalogenated aromatic
	Carcinogenicity	Polyhalogenated aromatic
969	Hepatotoxicity	Thiazole or derivative
	Carcinogenicity	Hydrazine
	Hepatotoxicity	Hydrazine
1252	Hepatotoxicity	Thiazole or derivative
	Skin sensitisation	Hydrazine or precursor
	Teratogenicity	Hydrazine

Table 4 Result obtained with the software Derek. Potential damage of each compound and the chemical group responsible for that action.

Candidate	Potential Damage (Derek)	Chemical group
1926	Ocular toxicity	Aryl sulphonamide
	Phototoxicity	Aryl sulphonamide
	Photoallergenicity	Halogenated aromatic compound
4442	Carcinogenicity	Hydrazine
	Hepatotoxicity	Hydrazine
	Hepatotoxicity	Thiophene
	Skin sensitisation	Hydrazine or precursor
	Teratogenicity	Hydrazine
5796	Ocular toxicity	Aryl sulphonamide
	Phototoxicity	Aryl sulphonamide
	Hepatotoxicity	Thiazole or derivative
6875	Hepatotoxicity	Thiazole or derivative
6909	Photoallergenicity	Diaryl ketone
	Phototoxicity	Aryl sulphonamide
	Phototoxicity	1,3,5-Hexatriene
7188	Hepatotoxicity	Thiophene
7626	Hepatotoxicity	Thiazole or derivative
	Skin sensitisation	Thiol or thiol exchange agent
	Photoallergenicity	Diaryl ketone
7659	Phototoxicity	1,3,5-Hexatriene
	Phototoxicity	Aryl sulphonamide
	Ocular toxicity	Aryl sulphonamide
13549	Carcinogenicity	Hydrazine
	Hepatotoxicity	Hydrazine
	Teratogenicity	Hydrazine
	Skin sensitisation	Hydrazine or precursor
	Photoallergenicity	Diaryl ketone
25797	Phototoxicity	1,3,5-Hexatriene
	Phototoxicity	Aryl sulphonamide
	Ocular toxicity	Aryl sulphonamide
25798	Phototoxicity	Aryl sulphonamide
	Ocular toxicity	Aryl sulphonamide
26255	Carcinogenicity	Ethanolamine or aminoethanethiol
	Carcinogenicity	Ethanolamine or aminoethanethiol
	HERG channel inhibition in vitro	HERG Pharmacophore II
	Irritation (of the respiratory tract)	Ethanolamine
	Photoallergenicity	Diaryl ketone
	Skin sensitisation	Hydroquinone or precursor
	Skin sensitisation	Diamine
	Irritation (of the eye)	Hydrogen halide
	Irritation (of the respiratory tract)	Hydrogen halide
30116	Methaemoglobinaemia	Simple aniline or precursor
	Teratogenicity	Anilide
30566	Skin sensitisation	Thiol or thiol exchange agent
	Hepatotoxicity	Thiazole or derivative
54457	Hepatotoxicity	Thiazole or derivative
54673	Hepatotoxicity	Thiazole or derivative
	Hepatotoxicity	Thiophene
57023	Carcinogenicity	Polyhalogenated aromatic
	Carcinogenicity	Polyhalogenated aromatic

Table 5 Prediction of the biological activity with the software PASS.

Candidate	Pa	Pi	Effects
11	0,482	0,006	Antineoplastic (pancreatic cancer)
223	0,420	0,010	Calpain inhibitor
569	0,513	0,008	Thiol protease inhibitor
969	0,709	0,008	Antiallergic
	0,675	0,010	Antiasthmatic
1252	0,542	0,059	Acute neurologic disorders treatment
1926	0,602	0,019	Cholestasis
4442	0,478	0,004	Cyclooxygenase inhibitor
5796	0,618	0,007	Atherosclerosis treatment
6875	0,468	0,004	Cyclooxygenase inhibitor
6909	0,876	0,008	Acidosis, metabolic
	0,767	0,048	Shivering
	0,709	0,009	Thioredoxin inhibitor
7188	0,616	0,002	Plasminogen activator inhibitor antagonist
7626	0,749	0,003	Thiol protease inhibitor
7659	0,912	0,005	Acidosis, metabolic
	0,674	0,020	Aldehyde oxidase inhibitor
13549	0,856	0,004	Bone diseases treatment
	0,840	0,004	Antiosteoporotic
25797	0,917	0,005	Acidosis, metabolic
	0,763	0,004	Lacrima secretion stimulant
	0,721	0,065	Shivering
	0,622	0,022	Thioredoxin inhibitor
25798	0,908	0,005	Acidosis, metabolic
	0,740	0,004	Lacrima secretion stimulant
	0,730	0,062	Shivering
26255	0,810	0,002	Alkylator
	0,810	0,011	Antineoplastic
30116	0,521	0,011	Alzheimer's disease treatment
30566	0,754	0,003	Thiol protease inhibitor
54457	0,459	0,030	Antidiabetic
54673	0,831	0,004	Atherosclerosis treatment
	0,820	0,005	Antidiabetic
	0,617	0,004	Vascular (periferal) disease treatment
	0,615	0,004	Heart failure treatment
57023	0,867	0,004	Antiobesity
	0,705	0,006	Antidiabetic

