



MATEUS SANTOS CARAPIÁ

**CHÁS COMERCIAIS/ ALIMENTOS NUTRACÊUTICOS:
PROSPECÇÃO DE MODULADORES ENZIMÁTICOS**

**Lavras – MG
2020**

MATEUS SANTOS CARAPIÁ

**CHÁS COMERCIAIS/ ALIMENTOS NUTRACÊUTICOS:
PROSPECÇÃO DE MODULADORES ENZIMÁTICOS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Agroquímica, área de concentração em Química e Bioquímica de produtos naturais e sintéticos, para a obtenção do título de Mestre

Orientador(a): Profa. Dra. Silvana Marcussi

Lavras – MG

2020

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

Carapiá, Mateus Santos.

Chás comerciais/alimentos nutracêuticos: prospecção de
moduladores enzimáticos / Mateus Santos Carapiá. - 2020.

83 p. : il.

Orientador(a): Silvana Marcussi.

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal
de Lavras, 2020.

Bibliografia.

1. Compostos Fenólicos. 2. Plantas Mediciniais. 3.
Antioxidantes. I. Marcussi, Silvana. II. Título.

MATEUS SANTOS CARAPIÁ

**CHÁS COMERCIAIS/ ALIMENTOS NUTRACÊUTICOS:
PROSPECÇÃO DE MODULADORES ENZIMÁTICOS.**

*COMMERCIAL TEA/ NUTRACEUTICAL FOODS:
PROSPECTING ENZYMATIC MODULATORS.*

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Agroquímica, área de concentração em Química e Bioquímica de produtos naturais e sintéticos, para a obtenção do título de Mestre

APROVADA em 05 de fevereiro de 2020

Dra. Silvana Marcussi	UFLA
Dr. Filippe Elias de Freitas Soares	UFLA
Dr. Clayton Zambeli Oliveira	UFPB

Orientador(a): Profa. Dra. Silvana Marcussi

**Lavras – MG
2020**

À minha amada e saudosa mãe, Ednalva Ferreira dos Santos (*in memoriam*), figura ímpar na minha formação enquanto cidadão, acadêmico e, sobretudo, ser humano.

Dedico

AGRADECIMENTOS

À fonte de todo amor, bondade e sabedoria.

À Universidade Federal de Lavras, em especial ao Departamento de Química,
assim como ao Programa de Pós-Graduação em Agroquímica..

À Prof. Dra. Silvana Marcussi pela orientação, obrigado pelo acolhimento,
auxílio, confiança e paciência. Aprendi muito durante todo esse processo, graças à esses
e outros profissionais inspiradores.

À todos familiares, amigos e colegas de laboratório que contribuíram direta ou
indiretamente para a realização deste mestrado acadêmico e que me apoiaram até aqui,
mesmo que não estejam citados.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento
de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

Eterna Gratidão!

RESUMO

Considerado a segunda bebida mais ingerida do mundo, o chá promove uma gama de benefícios à saúde humana, sendo estes geralmente associados a atividade antioxidante de diferentes compostos fenólicos, sobretudo os flavonoides e ácidos fenólicos. Dentre as principais infusões consumidas no Brasil estão os chás de camomila (*Matricaria chamomilla*), capim-limão (*Cymbopogon citratus*), erva-cidreira (*Melissa officinalis*), erva-doce (*Pimpinella anisum*), erva-mate (*Ilex paraguariensis*), hortelã-pimenta (*Mentha piperita L.*) e verde/preto (*Camellia sinensis*), sendo essas as infusões avaliadas no presente estudo. Proteases e fosfolipases A₂ foram utilizadas como ferramentas de estudo, para avaliar a ação inibidora dos chás nos testes de atividade fosfolipásica, hemólise, trombólise, fibrinogenólise, proteólise sobre a caseína e coagulação de plasma citratado. Em adição, o potencial anti-inflamatório dos chás foi avaliado em teste de hemólise em meio líquido a 54°C. A atividade de PLA₂s foi reduzida em valores superiores a 25% nos tratamentos com chá preto e chá-mate. As inibições na atividade de proteases mais significativas, foram observadas após incubação com chá preto (40,74%), chá verde (31,48%) e erva mate (25,93%). Infusões de chá preto e verde reduziram a hemólise avaliada em meio semissólido e em meio líquido (indicador de potencial anti-inflamatório). Os incubados de plasma com chá verde, chá preto e erva-cidreira, e posterior adição de peçonha (proporção 1:10; chá:PBS, v:v), prolongaram o tempo de coagulação do plasma citratado, em aproximadamente duas vezes, quando comparados ao controle positivo. As incontáveis comprovações dos benefícios dos chás a saúde humana, tanto advindas de uso popular milenar quanto de pesquisas científicas, destacam a relevância de promover a ampliação das possibilidades de uso, considerando o desenvolvimento de novas formulações e/ou produtos, assim como da recomendação de consumo dessas infusões para prevenção e como adjuvantes aos tratamentos convencionais de doenças, principalmente inflamatórias.

Palavras-Chave:

Antioxidantes, Hemostasia Humana, Compostos fenólicos, Flavonoides, Plantas Medicinais.

ABSTRACT

Considered the second most ingested drink in the world, tea promotes a range of benefits to human health, these are generally associated with the antioxidant activity of different phenolic compounds, especially flavonoids and phenolic acids. In Brazil, the most consumed infusions include chamomile (*Matricaria chamomilla*), lemongrass (*Cymbopogon citratus*), lemon balm (*Melissa officinalis*), anise (*Pimpinella anisum*), yerba mate (*Ilex paraguariensis*), peppermint (*Mentha piperita L.*), and green/black (*Camellia sinensis*) teas, these being the infusions evaluated in the present study. Proteases and phospholipases A2 were used as a study tool to evaluate the inhibitory action of teas in tests of phospholipase activity, hemolysis, thrombolysis, fibrinogenolysis, proteolysis on casein and coagulation of citrated plasma. In addition, the anti-inflammatory potential of teas was evaluated in a hemolysis test in liquid medium at 54°C. The activity of PLA2s was reduced by more than 25% in the treatments with black tea and mate tea. The most significant inhibitions in protease activity were observed after incubation with black tea (40.74%), green tea (31.48%) and yerba mate (25.93%). Infusions of black and green tea reduced the hemolysis assessed in semi-solid and environment liquid. Plasma incubators with green tea, black tea and lemon balm, and subsequent addition of venom (1:10 ratio; tea: PBS, v:v), prolonged the coagulation time of the citrated plasma by approximately twice, when compared to the positive control. The countless proofs of the benefits of teas to human health, both from ancient popular use and from scientific research, highlight the relevance of promoting the expansion of the possibilities of use, considering the development of new formulations and/or products, as well as the recommendation of consumption of these infusions for prevention and as an adjunct to conventional treatments for diseases, especially inflammatory ones.

Keywords:

Antioxidants, Human hemostasis, Phenolic compounds, Flavonoids, Medicinal plants.

LISTA DE FIGURAS

PRIMEIRA PARTE

- Figura 1. Principais rotas metabólicas de biossíntese de compostos fenólicos.....26
- Figura 2. Principais classes de compostos fenólicos e estruturas químicas dos seus derivados, A: flavonoides, B: ácidos fenólicos.....27
- Figura 3. Representação simplificada das etapas da hemostasia.....30
- Figura 4. Esquema da cascata do ácido araquidônico (cascata de inflamação).....32

SEGUNDA PARTE - Artigo

- Figura 1. Efeito das infusões de ervas sobre a atividade de PLA₂s de *Bothrops moojeni* (10µg), avaliado após incubação por 30 minutos a 37°C.....65
- Figura 2. Atividade hemolítica realizada em meio semissólido, induzida pela peçonha de *Bothrops moojeni* (10µg), avaliada após incubação com as infusões por 30 minutos a 37°C.....69
- Figura 3. Atividade de proteases da peçonha de *Bothrops moojeni* (10µg), avaliada após incubação com as infusões por 30 minutos a 37°C.....71
- Figura 4. Perfil eletroforético (SDS-PAGE) do resultado da ação proteolítica induzida pela peçonha de *Bothrops moojeni* sob fibrinogênio na ausência e presença de infusões de chá verde (*Camellia sinensis, green*) e chá-mate (*Ilex paraguariensis*) nas proporções 1:2 e 1:3 (volume de infusão em relação ao volume reacional).....73
- Figura 5. Efeito das infusões de ervas sobre a dissolução de trombos sanguíneos exercida pela peçonha de *Bothrops moojeni* (30µg), avaliado após incubação por 30 minutos a 37°C.....76

LISTA DE TABELAS

PRIMEIRA PARTE

Tabela 1. Principais compostos fenólicos presentes em alguns dos chás consumidos no Brasil e suas correlações com a saúde	23
---	----

SEGUNDA PARTE - Artigo

Tabela 1. Avaliação da hemólise térmica, na presença de anti-inflamatórios e infusões de <i>Camellia sinensis</i> (chá verde e preto)	68
---	----

Tabela 2. Tempo de coagulação de plasma citratado, induzida por peçonha de <i>Bothrops moojeni</i> , procedendo incubação prévia das infusões com o plasma e posterior adição da peçonha (A), e incubação prévia das infusões com o peçonha e posterior adição de plasma (B).....	73
---	----

SUMÁRIO

RESUMO	20
PRIMEIRA PARTE.....	26
1. INTRODUÇÃO.....	14
2. OBJETIVOS.....	15
2.1 Objetivo Geral.....	15
2.2 Objetivos Específicos.....	15
3. REFERENCIAL TEÓRICO.....	16
3.1 Infusões (Chás): regulamentação e correlações com a saúde.....	16
3.2 Compostos antioxidantes, fenólicos e a saúde.....	25
3.3 Biodisponibilidade dos compostos fenólicos no organismo humano.....	29
3.4 Hemostasia.....	30
3.5 Processos Inflamatórios.....	31
3.6 Moduladores enzimáticos de origem vegetal.....	34
3.7 Peçonhas de serpentes como ferramentas laboratoriais: composição e principais classes de enzimas.....	36
ANEXOS.....	51
SEGUNDA PARTE – ARTIGO.....	56
<i>ABSTRACT</i>	58
1. INTRODUÇÃO.....	59
2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	60
2.1 Obtenção das amostras e preparo dos chás.....	60
2.2 Obtenção de Sangue e Plasma Humano.....	60
2.3 Obtenção das peçonhas de serpente.....	61
2.4 Atividade fosfolipásica.....	61
2.5 Atividade anti-inflamatória avaliada pela estabilidade da membrana de eritrócitos frente à temperatura de 54°C.....	61
2.6 Atividade citotóxica sobre eritrócitos humanos.....	62
2.7 Atividade proteolítica sobre a caseína.....	62
2.8 Atividade fibrinogenolítica.....	63
2.9 Atividade coagulante.....	63
2.10 Atividade sobre trombos sanguíneos.....	64
2.11 Análise estatística.....	64

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	64
3.1 Atividade Fosfolipásica	65
3.2 Atividade anti-inflamatória avaliada pela estabilidade da membrana de eritrócitos frente à temperatura de 54°C.....	66
3.3 Atividade citotóxica sobre eritrócitos humanos	69
3.4 Atividade proteolítica sobre a caseína	70
3.5 Atividade fibrinogenolítica	72
3.6 Atividade Coagulante	73
3.7 Atividade sobre trombos sanguíneos	75
CONCLUSÃO	76
REFERÊNCIAS	77

PRIMEIRA PARTE

1. INTRODUÇÃO

O chá apresenta inúmeros benefícios à saúde, assim, é considerado a segunda bebida mais ingerida no mundo, ficando apenas atrás da água (ZIELINSKI *et al.*, 2014). O alto consumo de chá por diferentes populações ao longo dos anos, está relacionado com seus efeitos antimutagênicos, anticarcinogênicos, antimicrobianos, anti-inflamatórios e principalmente antioxidantes (PINTO *et al.*, 2013).

Os benefícios dos chás nos organismos, estão geralmente associados a atividade antioxidante de diferentes compostos fenólicos presentes nessas infusões, especialmente os flavonoides (COELHO *et al.*, 2016; YIN *et al.*, 2015; ZIELINSKI *et al.*, 2014). Os antioxidantes são substâncias que possuem a capacidade de inibir e/ou diminuir a ação de compostos oxidantes e radicais livres, além disso, podem agir quelando íons metálicos (ROSSA *et al.*, 2017).

Os compostos fenólicos, também chamados de polifenóis, fazem parte de uma classe de substâncias derivadas da via do ácido chiquímico e do acetato-malonato e adotam uma grande variedade de estruturas que possuem pelo menos um anel aromático com um ou mais grupos hidroxilas. A atividade antioxidante desses compostos é atribuída principalmente à presença dos grupamentos hidroxilas na estrutura dos polifenóis (MORAIS *et al.*, 2009). Os compostos fenólicos podem ser agrupados em dois grandes grupos: flavonoides (antocianinas, flavonóis, isoflavonas e flavonas), taninos e ácidos fenólicos (PINTO *et al.*, 2013).

Os compostos fenólicos com atividade antioxidante são apontados como importantes agentes no retardo do envelhecimento, assim como na prevenção de doenças degenerativas, cardiovasculares e cerebrais (MORAES-DE-SOUZA *et al.*, 2008). Além da atividade antioxidante, estes compostos desempenham outras funções no organismo, atuando como anti-inflamatórios, anti-aterogênicos, vasodilatadores, participam como moduladores de rotas enzimáticas, da expressão gênica e contribuem melhorando as funções de membranas e receptores celulares (CORRÊA *et al.*, 2015).

A biodiversidade no Brasil, no que se refere às plantas medicinais popularmente utilizadas com anti-inflamatórios naturais, impulsiona a procura por novos compostos bioativos. Entre as diferentes classes de compostos bioativos, os flavonoides se destacam por suas ações biológicas, por exemplo, possuem a capacidade de promover o controle de

processos inflamatórios e melhorias na resposta imunológica, conferindo assim um alto potencial farmacológico (COUTINHO *et al.*, 2009).

No contexto da exploração científica de produtos nutracêuticos, os chás de destacam pela composição rica em moléculas que atuam na prevenção e como adjuvantes no tratamento de diversas doenças de origem e desenvolvimento inflamatório, assim como são regulamentados como alimentos podendo ser facilmente recomendados ou prescritos, sem restrições legais. Dessa forma o presente trabalho tem por objetivo ampliar a caracterização farmacológica das principais infusões (camomila, capim-limão, erva-cidreira, erva-doce, erva-mate, hortelã-pimenta e chá verde/preto) consumidas no Brasil, de forma a prospectar os benefícios à saúde humana, associados aos compostos fenólicos, principalmente flavonoides contidos nessas bebidas.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Objetivou-se no presente estudo, avaliar o potencial *in vitro* de amostras comerciais de chás [camomila (*Matricaria chamomilla*), capim-limão (*Cymbopogon citratus*), erva-cidreira (*Melissa officinalis*), erva-doce (*Pimpinella anisum*), erva-mate (*Ilex paraguariensis*), hortelã-pimenta (*Mentha piperita L.*) e chá verde/preto (*Camellia sinensis*)] como moduladores enzimáticos na hemostasia, utilizando peçonhas de serpentes como ferramentas de indução de efeitos, a fim de ampliar a caracterização farmacológica e toxicológica destes chás.

2.2 Objetivos Específicos

- Analisar o efeito das infusões de ervas sobre a atividade fosfolipásica, induzida pela peçonha de *Bothrops moojeni*.
- Determinar o potencial anti-inflamatório das infusões de ervas pela proteção da integridade da membrana de eritrócitos, durante exposição destes à temperatura de 54°C.
- Avaliar o potencial inibidor das infusões de ervas sobre a atividade hemolítica, induzida pela peçonha de *B. moojeni*, à 37°C.
- Avaliar o potencial inibidor das infusões de ervas sobre enzimas proteolíticas em geral (utilizando o substrato caseína), fibrinogenolíticas (utilizando fibrinogênio bovino como

substrato), trombolíticas (metaloproteases hemorrágicas) e coagulantes (serinoproteases semelhantes à trombina e metaloproteases).

3. REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 Infusões (Chás): regulamentação e correlações com a saúde

A Resolução Nº 277, de 22 de setembro de 2005, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), defini o chá como o produto constituído das partes inteiras, fracionadas ou moídas de um (ou mais) vegetal, além da bebida proveniente da infusão deste produto (BRASIL, 2008).

Apenas algumas espécies vegetais e parte das plantas bem definidas podem ser comercializadas na forma de chás. As espécies vegetais e as suas partes permitidas para comercialização estão estabelecidas na Resolução RDC nº 267, de 22 de setembro de 2005 que aprova o "Regulamento Técnico de Espécies Vegetais para o Preparo de Chás (Brasil, 2005) e também na RDC nº 219, de 22 de dezembro de 2006 (Brasil, 2006). São elas: *Bromelia ananas*, *Malpighia glabra*, *Prunus domestica*, *Rubus spp*, *Ananas sativus*, *Musa sinensis*, *Musa paradisiaca*, *Musa sapientum*, *Vanilla aromatica*, *Beta vulgaris*, *Matricaria recutita*, *Cymbopogon citratus*, *Ribes nigrum*, *Prunus serotina*, *Camellia sinensis*, *Cichorium intybus*, *Daucus carota*, *Prunus armeniaca*, *Melissa officinalis*, *Ilex paraguariensis*, *Pimpinella anisum*, *Foeniculum vulgare*, *Ribes rubrum*, *Paullinia cupana*, *Hibiscus sabdariffa*, *Mentha piperita*, *Mentha arvensis*, *Jasminum officinale*, *Citrus aurantium*, *Citrus limmonia*, *Pyrus malus*, *Carica papaya*, *Mangifera indica*, *Passiflora quadrangularis*, *Passiflora edulis*, *Passiflora alata*, *Passiflora edulis*, *Pyrus cydonia*, *Cydonia sinensis*, *Vaccinium myrtillus*, *Pirus communis*, *Prunus persica*, *Stenocalyx michelii*, *Citrus reticulata*, *Vitis vinifera*, *Peumus boldus*, *Baccharis genistelloides*, *Cichorium intybus*, *Stevia rebaudiana*, *Rosa canina*, *Citrus reticulata*, *Tamarindus indica*. As plantas supracitadas que podem ser comercializadas como alimentos são transformadas em sachês isolados ou embalagens maiores (CARVALHO *et al.*, 2011), assim como as drogas vegetais de origem industrial, no entanto, as embalagens de plantas medicinais vendidas na forma de chá não podem conter indicações

terapêuticas enquanto que as drogas vegetais industrializadas podem conter essas informações de modo padronizado.

O Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) em 20/06/2013 publicou no Diário Oficial da União (DOU) as Instruções Normativas N° 17, 18 e 19 de 2013 que estabelecem a complementação dos Padrões de Identidade e Qualidade (PIQ) para as Bebidas Não Alcoólicas (BRASIL, 2013). A **Instrução Normativa N° 17/2013** versa sobre os Padrões de Identidade e Qualidade para Preparado Sólido para Refresco e Preparado Sólido para Bebida Composta, a **Instrução Normativa N° 18/2013** legisla sobre os Padrões de Identidade e Qualidade para Xarope, Preparado Líquido para Refresco, Preparado Líquido para Refrigerante, Preparado Líquido para Bebida Composta e Preparado Líquido para Chás.

As normativas ressaltam que os extratos permitidos para utilização como ingredientes característicos, são somente os extratos padronizados previstos nas novas Instruções Normativas e demais legislações do MAPA. Já os extratos aquosos, são aqueles previstos em legislação específicas da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). (BRASIL, 2013), conforme a agência, denomina-se extrato aquoso/ extrato aquoso desidratado o extrato obtido de espécies vegetais e suas partes, previstas em legislação específica da ANVISA e, obtidas por métodos físicos, utilizando água como único agente extrator/ e submetido à posterior desidratação.

Infusões de ervas frequentemente consumidas o Brasil e no mundo foram avaliadas por diversos autores, principalmente utilizando métodos *in vitro*, com o objetivo de avaliar o potencial antioxidante atribuído aos compostos fenólicos, sobretudo flavonoides (MORAIS *et al.*, 2009; DORMAN *et al.*, 2009, KERIO *et al.*, 2013; COSTA *et al.*, 2016; CAMARGO *et al.*, 2017; LIU *et al.*, 2018). A justificativa da relevância desses trabalhos reside na elevada atividade antioxidante dessas preparações, diretamente relacionada com a saúde humana (prevenção de doenças e adjuvante em terapias tradicionais) quando presentes na dieta constantemente, e paralelamente com a conservação da qualidade de alimentos, extrapolando assim as aplicações terapêuticas (MORAES-DE-SOUZA *et al.*, 2008).

Um estudo que demonstrou os teores de flavonóis e flavonas em chás comercializados no Brasil, destacou os chás preto e verde e também a erva-mate como grandes fontes de compostos fenólicos (MATSUBARA *et al.*, 2006). Seguindo a

classificação proposta por Vasco *et al.* (2008), de acordo com o teor de compostos fenólicos, as fontes vegetais podem ser divididas em três categorias: baixo teor de fenóis (<100 mg100 g⁻¹), médio teor de fenóis (100 – 500 mg100 g⁻¹) e alto teor de fenóis (> 500 mg100 g⁻¹), valores expressos em equivalentes ao ácido gálico (GAE).

No Brasil, o tipo de erva utilizada nas infusões, na forma *in natura* ou processada, pode variar de acordo com a região, no entanto, algumas plantas se ressaltam por serem comumente consumidas nas diferentes regiões do país. Dentre os chás consumidos frequentemente no Brasil, sob investigação científica de suas propriedades antioxidantes, estão: camomila (*Matricaria chamomilla*), capim-limão (*Cymbopogon citratus*), erva-cidreira (*Melissa officinalis*), erva-doce (*Pimpinella anisum*), erva-mate (*Ilex paraguariensis*), hortelã-pimenta (*Mentha piperita L.*) e chá verde/preto (*Camellia sinensis*) (ALBUQUERQUE *et al.*, 2016; COELHO *et al.*, 2016; BLUM-SILVA *et al.*, 2015; BOAVENTURA *et al.*, 2015; ZIELINSKI *et al.*, 2014; BARROS *et al.*, 2013; MORAIS *et al.*, 2009; MORAES-DE-SOUZA *et al.*, 2008).

- Camomila (*Matricaria chamomilla*)

A camomila (*Matricaria chamomilla L.*) se destaca como uma das principais e mais importantes ervas medicinais nativas do leste e sul europeu, também cultivada na Alemanha, Hungria, França, Rússia, Iugoslávia e Brasil (SINGH *et al.*, 2011). Também conhecida como "a estrela entre espécies medicinais", a camomila é utilizada em sua totalidade, como raiz, casca, goma, folha, fruta, flores, semente e óleo de semente, para várias doenças na medicina tradicional de diversos povos (SRIVASTAVA *et al.*, 2015). As Infusões e decocções são os principais tipos de preparações para o consumo de camomila e derivados (VIAPIANA *et al.*, 2016).

As propriedades medicinais atribuídas à camomila estão associadas ao seu óleo essencial e aos compostos fenólicos produzidos pelo metabolismo secundário do vegetal (VIAPIANA *et al.*, 2016; MORAES-DE-SOUZA *et al.*, 2008; SRIVASTAVA *et al.*, 2015; HAGHI *et al.*, 2014; SINGH *et al.*, 2011).

