



PEDRO HENRIQUE SOUZA CESAR

**Avaliação do potencial protetor de compostos
fenólicos sobre atividades tóxicas induzidas por
peçonhas de *Bothrops* spp. e *Crotalus durissus*
*terrificus***

**LAVRAS-MG
2016**

PEDRO HENRIQUE SOUZA CESAR

Avaliação do potencial protetor de compostos fenólicos sobre atividades tóxicas induzidas por peçonhas de *Bothrops* spp. e *Crotalus durissus terrificus*

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

Orientadora
Profa. Dra. Silvana Marcussi

Co-orientadora
Profa. Dra. Maria das Graças Cardoso

**LAVRAS-MG
2016**

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

Cesar, Pedro Henrique Souza.

Avaliação do potencial protetor de compostos fenólicos sobre
atividades tóxicas induzidas por peçonhas de *Bothrops* spp. e
Crotalus durissus terrificus / Pedro Henrique Souza Cesar. –
Lavras : UFLA, 2016.

124 p. : il.

Dissertação (mestrado acadêmico)–Universidade Federal de
Lavras, 2016.

Orientador(a): Silvana Marcussi.

Bibliografia.

1. Produtos naturais. 2. Ofidismo. 3. Compostos fenólicos. 4.
Toxicologia. 5. Animais Peçonhentos. I. Universidade Federal de
Lavras. II. Título.

PEDRO HENRIQUE SOUZA CESAR

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL PROTETOR DE COMPOSTOS
FENÓLICOS SOBRE ATIVIDADES TÓXICAS INDUZIDAS POR
PEÇONHAS DE *BOTHROPS* SPP. E *CROTALUS DURISSUS*
*TERRIFICUS***

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 29 de Fevereiro de 2016.

Prof. Dr. Luciano José Pereira	UFLA
Prof ^ª . Dr ^ª . Luciana Matos Alves Pinto	UFLA
Prof. Dr. Luiz Gustavo de Lima Guimarães	UFSJ
Prof. Dr. Chrystian Araujo Pereira	UFLA

Prof^ª. Dr^ª. Silvana Marcussi
Orientadora

**LAVRAS - MG
2016**

Aos meus pais, Gilson e Rita, por terem se esforçado tanto para possibilitar os meus estudos. Pelos incentivos, e por me orientar e acalmar nos dias difíceis.

Pelas lições valorosas de vida, que ajudaram a moldar o meu caráter

À minha namorada Heyde, pelo amor e carinho, e pela forma com que me impulsiona a buscar sucesso profissional e realização pessoal. Pela doação incondicional e pelas alegrias ao seu lado

Aos meus irmãos, João e Matheus, que estão sempre desejando o bem, e servindo de moldes para a construção de um Eu pautado na honestidade e perseverança

À minha orientadora Silvana Marcussi, por me guiar neste mundo fantástico que é a pesquisa, que tantas vezes me trouxe satisfação. Pelo modelo de pesquisadora meticulosa e comprometida com a ciência, o qual pretendo seguir

Aos meus amigos Anderson, Henrique e Raphael, que me auxiliaram em tantas etapas da minha vida acadêmica. Etapas que foram essenciais para chegar onde estou e para concluir este trabalho

Às minhas tias Gina e Giane, e ao meu tio Ricardo. Pessoas especiais, que se dispuseram a tornar possível o meu sonho de ingressar em uma universidade de renome. Pelo molde de simplicidade e fraternidade

DEDICO

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Lavras (UFLA), pela estrutura, educação e pelo saber que adquiri aqui. Ao Departamento de Química (DQI), por fornecer a oportunidade de estudo e trabalho, que me possibilitaram a conclusão do

Mestrado

Aos meus queridos professores Dra. Silvana Marcussi, Dra. Ana Paula Peconick, Dr. Luciano José Pereira e Dr. Raimundo Vicente de Sousa