Virtual screening by PASS was resorted to evaluate all compounds and discover possible biological activities. The Pa-Pi result should be greater than 0.7 to be accepted as being active. The compound 11, 223, 569, 1252, 1926, 4442, 5796, 6875, 7188, 30116 and 54457 had Pa-Pi less than 0.7, in that case, we couldn't consider as a good prediction (Table 4). On the other hand, the remainders compounds had higher confidence of biological probability value. All compounds selected were drug like (table 3) and had

already been used in different treatments, but none of them were related with the purpose of this study, *in vitro* studies should confirm the interactions found in the virtual screening.

In this work, ADMET predictions, molecular interaction field studies, flexible docking, as well as virtual screening were used to design and propose ten novel potential inhibitors of IPOC with drug-like properties. The ten molecules proposed showed interesting structural characteristics that could be required for inhibiting IPOC activity. After toxicophoric analysis of the most promising candidates, compounds 54673, 54457 and 7659 presented an minimal alarming toxicity risk and could be a promising drug candidate for the treatment of bee's accident. The best score compounds were 54673, 54457 and 7659. These three compounds could be used in further analysis to confirm *in vivo* or *in vitro* its potential to inhibit bvPLA2.

Acknowledgment.

We acknowledge financial support from CNPq, CAPES and FAPESP.

Reference:

- 1 SCHMIDT J.O. Biochemistry of insect venoms. **Ann. Rev. Entomol.**, 1982, 27, 339-68.
- 2 ANNAND R.R., KONTOYIANNI M., PENZOTTI J.E., DUDLER T., LYBRAND T.P., GELB M.H. Active site of bee venom phospholipase A2: the role of histidine-34, aspartate-64 and tyrosine-87. **Biochemistry**, 1996, 35, 4591-601.
- 3 BANKS B.E.C., SHIPOLINI R.A. Chemistry and pharmacology of honey bee venom. In: PIEK T. Venoms of the hymenoptera: biochemical, pharmacological and behavioral aspects. London: Academy Press, 1986: 329-416.
- 4 DOTIMAS E.M., HIDER R.C. Honeybee venom. **Bee world**, 1987, 68, 51-71.
- 5 HOFFMAN D.R. Hymenoptera venom proteins. **Nat. Toxins**, 1996, 2, 169-86.
- 6 AHMED T., KELLY S.M., LAWRENCE A.J., MEZNA M., PRICE N.C. Conformational changes associated with activation of bee venom, phospholipase A2. **J. Biochem.**, 1996, 120, 1224-31.
- 7 BERNHEIMER A.W., RUDY B. Interactions between membranes and cytolytic peptides. **Biochim. Biophys. Acta**, 1986, 864, 123-41.
- 8 WATALA C., KOWALCZYK J.K. Hemolytic potency and phospholipase activity of some bee and wasp venoms. **Comp. Biochem. Physiol.**, 1990, 97C, 187-94.
- 9 DE LIMA P. R., BROCHETTO-BRAGA M. R. Hymenoptera venom review focusing on Apismellifera. **J. Venom. Anim. Toxins incl. Trop. Dis.** 2003, vol.9 no.2 Botucatu.
- 10 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. **Adv. Drug Deliv. Rev.** 1997, 23, 3.
- 11 TOYODA, K., SHIBUTANI, M., SATO, H., UNEYAMA, C., TAKAHASHI, M., HAYASHI, Y., HIROSE, M. Lack of carcinogenicity and increased survival in F344 rats treated with 5-fluorouracil for two years. **Food Chem. Toxicol.** 2000, 38, 187.
- 12 KROVAT, E. M., FRUHWIRTH, K. H., LANGER, T. Pharmacophore identification, in silico screening, and virtual library design for inhibitors of the human factor Xa. **J. Chem. Inf. Model.** 2005, 45, 146-159.