A camomila é descrita como uma importante fonte de compostos com correlações medicinais, dentre as suas propriedades estão: atividade espasmolítica, antiflogística, anti-inflamatória, quimiopreventiva contra a radiação UV, anticarcinogênica, além dos efeitos sedativo, cicatrizante e calmante (SRIVASTAVA *et al.*, 2015; HANGHI *et al.*, 2014; MORAIS *et al.*, 2009).

- Capim-limão (*Cymbopogon citratus*)

Popularmente conhecido como capim-limão, grama citronela ou capim-santo, o *Cymbopogon citratus* pertence à família *Poaceae*. De origem asiática, tem seu provável surgimento na região do *Sri Lanka* ou Índia, no entanto, se popularizou mundialmente, principalmente em ambientes úmidos e subtropicais, como no Brasil (COELHO *et al.*, 2016). Comumente o capim-limão é utilizado na forma de chá, porém este se destaca como uma cultura de alto valor pelas diversas aplicações do seu óleo essencial, composto majoritariamente dos isômeros neral (*cis*-citrál) e geranial (*trans*-citrál), empregados na área farmacêutica, principalmente na síntese de vitamina A; no setor de alimentos; na produção de cosméticos e itens de perfumaria, como por exemplo, na produção de iononas e metil-iononas (SILVA *et al.*, 2017; GUIMARÃES *et al.*, 2011).

O capim-limão é utilizado há milhares de anos pelo homem, devido ao seu sabor característico e seus benefícios à saúde humana, na prevenção e auxílio no tratamento de doenças (COELHO *et al.*, 2016). Os principais efeitos associados aos compostos bioativos (parte deles fenólicos) do capim-limão são: antioxidante, antibacteriano, antifúngico, antiprotozoário, anti-inflamatório, antisséptico, anticarcinogênico, antirreumático e cardioprotetor (RITA *et al.*, 2018; PORT'S *et al.*, 2013; GUIMARÃES *et al.*, 2011; MORAIS *et al.*, 2009). Além disso, o capim-limão tem demonstrado ação no tratamento de diabetes, dislipidemia, complicações gastrointestinais, ansiedade, malária, gripe, febre e pneumonia (COSTA *et al.*, 2016).

- Erva-cidreira (*Melissa officinalis*)

A *Melissa officinalis*, popularmente chamada de erva-cidreira, é uma planta de origem asiática e europeia, herbácea perene, aromática e pertencente à família *Lamiaceae* (SILVA *et al.*, 2017). Essa erva é tradicionalmente utilizada em forma de infusão (chá), principalmente por seu sabor, aroma e suas qualidades terapêuticas. Essas propriedades são associadas aos flavonoides (como a apigenina e luteolina) e aos ácidos hidroxicinâmicos, sendo os ácidos rosmarínico e cafeico os fenólicos majoritários, tanto em erva-cidreira cultivada em jardins e *in vitro*, assim como em amostras comerciais (BARROS *et al.*, 2013).

A erva-cidreira é usada popularmente para fins terapêuticos devido às suas propriedades em conter crises nervosas, taquicardia, melancolia, histerismo e ansiedade, além disso essa espécie é comumente utilizada como sedativo, antiflatulento e antiespasmódico, assim como no tratamento de dores de cabeça, reumatismo, indigestão e hipersensibilidades (SILVA *et al.*, 2017; BARROS *et al.*, 2013).

- Erva-doce (*Pimpinella anisum*)

A *Pimpinella anisum* L. (erva-doce) é uma planta da família *Apiaceae* nativa da região do Mediterrâneo, cultivada especialmente em países de clima quente, como Irã, Egito, Turquia, Índia e Brasil. A erva-doce é amplamente utilizada para fins medicinais e culinários devido à suas propriedades terapêuticas, sabor e aroma adocicado, no entanto, aplicações industriais, principalmente na área de cosméticos e perfumaria são comuns para esta espécie (TAVALLALI *et al.*, 2018; MARTINS *et al.*, 2016).

Dentre as propriedades medicinais que tornam a erva-doce uma espécie atrativa para o consumo humano estão: ação antioxidante, inseticida, antifúngica, além dos efeitos antimicrobiano, antiespasmódico, antisséptico, expectorante e antiflatulento (TAVALLALI *et al.*, 2018).

- Erva-mate (*Ilex paraguariensis*)

Ilex paraguariensis é uma planta perene nativa da América do Sul e popularmente chamada de “erva-mate” ou “mate” (BOJIC *et al.*, 2013). O mate é um dos mais tradicionais e antigos componentes do sistema de silvicultura da região sul do Brasil. A infusão obtida através dessa planta, é um dos chás mais populares e consumidos no sul do Brasil, norte da Argentina, Paraguai e Uruguai (BLUM-SILVA *et al.*, 2015).

Dentre os benefícios atribuídos à erva-mate, relacionados à presença dos compostos fenólicos estão os efeitos: hipocolesterolêmico, hepatoprotetor, diurético e antioxidante (BLUM-SILVA *et al.*, 2015), auxiliando assim na redução dos níveis de colesterol; na saúde de órgãos como fígado, rins e coração; na estimulação do sistema nervoso central; na inibição da proliferação de células neoplásicas; e redução dos radicais livres (PIOVEZAN-BORGES *et al.*, 2016; BOJIC *et al.*, 2013; MORAES-DE-SOUZA *et al.*, 2008). Em paralelo, os extratos de erva-mate avaliados por Piovezan-Borges *et al.* (2016) não apresentaram caráter citotóxico em leveduras de *Saccharomyces cerevisiae*, o

que demonstra o potencial para o desenvolvimento de novas formulações a base de erva-mate.

- Hortelã-pimenta (*Mentha piperita* L.)

A *Mentha piperita* L. (hortelã-pimenta) é uma espécie vegetal da família *Lamiaceae*, de origem europeia, naturalizada no continente americano e cultivada por todo o globo; trata-se de um híbrido de *M. spicata* L. (hortelã) com *M. aquatica* L. (hortelã-d'água). Possui propriedades terapêuticas e agradáveis aroma e sabor, sendo amplamente empregada nos setores de alimentos, farmacêuticos, cosméticos e perfumaria (ANCUCEANU *et al.*, 2017). O óleo e os componentes bioativos das folhas de hortelã-pimenta podem variar com a maturidade da planta, variedade, região geográfica e condições de processamento (MCKAY *et al.*, 2006).

Foram atribuídas às folhas de hortelã-pimenta as atividades: antialérgicas, antivirais, antibacterianas, além dos efeitos antiespasmódico, antiflatulento, anti-helmíntico e antienvhecimento (ANCUCEANU *et al.*, 2017). A lista dos supostos benefícios atrelados ao consumo da erva, contempla o auxílio no tratamento de náuseas, vômitos, distúrbio envolvendo a vesícula biliar, estômago e trato gastrointestinal, na estimulação do apetite, no controle da febre, resfriados e inflamações (MCKAY *et al.*, 2006).

- Chá verde (*Camellia sinensis*)

A *Camellia sinensis* (chá verde) é uma planta perene e arbustiva da família *Theaceae*, cultivada em diversos países, principalmente na China, na Índia, no Japão e no Ceilão (ZARGAR *et al.*, 2018). O consumo de chá verde é apontado desde 2737 a.C., quando, o imperador da China, Shen Nung, descobriu e usou pela primeira vez, no entanto, o relato de suas propriedades medicinais foi reconhecido apenas no século VIII por monges budistas (NEVES *et al.*, 2010; BARBOSA *et al.*, 2007). Acredita-se que o chá verde é a bebida mais consumida no mundo depois da água, principalmente devido aos seus efeitos benéficos à saúde humana com destaque para a prevenção de doenças (DAS *et al.*, 2018; YASMEEN *et al.*, 2015; FIGUEIROA *et al.*, 2009).

O chá verde é uma fonte rica em compostos de interesse biológico, como polissacarídeos conjugados, aminoácidos, cafeínas, vitaminas e, sobretudo, compostos fenólicos, estando em maior quantidade as catequinas (flavonoides), dentre elas:

epigallocatequina galato, epigallocatequina, epicatequina galato, epicatequina, galato de galocatequina, galocatequina e catequina (DAS *et al.*, 2018; PINTO *et al.*, 2013; NEVES *et al.*, 2010). Estima-se que o teor médio de compostos fenólicos no extrato de chá verde é de 30% em peso seco (ALBUQUERQUE *et al.*, 2016). Os polifenóis presentes no chá verde são apontados como potentes antioxidantes, principalmente as catequinas que possuem a capacidade de doar íons de hidrogênio para inibir a ação de radicais livres, o que justifica sua correlação com a área medicinal (ZARGAR *et al.*, 2018; KERIO *et al.*, 2013). Além disso, as catequinas são conhecidas por suas propriedades antimutagênica, antitumoral e anticarcinogênica (YASMEEN *et al.*, 2015).

A *Camellia sinensis* pode ser utilizada em infusões e decocções na forma não fermentada (chá verde), semi fermentada (chá-branco/chá-vermelho) e fermentada (chá preto) (MORAES-DE-SOUZA *et al.*, 2008). Desta forma, as concentrações de compostos fenólicos e flavonoides nessas três versões podem variar, assim, a quantidade desses compostos bioativos geralmente diminui em função do grau de fermentação, sendo o chá verde correspondente à versão mais abundante em polifenóis (ZAGAR *et al.*, 2018).

Diversas correlações entre o chá verde e a saúde humana são feitas devido à presença de compostos fenólicos nos extratos, infusões e decocções deste vegetal, dentre elas estão as atividades antioxidante, anti-inflamatória, antimicrobiana, além de atuar no aumento da atividade da insulina, na proteção contra doenças cardiovasculares e isquemia cerebral (ZARGAR *et al.*, 2018). Outros estudos apontam o chá verde como um importante agente que auxilia na redução do colesterol, e atua na diminuição de gorduras, inibindo a adipogênese e promovendo a apoptose de adipócitos (ALBUQUERQUE *et al.*, 2016; YASMEEN *et al.*, 2015).

Na Tabela 1 estão apresentadas as principais informações e propriedades dos chás supracitados sobre a saúde humana, além dos compostos fenólicos mais abundantes nestes vegetais.

Tabela 1. Principais compostos fenólicos presentes em alguns dos chás consumidos no Brasil e suas correlações com a saúde.

Nome usual	Nome científico	Família	Principais compostos fenólicos	Principais propriedades/ações	Referência
Camomila	<i>Matricaria chamomilla</i>	<i>Asteraceae</i>	Ác. clorogênico, ác. cafeico, <i>miricetina</i> , quercetina, kaempferol, rutina, apigenina, luteolina e naringenina.	Anti-inflamatória, cicatrizante e calmante.	SRIVASTAVA, 2015; HAGHI, 2014; SINGH, 2011.
Capim-limão	<i>Cymbopogon citratus</i>	<i>Poaceae</i>	Ác. clorogênico, cafeico, <i>p</i> -Cumárico, rosmarínico, ferúlico e quercetina.	Antioxidante, antibacteriano, antifúngico e anti-inflamatório.	RITA, 2018; SILVA, 2017; COELHO, 2016; PORT'S, 2013; GUIMARÃES, 2011; MORAIS, 2009.
Erva-cidreira	<i>Melissa officinalis</i>	<i>Lamiaceae</i>	Apigenina, luteolina, Ác. rosmarínico e ác. cafeico.	Sedativo, calmante antiflatulento e antiespasmódico.	SILVA, 2017; BARROS, 2013.
Erva-doce	<i>Pimpinella anisum</i>	<i>Apiaceae</i>	Ác. <i>p</i> -cumárico, ác. 5-cafeoilquínico, ác. clorogênico, ác. neo-clorogênico, ác. criptoclorogênico, derivados de luteolina e apigenina.	Antioxidante, antiespasmódico, antisséptico, expectorante e antiflatulento.	TAVALLALI, 2018; MARTINS, 2016.
Erva-mate	<i>Ilex paraguariensis</i>	<i>Aquifoliaceae</i>	Derivados do ác. cafeóilo, ác. cafeico quercetina, rutina e o kaempferol.	Hipocolesterolêmico, hepatoprotetora, diurético e antioxidante.	PIOVEZAN-BORGES, 2016; BOJIC, 2013; BLUM-SILVA, 2015.
Hortelã-pimenta	<i>Mentha piperita L.</i>	<i>Lamiaceae</i>	Aeriocitrina, ácido rosmarínico, hesperidina e derivados de luteolina.	Antialérgica, antiviral, antibacterianas, antiflatulento, anti-helmínticos e antienvelhecimento.	ANCUCEANU, 2017; MCKAY, 2006.
Chá verde	<i>Camellia sinensis</i>	<i>Theaceae</i>	Ácidos fenólicos, epigalocatequina galato, epigalocatequina, epicatequina galato, epicatequina, galato de galocatequina, galocatequina e catequina.	Antioxidante, anti-inflamatória, antimicrobiana, antialérgica.	DAS, 2018; ALBUQUERQUE, 2016; YASMEEN, 2015; PINTO, 2013; NEVES, 2010.

3.2 Compostos antioxidantes, fenólicos e a saúde

As reações oxidativas que ocorrem nas células aeróbicas, assim como o próprio processo de respiração, resultam na formação de espécies reativas, como os radicais livres, os quais causam alterações nas estruturas de moléculas livres e nos componentes celulares, prejudicando a funcionalidade do organismo, e contribuindo assim para o surgimento de doenças, tais como, doenças inflamatórias, tumores malignos, mal de Alzheimer e doenças cardiovasculares, bem como aceleram o processo de envelhecimento (SENGER *et al.*, 2010; SILVA *et al.*, 2010).

Espécies reativas de oxigênio são formadas *in vivo* durante o metabolismo aeróbio normal, porém, disfunções na metabolização dessas espécies podem levar a seu acúmulo, e conseqüente desenvolvimento de várias doenças. A ação de radicais livres também pode causar danos oxidativos em moléculas de DNA, desempenhando um papel importante nos processos de mutagênese e carcinogênese (BIANCHI *et al.*, 1999). Vários estudos têm demonstrado que os radicais livres causam danos oxidativos em diferentes moléculas, como lipídios e proteínas (BUTKOVIC *et al.*, 2004; GARCÍA-ALONSO *et al.*, 2004).

Por isso, as células humanas possuem mecanismos antioxidantes para promover a metabolização adequada das espécies reativas e fornecer proteção contra os efeitos prejudiciais dos radicais livres, que são conseqüências inevitáveis da vida aeróbica. Para conseguir uma proteção hábil, os tecidos têm a sua disposição um integrado sistema antioxidante, trata-se de um arranjo de vários componentes hidrofóbicos (como vitamina E; carotenoides), hidrossolúveis (como ácido ascórbico; glutathione) e proteico/enzimáticos (como glutathione peroxidase; superóxido dismutase; catalase) (McLEAN *et al.*, 2005).

Algumas substâncias, chamadas de antioxidantes, são capazes de inibir a ação dos radicais livres, interrompendo a cadeia de propagação das reações oxidativas promovidas por essas espécies. Nos vegetais, os principais antioxidantes são as vitaminas C e E, os carotenoides e os compostos fenólicos, especialmente os flavonoides (CORRÊA *et al.*, 2015; SILVA *et al.*, 2010).

Denomina-se antioxidante qualquer espécie química que tem a capacidade de diminuir ou cessar os danos resultantes de reações oxidativas (como rancificação e formação de *off-flavors* em alimentos). Os antioxidantes podem proporcionar distintas

propriedades protetoras e atuar em várias etapas dos processos de oxidação, trabalhando por diversos mecanismos e são distribuídos em duas categorias: os antioxidantes primários e secundários. Os primários são as substâncias que possuem capacidade de cessar ou diminuir a oxidação por inativação de radicais devido à doação de hidrogênio ou de elétrons, transformando assim os radicais em compostos estáveis. Já os secundários oferecem uma ampla diversidade de maneiras de ação: ligando a cátions metálicos (alteração de valência); inativando espécies reativas de oxigênio, transformando hidroperóxidos em substâncias não-radicalares ou absorvendo radiação UV (MAISUTHISAKUL *et al.*, 2007).

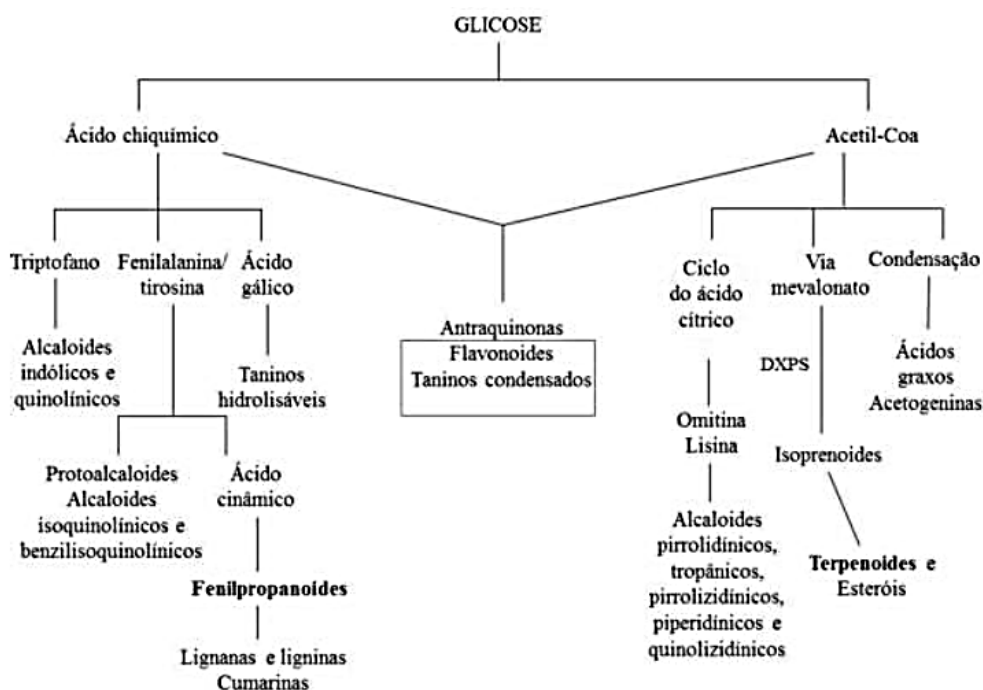
As moléculas orgânicas ou inorgânicas e os átomos que contém um ou mais elétrons não pareados, com existência independente, podem ser classificados como radicais livres. Essa configuração confere aos radicais livres estrutura altamente instável, com meia-vida curtíssima e quimicamente muito reativa. A presença dos radicais é crítica para a manutenção de muitas funções fisiológicas normais. Algumas espécies de radicais livres são: oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$), radical superóxido (O_2^-), radical hidroxila (OH^-), óxido nítrico (NO^\cdot) e peroxinitrito (ONOO^-) (BIANCHI *et al.*, 1999).

Os antioxidantes são capazes de interceptar os radicais livres gerados pelo mecanismo celular ou por fontes exógenas, impedindo o ataque sobre os lipídios, nos aminoácidos das proteínas, na dupla ligação dos ácidos graxos poli-insaturados e nas bases do DNA, evitando a formação de lesões e perda da integridade celular (PODSEDEK *et al.*, 2007).

Os polifenóis ou compostos fenólicos, são produtos do metabolismo secundário de plantas, produzidos durante o crescimento habitual e em condições de estresse, como radiação ultravioleta (UV), infecções e ferimentos (BALASUNDRAM *et al.*, 2006). Essas substâncias atuam como antioxidantes, colaborando na pigmentação, aproximando polinizadores e agindo como protetores contra radiação e patógenos (WROLSTAD *et al.*, 2005). Nos alimentos, os compostos fenólicos podem ser responsáveis pelo sabor amargo, flavor, adstringência, coloração, odor e estabilidade (CASTAÑEDA OVANDO *et al.*, 2009).

Os fenólicos são compostos largamente difundidos na natureza sendo que mais de oito mil polifenóis já foram identificados em plantas. Esse amplo e complexo grupo

integra os constituintes de uma variedade de vegetais, como frutas, hortaliças, e alimentos industrializados (ANGELO *et al.*, 2007).



Fonte: Simões *et al.* (2007).

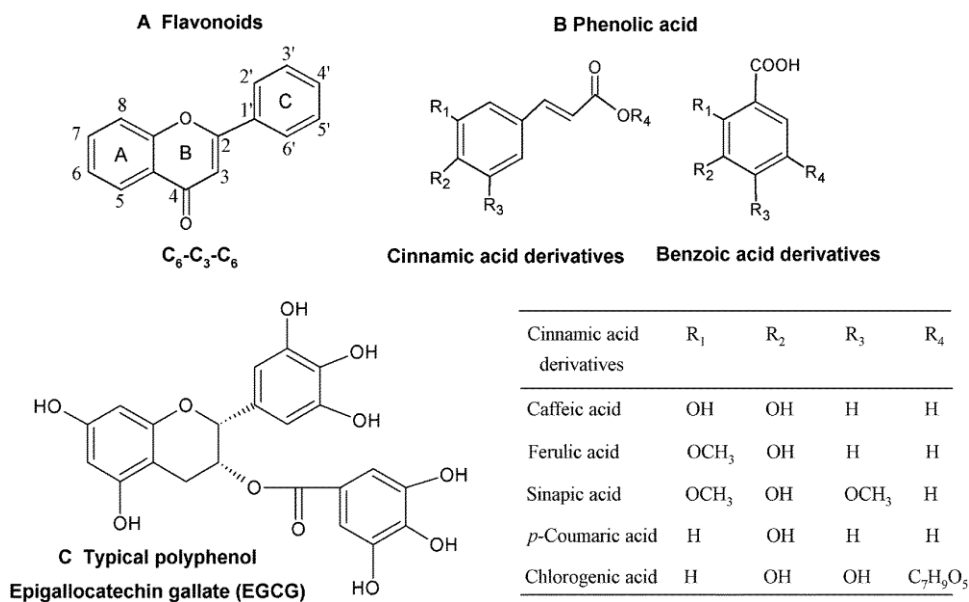
Figura 1. Principais rotas metabólicas de biossíntese de compostos fenólicos.

Os compostos fenólicos são produzidos a partir de duas vias biossintéticas (Figura 1), com possibilidade de simultaneidade entre elas: a via do ácido chiquímico, a partir da eritrose-4-fosfato e fosfoenolpiruvato e a via do ácido mevalônico, pela condensação entre unidades de acetil-CoA e acetoacetil-CoA, sendo assim, uma variedade de estruturas polifenólicas, de origem mista, pode ser sintetizada, desde de ácidos fenólicos de baixa massa molecular até compostos com alto grau de polimerização, como taninos e flavonoides (SIMÕES *et al.*, 2004; ZEIGER *et al.*, 2013).

Os flavonoides constituem o maior grupo de fenólicos de plantas, representando mais da metade dos compostos fenólicos que ocorrem naturalmente (BALASUNDRAM, SUNDRAM e SAMMAN, 2006). Dividem-se em seis classes: antocianinas, flavanonas, flavonas, flavonóis, isoflavonas e flavanóis (ANGELO *et al.*, 2007).

A estrutura dos flavonoides (Figura 2) tem sua base no núcleo que por sua vez consiste de dois anéis fenólicos, denominados respectivamente, A e B, além de um anel

C, podendo ser um pirano heterocíclico, como em flavanóis (catequinas) e antocianidinas, ou pirona, assim como nos flavonóis, flavanonas flavonas e isoflavonas, que possuem um grupamento carbonila na posição C-4 do anel C, abrangendo assim as principais classes dos flavonoides (ANGELO *et al.*, 2007; HUBER e RODRIGUEZ-AMAYA, 2008).