Aos meus colegas de laboratório, uma segunda família

RESUMO

Acidentes ofídicos são um grave problema de saúde pública e que afeta entre 1,2 a 5,5 milhões de pessoas ao redor do mundo. Aproximadamente 125 mil vêm a óbito e outras 400 mil apresentam sequelas permanentes. Embora a soroterapia possa prevenir os danos sistêmicos causados pelo envenenamento, os efeitos locais se mantem, prejudicando a qualidade de vida das vítimas e sua saúde. Tendo em vista o poder curativo que alguns compostos do metabolismo secundário de plantas apresentam contra diversas enfermidades e inclusive contra o ofidismo, este trabalho se propôs a testar os compostos fenólicos, sendo eles o ácido vanílico, o ácido p-cumárico, a catequina e a epicatequina, contra a ação tóxica da peçonha de algumas serpentes do gênero *Bothrops* e da espécie *Crotalus durissus terrificus*. A avaliação dessas propriedades foi realizada *in vitro* através das metodologias: atividade fosfolipásica, hemolítica, trombolítica, coagulante e proteolítica sobre os substratos fibrinogênio, caseína e BAPNA. Os compostos foram incubados previamente por 30 minutos à temperatura ambiente com cada peçonha antes de realizar cada teste. Os compostos avaliados apresentaram inibições sobre todas as atividades avaliadas com exceção apenas da atividade trombólítica induzida por *Crotalus durissus terrificus*. As maiores inibições (30 - 65%) foram observadas contra proteases, e em menor escala as fosfolipases A₂, inibidas em aproximadamente 30%. Com base nos resultados obtidos, os compostos aqui utilizados possuem potencial *in vitro* para controlar os efeitos tóxicos induzidos pelas peçonhas aqui avaliadas.

Palavras-chave: Ácidos fenólicos. Flavonoides. Antiofídico. Peçonha de serpente.

ABSTRACT

Snakebites are considered a serious public health problem that affects 1.2 to 5.5 million people per year, throughout the world. Approximately 125 thousand dies and other 400 thousand survive with permanent sequelae. However serum therapy may prevent systemic damage caused by envenoming, the local effects persists, impairing the quality of life of the victims, as well as its health. Keeping in mind the healing potential of plants secondary metabolites against various comorbidities including snakebites, this work committed to evaluate the phenolic compounds vanillic acid, p-coumaric acid, catechin and epicatechin, against the toxic activities of some *Bothrops* snakes venoms and *Crotalus durissus terrificus* snake venom. These properties evaluation was performed *in vitro* using the methodologies: phospholipase assay, hemolytic assay, thrombolytic, coagulation assay, and proteolytic assay on fibrinogen, casein and BAPNA as substrates. The compounds were incubated previously with snake venoms, for 30 minutes at room temperature before each test. The compounds evaluated presented inhibitions for all activities, except for thrombotic activity of *Crotalus durissus terrificus* venom. The most pronounced inhibitions (30 - 65%) occurred against proteases, and in a lesser proportion phospholipases A₂, inhibited on an average of 30%. Based on our results, the compounds here utilized possess a potential to control *in vitro*, the toxic effects induced by snake venoms, here utilized.

Keywords: Phenolic acids. Flavonoids. Antiophidic. Snake venom.

LISTA DE ABREVIATURAS

AA – Ácido Araquidônico
COX-1 e 2 – Cicloxigenase 1 e 2
DCM – Dose coagulante mínima
kDa – quilo Dalton
MP-I a IV – Metaloprotease classe I, II, III, IV
PBS - phosphate buffered saline
PG – Prostaglandina
PGD₂ – Prostaglandina D₂
PGE₂ – Prostaglandina E₂
PGI₂ – Prostaglandina I₂
PLA₂ – fosfolipase A₂
SVMP – Snake Venom MetalloProteinase
SVSP – Snake Venom Serineprotease
TXA₂ – Tromboxano A₂