- 13 SRINIVAS REDDY A., PRIYADARSHINI PATI S., PRAVEEN KUMAR P., PRADEEP H.N. and NARAHARI SASTRY G..Virtual Screening in Drug Discovery – A Computational Perspective.**Current Protein and Peptide Science**, 2007, 8, 329-351
- 14 CHEMBRIDGE; Chembridge Corporation: San Diego, CA, 2007.
- 15 Neudert G., Klebe G. DSX: a knowledge-based scoring function for the assessment of protein-ligand complexes. *Journal of chemical information and modeling*, v. 51, n. 10, p. 2731-45, 2011.
- 17 DEREK and METEOR 8.0; LHASA Limited: Leeds, U.K., 2004.
- 18LAGUNIN, A.; STEPANCHIKOVA, A.; FILIMONOV, D.; POROIKOV, V.PASS: prediction of activity spectra for biologically active substances.**Bioinformatics** 2000, 16, 747.
- 19 Ilib diverse, Inte: Ligand GmbH: Maria Enzersdorf, Austria, <http://www.inteligand.com>
- 20CRONIN M.T.D., BASKETTER D.A., Multivariate QSAR analysis of a skin sensitization database.**SAR and QSAR in Environmental Research**, 1994, 2, 159-179
- 21OPDYKE D.L.J., Fragrance raw materials monographs: alpha-methylanisalacetone. **Food and Cosmetics Toxicology**, 1979, 17, 863
- 22BASKETTER D.A., LEA L.J., COOPER K., STOCKS J., DICKENS A., PATE I., DEARMAN R.J., KIMBER I., Threshold for classification as a skin sensitizer in the local lymph node assay: a statistical evaluation. **Food and Chemical Toxicology**, 1999, 37, 1167-1174
- 23BERGSTROM M.A., OTT H., CARLSSON A., NEIS M., ZWADLO-KLARWASSER G., JONSSON C.A.M., MERK H.F., KARLBERG A.T., BARON J.M., A skin-like cytochrome P450 cocktail activates prohapens to contact allergenic metabolites.**Journal of Investigative Dermatology**, 2007, 127, 1145-1153
- 24BARRATT, M. D.; BASKETTER, D. A.Possible origin of the skin sensitization potential of isoeugenol and related compounds.**Contact Dermatitis** 1992, 27, 98
- 25PEARLSTEIN R.A., VAZ R.J., KANG J., CHEN X.L., PREOBRAZHENSKAYA M., SHCHEKOTIKHIN A.E., KOROLEV A.M., LYSENKOVA L.N., MIROSHNIKOVA O.V., HENDRIX J., RAMPE D., Characterization of HERG potassium channel inhibition using CoMSiA 3D QSAR and homology modeling approaches. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, 2003, 13, 1829-1835
- 26KAMIJO Y, SOMA K, KOKUTO M, OHBU M, FUKU C AND OHWADA T. Hepatocellular injury with hyperaminotransferasemia after cresol ingestion. **Archives of Pathology and Laboratory Medicine**, 2003, 127, 364-366
- 27MIZUTANI T., SATOH K., NOMURA H., NAKANISHI K.,Hepatotoxicity of eugenol in mice depleted of glutathione by treatment with DL-buthioninesulfoximine. **Research Communications in Chemical Pathology and Pharmacology**, 1991, 71, 219-230.
- 28KALYANARAMAN B., FELIX C.C., SEALY R.C.,Semiquinone anion radicals of catechol(amine)s, catechol estrogens, and their metal ion complexes. **Environmental Health Perspectives**, 1985, 64, 185-19
- 29CAVALIERI E.L., LI K.M., BALU N., SAEED M., DEVANESAN P., HIGGINBOTHAM S., ZHAO J., GROSS M.L., ROGAN E.G.,Catecholortho-quinones: the electrophilic compounds that form depurinating DNA adducts and could initiate cancer and other diseases. **Carcinogenesis**, 2002, 23, 1071-1077
- 30OIKAWA S., HIROSAWA I., HIRAKAWA K., KAWANISHI S., Site specificity and mechanism of oxidative DNA damage induced by carcinogenic catechol. **Carcinogenesis**, 2001, 22, 1239-1245

31BRYAN S.E., VIZARD D.L., BEARY D.A., LABICHE R.A., HARDY K.J., Partitioning of zinc and copper within subnuclear nucleoprotein particles. **Nucleic Acids Research**, 1981, 9, 5811-5823