Fonte: Liu *et al.* (2014)

Figura 2. Principais classes de compostos fenólicos e estruturas químicas dos seus derivados, A: flavonoides, B: ácidos fenólicos.

Os flavonoides, em especial as antocianinas e flavonóis, são utilizados pelas plantas atraindo polinizadores, disseminadores de sementes e conferindo pigmentação em sementes, folhas, flores e frutos. Os flavonoides possuem outras funções, como na sinalização entre plantas e micróbios, em alguns vegetais esses compostos podem ainda atuar na fertilidade, na defesa como agentes antimicrobianos e na proteção à radiação ultravioleta (WINKEL-SHIRLEY *et al.*, 2001).

Os flavonoides (exceto as catequinas) são presentes em plantas geralmente na forma glicosilada, ou seja, unidos a monossacarídeos, sendo principalmente o-glicosídeos, com o açúcar ligado ao grupamento hidroxila (OH) na arranjo C3 ou C7 (ANGELO *et al.*, 2007). Os polifenóis despertam interesse devido a investigações epidemiológicas que apontam que uma alimentação rica nestes compostos está relacionada ao baixo risco de complicações cardiovasculares e alguns tipos de câncer.

Afirma-se cientificamente que as propriedades associadas à saúde desempenhada pelos fenólicos, especialmente flavonoides, são fundamentadas principalmente na sua ação antioxidante, agindo como sequestradores de radicais livres e quelantes de íons metálicos que catalisam a peroxidação de lipídeos (ROSSA *et al.*, 2017). Outras formas de ação também são atribuídas aos flavonoides, como diminuição da proliferação celular, ação estrogênica, antibacteriana, antiaterogênica, anticoagulante, anti-inflamatória, antifibrótica e anti-hipertensiva (COELHO *et al.*, 2016; YIN *et al.*, 2015; ZIELINSKI *et al.*, 2014; WILLIANS *et al.*, 2004).

Os ácidos fenólicos também correspondem aos principais compostos que fazem parte do grupo de compostos fenólicos, estando vinculados à formação de compostos derivados e em reações químicas e biológicas nas plantas. Os ácidos fenólicos se caracterizam por possuírem um anel benzênico, com um grupo carboxílico e um ou mais grupos hidroxilas e/ou metoxila na estrutura molecular, conferindo propriedades antioxidantes às plantas (SIMÕES *et al.*, 2007).

Os ácidos fenólicos são divididos em dois grupos, derivados do ácido hidroxibenzóico e derivados do ácido hidroxicinâmico. Os ácidos hidroxibenzóicos incluem os ácidos *p*-hidroxibenzóico, protocatecuico, vanílico, gálico e siríngico, enquanto os ácidos hidroxicinâmicos, são substâncias aromáticas com 3 carbonos que formam uma cadeia lateral (C₆-C₃), como por exemplo, os ácidos *p*-cumárico, cafeico, ferúlico e sinápico (ANGELO *et al.*, 2007).

Embora existam diversos estudos comprovando os benefícios para a saúde por via da ingestão de compostos fenólicos, pouco se sabe sobre a atividade dos seus metabólitos em sistemas biológicos, além disso, as avaliações sobre a eficácia de compostos bioativos, são geralmente realizadas *in vitro*, investigando o “composto-mãe”, mas não os seus metabólitos circulantes. Desta forma, aponta-se a necessidade de novos estudos para compreender a ação desses compostos, assim como os benefícios dos produtos de seu metabolismo no organismo humano (PINTO *et al.*, 2013).

3.3 Biodisponibilidade dos compostos fenólicos no organismo humano

A biodisponibilidade, tratando-se de alimentos é definida como a proporção de uma substância ou nutriente do alimento que é digerida, absorvida e metabolizada (OLIVEIRA *et al.*, 2011).

A avaliação da biodisponibilidade dos polifenóis apresenta como finalidade, determinar biomarcadores, além de substâncias alvo que possam ser empregadas na elucidação das atividades biológicas de alimentos ricos em fenólicos e seus possíveis mecanismos de ação (ZAMORA-ROS *et al.*, 2012).

Alguns fatores afetam a biodisponibilidade de compostos bioativos em alimentos, incluindo os chás, tal como a complexidade da matriz alimentícia, a forma química do composto de interesse, estrutura e quantidade de outros compostos ingeridos concomitantemente e ainda o tempo de trânsito intestinal, esvaziamento gástrico, metabolismo do composto e grau de conjugação, possíveis interações com proteínas na circulação sanguínea e tecidos, composição da microbiota intestinal e o perfil gástrico do indivíduo. Estes fatores quando associados, interferem na biodisponibilidade de uma determinada substância (HOLST *et al.*, 2008; CROZIER *et al.*, 2009; SCHOLZ *et al.*, 2007).

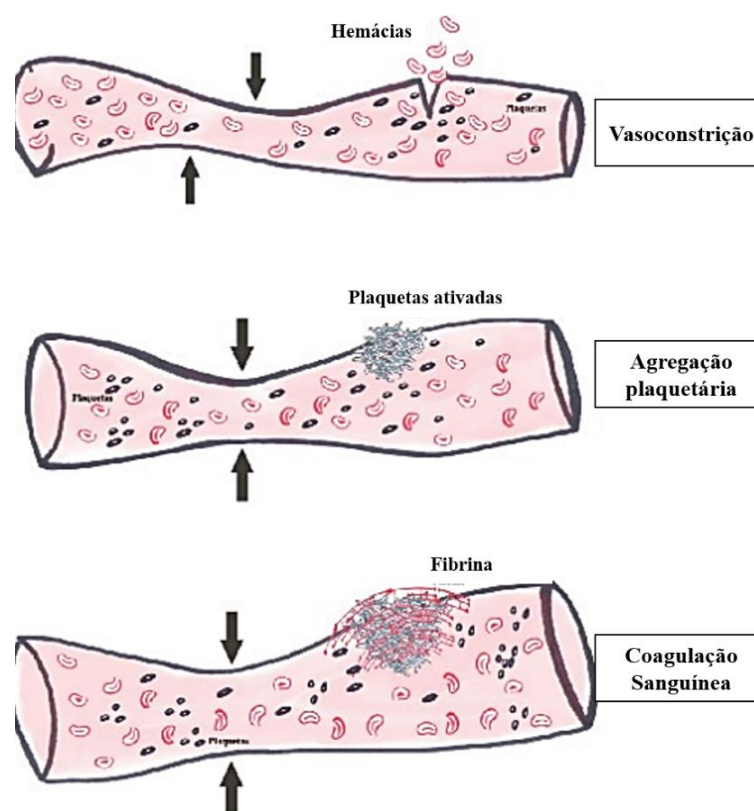
Os polifenóis formam complexos estáveis com ferro dietético não-heme e limitam sua absorção no intestino (GIADA *et al.*, 2006). Para grupos populacionais mais suscetíveis ao desenvolvimento de deficiência de ferro (recém-nascidos, crianças e mulheres grávidas) é aconselhável evitar o consumo elevado de bebidas ricas em polifenóis, como chá ou café, junto com alimentos fonte de ferro. Em contrapartida, para pessoas com sobrecarga de ferro no organismo, é indicado o consumo de bebidas ou suplementos ricos em polifenóis como uma estratégia para reduzir a absorção de ferro (SCORSATTO *et al.*, 2017; SCALBERT *et al.*, 2002).

Na biodisponibilidade dos compostos fenólicos, os efeitos da matriz alimentar ainda não foram estudados detalhadamente, no entanto, sabe-se que interações diretas entre esses compostos e alguns componentes dos alimentos, como ligações com proteínas e polissacarídeos, podem interferir na absorção (COZZOLINO, 2012).

3.4 Hemostasia

A hemostasia, trata-se de um complexo e eficiente mecanismo, de natureza fisiológica de defesa contra a perda descontrolada de sangue. A partir das propriedades não trombogênicas dos vasos, a normalidade da fluidez do sangue é mantida. A injúria aos vasos resulta numa imediata resposta hemostática que previne a hemorragia (BERGER *et al.*, 2014).

O sistema hemostático é resultado de um conjunto de processos regulados criteriosamente e com elevada eficiência, isto inclui a parede vascular, as estruturas e os agentes vasoativos associados a vasoconstrição e a vasodilatação, os fatores que acarretam a adesão e a agregação das plaquetas, compondo o tampão hemostático, e a ativação dos fatores da cascata de coagulação, levando a produção de redes de fibrina (Figura 3). Subsequentemente, os coágulos são decompostos pelo sistema fibrinolítico, durante a regeneração total do tecido danificado. Em circunstância em que qualquer membro desses mecanismos esteja modificado, a hemostasia é afetada e o resultado pode ser tanto trombose como hemorragia (DAVIE *et al.*, 1991; DAHLBÄCK *et al.*, 2000).



Adaptado da fonte: Berger *et al.*, 2014

Figura 3. Representação simplificada das etapas da hemostasia.

3.5 Processos Inflamatórios

Diversas patologias estão associadas ao processo inflamatório, tais como contusões, tendinites, infecções respiratórias, asma e doenças autoimunes. Seu objetivo é conter a

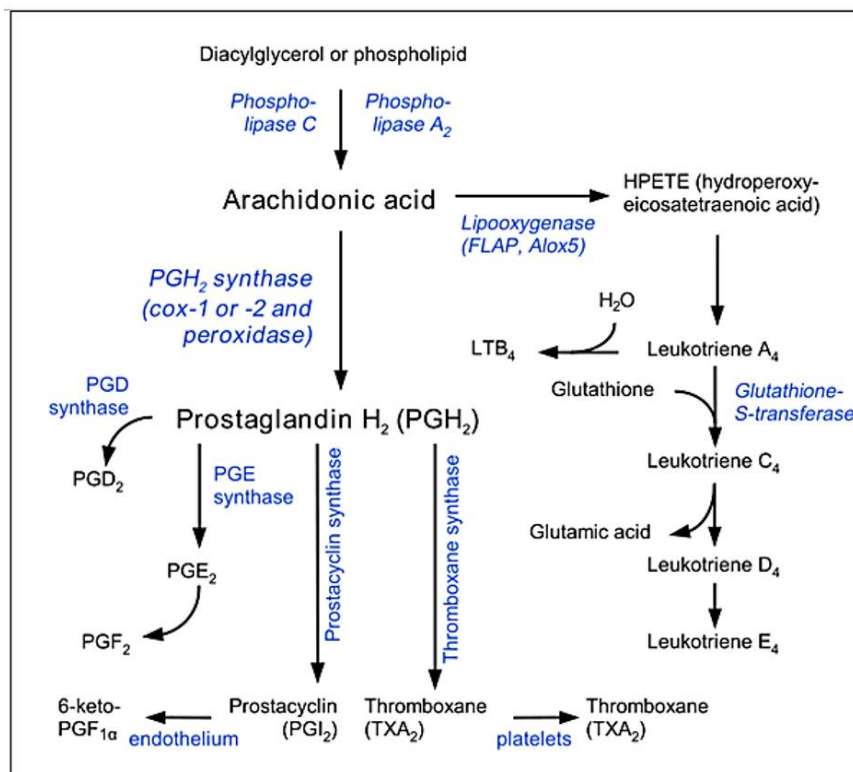
causa primária da lesão celular, causada por microrganismos ou agentes físicos, desta forma, os processos inflamatórios apresentam-se como um mecanismo de defesa do organismo (COUTINHO *et al.*, 2009).

Sobre os aspectos macroscópicos, a região inflamada torna-se avermelhada, edemaciada, aquecida e dolorosa, podendo haver interferência ou modificação da sua função. Por fim, o resultado do processo inflamatório é a cura ou a inflamação crônica – caso a resposta não seja suficiente, o micro-organismo ou o composto nocivo persistirem e o processo evoluir (DAHLBÄCK *et al.*, 2000; ABBAS *et al.*, 2008).

Inicialmente, a resposta inflamatória não é específica, independentemente do tipo da injúria. Os eventos que sucedem essa reação, são dependentes de fatores relacionados ao agente danoso ao próprio tecido danificado. As reações inatas ocorrem no interior dos tecidos, dividindo-se em eventos vasculares e celulares. Os vasculares são caracterizados por modificações no calibre do vaso, que resultam em aumento no fluxo de sangue e por variações na permeabilidade vascular, culmina no extravasamento de exsudato para o interstício, seguido da formação de edema (ABBAS *et al.*, 2008).

Os responsáveis pela vasodilatação e pelo aumento da permeabilidade vascular são os mediadores, formados a partir do plasma e células. Esses mediadores podem agir de forma isolada, conjunta ou em sequência, de modo a ampliar a resposta inflamatória e alterar sua evolução. Em relação aos eventos celulares, as células associadas à inflamação estão contidas no tecido (por exemplo, células endoteliais e macrófagos) ou podem ter acesso a região afetada através da circulação (como plaquetas e leucócitos) (ABBAS *et al.*, 2008).

A exposição celular aos microrganismos patógenos e o dano tecidual resulta na formação e na liberação de diferentes mediadores químicos que caracterizam a área inflamada (Figura 4). Dentre esses encontram-se a histamina, metabólitos do ácido araquidônico (prostaglandinas, tromboxanos e leucotrienos), fator de ativação plaquetária, bradicinina, óxido nítrico, neuropeptídeos e citocinas (BOTTING *et al.*, 2006; LÓPEZ-POSADAS *et al.*, 2008).



Fonte: Devlin, 2005.

Figura 4. Esquema da cascata do ácido araquidônico (cascata de inflamação).

A partir de estímulos mecânicos, químicos, físicos ou por outros mediadores, os fosfolípidos das membranas celulares liberam o ácido araquidônico, através da ativação de enzimas fosfolipases A_2 . Duas classes de enzimas podem metabolizar o ácido araquidônico livre, são elas: as ciclo-oxigenases (COX 1 e 2), dando início a biossíntese de prostaglandinas e tromboxanos e as lipoxigenases (LOX), iniciando a biossíntese de leucotrienos (LT) (BOTTING *et al.*, 2006; LÓPEZ-POSADAS *et al.*, 2008).

Produzido pelas células endoteliais do tecido lesionado, o óxido nítrico (NO) possui uma forte ação vasodilatadora, gerando um aumento da permeabilidade vascular. Além disso, pode agir como regulador do recrutamento de leucócitos e desempenha uma ação citotóxica contra microorganismos. O NO é produzido pela NO sintase (NOS), enzima que se apresenta em três isoformas, sendo a forma induzível (iNOS) a isoforma participante nas reações inflamatórias (SAUTEBIN *et al.*, 2000).

No decorrer das reações imunes e inflamatórias, as citocinas são liberadas de modo a regular a ação das células que compõem o sistema. Em destaque estão as citocinas pró-inflamatórias TNF- α (Fator de Necrose Tumoral α) e IL-1 (Interleucina-1). Estas

citocinas atuam favorecendo a aderência leucocitária ao endotélio, aumentando a produção de prostaciclina e desencadeando uma cascata de citocinas secundárias (por exemplo, as quimiocinas) que agem atraindo e ativando as células inflamatórias móveis (LÓPEZ-POSADAS *et al.*, 2008).

3.6 Moduladores enzimáticos de origem vegetal

O desenvolvimento da química de produtos naturais de origem vegetal, através da interação com a farmacologia, é decorrente do trabalho de diversos grupos de pesquisa. O surgimento de novos alvos terapêuticos para o processo de inflamação, assim como os trabalhos de modelagem molecular, correlacionando a estrutura com a atividade, apresentam-se como ferramentas fundamentais na descoberta e avaliação de novos compostos (COUTINHO *et al.*, 2009).

Na investigação da ação anti-inflamatória de compostos fenólicos, são realizados métodos *in vitro* e *in vivo*. Os ensaios *in vitro* são feitos em cultura de células e visam verificar a capacidade do polifenol em reduzir ou até mesmo inibir a formação de mediadores, a síntese de enzimas e citocinas relacionadas, a proliferação de linfócitos, etc. Os ensaios *in vivo* empregam agentes que induzem a inflamação no animal (por exemplo: carragenina, PMA – Acetato de Miristato de Forbol, e TPA - 12-Otetradecanoilforbol-13-acetato), objetivando avaliar se o composto fenólico tem capacidade de inibição ou redução na formação de edemas, na migração de células responsáveis pela defesa, na produção de mediadores e enzimas (COUTINHO *et al.*, 2009; CHEN *et al.*, 2018).

Os flavonoides, como os flavonóis quercetina e kaempferol são relatados como distribuídos amplamente pelo reino vegetal e apresentam forte ação anti-inflamatória, atribuída à inibição das enzimas fosfolipases A₂ (PLA₂), lipoxigenase, cicloxigenase e inibição da síntese de óxido nítrico através da modulação da enzima iNOS e da produção de citocinas pró-inflamatórias (por exemplo, TNF- α e IL-1) (KIM *et al.*, 2004).

Compostos bioativos oriundos de alimentos, têm sido empregados para modular a inflamação crônica e prevenir o início do câncer através da regulação dos mecanismos anti/pró-inflamatórios. Dentre eles estão (-) - epigallocatequina-3-galato, curcumina, resveratrol, genisteína, luteolina, quercetina, que possuem algum grau de inibição de mediadores pró-inflamatórios como TNF- α , IL-6, COX-2, iNOS, fator nuclear kappa B

(NF- κ B) e promovem mediadores anti-inflamatórios incluindo fator de crescimento transformador beta (TGF- β), IL-10, receptor ativado por proliferador de peroxissoma gama (PPAR- γ), glutationa e catalase (KIM *et al.*, 2019).

Trabalhos relacionando a estrutura do flavonoide com sua atividade biológica são fundamentais no processo de obtenção de novos agentes com ação anti-inflamatória. Estes estudos visam determinar as funções orgânicas responsáveis pela efeito farmacológico e compreender como ocorre a interação do polifenol com o receptor, de modo a poder aperfeiçoar o composto original no que se refere à sua atividade (COUTINHO *et al.*, 2009). Dentre os fatores estruturais de relevância para a ação anti-inflamatória de flavonoides, encontram-se: a instauração no anel C (na posição 2-3), a numeração e posicionamento dos grupamentos hidroxilas e a não glicosilação molecular. No entanto, mesmo sem possuir esses padrões, subclasses de flavonoides também se destacam por sua ação sobre enzimas da cascata de inflamação, como por exemplo a aglicona kaempferol (LÄTTIG *et al.*, 2007).

As interações entre os polifenóis e as proteínas podem acarretar mudanças em algumas propriedades físico-químicas das macromoléculas, como: estabilidade térmica, solubilidade e digestibilidade. Através da ligação do composto fenólico com a porção lateral da cadeia proteica em pH >7, ocorre a liberação de hidrogênios que se ligam à proteína gerando, por exemplo, pontes cruzadas de hidrogênio, de modo a alterar a atividade de algumas enzimas (OZDAL *et al.*, 2013). Além disso, compostos fenólicos, como os taninos, podem precipitar proteínas e formar complexos insolúveis com diversos íons metálicos (agindo como quelante), fundamentais para a atividade catalítica das enzimas, minimizando assim seu potencial catalítico (QUILES *et al.*, 2002).

Estudos que investigaram interações entre compostos vegetais e toxinas por simulação apontam a provável ligação destes inibidores aos sítios catalíticos de enzimas. Foi observado por Cavalcante *et al.* (2007) uma diminuição de 40% na atividade enzimática da PLA₂ da peçonha de *Crotalus durissus terrificus*, sendo essa redução associada à ligação da quercetina, no sítio catalítico da PLA₂, próxima ao resíduo de Histidina da posição 48 (His48) (CAVALCANTE *et al.*, 2007). Através da utilização de polifenóis isolados (polihidroxi benzenos e polihidroxi acetofenonas), Silva e Fernandes Júnior (2010) conseguiram reduzir a atividade enzimática de PLA₂s contidas na peçonha de *Crotalus adamanteus*. Os autores ainda observaram no estudo, por meio de análises computacionais que os compostos fenólicos se ligavam ao aminoácido Asp49,

desestabilizando a coordenação certa do íon Ca^{2+} no sítio catalítico, culminando na diminuição da atividade enzimática.

3.7 Peçonhas de serpentes como ferramentas laboratoriais: composição e principais classes de enzimas.

As peçonhas de serpentes possuem uma complexidade distinta quando comparadas às peçonhas de outros animais, como aranhas e escorpiões (ZELANIS e TASHIMA, 2014). Peçonhas de serpentes consistem em uma matriz mais diversificada de proteínas e peptídeos de maior peso, o que resulta em uma grande variedade de efeitos farmacológicos e toxicológicos (ZHANG *et al.*, 2015). As peçonhas de *Bothrops* e *Crotalus* são constituídas de misturas complexas de enzimas, peptídeos, lipídeos, nucleotídeos, proteínas não enzimáticas e outros íons (KINI *et al.*, 2006).

As famílias de enzimas dominantes nessas peçonhas são: fosfolipases A_2 (PLA_2s), metaloproteases (SVMP) e serinoproteases (SVSP), além de peptídeos de três dígitos (3FTX), enquanto as famílias secundárias compreendem proteínas secretoras ricas em cisteína, L-aminoácido oxidases, desintegrinas e peptídeos natriuréticos (SLAGBOOM *et al.*, 2017; TASOULIS e ISBISTER, 2017; MUNAWAR *et al.*, 2018).

A diversidade das isoformas de PLA_2s (EC 3.1.1.4) encontradas na peçonha de diferentes serpentes reflete uma variedade de fatores, incluindo a história evolutiva, dieta, filogeografia e condições ambientais relacionadas a uma espécie ou população dentro de uma espécie (ZANCOLLI *et al.*, 2019)

As enzimas da família das fosfolipases A_2 (PLA_2s) são estáveis, com massa molecular relativamente pequena (~14 kDa), dependentes de cálcio (Ca^{2+}) e ricas em interações dissulfeto, que catalisam a hidrólise de ligações éster de fosfoglicerídeos, formando ácidos graxos, especialmente ácido araquidônico e lisofosfolipídeos (YARLA *et al.*, 2015). O ácido araquidônico é um precursor de moléculas envolvidas em processos inflamatórios, como prostaglandinas, leucotrienos e tromboxanos (CARVALHO *et al.*, 2013). As principais vias enzimáticas na conversão do ácido araquidônico em lipídeos bioativos são: cicloxigenase (COX) e lipoxigenase (LOX) (REDDY *et al.*, 2015).

As PLA_2s de peçonhas de serpentes têm sido avaliadas não somente por apresentar uma variedade de efeitos biológicos, comumente responsáveis por danos musculares,

entre outras funções tóxicas e digestivas importantes na captura e imobilização de presas, mas também por sua acessibilidade, purificação facilitada e semelhança com as fosfolipases de mamíferos, como as PLA₂s humanas (MARCUSSE *et al.*, 2013; SCHALOSKE *et al.*, 2006).

Entre as proteases destacam-se as serinoproteases (EC 3.4.21) que agem seletivamente sobre fatores da cascata de coagulação, com ação na agregação plaquetária, fibrinólise e coagulação, e as metaloproteases (EC 3.4.17), enzimas dependentes de zinco (Zn²⁺) responsáveis por hemorragias, mionecrose e danos teciduais colaborando para o perda de função ou amputação do membro e inflamação local (GUTIÉRREZ *et al.*, 2010; OLIVEIRA *et al.*, 2016).