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 – Locais da via de coagulação onde atuam as serinoproteases. O ícone de serpente indica o local de atuação.....19
- Figura 2 – Locais da via de coagulação onde atuam as metaloproteases. O ícone de serpente indica o local de atuação.....21
- Figura 3 – Esquema do mecanismo de ação de uma fosfolipase A₂ sobre um fosfolípido. A quebra ocorre na posição sn-2, liberando um lisofosfolípido e um ácido araquidônico.....23
- Figura 4 – Compostos solúveis em água: **a** - ácido fenólico; **b** -fenilpropanoide (ácido cinâmico) **c** – flavonoide.....24
- Figura 5 – Composto fenólico insolúvel em água. Um tanino condensado, formado a partir de unidades de ácido gálico (destacado em cinza).....24

SUMÁRIO

PRIMEIRA PARTE	12
1 INTRODUÇÃO	13
2 REFERENCIAL TEÓRICO	15
2.1 Peçonhas de <i>Bothrops</i> e <i>Crotalus</i>	15
2.1.1 Serinoproteases	16
2.1.2 Metaloproteases	20
2.1.3 Fosfolipases A₂	21
2.2 Compostos Fenólicos	23
2.2.1 Compostos Fenólicos na Inibição de Peçonhas	27
REFERÊNCIAS	30
SEGUNDA PARTE	39
ARTIGO I: Vanillic acid potential use in physiologic alterations induced by snake venoms: a proteases and phospholipases A₂ inhibitor	40
ARTIGO II: Epicatequina e Catequina como inibidores enzimáticos naturais: ação sobre metaloproteases, serinoproteases e fosfolipases A₂	67
ARTIGO III: Ácido <i>p</i>-cumárico e toxinas de serpentes: Interações bioquímicas	100

PRIMEIRA PARTE
Introdução Geral

1 INTRODUÇÃO

Picadas de serpentes são consideradas um problema de saúde pública e afetam em sua maioria, populações das áreas rurais em idade produtiva. Atingindo principalmente as extremidades dos membros como mãos e pés (WHO, 2007). Muitas vezes os indivíduos acometidos por acidentes ofídicos não possuem acesso aos centros que realizam a soroterapia, devido à distância em que habitam ou ainda quando são atendidos não recebem soroterapia específica resultando em um tratamento pouco efetivo (HUI WEN et al., 2015)

A Organização Mundial de Saúde relatou algo em torno de 100.000 mortes anuais, bem como 400.000 amputações e outras notificações graves (infecção, tétano e perda de função do membro atingido), que podem afastar o indivíduo do mercado de trabalho (CHIPPAUX, 2008). Já no Brasil o número chega a 20 mil casos anuais registrados nos centros de saúde, com mortalidade de 0,43% em média, sendo o gênero *Bothrops* (incluindo *Bothrocophias*) responsável por 90,5% dos acidentes ofídicos, devido a sua ampla distribuição geográfica e o comportamento agressivo que suas espécies apresentam quando ameaçadas (ALBUQUERQUE et al., 2013).

Os acidentes envolvendo serpentes são muito variados quando se trata dos efeitos locais, mesmo dentro de um mesmo gênero. Isto ocorre devido a fatores como distribuição geográfica, alimentação, idade e variações ambientais que podem alterar a composição da peçonha e a presença/ausência de determinadas toxinas.

A Família Viperidae tem sua peçonha composta principalmente por proteases (metaloproteases e serinoproteases) e fosfolipases A₂, e em menor quantidade nucleases, L-aminoácido oxidases, entre outras (FERNÁNDEZ CULMA et al., 2014). Essas toxinas, quando não levam ao óbito, desempenham atividades que favorecem a degradação dos tecidos do indivíduo atacado,

imobilização da presa e aumento de permeabilidade dos tecidos permitindo maior distribuição das toxinas presentes na peçonha, resultando em efeitos como aumento dos batimentos cardíacos e da frequência respiratória, degradação das membranas de células que compõem os vasos, hemorragias, miotoxicidade e formação de trombos.