As serinoproteases e metaloproteases possuem um perfil farmacológico diversificado, o que inclui ações sobre as proteínas da cascata de coagulação, tais como a atividade do tipo trombina sobre o fibrinogênio, a ativação do fator V e da proteína C, a fibrinogénólise, a ativação do plasminogênio e a indução da agregação plaquetária. As serinoproteases são geralmente conhecidas como ‘trombina-like’ por atuarem diretamente na conversão do fibrinogênio plasmático em fibrina, sem o envolvimento da trombina endógena (MARKLAND *et al.*, 1998; SERRANO *et al.*, 2005).

Os Compostos fenólicos são capazes de interagir com as regiões hidrofóbicas presentes nas estruturas de proteases e PLA₂, modulando sua atividade enzimática, visto que as regiões hidrofóbicas dessas enzimas são responsáveis por seu acoplamento com as estruturas celulares (ALVES *et al.*, 2008; CISCOTTO *et al.*, 2009; GUO *et al.*, 2012; IZIDORO *et al.*, 2014; NAUMANN *et al.*, 2011). Além disso, flavonoides podem atuar como agentes quelantes de íons bivalentes, como o Ca²⁺ e Zn²⁺, tornando-os indisponíveis para se ligar às enzimas para as quais agem como cofatores, respectivamente PLA₂s e metaloproteases, podendo em alguns casos reduzir efeitos tóxicos, como por exemplo, a genotoxicidade induzida por essas enzimas (DIAZ *et al.*, 2005; BRENES *et al.*, 2010).

Compostos fenólicos são apontados como inibidores de metaloproteases e PLA₂s, indicando a provável ligação dos polifenóis aos sítios catalíticos das enzimas, além de outros mecanismos inibidores já relatados (CAVALCANTE *et al.* (2007).

Nesse contexto, as peçonhas de serpentes e suas toxinas isoladas configuram ferramentas valiosas para estudos bioquímicos/ fisiológicos/ farmacológicos/ toxicológicos, assim como para a caracterização de moléculas que atuam sobre células ou

moléculas humanas, modulando diversos processos no organismo. Uma diversidade de funções biológicas exercidas por toxinas de peçonhas de serpentes ainda é passível de exploração, incluindo suas propriedades inflamatórias e suas interações com neurônios sensoriais e outros compartimentos do sistema nervoso, levando assim à elucidação de novas funções biológicas e ao desenvolvimento de ferramentas de pesquisa (FERRAZ *et al.* 2019).

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Incontáveis são as correlações entre o uso de chá e benefícios a saúde humana, tanto advindas do conhecimento tradicional popular quanto pelas comprovações científicas, assim, destaca-se a relevância de promover continuidade à tradição de seu consumo bem como direcionam para a ampliação das possibilidades de uso, considerando o desenvolvimento de novas formulações e/ou produtos, como por exemplo, nutracêuticos e cosméticos. Infusões de ervas são apontadas como alimentos nutracêuticos, sendo assim, o consumo de chás e seus derivados, mostra-se de grande importância para a prevenção e tratamento de diversas doenças, uma vez que os chás apresentam rica composição fenólica, sendo farmacologicamente ativos que promovem a manutenção dos processos fisiológicos em humanos, promovendo sua saúde e qualidade de vida.

REFERÊNCIAS

- ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. (Trad. Farias, A. S.); **Imunologia Celular e Molecular**, 6^a ed., Elsevier: Rio de Janeiro, 2008.
- ACHKAR, M. T.; NOVAES, G. M.; SILVA, M. J. D.; VILEGAS, W. Propriedade antioxidante de compostos fenólicos: importância na dieta e na conservação de alimentos. **Revista da Universidade Vale do Rio Verde**, Três Corações, v. 11, n. 2, p. 398-406, ago./dez. 2013.
- ALBUQUERQUE, K.; MARINOVIC, M.P.; MORANDI, A. C.; BOLIN A. P.; OTTON, R.. Green tea polyphenol extract in vivo attenuates inflammatory features of neutrophils from obese rats. **European Journal of Nutrition**, 55, 1261-1274, 2016.
- ALVES, R. M. *et al.* Evidence of caspase-mediated apoptosis induced by L-amino acid oxidase isolated from *Bothrops atrox* snake venom. **Comparative Biochemistry and Physiology a-Molecular & Integrative Physiology**, Ribeirão Preto, v. 151, n. 4, p. 542-550, Dec 2008.
- ANCUCEANU, R.; HOVANET, M. V.; ANGHEL, DINU, M.; DUNE, A.; CIOLEA, M.; OLARU O. T.; POPESCU C.;. Variation of polyphenols and iron concentration in *Mentha x Piperita L.* By development stage and soil type. **Farmacia**, 65, 748-754, 2017.
- ANGELO, P. M.; JORGE, N. Compostos fenólicos em alimentos - uma breve revisão. **Rev. Inst. Adolfo Lutz (Impr.)**; vol.66, n.1, pp. 01-09. ISSN 0073-9855, 2007.
- ANIL U. T.; AJAY K. S. Further studies on membrane stabilizing, anti-inflammatory and FCA induced arthritic activity of various fractions of bark of *Machilus macrantha* in rats. **Rev. bras. farmacogn.** vol.21 no.6 Curitiba Nov./Dec. 2011 Epub Aug 26, 2011.
- BALASUNDRAM, N.; SUNDRAM, K.; SAMMAN,S. Phenolic compounds in plants and agri-industrial byproducts: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. **Food Chemistry**, v. 99, p. 191 – 203, 2006.
- BARBOSA, D. S. Green tea polyphenolic compounds and human health. **Journal of Consumer Protection and Food Safety**, 2, 407-413, 2007.
- BARROS, L.; DUENAS, M.; DIAS, M. I.; SOUSA, M. J.; SANTOS-BUELGA C.; & FERREIRA I. Phenolic profiles of cultivated, in vitro cultured and commercial samples of *Melissa officinalis L.* infusions. **Food Chemistry**, 136, 1-8, 2013.
- BERGER, M.; Hemostasia: Uma Breve Revisão. **Caderno pedagógico**, Lajeado, v. 11,n. 1, p. 140-148, 2014.
- BIANCHI, M. L. P.; ANTUNES, L. M. Radicais livres e os princípios antioxidantes da dieta. **Revista de Nutrição, Campinas**, v. 12, n. 2, p. 123-130, 1999.

BLUM-SILVA, C. H.; CHAVES, V. C.; SCHENKEL, E. P.; COELHO G. C.; REGINATTO F. H. The influence of leaf age on methylxanthines, total phenolic content, and free radical scavenging capacity of *Ilex paraguariensis* aqueous extracts. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, 25, 1-6, 2015.

BOAVENTURA, B. C. B.; AMBONI, DA SILVA, R.; E. L.; PRUDENCIO, E. S.; DI PIETRO, P. F.; MALTA, L. G.; POLINATI R. M.; LIU, R. H.. Effect of in vitro digestion of yerba mate (*Ilex paraguariensis*) extract on the cellular antioxidant activity, antiproliferative activity and cytotoxicity toward HepG2 cells. **Food Research International**, 77, 257-263, 2015.

BOJIC, M.; HAAS, V. S.; SARIC D.; MALES Z. Determination of Flavonoids, Phenolic Acids, and Xanthines in Mate Tea (*Ilex paraguariensis*). **Journal of Analytical Methods in Chemistry**, 2013.

BOTTING, R. M. Cyclooxygenase: past, present and future a tribute to John R. Vane (1927-2004). **Journal of Thermal Biology**. v. 34, 208-219, 2006.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria Nacional de Defesa Agropecuária. Laboratório Nacional de Referência Animal. Padrões de Identidade e Qualidade (PIQ) para as Bebidas Não Alcoólicas. **Diário Oficial da União (DOU)**, 2013.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Aprova o regulamento técnico para café, cevada, chá, erva-mate e produtos solúveis. **Resolução de Diretoria Colegiada (RDC) nº. 277**, de 22 de setembro de 2005.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 267, de 22 de setembro de 2005. Regulamento Técnico de Espécies Vegetais para o Preparo de Chás. **Diário Oficial da União**. Brasília, DF, 23 ago.2005.

BRAUD S: Snake venom proteins acting on hemostasis. **Biochimie.**; 82:851–859, 2000.

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

BUTKOVIC, V.; KLASINC, L.; BORS, W. Kinetic Study of Flavanoid Reactions with Stable Radicals. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, London, v. 52, p. 2816-2820, 2004.

CAMARGO, A. C.; REGITANO-D'ARCE, M. A. B.; RASERA, G. B.; CANNIATTI-BRAZACA, S. G.; DO PRADO-SILVA, L.; ALVARENGA, V. O.; SANT'ANA A. S.; SHAHIDI F.; Phenolic acids and flavonoids of peanut by-products: Antioxidant capacity and antimicrobial effects. **Food Chemistry**, 237, 538-544, 2017.

CARVALHO, B. M. A. *et al.* Snake venom PLA2s inhibitors isolated from brazilian plants: synthetic and natural molecules. **BioMed Research International**, London, v. 2013, p. 1-8, 2013.

CASTAÑEDA-OVANDO, C.A.; PACHECO-HERNÁNDEZ, M.L.; PÁEZ-HERNÁNDEZ, M.E.; RODRÍGUEZ, J.A.; GALÁN-VIDAL, C.A. Chemical studies of anthocyanins: A review. **Food Chemistry**, v.113, p.859-871, 2009.

CAVALCANTE, W. L. G. *et al.* Neutralization of snake venom phospholipase A2 toxins by aqueous extract of *Casearia sylvestris* (*Flacourtiaceae*) in mouse neuromuscular preparation. **Journal of ethnopharmacology**, v. 112, n. 3, p. 490–7, 25 jul. 2007.

CHEN, L.; DENG, H.; CUI, H.; FANG, J.; ZUO, Z.; DENG, J.; ZHAO, L. Inflammatory responses and inflammation-associated diseases in organs. **Oncotarget**, 9(6), 7204, 2018.

CINTRA A.C.O.; DE TONI L.G.B.; SARTIM M.A.; FRANCO J.J.; CAETANO R.C.; MURAKAMI M.T.; SAMPAIO S. V. Batroxase, a new metalloproteinase from *B. atrox* snake venom with strong fibrinolytic activity. **Toxicon**, 60:70–82, 2012.

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

COELHO, M.; ROCHA, C.; CUNHA, L. M.; CARDOSO, L.; ALVES, L.; LIMA, R. C.; PEREIRA, M. J.; CAMPOS P. M.; PINTADO M.; Influence of harvesting factors on sensory attributes and phenolic and aroma compounds composition of *Cymbopogon citratus* leaves infusions. **Food Research International**, 89, 1029-1037, 2016.

CORREA, V. G.; TURECK, C.; LOCATELI, G.; PERALTA M.; KOEHNLEIN E. A. Estimate of consumption of phenolic compounds by Brazilian population. **Revista De Nutricao-Brazilian Journal of Nutrition**, 28, 185-196, 2015.

COSTA, G.; GRANGEIA, H.; FIGUEIRINHA, A.; FIGUEIREDO, I. V.; BATISTA, M. T.; Influence of harvest date and material quality on polyphenolic content and antioxidant activity of *Cymbopogon citratus* infusion. **Industrial Crops and Products**, 83, 738-745, 2016.

COUTINHO, M.A.S.; MUZITANO, M.F.; COSTA S.S. Flavonoids: potential therapeutic agents for the inflammatory process. *Revista Virtual de Química*; 1:241-256, 2009.

COZZOLINO, S. M. F. Biodisponibilidade de Nutrientes (4ª edição), **Manole** (Barueri - SP-Brasil), 4, 879-914, 2012.

CROZIER, A.; JAGANATH, I. B.; CLIFFORD, M. N. Dietary phenolics: chemistry, bioavailability and effects on health. **Nat. Prod.** 26, 1001, 2009.

DAHLBACK, B. Blood coagulation. **Lancet**, v. 355, p. 1627-1632, 2000.

DAS, P. R.; J. B. Eun. A comparative study of ultra-sonication and agitation extraction techniques on bioactive metabolites of green tea extract. **Food Chemistry**, 253, 22-29, 2018.

DAVIE, E.W.; FUJIKAWA, K.; KISIEL, W. The coagulation cascade: initiation, maintenance and regulation. **Biochemistry**, v. 30, n. 43, p. 10363-10370, 1991.

DEVLIN, T. *et al.* Textbook of Biochemistry with clinical correlations. **Wiley-Liss**, 6^a edição, 2005.

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

DORMAN, H. J. D.; KOSAR, M.; BASER K. H. C.; HILTUNEN R. Phenolic Profile and Antioxidant Evaluation of *Mentha x piperita L.*, (*Peppermint*) Extracts. **Natural Product Communications**, 4, 535-542, 2009.

FERRAZ *et al.* Multifunctional Toxins in Snake Venoms and Therapeutic Implications: From Pain to Hemorrhage and Necrosis. REVIEW. **Frontiers in Ecology and Evolution**. 19 June 2019.

FIGUEIROA, M. S.; CESAR, J. S. B.; LEITE, D. S.; ANDRADE, R. C. O.; FERREIRA, F.; GOUVEIA, P. S.; UDRISAR D. P.; WANDERLEY M. I. Green tea polyphenols inhibit testosterone production in rat Leydig cells. **Asian Journal of Andrology**, 11, 362-370, 2009.

GARCIA D. M.E.; ACOSTA O.C.; HUANCAHUIRE-VEGA S.; MARTINS-DE-SOUZA D.; MARANGONI S.; MARUÑAK S.L.; TEIBLER G.P.; LEIVA L.C.; PONCE-SOTO L.A. Isolation and functional characterization of a new acidic PLA2 Ba SpII RP4 of the *Bothrops alternatus* snake venom from Argentina. **Toxicon**, 56:64–74, 2010.

GARCÍA-ALONSO, M.; PASCUAL-TERESA, T.; SANTOS-BUELGA, C.; RIVAS-GONZALO, J. C. Evaluation of the antioxidant properties of fruits. **Food Chem.**, v. 84, p. 13-18, 2004.

GIADA, M. L. R.; MANCINI, F. J. Importância dos compostos fenólicos da dieta na promoção da saúde humana. **Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 12, n. 4, p. 7-15, 2006.

GUIMARÃES, L. G. L.; CARDOSO, M. G.; SOUSA, P. E.; ANDRADE, J.; VIEIRA, S. S. Atividades antioxidante e fungitóxica do óleo essencial de capim-limão e do citral. **Revista Ciência Agrônômica**, v. 42, n. 2, p. 464-472, abr-jun, 2011.

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

GUTIÉRREZ, J.; 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.

GUTIÉRREZ J.M.; WILLIAMS D.; FAN H.W.; WARRELL D.A. Snakebite envenoming from a global perspective: Towards an integrated approach. **Toxicon**, 56:1223–35, 2010.

GUTIÉRREZ, J. M. *et al.* Tissue pathology induced by snake venoms: how to understand a complex pattern of alterations from a systems biology perspective? **Toxicon**, Elmsford, v. 55, n.1, p. 166–70, Jan. 2010.

HAGHI, G.; HATAMI, A.; SAFAEI, A.; MEHRAN, M. Analysis of phenolic compounds in *Matricaria chamomilla* and its extracts by UPLC-UV. **Research in Pharmaceutical Sciences**; 9(1): 31–37, 2014.

HOLST, B.; WILLIAMSON, G. Nutrients and phytochemicals: from bioavailability to bioefficiency beyond antioxidants. **Curr. Opin. in Biotechnol.** 19, 73, 2008.

HUBER, L.S.; RODRIGUEZ-AMAYA, D.B. Flavonóis e flavonas: fontes brasileiras e fatores que influenciam, a composição de alimentos. **Alimentos e Nutrição**, Campinas, v.19, n.1, p.97-108, 2008.l., 21, 473, 2007.

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

KASTURIRATNE, A.; WICKREMASINGHE, A.R.; DE SILVA, N.; GUNAWARDENA, N.K.; PATHMESWARAN, A.; PREMARATNA, R.; SAVIOLI, L.; LALLOO, D.G.; DE SILVA, H.J. The Global Burden of Snakebite: A Literature Analysis and Modelling Based on Regional Estimates of Envenoming and Deaths. **PLoS Med**, 5:e218, 2008.

KERIO, L. C.; WACHIRA, F. N.; WANYOKO, J. K.; ROTICH, M. K. Total polyphenols, catechin profiles and antioxidant activity of tea products from purple leaf coloured tea cultivars. **Food Chemistry**, 136, 1405-1413, 2013.

KIM, H. P.; SON, K. H.; CHANG, H. W.; KANG, S. S. J. Anti-inflammatory Plant Flavonoids and Cellular Action Mechanisms. **Pharmacol. Sci.** 96, 229, 2004.

KIM, YS *et al.* Componentes alimentares bioativos, alvos inflamatórios e prevenção do câncer. **Cancer Prevention Research**, pp. 200 – 208, 2019.

KINI, R. M. Anticoagulant proteins from snake venoms: structure, function and mechanism. **The Biochemical journal**, v. 397, n. 3, p. 377–87, 1 ago. 2006.

KUMAR, K. R.; VENNILA, R.; KANCHANA, S.; ARUMUGAM, M. E BALASUBRAMANIAM, T. Fibrinolytic and anticoagulant activities in the tissue covering the stingers of marine stingrays *Dasyatis sephen* and *Aetobatis narinari*. **Journal of Thrombosis and Thrombolysis**, v. 31, n. 4, p 464-471, 2011.

LAEMMLI UK: Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. **Nature**, 227:680–685, 1970.

LÄTTIG J.; BÖHL M.; FISCHER P.; TISCHER S.; TIETBÖHL C.; MENSCHIKOWSKI M.; GUTZEIT H.O.; METZ P.; PISABARRO M.T. Mechanism of inhibition of human secretory phospholipase A2 by flavonoids: rationale for lead design. **J Comput Aided Mol Des** 21: 473-483, 2007.

LIU, L.; JIN, C. AND ZHANG, Y. Lipophilic phenolic compounds (Lipo-PCs): emerging antioxidants applied in lipid systems. **Rsc Advances**, 4(6), 2879-2891, 2014.

LIU, L.Y.; JIN, C.; ZHANG, Y. Lipophilic phenolic compounds (Lipo-PCS): emerging antioxidants applied in lipid systems. **Food Chem.** 53, 2441e2445.2014, 2017.

LIU, Y.; LUO, X. L.; LAN, Z. Q.; TANG, J. R.; ZHAO, P.; KAN, H. Ultrasonic-assisted extraction and antioxidant capacities of flavonoids from *Camellia fascicularis* leaves. **Cyta-Journal of Food**, 16, 105-112, 2018.

LOPEZ-POSADAS R.; BALLESTER I.; ABADIA-MOLINA A.C.; SUAREZ M.D. ZARZUELO A.; MARTINEZ-AUGUSTIN O.; SANCHEZ M.F. Effect of flavonoids on rat splenocytes, a structure-activity relationship study. **Biochem Pharmacol.**, 76:495–506, 2008.

MACHADO, W. M.; PEREIRA, A. D.; MARCON, M. V. Efeito do processamento e armazenamento em compostos fenólicos presentes em frutas e hortaliças. **Exact Earth Sci.**, Ponta Grossa, 19 (1): 17-30, jan/jun. 2013.

MAISUTHISAKUL, P.; SUTTAJIT, M.; PONGSAWATMANIT, R. Assessment of phenolic content and free radical-scavenging capacity of some Thai indigenous plants. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, London, v. 100, p. 1409-1418, 2007.

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

MARKLAND, F. S. Snake venoms and the hemostatic system. **Toxicon**, Elmsford, v. 36, n. 12, p. 1749–1800, Dec. 1998.

MARKUS-BERGER, M.; DA SILVA, W.O.B.; SANTI, L.; GUIMARÃES, J. A. Hemostasia: uma breve revisão. **Caderno pedagógico** (ISSN 1983-0882), v. 11, n. 1, p. 140-148, 2014.

MARTINS, N.; BARROS, L.; SANTOS-BUELGA, C.; FERREIRA, I. Antioxidant potential of two *Apiaceae* plant extracts: A comparative study focused on the phenolic composition. **Industrial Crops and Products**, 79, 188-194, 2016.

MATSUBARA, S.; RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. Conteúdo de miricetina, quercetina e kaempferol em chás comercializados no Brasil. **Ciênc. Tecnol. Alim.**, v. 26, n.2, p. 380-385, 2006.

MCKAY, D. L.; J. B. BLUMBERG. A review of the bioactivity and potential health benefits of chamomile tea (*Matricaria recutita L.*). **Phytotherapy Research**, 20, 519-530, 2006.

MCLEAN, J. A. Lipid-soluble and water-soluble antioxidant activities of the avian intestinal mucosa at different sites along the intestinal tract. **Comparative Biochemistry and Physiology**, New York, v. 141, p. 366-372, 2005.

MORAES-DE-SOUZA, R. A.; OLDONI, T. L. C.; REGITANO-D'ARCE, M. A. B.; ALENCAR, S. M.; Antioxidant activity and phenolic composition of herbal infusions consumed in Brazil. **Ciencia Y Tecnologia Alimentaria**, 6, 41-47, 2008.

MORAIS, S. M.; CAVALCANTI, E. S. B.; COSTA, S. M. O.; AGUIAR, L. A.; Antioxidant action of teas and seasonings more consumed in Brazil. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, 19, 315-320, 2009.

MUNAWAR, A.; ALI, S. A.; AKREM, A.; AND BETZEL, C. Snake venom peptides: tools of biodiscovery. **Toxins** 10:E474, 2018.

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

NEVES, A. L. D.; KOMESU, M. C.; DI MATTEO, M. A. S.. Effects of Green Tea Use on Wound Healing. **International Journal of Morphology**, 28, 905-910, 2010.

NIRMAL, N.; PRABA, G.O.; VELMURUGAN, D. Modeling studies on phospholipase A₂-inhibitor complexes. **Indian. J. Biochem. Biophys.**, 45:256–62, 2008.

NKEH-CHUNGAG B.N.; OYEDEJI O.O.; OYEDEJI A.O.; NDEBIA E.J.; Anti-inflammatory and membrane-stabilizing properties of two semisynthetic derivatives of oleanolic acid. **Inflammation.**; 38(1):61-9, 2015.

SCHALOSKE, R. H.; DENNIS, E. A. The phospholipase A₂ superfamily and its group numbering system. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids**, Amsterdam, v.1761, n. 11, p. 1246-1259, Nov. 2006.

OLIVEIRA, C. H. M. *et al.* Inhibition of proteases and phospholipases A₂ from *Bothrops atrox* and *Crotalus durissus terrificus* snake venoms by ascorbic acid, vitamin E, and B-complexvitamins. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, Rio de Janeiro, v. 88, n. 3, p. 2005-2016, Oct, 2016.

OLIVEIRA, D. M.; BASTOS, D. H. M. Biodisponibilidade de ácidos fenólicos. **Química Nova**, vol.34 no.6, 1051-1056, 2011.

OZDAL, T.; CAPANOGLU, E.; ALTAY, F. A review on protein–phenolic interactions and associated changes. **Food Research International**, v. 51, n. 2, p. 954–970, maio 2013.

PÉREZ-JIMÉNEZ, J.; FEZEU, L.; TOUVIER, M.; ARNAULT, N.; MANACH, C.; HERCBERG, S. Dietary intake of 337 polyphenols in French adults. **J. Clin. Nutr.**; 93(6):1220-28, 2011.

PINTO, M. D. *et al.* Tea: A new perspective on health benefits. **Food Research International**, 53, 558-567, 2013.

PIOVEZAN-BORGES, A. C.; VALÉRIO-JÚNIOR, C.; GONÇALVES, I. L.; MIELNICZKI-PEREIRA, A. A.; VALDUGA, A. T. Antioxidant potential of yerba mate

(*Ilex paraguariensis*) extracts in *Saccharomyces cerevisiae* deficient in oxidant defense genes. **Brazilian Journal of Biology**, vol.76 no.2 São Carlos Apr./June 2016 Epub Mar 01, 2016.

PODSEDEK, A. Natural antioxidants and antioxidant capacity of Brassica vegetables: A review. **Food Sci. Technol**, v. 40, p. 1-11, 2007.

PORT'S, P. D.; CHISTE, R. C.; GODOY, H. T.; PRADO, M. A.; . The phenolic compounds and the antioxidant potential of infusion of herbs from the Brazilian Amazonian region. **Food Research International**, 53, 875-881, 2013.

QUILES, J. L. *et al.* Antioxidant nutrients and adriamycin toxicity. **Toxicology**, v. 180, n. 1, p. 79–95, 30 out. 2002.

R CORE TEAM: R: A Language and Environment for Statistical Computing. Viena: Viena: **R Foundation for Statistical Computing**; 2012.

REDDY, K. K. *et al.* Exploration of binding site pattern in arachidonic acid metabolizing enzymes, cyclooxygenases and lipoxygenases. **BMC Research Notes**, London, v. 8, n. 152, p. 1-10, Apr. 2015.

RITA, I.; PEREIRA, C.; BARROS, L.; FERREIRA, I. Exploring reserve lots of *Cymbopogon citratus*, *Aloysia citrodora* and *Thymus x citriodorus* as improved sources of phenolic compounds. **Food Chemistry**, 257, 83-89, 2018.

RODRIGUES V.M.; SOARES A.M.; GUERRA-SÁ R.; RODRIGUES V.; FONTES M.R.; GIGLIO JR. Structural and functional characterization of neuwiedase, a nonhemorrhagic fibrin(ogen)olytic metalloprotease from *Bothrops neuwiedi* snake venom. **Arch Biochem Biophys** 2000, 381:213–24.

ROSSA, U. B.; ANGELO, A. C.; MAZUCHOWSKI, J. Z.; WESTPHALEN, D. J.; FRIZON, C. N. T.; MARTINS, C. E. N.. Influence of light and fertilizers on methylxanthines and phenolic compounds in leaves of mate tea. **Ciência Florestal**, 27, 1365-1374, 2017.

SANT' ANA C.D.; TICLI F.K.; OLIVEIRA L.L.; GIGLIO JR.; RECHIA C.G. V.; FULY, A.L.; DE ARAÚJO, H.S.; FRANCO, J.J.; STABELI, R.G.; SOARES, A.M.; SAMPAIO, S.V. BJUSSUSP-I: a new thrombin-like enzyme isolated from *Bothrops jararacussu* snake venom. **Biochem Physiol A Mol Integr Physiol**, 151:443–54, 2008.

SAUTEBIN, L. Prostaglandins and nitric oxide as molecular targets for anti-inflammatory therapy. **Fitoterapia**, 71, S48, 2000.

SCALBERT, A.; WILLIAMSON, G. Dietary intake and bioavailability of polyphenols **J. Nutr**, 130, 2073S–85S, 2000.

SCHALOSKE, RALPH H.; DENNIS, EDWARD A. The phospholipase A2 superfamily and its group numbering system. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids**, 1761.11: 1246-1259, 2006.

SCHOLZ, S.; WILLIAMSON, G. Interactions affecting the bioavailability of dietary polyphenols *in vivo* Int. **J. Vitam. Nutr. Res.**, 77, 224, 2007.

SCORSATTO, M.; PIMENTEL, A.C.; SILVA, A.J.R.; SABALLY, K.; ROSA, G.; OLIVEIRA, G.M.M. Avaliação de Compostos Bioativos, Composição Físico-Química e Atividade Antioxidante In Vitro da Farinha de Berinjela. **International Journal of Cardiovascular Sciences**. 30(3):235-242, 2017.

SELISTRE, H.S.; QUEIROZ, L.S.; CUNHA, O.A.B.; DE SOUZA, G.E.P.; GIGLIO, JR. Isolation and characterization of hemorrhagic, myonecrotic and edema-inducing toxins from *Bothrops insularis* (jararaca ilha) snake venom. **Toxicon**, 28:261–273, 1990.

SENGER, A.E.; SCHAEANKE, C.H.A.; GOTTIEB, M.G.V. Chá verde (*Camellia sinensis*) e suas propriedades funcionais nas doenças crônicas não transmissíveis. **Sci Med.**; 20(4):292-300, 2010.

SERRANO, S. M. T.; MAROUN, R. C. Snake venom serine proteinases: sequence homology vs. substrate specificity, a paradox to be solved. **Toxicon**, Elmsford, v. 45, n. 8, p. 1115–1132, June 2005.

SILVA, M. L. C.; COSTA, R. S.; SANTANA, A. S.; KOBLITZ, M. G. B. Compostos fenólicos, carotenoides e atividade antioxidante em produtos vegetais. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 31, n. 3, p. 669-682, 2010.

SILVA, N. L.; ARAÚJO, I. P. C.; BATISTA, M. R. F.; SANTOS, T. B. A.; FERNANDO, W. L.; AMARAL, F. R. Determinação da atividade antioxidante e do teor de flavonoides totais equivalentes em quercetina em extrato aquoso de folhas de *Cymbopogon citratus* (d.c.) stapf e *Melissa officinalis lam* obtidos por decocção. **Revista Conexão Ciência**, Vol. 12, Nº 1, p. 46 - 53, 2017.

SILVA, N.; FERNANDES JÚNIOR, A. Biological properties of medicinal plants: a review of their antimicrobial activity. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v. 16, n. 3, p. 402–413, 2010.

SINGH, O.; KHANAM, Z.; MISRA, N.; SRIVASTAVA, M.K. Chamomile (*Matricaria chamomilla L.*): An overview. **Pharmacogn Rev**; 5(9):82-95, 2011.

SLAGBOOM, J.; KOOL, J.; HARRISON, R.A.; CASEWELL, N.R. Haemotoxic snake venoms: their functional activity, impact on snakebite victims and pharmaceutical promise. **Br. J. Haematol.**; v. 177, 947–959, 2017.

SRIVASTAVA, S.; KUMAR, R.; LUQMAN, S. Antioxidative and pro-oxidative property of *Matricaria chamomilla L.* flower for the variants of deoxyribose degradation. **Annals of Phytomedicine-an International Journal**, 4, 52-58, 2015.

TASOULIS, T.; ISBISTER, G.K. A review and database of snake venom proteomes. **Toxins** 9:E290, 2017.

TAVALLALI, V.; ZAREIYAN, F. Antioxidant activity, polyphenolic contents and essential oil composition of aniseed (*Pimpinella anisum L.*) as influenced by 5-

aminolevulinic acid. **Journal of Food Measurement and Characterization**, 12, 1065-1071, 2018.

TRESSERRA-RIMBAU, A.; MEDINA-REMÓN, A.; PÉREZ-JIMÉNEZ, J.; MARTÍNEZ-GONZÁLEZ, M.A.; COVAS, M.I.; CORELLA, D. Dietary intake and major food sources of polyphenols in a Spanish population at high cardiovascular risk: The PREDIMED study. **Nutr Metab Cardiovasc Dis.**, 23(10):953-9, 2013.

VIAPIANA, A.; STRUCK-LEWICKA, W.; KONIECZYNSKI, P.; WESOŁOWSKI, M. AND KALISZAN R. An Approach Based on HPLC-Fingerprint and Chemometrics to Quality Consistency Evaluation of *Matricaria chamomilla L.* Commercial Samples. **Front. Plant Sci.** 7:1561, 2016.

VASCO, C.; RUALES, J.; KAMAL-ELDIN, A. Total phenolic compounds and antioxidant capacities of major fruits from Ecuador. **Food Chemistry**, London, v. 111, p. 816-823, 2008.

WANG, W.J.; SHIH, C.H.; HUANG, T.F.; A novel P-I class metalloproteinase with broad substrate-cleaving activity, agkislysin, from *Agkistrodon acutus* venom. **Biochem Biophys Res Commun.**, 324:224–30, 2004.

WILLIAMS, D.; GUTIÉRREZ, J.M.; HARRISON, R.; WARRELL, D.A.; WHITE, J.; WINKEL, K.D. Gopalakrishnakone P: The Global Snake Bite Initiative: an antidote for snake bite. **Lancet.**, 375:89–91, 2010.

WILLIAMS L.A.; O'CONNAR, A.; LATORE, L.; DENNIS, O.; RINGER, S.; WHITTAKER, J.A.; CONRAD, J.; VOGLER, B.; ROSNER, H.; KRAUS, W. The in vitro anti-denaturation effects induced by natural products and non-steroidal compounds in heat treated (immunogenic) bovine serum albumin is proposed as a screening assay for the detection of anti-inflammatory compounds, without the use of animals, in the early stages of the drug discovery process. **West Indian Med J.**; 57(4):327-31, 2008.

WILLIAMS, R.J.; SPENCER, J.P.E.; RICE-EVANS, C. Flavonoids: Antioxidants or signalling molecules?. In: **Free Radical Biology and Medicine.**; Vol. 36, No. 7. pp. 838 – 849, 2004.

WINKEL-SHIRLEY, B. Flavonoid biosynthesis, a colourful model for genetics, biochemistry, cell biology, and biotechnology. **Plant Physiology**, Minneapolis, n.126, p.485-493, 2001.

WROLSTAD, R. E.; DURST, R. W.; LEE, J. Tracking color and pigment changes in anthocyanin products. **Trends in Food Science & Technology**, v. 16, p. 423-428, 2005.

YARLA, N. S. *et al.* Phospholipase A2: A potential therapeutic target in inflammation and cancer (*in silico*, *in vitro*, *in vivo* and clinical approach). **Journal of Cancer Science & Therapy**, Osaka, v.7, n. 7, p. 249-252, July 2015.

YASMEEN, H.; HASNAIN, S. *In vitro* antioxidant effect of *Camellia sinensis* on human cell cultures. **Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences**, 28, 1573-1581, 2015.

YIN, D.; YUAN, D., R. Y.; WU, Q.; LI, S. S.; SHAO, S.; XU, Y. J.; HAO, X. H.; WANG, L. S.; Assessment of flavonoids and volatile compounds in tea infusions of water lily flowers and their antioxidant activities. **Food Chemistry**, 187, 20-28, 2015.

ZAMORA-ROS R.; KNAZE V.; LUJÁN-BARROSO L.; ROMIEU I.; SCALBERT, A.; SLIMANI, N. Differences in dietary intakes, food sources and determinants of total flavonoids between Mediterranean and nonMediterranean countries participating in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC) study. **Br J Nutr.**, 109(8):1498- 1507, 2013.

ZANCOLLI, G.; CALVETE, J.J.; CARDWELL, M.D.; GREENE, H.W.; HAYES, W.K.; HEGARTY, M.J. When one phenotype is not enough: divergent evolutionary trajectories govern venom variation in a widespread rattlesnake species. **Proc. Biol. Sci.** 286:20182735, 2019.

ZARGAR, B.; MAJEED, D.; GANAI, S. A.; MIR S. A.; DAR, B. N. Effect of different processing parameters on antioxidant activity of tea. **Journal of Food Measurement and Characterization**, 12, 527-534, 2018.

ZELANIS, A.; TASHIMA, A. K. Unraveling snake venom complexity with ‘omics’ approaches: challenges and perspectives. **Toxicon** 87, 131–134, 2014.

ZHANG, Y. Why do we study animal toxins? **Dongwuxue Yanjiu** 36, 183–222, 2015.

ZIELINSKI, A.A.F.; HAMINIUK, C.W.I.; ALBERTI, A.; NOGUEIRA, A.; DEMIATE, I.M.; GRANATO D. A comparative study of the phenolic compounds and the *in vitro* antioxidant activity of different Brazilian teas using multivariate statistical techniques. **Food Research International**, 60, 246-254, 2014.

ANEXOS

I – Parecer do Comitê de Ética para Pesquisa com Seres Humanos

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
LAVRAS

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: CHÁS COMERCIAIS COMO ALIMENTOS NUTRACÊUTICOS: AÇÃO COMO MODULADORES ENZIMÁTICOS.

Pesquisador: Silvana Marcussi

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 10587519.1.0000.5148

Instituição Proponente: Universidade Federal de Lavras

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 3.362.611

Apresentação do Projeto:

O chá apresenta inúmeros benefícios à saúde, assim, é considerado a segunda bebida mais ingerida no mundo, ficando apenas atrás da água (ZIELINSKI et al., 2014). O alto consumo de chá por diferentes populações ao longo dos anos, está relacionado com seus efeitos antimutagênicos, anticarcinogênicos, antimicrobianos, anti-inflamatórios e principalmente antioxidantes (PINTO, 2013). Os benefícios dos chás nos organismos, estão geralmente associados a atividade antioxidante de diferentes compostos fenólicos presentes nessas infusões, especialmente os flavonoides (COELHO, 2016; YIN, 2015; ZIELINSKI et al., 2014). Os antioxidantes são substâncias que possuem a capacidade de inibir e/ou diminuir a ação de compostos oxidantes e radicais livres, além disso, podem agir quelando íons metálicos (ROSSA, 2017). Os compostos fenólicos, também chamados de polifenóis, fazem parte de uma classe de substâncias derivadas da via do ácido chiquímico e do acetato-malonato e adotam uma grande variedade de estruturas que possuem pelo menos um anel aromático com um ou mais grupos hidroxilas. A atividade antioxidante desses compostos é atribuída principalmente à presença dos grupamentos hidroxilas na estrutura dos polifenóis (MORAIS, 2009). Os compostos fenólicos podem ser agrupados em dois grandes grupos: flavonoides (antocianinas, flavonóis, isoflavonas e flavonas), taninos e ácidos fenólicos (PINTO, 2013). Os compostos fenólicos com atividade antioxidante são apontados como importantes agentes no retardo do envelhecimento, assim como na prevenção de doenças degenerativas, cardiovasculares

Endereço: Campus Universitário Cx Postal 3037

Bairro: PRP/COEP

CEP: 37.200-000

UF: MG

Município: LAVRAS

Telefone: (35)3829-5182

E-mail: coep@nintec.ufla.br

Continuação do Parecer: 3.362.611

e cerebrais (MORAES-DE-SOUZA, 2008). Além da atividade antioxidante, estes compostos desempenham outras funções no organismo, atuando como anti-inflamatórios, antiaterogênicos, vasodilatadores, participam como moduladores de rotas enzimáticas, da expressão gênica e contribuem melhorando as funções de membranas e receptores celulares (CORRÊA, 2015). A biodiversidade no Brasil, no que se refere às plantas medicinais popularmente utilizadas com anti-inflamatórios naturais, impulsiona a procura por novos compostos bioativos. Entre as diferentes classes de compostos bioativos, os flavonoides se destacam por suas ações biológicas, por exemplo, possuem a capacidade de promover o controle de processos inflamatórios e melhorias na resposta imunológica, conferindo assim um alto potencial farmacológico (COUTINHO, 2009). No contexto da exploração científica de produtos nutraceuticos, os chás de destacam pela composição rica em moléculas que atuam na prevenção e como adjuvantes no tratamento de diversas doenças de origem e desenvolvimento inflamatório, assim como são regulamentados como alimentos podendo ser facilmente recomendados ou prescritos, sem restrições legais. Dessa forma o presente trabalho tem por objetivo ampliar a caracterização farmacológica das principais infusões (camomila, capim-limão, erva-cidreira, ervadoce, erva mate, hortelã-pimenta e chá verde/preto) consumidas no Brasil, de forma a prospectar os benefícios à saúde humana, associados aos compostos fenólicos, principalmente flavonoides contidos nessas bebidas.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Avaliar o potencial *in vitro* de amostras comerciais de chás (camomila (*Matricaria chamomilla*), capim-limão (*Cymbopogon citratus*), erva-cidreira (*Melissa officinalis*), erva-doce (*Pimpinella anisum*), erva-mate (*Ilex paraguariensis*), hortelã-pimenta (*Mentha piperita* L.) e chá verde/preto (*Camellia sinensis*)) como moduladores enzimáticos na hemostasia, utilizando-se de peçonhas de serpentes como ferramenta de indução de efeitos, a fim de realizar a caracterização farmacológica e toxicológica destes chás.

Objetivo Secundário:

- Determinar a atividade anti-inflamatória das infusões de ervas pela estabilidade da membrana de eritrócitos, avaliada em diferentes temperaturas.- Analisar o efeito das infusões de ervas sobre a atividade fosfolipásica, induzida pela peçonha de *Bothrops moojeni*.- Avaliar o potencial inibidor das infusões de ervas sobre a atividade hemolítica, induzida pela peçonha de *B. moojeni*.- Avaliar

Endereço: Campus Universitário Cx Postal 3037

Bairro: PRP/COEP

CEP: 37.200-000

UF: MG

Município: LAVRAS

Telefone: (35)3829-5182

E-mail: coep@nintec.ufla.br

Continuação do Parecer: 3.362.611

o potencial inibidor das infusões de ervas sobre enzimas proteolíticas em geral (utilizando o substrato caseína), fibrinogenolíticas (utilizando fibrinogênio bovino como substrato), trombolíticas (metaloproteases hemorrágicas e debridantes) e coagulantes (serinoproteases semelhantes à trombina e metaloproteases).

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

A coleta de sangue poderá causar algumas pequenas manifestações no local da injeção, como um pequeno inchaço, vermelhidão ou formação de mancha roxa, ou seja, sinais comuns em coletas rotineiras de sangue e de baixo risco à saúde do doador. Alguns voluntários poderão sentir mal estar antes, durante ou após a coleta de sangue, devido à diminuição da pressão sanguínea, e, caso isso ocorra, a coleta do sangue poderá ser suspensa e se necessário o docente responsável solicitará atendimento médico para o voluntário. Espera-se obter o mínimo de situações em que os voluntários sintam mal estar, uma vez que, teoricamente, pessoas que se sentem mal ao ver sangue ou ter seu sangue retirado não irão se voluntariar, além disso, porque as coletas serão feitas na ausência de jejum, a qualquer hora do período da manhã.

Benefícios:

Não haverá qualquer benefício direto ao voluntário nesta pesquisa. No entanto, ele estará contribuindo com a conclusão dos estudos referentes ao projeto do pesquisador colaborador Mateus Santos Carapiá, no qual se pretende obter informações sobre os efeitos in vitro de amostras comerciais de chás; camomila (*Matricaria chamomilla*), capim-limão (*Cymbopogon citratus*), erva-cidreira (*Melissa officinalis*), erva-doce (*Pimpinella anisum*), erva-mate (*Ilex paraguariensis*), hortelã-pimenta (*Mentha piperita* L.) e chá verde/preto (*Camellia sinensis*); como moduladores enzimáticos na hemostasia, considerando parâmetros fisiológicos e toxicológicos, visando a comprovação de indicações de uso popular dessas plantas, assim como a obtenção de conhecimentos que permitam sugerir novas aplicações com eficácia e segurança.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

- Folha de rosto - ok
- Projeto detalhado - Ok
- Requerimento à Graduação para recrutamento de participantes - ok
- Informações básicas do protocolo de pesquisa: ok.

Endereço: Campus Universitário Cx Postal 3037

Bairro: PRP/COEP

CEP: 37.200-000

UF: MG

Município: LAVRAS

Telefone: (35)3829-5182

E-mail: coep@nintec.ufla.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
LAVRAS



Continuação do Parecer: 3.362.611

- Comentários Éticos: ok
- Declaração do Pesquisador: ok

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

TCLE - ok

Recomendações:

Nenhuma recomendação.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Nenhuma pendência.

Considerações Finais a critério do CEP:

Ao Final do experimento o pesquisador deverá enviar relatório final, indicando ocorrências e efeitos adversos quando houver.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1323769.pdf	06/05/2019 10:53:43		Aceito
Outros	cartaRespostaVERSAO2.doc	06/05/2019 10:53:15	Silvana Marcussi	Aceito
Declaração de Pesquisadores	MATEUSDeclaracaopesquisadorVERSAO2.docx	06/05/2019 10:52:40	Silvana Marcussi	Aceito
Outros	MATEUSComentarioseticosVERSAO2.docx	06/05/2019 10:51:11	Silvana Marcussi	Aceito
Outros	MATEUSComentarioseticos.docx	28/03/2019 13:33:42	Silvana Marcussi	Aceito
Outros	autorizacaoPRGmateus.docx	28/03/2019 13:33:06	Silvana Marcussi	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	MATEUSTermodeconsentimento.doc	28/03/2019 13:32:32	Silvana Marcussi	Aceito
Declaração de Pesquisadores	MATEUSDeclaracaopesquisador.docx	28/03/2019 13:32:21	Silvana Marcussi	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	PROJETOCHASMATEUS.pdf	28/03/2019 13:32:06	Silvana Marcussi	Aceito
Folha de Rosto	folhaderostomateus.docx	28/03/2019 13:29:42	Silvana Marcussi	Aceito

Endereço: Campus Universitário Cx Postal 3037

Bairro: PRP/COEP

CEP: 37.200-000

UF: MG **Município:** LAVRAS

Telefone: (35)3829-5182

E-mail: coep@nintec.ufla.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
LAVRAS



Continuação do Parecer: 3.362.611

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

LAVRAS, 01 de Junho de 2019

Assinado por:

**Giancarla Aparecida Botelho Santos
(Coordenador(a))**

Endereço: Campus Universitário Cx Postal 3037

Bairro: PRP/COEP

CEP: 37.200-000

UF: MG

Município: LAVRAS

Telefone: (35)3829-5182

E-mail: coep@nintec.ufla.br

SEGUNDA PARTE – ARTIGO

O artigo está estruturado de acordo com as normas da revista científica escolhida para submissão: Anais da Academia Brasileira de Ciências, Qualis A2 para Ciências Agrárias.

ARTIGO**Influência de chás sobre a atividade de fosfolipases A₂ e proteases no contexto de processos relacionados à hemostase sanguínea.**

Artigo redigido conforme normas da revista “Anais da Academia Brasileira de Ciências”, Qualis A2 para Ciências Agrárias.

Mateus Santos Carapiá¹, Daniela Aparecida Oliveira¹, Tatiane Silva de Abreu¹,
Marcus Vinicius Cardoso Trento¹, Silvana Marcussi¹

¹Department of Chemistry, Biochemistry Laboratory, Federal University of Lavras (UFLA), Lavras, Minas Gerais, 37200-000, Brazil.

Corresponding Author: Dra. Silvana Marcussi, Biochemistry Laboratory, Department of Chemistry, Federal University of Lavras, CEP: 37200-000, Lavras, Brazil (telefax number: +55(35) 3829-1271, e-mail: marcussi@ufla.br).

ABSTRACT

Tea is identified as the second most consumed drink in the world, and its frequent intake is related to several benefits to human health, considering its antimutagenic, anticarcinogenic, antimicrobial, anti-inflammatory, antihistamine, diuretic, calming effects, and above all, antioxidant. These effects are often associated with the action of the phenolic compounds contained in these infusions. In Brazil, among the most consumed infusions, are the teas of: chamomile (*Matricaria chamomilla*), lemongrass (*Cymbopogon citratus*), lemon balm (*Melissa officinalis*), anise (*Pimpinella anisum*), yerba mate (*Ilex paraguariensis*), peppermint (*Mentha piperita L.*), and green/black (*Camellia sinensis*). The activity of PLA2s was reduced by more than 25% in the treatments with black tea and mate tea. The most significant inhibitions in protease activity were observed after incubation with black tea (40.74%), green tea (31.48%) and yerba mate (25.93%). Infusions of black and green tea reduced the hemolysis evaluated in semi-solid and liquid environment, for the latter, reductions of up to 50% of hemolytic activity were observed, indicating an anti-inflammatory potential of the samples. Plasma incubators with green tea, black tea and lemon balm, and subsequent addition of venom (1:10 ratio; tea: PBS, v: v), prolonged the coagulation time of the citrated plasma by approximately twice, when compared to the positive control. All controls with pure tea had a thrombolytic character, in higher proportions than the venom control, with emphasis on chamomile (273, 55% dissolution). The evaluated teas showed potential for nutraceutical use, thus pointing to the possibility of use as an adjuvant in the treatment of diseases linked to hemostasis.

Keywords:

Antioxidants, Phenolic compounds, Flavonoids, Enzyme modulators.

1. INTRODUÇÃO

O chá apresenta inúmeros benefícios à saúde, assim, é considerado a segunda bebida mais ingerida no mundo, ficando apenas atrás da água (ZIELINSKI *et al.*, 2014). O alto consumo de chá por diferentes populações ao longo dos anos, está relacionado com seus efeitos antimutagênicos, anticarcinogênicos, antimicrobianos, anti-inflamatórios e principalmente antioxidantes (PINTO, 2013).

Os benefícios dos chás nos organismos, estão geralmente associados a atividade antioxidante de diferentes compostos fenólicos presentes nessas infusões, especialmente os flavonoides (COELHO *et al.*, 2016; YIN *et al.*, 2015; ZIELINSKI *et al.*, 2014). Os antioxidantes são substâncias que possuem a capacidade de inibir e/ou diminuir a ação de compostos oxidantes e radicais livres, além disso, podem agir quelando íons metálicos (ROSSA *et al.*, 2017).

Os compostos fenólicos, também chamados de polifenóis, fazem parte de uma classe de substâncias derivadas da via do ácido chiquímico e do acetato-malonato e adotam uma grande variedade de estruturas que possuem pelo menos um anel aromático com um ou mais grupos hidroxilas. A atividade antioxidante desses compostos é atribuída principalmente à presença dos grupamentos hidroxilas na estrutura dos polifenóis (MORAIS *et al.*, 2009). Os compostos fenólicos podem ser agrupados em três grandes grupos: flavonoides (antocianinas, flavonóis, isoflavonas e flavonas), taninos e ácidos fenólicos (PINTO, 2013).

Entre os compostos fenólicos, destacam-se os flavonoides como principais alvos de interesse médico-científico, especialmente por suas propriedades anti-inflamatórias e hipocolesterolêmicas, relacionadas a capacidade desses compostos em inibir enzimas específicas (BURKARD *et al.*, 2017).

Os compostos fenólicos com atividade antioxidante são apontados como importantes agentes no retardo do envelhecimento, assim como na prevenção de doenças degenerativas, cardiovasculares e cerebrais (MORAES-DE-SOUZA *et al.*, 2008). Além da atividade antioxidante, estes compostos desempenham outras funções no organismo, atuando como anti-aterogênicos e vasodilatadores, participam como moduladores de rotas enzimáticas, da expressão gênica e contribuem melhorando as funções de membranas e receptores celulares (CORRÊA *et al.*, 2015).

Peçonhas de serpentes são utilizadas como ferramentas laboratoriais na indução de respostas inflamatórias. As peçonhas constituem-se de uma matriz diversificada de proteínas e peptídeos de alto peso, com uma diversidade de efeitos farmacológicos e toxicológicos de interesse científico (ZHANG *et al.*, 2015).

No contexto da exploração científica de produtos nutracêuticos, os chás de destacam pela composição rica em moléculas que atuam na prevenção e como adjuvantes no tratamento de diversas doenças de origem e desenvolvimento inflamatório, assim como são regulamentados como alimentos podendo ser facilmente recomendados ou prescritos, sem restrições legais. Dessa forma o presente trabalho amplia a caracterização farmacológica das principais infusões (camomila, capim-limão, erva-cidreira, erva-doce, erva-mate, hortelã-pimenta e chá verde/preto) consumidas no Brasil, apontando os possíveis benefícios à saúde humana, associados aos compostos fenólicos, principalmente flavonoides contidos nessas bebidas.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Obtenção das amostras e preparo dos chás

As espécies vegetais [camomila (*Matricaria chamomilla*), capim-limão (*Cymbopogon citratus*), erva-cidreira (*Melissa officinalis*), erva-doce (*Pimpinella anisum*), erva-mate (*Ilex paraguariensis*), hortelã-pimenta (*Mentha piperita L.*) e chá verde/preto (*Camellia sinensis*)] foram adquiridas em comércio local no município de Lavras-MG (21°14'5, 45°00 O e 918 m de altitude). Os chás foram preparados utilizando 3 sachê (2g de folhas e/ou flores secas, cada) que permaneceram sob infusão em tampão fosfato-salino ou *phosphate buffered saline* (PBS), recém fervido, simulando o preparo dos chás pela maioria da população, porém, com substituição de água por PBS. O conteúdo utilizado para avaliação direta nos ensaios foi armazenado à -20°C durante a execução da pesquisa.

2.2 Obtenção de Sangue e Plasma Humano

O sangue utilizado para os testes foram obtidos de 10 voluntários saudáveis, de ambos os sexos e com faixa etária entre 20 e 40 anos, que declararem não ter feito uso de medicação durante um período de 30 dias antes da coleta de sangue. Um volume de 10mL de sangue, por voluntário, foi coletado por punção venosa em tubos contendo citrato para

a atividade coagulante, heparina para atividade anti-inflamatória, hemolítica e em tubos sem anticoagulante para a atividade trombolítica. Todos os experimentos foram realizados conforme protocolos previamente aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos (COEP) da Universidade Federal de Lavras, sob o número de registro (Nº CAAE/10587519.1.0000.5148).

2.3 Obtenção das peçonhas de serpente.

Para a realização dos ensaios, foram utilizadas peçonhas de *Bothrops moojeni* adquiridas comercialmente do serpentário Bioagents (Batatais-SP). As peçonhas foram pesadas (10 mg) e dissolvidas em 1 mL de salina tamponada em fosfato (PBS, pH 7,4) para realização dos ensaios.

2.4 Atividade fosfolipásica

A atividade fosfolipásica foi avaliada conforme descrito por Gutiérrez *et al.* (1988). Os ensaios de inibição de fosfolipases A₂ foram realizados utilizando a peçonha de *Bothrops moojeni* (30 µg) sendo estas previamente incubada com as infusões, por 30 minutos a 37°C. A avaliação da atividade fosfolipásica foi realizada em gel de ágar, preparado em CaCl₂ 0,01 mol L⁻¹; gema de ovo 1:3 v:v (fosfatidilcolina, fosfatidilserina e fosfatidiletanolamina); PBS (pH 7,4); ágar bacteriológico 1% e azida de sódio 0,005%, vertendo o meio à temperatura de 45-50 °C em placas de petri. Após a solidificação do gel, os tratamentos foram aplicados, em volume final de 30 µL, em orifícios de 0,5 cm de diâmetro. As placas permaneceram em câmara de cultivo celular por 18 horas seguindo com medida dos halos. A média dos valores obtidos nos controles contendo apenas as fosfolipases foi considerado como 100% de atividade. Controles de inibição das enzimas foram realizados com o uso de prednisolona.

2.5 Atividade anti-inflamatória avaliada pela estabilidade da membrana de eritrócitos frente à temperatura de 54°C.

Sangue periférico humano (10 mL) foi coletado em tubos contendo heparina e imediatamente centrifugado à 3600 rpm por 5 minutos seguindo com remoção do plasma. Uma alíquota do concentrado de eritrócitos rico em plaquetas foi utilizada para elaboração de uma suspensão celular com hematócrito à 2% em PBS, pH~7,4 (v:v). Para a avaliação de cada tratamento foram utilizados 1,2 mL da solução diluída de eritrócitos. Preparou-se os tratamentos em volume final de 200 µL, podendo este conter uma massa

de até 100 mg da amostra a ser avaliada, adaptando os ensaios às características de solubilidade de cada amostra. Os controles positivos foram elaborados com nimesulida e prednisolona. Os controles negativos não receberam tratamentos, sendo utilizados como branco para a realização das leituras no espectrofotômetro. As incubações foram realizadas a 37°C por período de 30 minutos para extratos na forma líquida. Após a incubação, os tubos contendo os tratamentos permaneceram em banho termostático a 54°C por 20 minutos. Em seguida, os incubados foram centrifugados à 3600 rpm por 5 minutos e a leitura do sobrenadante realizada em espectrofotômetro a 540 nm (NKEH-CHUNGAG *et al.*, 2015; ANIL *et al.*, 2011; WILLIAMS *et al.*, 2008).

2.6 Atividade citotóxica sobre eritrócitos humanos

Para o ensaio de citotoxicidade sobre eritrócitos humanos foi utilizado o mesmo método descrito por Gutiérrez *et al.* (1988) (seção 2.4) com a substituição dos fosfolipídios por um concentrado de eritrócitos humanos na mesma proporção. Para a obtenção das hemácias 10 mL de sangue humano foram coletados na presença de anticoagulante, misturados em mesmo volume com solução salina (2 mM NaH₂PO₄; 3 mM Na₂HPO₄; 154 mM NaCl; pH 7.4) e centrifugados a 700 rpm (Fanem Baby@I Modelo 206 BL) por 10 minutos. O plasma foi removido, e as hemácias suspensas em 5 mmol.L⁻¹ de PBS, pH 7,4 e centrifugadas nas mesmas condições, sendo esta etapa repetida duas vezes conforme descrito por Preté *et al.* (2011). A inibição da atividade hemolítica foi avaliada utilizando a peçonhas de *B. moojeni* (30µg) previamente incubadas com as infusões, por 30 minutos à 37°C, no volume final de reação de 30µL por amostra/por poço.

As atividades fosfolipásica e citotóxica sobre eritrócitos foram avaliadas pela medida (mm) do halo translúcido formado ao redor dos orifícios nos géis, onde as amostras foram aplicadas e os resultados expressos em porcentagem considerando a média dos controles contendo apenas peçonha, como 100% de atividade.

2.7 Atividade proteolítica sobre a caseína

Para a avaliação desta atividade foi utilizada a metodologia descrita por Gutiérrez *et al.* (1988), sendo realizada a substituição dos fosfolipídios por solução de caseína, utilizando este substrato na concentração descrita por Wang, Shih e Huang

(2004) para o teste caseinolítico em meio líquido. Para o preparo do gel foi utilizada solução de caseína na concentração de 5 mg.mL^{-1} , em tampão Tris-HCl 50 mM e pH 8,0.

As proteases da peçonha de *B. moojeni* (10 μg) e as infusões foram incubadas previamente no volume final de reação de $30\mu\text{L}$ por amostra, por 30 minutos à 37°C , e posteriormente aplicadas aos orifícios feitos no gel, seguindo com incubação por período de 18 horas à 37°C em câmara de cultivo celular. Controles contendo apenas as proteases também foram avaliados.

O gel foi submetido à coloração com solução de amido black a 1% e descoloração em solução de ácido acético a 10%, possibilitando a quantificação da atividade pela medida dos diâmetros dos halos translúcidos, formados ao redor dos orifícios. Os resultados foram expressos em porcentagem, onde a média dos controles contendo apenas peçonha foi considerado como 100% de atividade proteolítica.

2.8 Atividade fibrinogenolítica

Para a avaliação da atividade fibrinogenolítica foi utilizada a metodologia de eletroforese em gel de poliacrilamida conforme descrito por Laemmly (1970). Os ensaios de inibição de proteases foram realizados com incubação prévia da peçonha de *B. moojeni* (40 μg) com as infusões no volume final de reação de $30\mu\text{L}$ por amostra e em metade deste, por período de 30 minutos à 37°C , seguido pela adição do fibrinogênio e subsequente incubação por mais 2h em mesma temperatura. Controles contendo apenas fibrinogênio e peçonha também foram realizados.

As amostras foram analisadas em gel de poliacrilamida a 12% (m/v), possibilitando a observação das cadeias α , β e γ do fibrinogênio controle, assim como a presença de fibrinopeptídios nas amostras em que houve proteólise.

2.9 Atividade coagulante

A metodologia para a avaliação do tempo de coagulação de plasma humano citratado foi realizada conforme descrita por Rodrigues *et al.* (2000). As infusões foram previamente incubadas com a peçonha de *B. moojeni*, no volume final de reação de $30\mu\text{L}$ por amostra, por período de 30 minutos 37°C . Os incubados foram então adicionadas a tubos contendo plasma citratado (200 μL), estabilizado em banho de aquecimento à mesma temperatura, e o tempo imediatamente cronometrado até a formação de um

coágulo rígido. Controles contendo somente a peçonha foram também realizados. Os ensaios também foram realizados com incubação prévia das infusões com o plasma citratado e posterior adição da peçonha. Desta forma, puderam ser avaliadas possíveis interações com as proteases ou com constituintes do plasma. A dose coagulante mínima foi definida previamente, sendo esta a quantidade mínima de proteases capazes de induzir a coagulação do plasma em um intervalo entre 1 minuto e 1 minuto e 25 segundos (SELISTRE *et al.*, 1990).

2.10 Atividade sobre trombos sanguíneos

A atividade trombolítica foi avaliada sobre coágulos sanguíneos humanos formados *in vitro*, de acordo com Cintra *et al.* (2012). Os coágulos foram incubados por 24 horas a 37°C com amostras contendo apenas peçonha de *B. moojeni* (30µg), PBS, infusões ou peçonha previamente incubada (30 minutos à 37°C) com as infusões no volume final de reação (30µL por amostra/por poço). A atividade trombolítica foi estimada pela medida do volume de líquido liberado por cada trombo. A média dos volumes obtidos nos controles realizados com a peçonha foi considerado como 100% de atividade.

2.11 Análise estatística

Os resultados foram apresentados como a média de triplicatas \pm o desvio padrão. Os dados foram avaliados estatisticamente por análise de variância, e as médias comparadas usando o teste Scott Knott ($p < 0,05$) com auxílio do programa estatístico R (R CORE TEAM, 2012).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Compostos fenólicos são investigados como importantes inibidores de enzimas constituintes de peçonha de serpentes e, por consequência, dos efeitos tóxicos e/ou farmacológicos associados à atividade dessas enzimas (CARVALHO *et al.*, 2013; GUIMARÃES *et al.*, 2014). O efeito anti-inflamatório dos flavonoides está principalmente associado às interações com os sistemas enzimáticos, inibição do metabolismo do ácido araquidônico (MOURA *et al.*, 2016; ROSSA *et al.*, 2017; ACHKAR *et al.*, 2014) e a remoção de espécies reativas de oxigênio, convertidas em híbridos de ressonância estáveis, e posteriormente a quinona (ANANTHARAJU *et al.*, 2016).

3.1 Atividade Fosfolipásica

Foram observadas porcentagens de inibição de PLA₂s superiores a 25%, para as infusões de chá preto (27,54%) e erva-mate (29,15%). Valores menores de inibição foram observados para as infusões de capim-limão (17,87%), chá verde (19,48%), hortelã (21,10%), camomila (14,65%), erva-doce (13,04%) e erva-cidreira (6,60%) (Figura 1). Os desvios padrões relativos (todos <4%) indicam concordância entre os dados obtidos nas repetições, sendo assim, nas condições experimentais avaliadas, a inibição de PLA₂s de *B. moojeni* foi mais efetiva após incubação com as infusões de chá preto e erva-mate. Controles foram elaborados com os anti-inflamatórios prednisolona e dexametasona na concentração de 1µg.µL⁻¹, obtendo o máximo de inibição de 13,04% e 19,48%, respectivamente, valores menores aos observados na maioria das amostras contendo infusões de ervas.

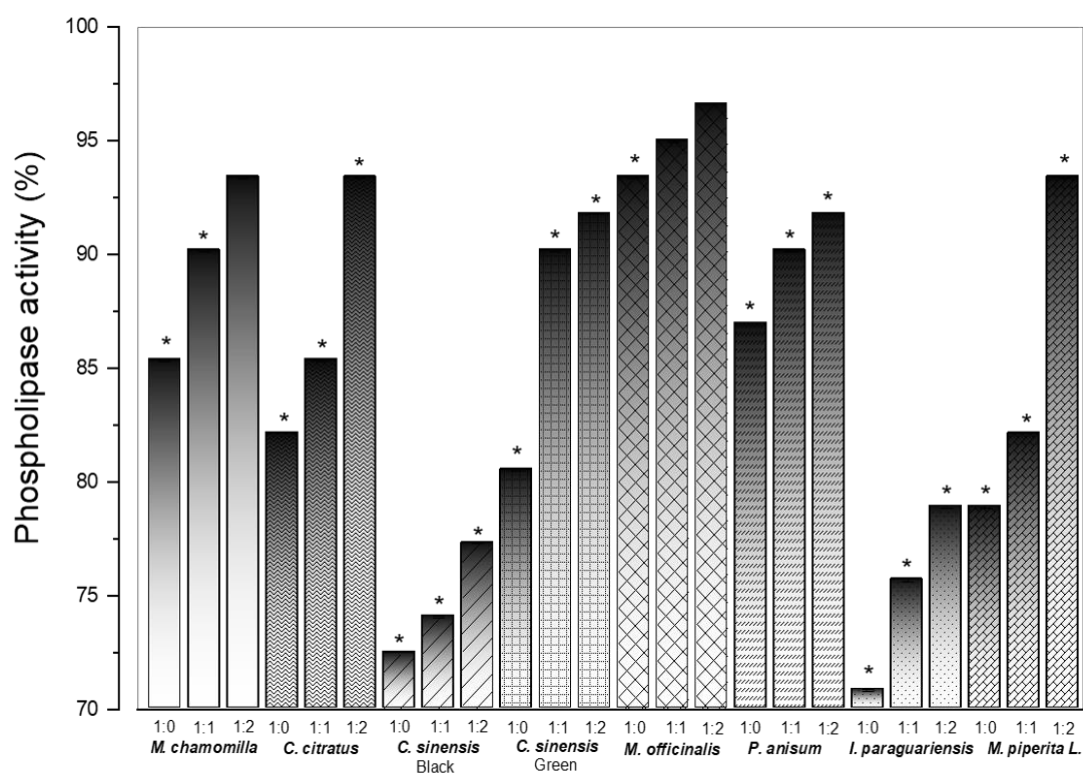


Figura 1. Efeito das infusões de ervas sobre a atividade de PLA₂s de *Bothrops moojeni* (10µg), avaliado após incubação por 30 minutos a 37°C. Os dados correspondem a médias com seus respectivos desvios padrão (n=3). As proporções correspondem ao volume de infusão em relação ao volume total da reação, sendo 1:0, 1:1 e 1:2 de chá:PBS (v/v). A média dos controles contendo apenas peçonha foi considerada como 100% de atividade. *Difere estatisticamente do respectivo controle positivo, p < 0,05.

A literatura tem descrito a ação anti-inflamatória das espécies vegetais *C. sinensis* e *I. paraguayenses*, atribuindo esse efeito à presença de compostos fenólicos como os ácidos fenólicos (ácido cafeico, ácido gálico e ácido sirínico) e principalmente flavonoides (quercetina, kaempferol, catequina e galato de epigalocatequina) (BLUM-SILVA *et al.*, 2015; BEDROOD *et al.*, 2018; PIOVEZAN-BORGES *et al.*, 2016; DAS *et al.*, 2018). Extratos de plantas ricos em compostos fenólicos são apontados também como inibidores de PLA₂ (MARQUES *et al.*, 2016).

De acordo com Moura (2016), a atividade catalítica de PLA₂s é dependente de cálcio, assim, sua inibição pode estar associada a complexação dos íons metálicos (Ca²⁺), pelos quelantes fenólicos (principalmente flavonoides). Os flavonoides também podem atuar por mecanismos de doação de hidrogênio para inibir a ação de radicais livres, o que justifica sua correlação com efeitos medicinais (ZARGAR, 2018; KERIO, 2013). Além disso, os compostos fenólicos podem se ligar a regiões hidrofóbicas existentes na estrutura dessas enzimas e/ou interagir com resíduos de aminoácidos encontrados nos sítios catalíticos das fosfolipases (TEIXEIRA *et al.*, 2019).

Os flavonóis, como a quercetina e kaempferol, são relatados como as biomoléculas com maior potencial de inibição de PLA₂s, sendo esses representantes dos principais constituintes fenólicos encontrados na erva-mate e chá preto (COUTINHO *et al.*, 2009; PELUSO *et al.*, 2017), cujas infusões apresentaram as mais altas porcentagens de inibição de PLA₂s, entre as amostras testadas.

Na quantificação de flavonoides em erva-mate, realizada por Bojic (2013), foram determinadas as concentrações de quercetina e kaempferol como sendo, respectivamente, 2,2mg.g⁻¹ e 4,5mg.g⁻¹. O tratamento com quercetina, realizado por Cotrim *et al.* (2011) levou a uma redução de cerca de 40% na atividade enzimática de PLA₂s induzida pela peçonha de *Crotalus durissus terrificus*. A infusão de erva-mate utilizada no presente trabalho, foi capaz de inibir aproximadamente 30% da atividade fosfolipásica, confirmando assim o potencial dessa erva na modulação da atividade de PLA₂s, induzida pela peçonha de *B. moojeni*.

3.2 Atividade anti-inflamatória avaliada pela estabilidade da membrana de eritrócitos frente à temperatura de 54°C

As inibições expressivas na atividade de fosfolipases A₂, configuram ação anti-inflamatória para as infusões avaliadas. Contudo, as infusões não exerceram efeito

inibidor sobre a lise de eritrócitos induzida por incubação em banho de aquecimento a 54°C.

O teste de avaliação da estabilidade das membranas de eritrócitos tem sido considerado um indicador de potencial anti-inflamatório, pela similaridade entre as membranas de eritrócitos e as de lisossomos, cujos conteúdos liberados a partir de sua lise amplificam o processo inflamatório. Entretanto, os mecanismos anti-inflamatórios associados à proteção das membranas não foram descritos em literatura. Desta forma, as infusões avaliadas são capazes de reduzir a produção de eicosanoides, pelo mecanismo de inibição de fosfolipases A₂ (COUTINHO *et al.*, 2009; PELUSO *et al.*, 2017), resultando na diminuição da produção de ácido araquidônico e conseqüentemente de seus derivados estruturais, embora não exerçam ação protetora sobre as membranas de eritrócitos.

Nas avaliações realizadas após incubação a 37°C foram observadas porcentagens de hemólise entre 21 e 24% nos tratamentos com prednisolona (AIE, anti-inflamatório esteroideal), entre 19 a 24% para o tratamento com infusão de chá preto e entre 10 e 13% para o tratamento com infusão de chá verde, em comparação a taxa normal de hemólise mecânica obtida no controle negativo (PBS), que foi de aproximadamente 4% (Tabela 1).

Nos testes de indução de hemólise à 54°C, o tratamento com nimesulida (AINE, anti-inflamatório não esteroideal) resultou em porcentagens de hemólise entre 20 e 22%, frente a uma porcentagem basal, obtida no controle negativo, de aproximadamente 22%. Embora os tratamentos com as infusões de chá preto e verde, tenham reduzido a hemólise induzida a 54°C, em comparação ao controle positivo (água pura, 100% de hemólise), as porcentagens de hemólise observadas ficaram entre 50 e 76% (Tabela 1).

Neste contexto, faz-se necessário destacar que as amostras avaliadas representam pequenos volumes de chás que podem ser consumidos diariamente, potencializando seus efeitos de prevenção e manutenção da saúde, estando ausentes as ações adversas associadas ao uso de anti-inflamatórios sintéticos, sobretudo os esteroideais.

Tabela 1. Avaliação da hemólise térmica, na presença de anti-inflamatórios e infusões de *Camellia sinensis* (chá verde e preto).

Amostras	Temperatura (°C)	Hemólise (%)
PBS	37	4,45094*
AIE (25µg.mL ⁻¹)	37	24,269*
AIE (50µg.mL ⁻¹)	37	21,9948*
AIE (75µg.mL ⁻¹)	37	21,0527*
PBS	37 / 54	22,6446*
AINE (25µg.mL ⁻¹)	37 / 54	20,7927*
AINE (50µg.mL ⁻¹)	37 / 54	22,4172*
AINE (75µg.mL ⁻¹)	37 / 54	22,7087*
<i>Camellia sinensis</i> (black)		
1:0	37	19,3023*
1:1	37	24,5289*
1:0	37 / 54	50,9421*
1:1	37 / 54	50,2599*
<i>Camellia sinensis</i> (green)		
1:0	37	10,1039*
1:1	37	13,3203*
1:0	37 / 54	55,1332*
1:1	37 / 54	76, 8356*

Os dados correspondem a médias com seus respectivos desvios padrão (n=3). As proporções correspondem ao volume de infusão em relação ao volume total da reação, sendo 1:0 e 1:1 de chá:PBS (v/v), AIE: nimesulida e AINE: prednisolona. Os testes foram avaliados em solução de hematócrito a 2% (v/v). A média dos controles contendo apenas água foi considerada como 100% de hemólise. *Difere estatisticamente do respectivo controle positivo, $p < 0,05$.

Em alguns tipos de chás fermentados, como o chá preto, as catequinas monoméricas são oxidadas ou condensadas para formar teaflavinas (BANCIROVA *et al.*, 2010). Raghava *et al.* (2017) destacam o caráter anti-hemolítico do extrato aquoso de *C. sinensis*, além disso, é relatada a diminuição da hemólise induzida por estresse oxidativo em eritrócitos, na presença de chá verde e chá preto, sendo as catequinas e teaflavinas apontadas como as principais responsáveis pelo efeito. Estes relatos de literatura apontam um possível mecanismo que explicaria o comportamento dos chás avaliados no teste de estabilidade de membrana.

Diversos efeitos biológicos da teaflavina foram atribuídos à sua propriedade antioxidante, embora o mecanismo exato em muitos casos não seja completamente explicado (FATIMA *et al.*, 2013). É relatado que as teaflavinas presentes em chá preto, como a teaflavina-3,3'-digalato, são inibidoras de proteases mais eficazes do que as catequinas presentes no chá verde (CHEN *et al.*, 2005).

3.3 Atividade citotóxica sobre eritrócitos humanos

Nos ensaios de hemólise em gel, a peçonha, utilizada como indutora de lise, teve sua atividade inibida em 50,00% pelo chá de erva-mate e 58,33% pelo chá preto. As infusões de chá verde, erva-cidreira e capim-limão, exerceram menor efeito inibidor, sendo observadas para as maiores doses, as respectivas porcentagens de inibição, 44,44%, 41,67% e 38,89%. Inibições menores, porém estatisticamente significantes, foram observadas para os chás de camomila (27,78%), erva-doce (25,00%) e hortelã (19,44%). Sendo assim, nas condições experimentais avaliadas, a inibição da hemólise induzida pela peçonha de *B. moojeni*, foi mais efetiva para os chás preto e de erva-mate (Figura 2), assim como no teste fosfolipásico.

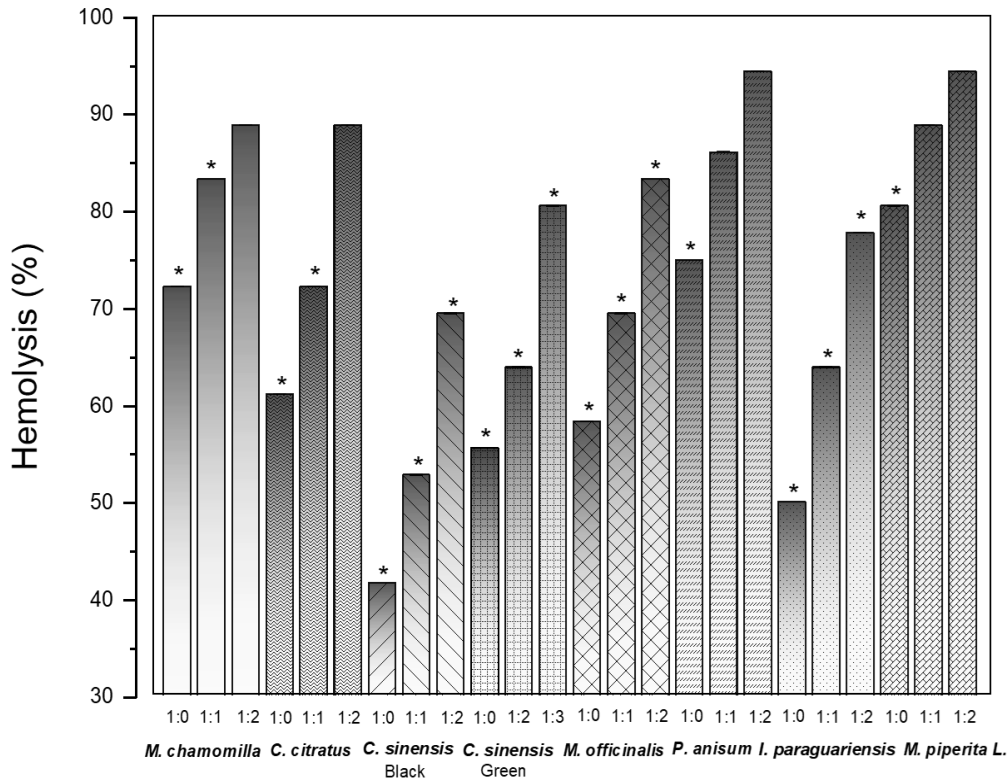


Figura 2. Atividade hemolítica realizada em meio semissólido, induzida pela peçonha de *Bothrops moojeni* (10µg), avaliada após incubação com as infusões por 30 minutos a

37°C. Os dados correspondem a médias com seus respectivos desvios padrão (n=3). As proporções correspondem ao volume de infusão em relação ao volume total da reação, sendo 1:0, 1:1 e 1:2 de chá:PBS (v/v). A média dos controles contendo apenas peçonha foi considerada como 100% de atividade. *Difere estatisticamente do respectivo controle positivo, $p < 0,05$.

Dentre as classes de enzimas presentes na peçonha utilizada como indutora de hemólise, destacam-se as metaloproteases com domínio disintegrina e região rica em cisteínas em suas estruturas, caracterizadas por ação citotóxica, hemorrágica e trombolítica (OLIVEIRA *et al.*, 2016; CATE *et al.*, 2017). O efeito inibidor dos chás sobre a atividade hemolítica corroboram relatos de literatura, na qual a rica composição fenólica vegetal está associada à inibição de proteases (PATIÑO *et al.*, 2013; SAAVEDRA *et al.*, 2018;).

As proteases estão associadas ao processo hemorrágico, agregação plaquetária e coagulação (QUEIROZ *et al.*, 2017). De acordo com Saavedra *et al.* (2018), inibidores naturais de natureza não proteica, como é o caso dos compostos fenólicos, realizam interações hidrofóbicas com resíduos aromáticos de aminoácidos presentes na estrutura das enzimas, além de promover a complexação com íons metálicos (IZIDORO *et al.*, 2014; QUEIROZ *et al.*, 2017).

3.4 Atividade proteolítica sobre a caseína

A degradação da caseína foi avaliada utilizando a peçonha de *B. moojeni* como fonte de proteases, e a ação inibidora das infusões de ervas sobre a catálise exercida pelas proteases, foi avaliada após incubação destas com 10µg de peçonha, por período de 30 min. a 37°C. As inibições mais significativas estatisticamente foram observadas para o chá preto (40,74%), verde (31,48%) e erva-mate (25,93%). As demais infusões, exerceram inibições menores, porém estatisticamente significantes em relação ao controle positivo, sendo elas, 14,81% para a camomila, 16,67% para o capim-limão, 14,81% para a erva-cidreira e erva-doce, e 12,96% para a hortelã (Figura 3).

Os desvios padrões relativos das amostras citadas (todos <5,00%) indicam concordância entre os dados, sendo assim, nas condições experimentais avaliadas, a inibição das proteases presentes na peçonha de *B. moojeni* foi mais efetiva para os chás preto, verde e de erva-mate.

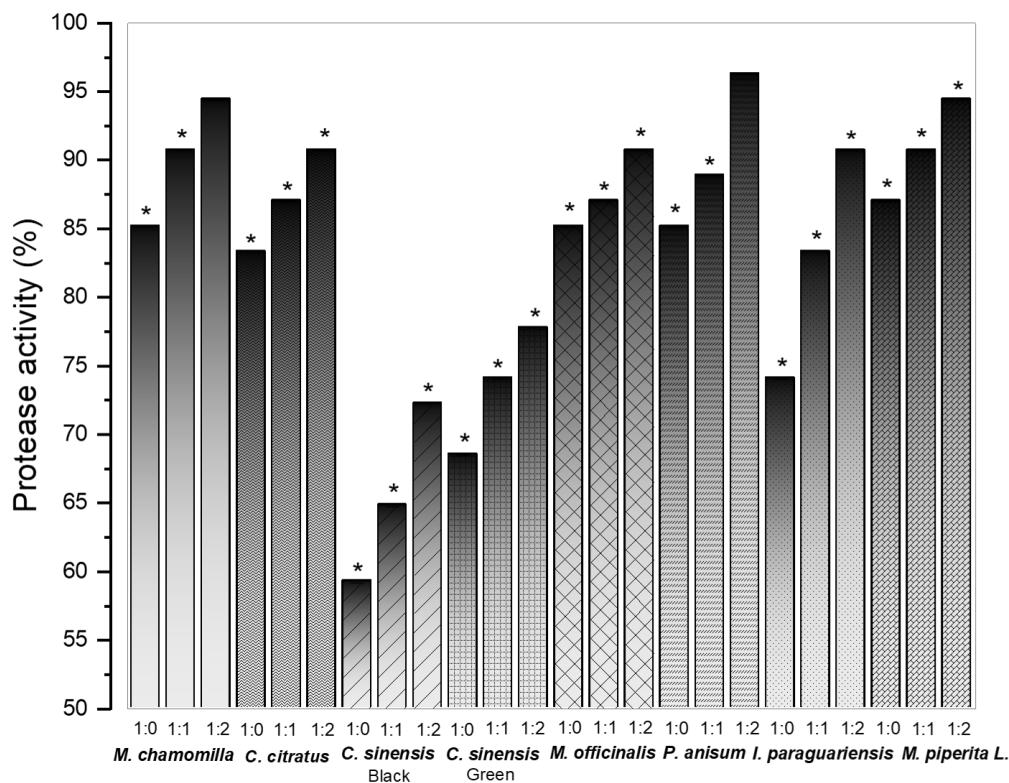


Figura 3. Atividade de proteases da peçonha de *Bothrops moojeni* (10µg), avaliada após incubação com as infusões por 30 minutos a 37°C. Os dados correspondem a médias com seus respectivos desvios padrão (n=3). As proporções correspondem ao volume de infusão em relação ao volume total da reação, sendo 1:0, 1:1 e 1:2 de chá:PBS (v/v). A média dos controles contendo apenas peçonha foi considerada como 100% de atividade. *Difere estatisticamente do respectivo controle positivo, $p < 0,05$.

As inibições exercidas pelos chás na atividade citotóxica corroboram os resultados observados na atividade proteolítica sobre caseína, uma vez que grande parte da ação hemolítica exercida pela peçonha pode ser atribuída à proteases.

As principais moléculas de origem vegetal descritas em literatura com ação inibidora sobre proteases, sobretudo as que compõem peçonhas de serpentes, são compostos fenólicos, como por exemplo, quercetina, kaempfero, catequinas, teaflavinas e os ácidos cafeico e gálico (CHEN *et al.* 2005; LIU, 2014; MAHMOOD *et al.*, 2016; XUE *et al.*; XU *et al.*, 2017).

Dentre as amostras testadas, as infusões de *Camellia sinensis* (chá preto e chá verde) foram as mais eficientes na redução da atividade proteolítica. O chá verde é uma fonte rica em compostos de interesse biológico, sobretudo, compostos fenólicos, estando em maior quantidade as catequinas (PINTO, 2013; DAS *et al.*, 2018).

3.5 Atividade fibrinogenolítica

As infusões de chá verde (3 e 4) e chá mate (5 e 6) foram capazes de diminuir a atividade proteolítica induzida pela peçonha *B. moojeni* sobre as cadeias α e β do fibrinogênio, quando comparado ao controle peçonha com fibrinogênio (8), no entanto, o chá-mate na proporção 1:2 demonstra-se ligeiramente vantajoso frente aos demais tratamentos (Figura 4). Assim, esse resultado de inibição de atividade fibrinogenolítica corrobora a ação inibidora dos compostos fenólicos presentes nos chás sobre a atividade de proteases presentes na peçonha.

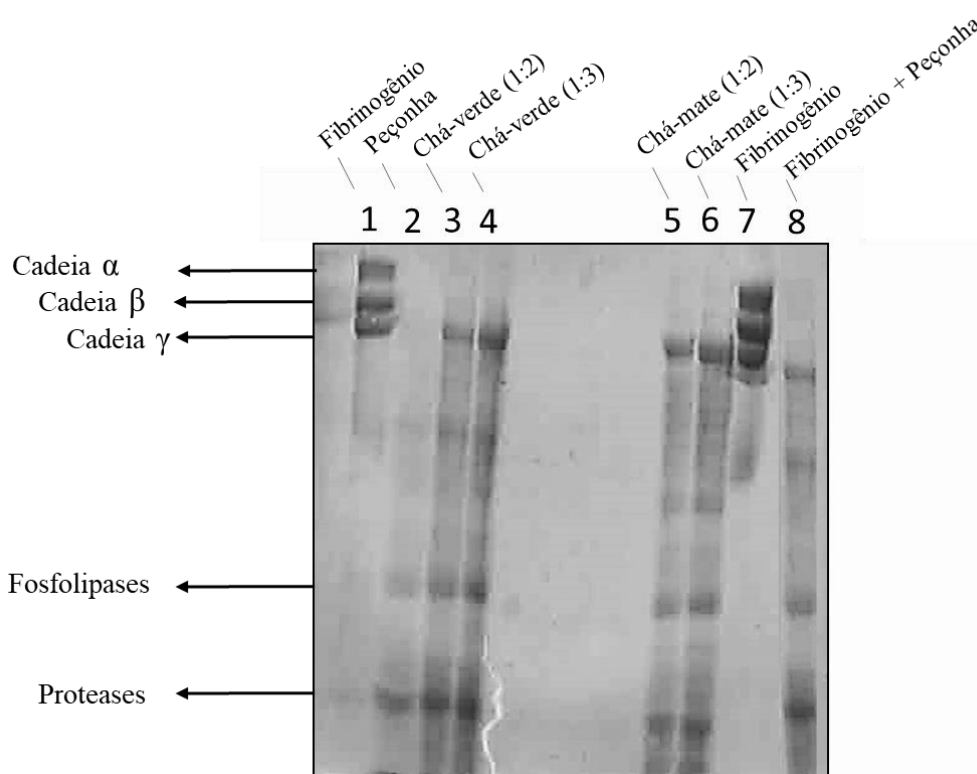


Figura 4. Perfil eletroforético (SDS-PAGE) do resultado da ação proteolítica induzida pela peçonha de *Bothrops moojeni* sob fibrinogênio na ausência e presença de infusões de chá verde (*Camellia sinensis*, green) e chá-mate (*Ilex paraguariensis*) nas proporções 1:2 e 1:3 (volume de infusão em relação ao volume reacional). 1- fibrinogênio (60 μ g); 2- *B. moojeni* (60 μ g); 3- *B. moojeni* + fibrinogênio + *C. sinensis* (1:2 v/v); 4- *B. moojeni* + fibrinogênio + *C. sinensis* (1:3 v/v); 5- *B. moojeni* + fibrinogênio+ *I. paraguariensis* (1:2 v/v); 6- *B. moojeni* + fibrinogênio + *I. paraguariensis* (1:3 v/v); 7- fibrinogênio (50 μ g); 8- *B. moojeni* (60 μ g) + fibrinogênio.

As fibrinogenases (como as metaloproteases α -fibrinogenase e β -fibrinogenase) contidas na peçonha de *B. moojeni* (ZHANG, 2015) foram inibidas na presença de infusões de erva mate e chá verde, corroborando assim os resultados do teste proteolítico e hemolítico (seção 3.3 e 3.4), que também apresentaram redução da atividade destas enzimas, além disso, acredita-se que o mecanismo de inibição de fibrinogenases seja similar aos já citados neste trabalho, como por complexação de cofatores e/ou interação hidrofóbicas entre os compostos bioativos e os sítios catalíticos (QUEIROZ *et al.*, 2017; SAAVEDRA *et al.*, 2018).

3.6 Atividade Coagulante

A dose mínima coagulante utilizada foi de 10 μ g da peçonha de *B. moojeni*. Nos ensaios com incubação de plasma/infusão e posterior adição de peçonha, o tempo de coagulação foi prolongado para todas as amostras, sendo o maior tempo observado para as amostras com proporção 1:0 (Tabela 2A). Os incubados de chá verde, chá preto e erva-cidreira, apresentaram tempo de coagulação de aproximadamente o dobro do tempo obtido para o grupo controle, contendo apenas peçonha.

Nos ensaios com incubação de infusão/peçonha e posterior adição de plasma, o prolongamento do tempo de coagulação foi observado em todas as amostras, com valores mais significantes para as amostras elaboradas com proporção 1:0 (Tabela 2B). Os tratamentos com chá verde e chá preto apresentaram tempos de coagulação aproximadamente 2 vezes maior que o controle peçonha, na proporção 1:0. Em ambos ensaios (A e B) o chá preto se destacou promovendo os maiores tempos até a formação de coágulos rígidos, especialmente nos tratamentos em que foi previamente incubado com a peçonha (132,33 \pm 4,04 s; proporção 1:0, chá:PBS).

Tabela 2. Tempo de coagulação de plasma citratado, induzida por peçonha de *Bothrops moojeni*, procedendo incubação prévia das infusões com o plasma e posterior adição da peçonha (A), e incubação prévia das infusões com a peçonha e posterior adição de plasma (B).

Tempo de coagulação de plasma citratado (segundos)

Controle (<i>Bothrops moojeni</i> 10 μ g)	60,66 \pm 3,05
--	------------------

(A) Incubação plasma + infusão e posterior adição da peçonha

Amostra	Razão Infusão:PBS (v:v)	Segundos
<i>Camellia sinensis</i> (green)	1:0	117,00±7,00*
	1:1	79,00±6,24*
<i>Camellia sinensis</i> (black)	1:0	127,66±6,50*
	1:1	105,00±10,81*
<i>Ilex paraguariensis</i>	1:0	103,00±4,34*
	1:1	98,33±7,50*
<i>Melissa officinalis</i>	1:0	121,33±6,11*
	1:1	94,66±4,04*

(B) Incubação infusão + peçonha e posterior adição no plasma

Amostra	Razão Infusão:PBS (v:v)	Segundos
<i>Camellia sinensis</i> (green)	1:0	111,33±8,02*
	1:1	101,33±8,14*
<i>Camellia sinensis</i> (black)	1:0	132,33±4,04*
	1:1	94,00±8,18*
<i>Ilex paraguariensis</i>	1:0	108,33±7,57*
	1:1	106,00±6,08*
<i>Melissa officinalis</i>	1:0	94,66±5,03*
	1:1	89,33±7,04*

Os dados correspondem a médias com seus respectivos desvios padrão (n=3) e $p < 0.05$. As proporções correspondem ao volume de infusão em relação ao volume total da reação, sendo 1:0 e 1:1 de chá:PBS (v/v). *Difere estatisticamente do respectivo controle positivo, $p < 0,05$.

A prospecção de moduladores de fosfolipases e proteases, em matrizes vegetais é de grande relevância para o controle de distúrbios no sistema hemostático, devido a ação de compostos vegetais (principalmente flavonoides) na formação de complexos com íons Ca^{2+}/Zn^{2+} , cofatores de enzimas ligadas à hemostasia, resultando não somente na inibição de PLA_2s , mas também da ação coagulante de proteases humanas que atuam na cascata de coagulação (MOURA *et al.*, 2016; CATE *et al.*, 2017).

Em comparação ao controle peçonha, os incubados, especialmente os de chá preto, apresentaram aumento significativo no tempo de coagulação, provavelmente por atuarem como inibidores de algumas enzimas (como as proteases pró-coagulantes), podendo ser explorado com potencial de aplicação em tratamento de doenças cardiovasculares. Abre-se assim, novas possibilidades de estudos para avaliar o potencial farmacológico, eficácia e segurança dessas infusões de ervas.

3.7 Atividade sobre trombos sanguíneos

Quando comparados ao controle contendo apenas peçonha, (considerado como 100% de lise dos trombos), verificou-se que todos os controles com chá puro apresentaram caráter trombolítico, promovendo a dissolução dos trombos em proporções superiores à induzida pela peçonha, com destaque para a camomila com valor 2,7 vezes maior que o da peçonha (273,55% de dissolução) (Figura 5).

De forma oposta, os tratamentos com erva-cidreira e erva-mate na menor dose, e hortelã na maior dose, resultaram em ação trombótica, havendo redução na liberação de líquido em comparação ao controle negativo (PBS) (Figura 5).

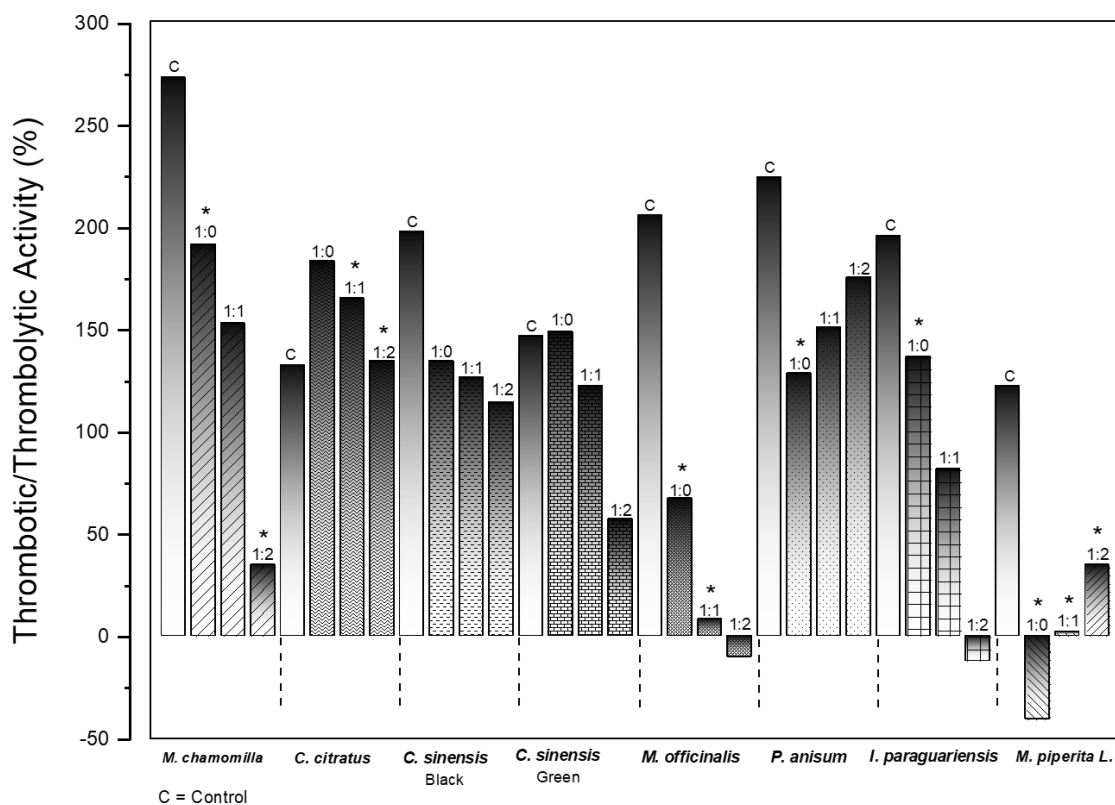


Figura 5. Efeito das infusões de ervas sobre a dissolução de trombos sanguíneos exercida pela peçonha de *Bothrops moojeni* (30 μ g), avaliado após incubação por 30 minutos a 37°C. Os dados correspondem a médias com seus respectivos desvios padrão (n=3). As proporções correspondem ao volume de infusão em relação ao volume total da reação, sendo 1:0, 1:1 e 1:2 de chá:PBS (v/v). A média dos controles contendo apenas peçonha (controle positivo) foi considerada como 100% de atividade. A média do volume desprendido pelos trombos tratados apenas com PBS (controle negativo) foi descontada dos demais tratamentos. C = correspondem aos controles tratados apenas com as infusões, sem peçonha. *Difere estatisticamente do respectivo controle positivo, $p < 0.05$.

A lise dos trombos sanguíneos está associada à proteases com ação hemorrágica, fibrin(ogen)olítica e citotóxica, cujas estruturas apresentam, em sua maioria, os domínios disintegrina e rico em cisteínas (BARALDI *et al.*, 2016). Embora as mesmas classes de enzimas da peçonha estejam associadas a lise dos trombos e a hemólise, o padrão de comportamento das infusões no teste de hemólise foi diferente do padrão observado no ensaio trombolítico, embora ambos resultados apontem para a presença de inibidores de proteases nas infusões avaliadas. Isso pode ser explicado pela presença de compostos nas infusões, que afetam a integridade dos trombos, como por exemplo, agentes antiplaquetários, fibrinolíticos e ativadores de plasminogênio (AL-HORANI *et al.*, 2018). Em adição, devemos considerar a diversidade de moléculas presentes tanto nas infusões quanto na peçonha, agindo sobre substratos distintos, sendo apenas eritrócitos livre no teste de hemólise e uma complexa trama de moléculas (lipídios, carboidratos e proteínas) e células (eritrócitos e leucócitos) no teste de avaliação de efeitos sobre trombos (elaborado com sangue total de voluntário sem jejum).

As substâncias bioativas contidas em extratos vegetais podem alterar a forma dos sítios de coordenação dos cofatores presentes nas estruturas de proteases, assim, interferem na ligação dos cofatores, e como resultado alteram as propriedades catalíticas das enzimas. Metabolitos secundários de extratos de plantas são relatados como agentes de neutralização do efeito hemorrágico induzido por peçonha de *Bothrops asper*, além disso, extratos ricos em flavonoides são apontados como capazes de quelar íons como o Zn^{2+} , fundamentais para a atividade enzimática de metaloproteases (PATIÑO *et al.*, 2013; OLIVEIRA *et al.*, 2015).

Assim, a expressiva redução, tanto da atividade proteolítica, quanto da hemólise, na presença do chá preto, pode estar associada a ação dessas biomoléculas na modulação de proteases.

CONCLUSÃO

As infusões de ervas apresentaram potencial de uso nutracêutico, podendo exercer ação adjuvante no tratamento de doenças com origem ou progressão inflamatória, com efeitos provavelmente associados ao conteúdo de compostos fenólicos, em especial flavonoides, presentes nos chás.

A atividade fosfolipásica foi inibida em mais de 25% na presença de chá preto e chá-mate, sendo apontados como os possíveis responsáveis pela modulação de PLA₂s os flavonoides quercetina e kaempferol, presentes em quantidades expressivas nessas infusões e descritos previamente em literatura. A atividade hemolítica foi reduzida significativamente nos tratamentos com infusões de *C. sinensis* (verde e preto) e *I. paraguariensis* (chá mate), assim, a redução da hemólise pode estar associada às interações hidrofóbicas entre flavonoides e os resíduos aromáticos de aminoácidos presentes na estrutura das enzimas, além da possível complexação com seus cofatores. A inibição de proteases foi mais efetiva em tratamentos utilizando chá preto e chá verde, sendo os compostos fenólicos quercetina, kaempferol, catequinas e teaflavinas indicados como prováveis moduladores. O chá preto se destacou dentre os demais ao retardar por mais tempo a coagulação do plasma, especialmente no tratamento prévio com peçonha.

Desta forma, é possível concluir que uma rotina de consumo de infusões de ervas, como o chá preto, chá verde e chá mate, poderia resultar em benefícios à saúde humana, tanto pela elevada quantidade de compostos bioativos antioxidantes que exercem efeitos na prevenção de doenças, quanto por sua capacidade de modular a atividade de enzimas ligadas ao sistema hemostático, com possíveis efeitos no tratamento complementar às doenças inflamatórias e cardiovasculares.

REFERÊNCIAS

- ACHKAR M, NOVAES GM, SILVA MJD E VILEGAS W. 2013. Propriedade antioxidante de compostos fenólicos: importância na dieta e na conservação de alimentos. Revista da Universidade Vale do Rio Verde, Três Corações, v. 11, n. 2, p. 398-406.
- AL-HORANI RA AND AFOSAH DK. 2018. Recent advances in the discovery and development of factor XI/XIa inhibitors. Medicinal research reviews, Vol.38, cap.6, p 1974-2023.
- ANANTHARAJU PG, GOWDA PC, VIMALAMBIKE MG AND MADHUNAPANTULA SV. 2016. An overview on the role of dietary phenolics for the treatment of cancers. Nutrition Journal, v. 15, n. 99, p. 1-16.
- ANIL UT AND AJAY KS. 2011. Further studies on membrane stabilizing, anti-inflammatory and FCA induced arthritic activity of various fractions of bark of *Machilus macrantha* in rats. Rev bras farmacogn. vol.21 no.6.

BANCIROVA M. 2010. Comparison of the antioxidant capacity and the antimicrobial activity of black and green tea. *Food Research International*, 43.5: 1379-1382.

BARALDI PT, MAGRO AJ, MATIOLI FF, MARCUSSI S, LEMKE N, CALDERON, LA AND FONTES MR. 2016. A novel synthetic quinolinone inhibitor presents proteolytic and hemorrhagic inhibitory activities against snake venom metalloproteases. *Biochimie*, 121, 179-188.

BEDROOD ZMR AND HOSSEINZADEH H. 2018. "Toxicological effects of *Camellia sinensis* (green tea): a review," *Phytotherapy Research*, vol. 32, no. 7, pp. 1163.

BLUM-SILVA CH, CHAVES VC, SCHENKEL EP, COELHO GC AND REGINATTO FH. 2015. The influence of leaf age on methylxanthines, total phenolic content, and free radical scavenging capacity of *Ilex paraguariensis* aqueous extracts. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, 25, 1-6.

BOJIC M, HAAS VS, SARIC D AND MALES Z. 2013. Determination of Flavonoids, Phenolic Acids, and Xanthines in Mate Tea (*Ilex paraguariensis*). *Journal of Analytical Methods in Chemistry*, vol. 2013, 1-6.

BURKARD M, LEISCHNER C, LAUER UM, BUSCH C, VENTURELLI S AND FRANK J. 2017. Dietary flavonoids and modulation of natural killer cells: implications in malignant and viral diseases. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 46, 1-12.

CARVALHO BMA, SANTOS JDL, XAVIER BM, ALMEIDA JR, RESENDE L M, MARTINS W AND SOARES AM. 2013. Snake venom PLA2s inhibitors isolated from Brazilian plants: synthetic and natural molecules. *BioMed research international*, vol. 2013.

CATE HT, HACKENG TM AND FRUTOS PG. 2017. Coagulation factor and protease pathways in thrombosis and cardiovascular disease. *J. Thromb. Haemost.* vol.117, 1265-1271.

CHEN CN, LIN CP, HUANG KK, CHEN WC, HSIEH HP, LIANG PH AND HSU JTA. 2005. Inhibition of SARS-CoV 3C-like protease activity by theaflavin-3, 3'-digallate (TF3). *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2(2), 209-215.

CHUNGAG BN, OYEDEJI OO AND OYEDEJI AO. 2015. NDEBIA EJ. Anti-inflammatory and membrane-stabilizing properties of two semisynthetic derivatives of oleanolic acid. *Inflammation*. 38(1):61-9.

CINTRA ACO, TONI LGBD, SARTIM MA, FRANCO JJ, CAETANO RC, MURAKAMI MT AND SAMPAIO SV. 2012. Batroxase, a new metalloproteinase from *B. atrox* snake venom with strong fibrinolytic activity. *Toxicon*, 60:70–82.

COELHO M, ROCHA LC, CUNHA LM, CARDOSO L, ALVES RC, LIMA MJ, PEREIRA PMC AND PINTADO M. 2016. Influence of harvesting factors on sensory attributes and phenolic and aroma compounds composition of *Cymbopogon citratus* leaves infusions. *Food Research International*, 89, 1029-1037.

CORREA VG, TURECK C, LOCATELI G, PERALTA RM AND KOEHNLEIN EA. 2015. Estimate of consumption of phenolic compounds by Brazilian population. *Brazilian Journal of Nutrition*, 28, 185-196.

COTRIM CA, DE OLIVEIRA SCB, FILHO EBD, FONSECA FV, BALDISSERA JR L, ANTUNES E & OLIVEIRA TDD. 2011. Quercetin as an inhibitor of snake venom secretory phospholipase A2. *Chemico-Biological Interactions*, 189 (1-2), 9-16.

COUTINHO MAS, MUZITANO MF AND COSTA SS. 2009. Flavonoids: potential therapeutic agents for the inflammatory process. *Revista Virtual de Química*; 1:241-256.

COZZOLINO SMF. 2012. Biodisponibilidade de Nutrientes (4ª edição), Manole (Barueri -SP-Brasil), 4, 879-914.

DAS PR AND EUN JB. 2018. A comparative study of ultra-sonication and agitation extraction techniques on bioactive metabolites of green tea extract. *Food Chemistry*, 253, 22-29.

FATIMA M, KESHARWANI RK, MISRA K AND RIZVI SI. 2013. Protective effect of theaflavin on erythrocytes subjected to in vitro oxidative stress. *Biochem Res Int*. vol. 2013.

GUIMARÃES CL, MOREIRA-DILL LS, FERNANDES RS, COSTA TR, HAGEMELIM LI, MARCUSSI S, CARVALHO BM, DA SILVA SL, ZULIANI JP, FERNANDES CF, CALDERON LA, SOARES AM AND STABELI RG. 2014. Biodiversity as a source of bioactive compounds against snakebites. *Curr Med Chem.*, 21(25), 2952-2979.

GUIMARÃES LGL, CARDOSO MG, SOUSA PE, ANDRADE J E VIEIRA SS. 2011. Atividades antioxidante e fungitóxica do óleo essencial de capim-limão e do citral. *Revista Ciência Agronômica*, v. 42, n. 2, p. 464-472.

GUO C, LIU S, YAO Y, ZHANG Q AND SUN MZ. 2012. Past decade study of snake venom L-amino acid oxidase. *Toxicon*, 60(3), 302-311.

GUTIÉRREZ J, AVILA C, ROJAS E AND CERDAS L. 1988. An alternative in vitro method for testing the potency of the polyvalent antivenom produced in Costa Rica. *Toxicon*, 26:411-413.

GUTIÉRREZ JM, WILLIAMS D, FAN HW AND WARRELL DA. 2010. Snakebite envenoming from a global perspective: Towards an integrated approach. *Toxicon*, 56:1223-35.

GUTIÉRREZ, JM, RUCAVADO A, ESCALANTE T, LOMONTE B, ANGULO Y AND FOX JW. 2010. Tissue pathology induced by snake venoms: How to understand a complex pattern of alterations from a systems biology perspective? *Toxicon*, 55(1), 166-170.

IZIDORO LFM, SOBRINHO JC, MENDES MM, COSTA TR, GRABNER AN, RODRIGUES VM, AND CALDERON LA. 2014. Snake venom L-amino acid oxidases: trends in pharmacology and biochemistry. *BioMed research international*, vol. 2014.

FÉLIX-SILVA J, SILVA-JUNIOR AA, ZUCOLOTTO S M AND FERNANDES-PEDROSA MDF. 2017. Medicinal plants for the treatment of local tissue damage induced by snake venoms: an overview from traditional use to pharmacological evidence. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, vol. 2017.

KERIO LC, WACHIRA FN, WANYOKO JK AND ROTICH MK. 2013. Total polyphenols, catechin profiles and antioxidant activity of tea products from purple leaf coloured tea cultivars. *Food Chemistry*, 136, 1405-1413.

KUMAR, KR, VENNILA R, KANCHANA S, ARUMUGAM ME AND BALASUBRAMANIAM T. 2011. Fibrinolytic and anticoagulant activities in the tissue covering the stingers of marine stingrays *Dasyatis sephen* and *Aetobatis narinari*. *Journal of Thrombosis and Thrombolysis*, v. 31, n. 4, p 464-471.

LAEMMLI UK. 1970. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature*, 227:680–685.

LIU L, JIN C AND ZHANG Y. 2014. Lipophilic phenolic compounds (Lipo-PCs): emerging antioxidants applied in lipid systems. *Rsc Advances*, 4(6), 2879-2891.

LIU Y, LUO XL, LAN ZQ, TANG JR, ZHAO P AND KAN H. 2018. Ultrasonic-assisted extraction and antioxidant capacities of flavonoids from *Camellia fascicularis* leaves. *Cyta-Journal of Food*, 16, 105-112.

QUEIROZ MR, DE SOUSA BB, DA CUNHA PDF, MAMEDE CCN, MATIAS MS, DE MORAIS NCG AND DE OLIVEIRA F. 2017. The role of platelets in hemostasis and the effects of snake venom toxins on platelet function. *Toxicon*, 133, 33-47.

MAHMOOD MS, MÁRTINEZ JL, ASLAM A, RAFIQUE A, VINET R, LAURIDO C, AND ALI S. 2016. Antiviral effects of green tea (*Camellia sinensis*) against pathogenic viruses in human and animals (a mini-review). *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines*, 13(2), 176-184.

MARQUES TR, CAETANO AA, SIMÃO AA, CASTRO FCO, RAMOS VO AND CORRÊA AD. 2016. Metanolic extract of *Malpighia emarginata* bagasse: phenolic compounds and inhibitory potential on digestive enzymes. *Rev Bras Farmacogn*. 26(2), 191-196.

MORAES-DE-SOUZA RA, OLDONI TLC, REGITANO-D'ARCE MAB AND ALENCAR SM. 2008. Antioxidant activity and phenolic composition of herbal infusions consumed in Brazil. *Ciencia Y Tecnologia Alimentaria*, 6, 41-47.

MORAIS SM, CAVALCANTI ESB, COSTA SMO AND AGUIAR LA. 2009. Antioxidant action of teas and seasonings more consumed in Brazil. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, 19, 315-320.

MOURA VM, SILVA WC, RAPOSO JD, FREITAS-DE-SOUSA LA, DOS-SANTOS MC, OLIVEIRA RB AND VERAS MOURÃO RH. 2016. The inhibitory potential of the condensed-tannin-rich fraction of *Plathymania reticulata* Benth. (*Fabaceae*) against *Bothrops atrox* envenomation. *J Ethnopharmacology* 13: 136-142.

NKEH-CHUNGAG BN, OYEDEJI OO, OYEDEJI AO AND NDEBIA EJ. 2015. Anti-inflammatory and membrane-stabilizing properties of two semisynthetic derivatives of oleanolic acid. *Inflammation*, 38(1):61-9.

OLIVEIRA CHM, SIMAO AA AND MARCUSSI S. 2015. Inhibitory effects of ascorbic acid, vitamin E, and vitamin B-complex on the biological activities induced by *Bothrops venom*. *Pharmaceutical Biology*, vol. 2015.

OLIVEIRA CH, SIMÃO AA, TRENTO MV, CÉSAR PH AND MARCUSSI S. 2016. Inhibition of proteases and phospholipases A2 from *Bothrops atrox* and *Crotalus durissus terrificus* snake venoms by ascorbic acid, vitamin E, and B-complex vitamins. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 88(3).

OLIVEIRA DM E BASTOS DHM. 2011. Biodisponibilidade de ácidos fenólicos. *Química Nova* vol.34 no.6, 1051-1056.

PATIÑO AC, BENJUMEA DM AND PEREAÑEZ JA. 2013. Inhibition of venom serine proteinase and metalloproteinase activities by *Renealmia alpínia* (*Zingiberaceae*) extracts: Comparison of wild and *in vitro* propagated plants. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 149, p. 590-596.

PELUSO I AND SERAFINI M. 2017. Antioxidants from black and green tea: from dietary modulation of oxidative stress to pharmacological mechanisms. *Br. J. Pharmacol.* 174(11), 1195-1208.

PINTO MD. 2013. Tea: A new perspective on health benefits. *Food Research International*, 53, 558-567.

PIOVEZAN-BORGES AC, VALÉRIO-JÚNIOR C, GONÇALVES IL, MIELNICZKI-PEREIRA AA AND VALDUGA AT. 2016. Antioxidant potential of yerba mate (*Ilex paraguariensis*) extracts in *Saccharomyces cerevisiae* deficient in oxidant defense genes. *Brazilian Journal of Biology*, vol.76 no.2.

PRETÉ PSC, DOMINGUES CC, MEIRELLES NC, MALHEIROS SVP, GOÑI FM, DE PAULA E AND SCHREIER S. 2011. Multiple stages of detergent-erythrocyte membrane interaction—A spin label study. *Biochim Biophys Acta - Biomembr*, 1808:164–170.

R CORE TEAM. 2012. R: A Language and Environment for Statistical Computing. Viena: Viena: R Foundation for Statistical Computing; 2012.

RAGHAVA KP, HAKIRA A, KIRANMAI, GS, REDDY YH, KARTHEEK C AND BABU AMSS. 2017. Evaluation of anti-hemolytic activity of green tea aqueous extracts by *in vitro* method. *International Journal of Research in Pharmacology & Pharmacotherapeutics*, vol.6, issue 2.

RODRIGUES VM, SOARES AM, GUERRA-SÁ R, RODRIGUES V, FONTES MR AND GIGLIO JR. 2000. Structural and functional characterization of neuwiedase, a nonhemorrhagic fibrin(ogen)olytic metalloprotease from *Bothrops neuwiedi* snake venom. *Arch Biochem Biophys*, 381:213–24.

ROSSA UB, ANGELO AC, MAZUCHOWSKI JZ, WESTPHALEN DJ, FRIZON CNT AND MARTINS CEN. 2017. Influence of light and fertilizers on methylxanthines and phenolic compounds in leaves of mate tea. *Ciência Florestal*, 27, 1365-1374.

SAAVEDRA SL, AVILA L, GIUDICCESSI SL, ALBERICIO F, CAMPERI, SA, CASCONO O, MARTINEZ E E CERON MC. 2018. Inibidores naturais do veneno de serpentes e seus usos farmacêuticos: desafios e possibilidades. *Curr Pharm Des* 24, 1737 - 1747.

SELISTRE HS, QUEIROZ LS, CUNHA OAB, DE SOUZA GEP AND GIGLIO JR. 1990. Isolation and characterization of hemorrhagic, myonecrotic and edema-inducing toxins from *Bothrops insularis* (jararaca ilhoa) snake venom. *Toxicon*, 28:261–273.

TEIXEIRA ML, MARCUSSI S, DE CSR, DANUBIA A, MAGALHÃES ML, NELSON DL AND CARDOSO MDG. 2019. Essential Oil from *Lippia origanoides* (*Verbenaceae*): Haemostasis and Enzymes Activity Alterations. *Medicinal Chemistry*, 15(2), 207-214.

WANG WJ, SHIH CH AND HUANG TF. 2004. A novel P-I class metalloproteinase with broad substrate-cleaving activity, agkislysin, from *Agkistrodon acutus* venom. *Biochem Biophys Res Commun*, 324:224–30.

WILLIAMS LA, O'CONNAR A, LATORE L, DENNIS O, RINGER S, WHITTAKER JA, CONRAD J, VOGLER B, ROSNER H AND KRAUS W. 2008. The *in vitro* anti-denaturation effects induced by natural products and non-steroidal compounds in heat treated (immunogenic) bovine serum albumin is proposed as a screening assay for the detection of anti-inflammatory compounds, without the use of animals, in the early stages of the drug discovery process. *West Indian Med J.*; 57(4):327-31.

XU, XH, ZHAO C, PENG Q, XIE P AND LIU QH. 2017. Kaempferol inhibited VEGF and PGF expression and *in vitro* angiogenesis of HRECs under diabetic-like environment. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 50(3).

XUE G, GONG L, YUAN C, XU M, WANG X, JIANG L AND HUANG MA. 2017. Structural Mechanism of Flavonoids in Inhibiting Serine Proteases. *Food Funct.* 8, 2437–2443.

TAN Y, CHANG SKC AND ZHANG Y. 2017. Comparison of α -amylase, α -glucosidase and lipase inhibitory activity of the phenolic substances in two black legumes of different genera. *Food Chem.*, 214, 259–268.

YIN DD, YUAN RY, WU Q, LI SS, SHAO S, XU YJ, HAO XH AND WANG LS. 2015. Assessment of flavonoids and volatile compounds in tea infusions of water lily flowers and their antioxidant activities. *Food Chemistry*, 187, 20-28.

ZHANG Y. Why do we study animal toxins? *Dongwuxue Yanjiu* 36, 183–222, 2015.

ZARGAR B, MAJEED D, GANAI SA, MIR SA AND DAR BN. 2018. Effect of different processing parameters on antioxidant activity of tea. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 12, 527-534.

ZIELINSKI AAF, HAMINIUK CWI, ALBERTI A, NOGUEIRA A, DEMIATE IM AND GRANATO D. 2014. A comparative study of the phenolic compounds and the *in vitro* antioxidant activity of different Brazilian teas using multivariate statistical techniques. Food Research International, 60, 246-254.