Atualmente a principal forma de tratamento dos acidentes é pela soroterapia realizada com anticorpos de cavalos previamente imunizados pela administração de peçonha. A função principal desses anticorpos, portanto, é neutralizar a ação das toxinas pela modificação estrutural, prevenindo seu funcionamento normal (CHIPPAUX; GOYFFON, 1998). Embora seja eficaz contra os efeitos sistêmicos, evitando a morte das vítimas, muitas sequelas permanecem, decorrentes dos efeitos locais e/ou por efeitos de toxinas não neutralizadas pelo soro.

Com base em estudos realizados com compostos naturais, a ciência vem buscando alternativas que possam neutralizar e reparar os efeitos locais. Investigando principalmente os tratamentos que são utilizados pelas comunidades tradicionais nos casos de acidentes ofídicos, uma quantidade expressiva de substâncias com atividades farmacológicas importantes vem sendo descoberta, dentre as quais destacam-se os compostos fenólicos (ácidos fenólicos, taninos e flavonoides).

Alguns compostos já são documentados na literatura como agentes anti-inflamatórios, antibióticos, antioxidantes e antiofídicos (CHIANG et al., 2003). Portanto, o desenvolvimento de pesquisas com os compostos fenólicos é de grande valia na busca por alternativas baratas, de fácil acesso e eficazes para serem utilizadas na complementação da soroterapia tradicional.

Almeja-se com o presente trabalho obter informações sobre o potencial antiofídico de diferentes compostos fenólicos, quando incubados com peçonhas

de diversas espécies de serpentes pertencentes ao gênero *Bothrops* e da espécie *Crotalus durissus terrificus*.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Peçonhas de *Bothrops* e *Crotalus*

As serpentes do gênero *Bothrops* (família *Viperidae*) são as principais responsáveis pela maioria dos acidentes ofídicos que ocorrem na América Central e do Sul, representando cerca de 90% dos casos notificados no Brasil, enquanto que as serpentes do gênero *Crotalus* representam aproximadamente 7,7% dos casos (ALBUQUERQUE et al., 2013). Existem 33 espécies do gênero *Bothrops*, filogeneticamente distribuídas entre sete grupos que são nomeadas de acordo com as espécies representativas *Bothrops alternatus*; *Bothrops atrox*; *Bothrops jararaca*; *Bothrops jararacussu*; *Bothrops microphthalmus*; *Bothrops neuwiedi* e *Bothrops taeniatus* (WARRELL; CAMPBELL; LAMAR, 2004). No Brasil, as serpentes *Crotalus* são representadas principalmente por *Crotalus durissus terrificus* (SOUSA et al., 2013).

O envenenamento por *Bothrops* sp. é caracterizado clinicamente por efeitos locais que incluem dor, edema, hemorragia local, formação de bolhas e necrose tecidual; e efeitos sistêmicos como coagulopatia, hemorragia sistêmica, choque cardiovascular e danos severos aos rins (GUTIÉRREZ et al., 2009). Enquanto que o envenenamento por *Crotalus durissus terrificus* é marcado por miotoxicidade, nefrotoxicidade e neurotoxicidade além de coagulopatia, sendo neste último caso marcado pela indução da coagulação sanguínea intensa. Outros efeitos associados são parestesia, náuseas, vômitos, cefaléia, secura da boca, prostração e sonolência ou inquietação. O Brasil apresenta uma estimativa de letalidade de acidentes crotálicos, baseada em casos notificados, ao redor de 0,4%, embora existam dados epidemiológicos apontando para um valor

aproximado de 1,87% considerando a frequência em que os quadros de acidentes ofídicos convertem para uma insuficiência renal grave (ALBUQUERQUE et al., 2013).

As peçonhas de *Bothrops* e *Crotalus* compreendem misturas complexas de enzimas, proteínas não enzimáticas, peptídeos, lipídeos, nucleotídeos e diversos íons. Entre as classes de enzimas responsáveis pelos efeitos danosos destacam-se serinoproteases (Snake Venom Serine Proteases; SVSP), metaloproteases (Snake Venom Metalloproteinases; SVMPP), fosfolipases A₂ (Phospholipase A₂; PLA₂) e L-aminoácido oxidases (LAAOs) (esta última em menor proporção) (KINI, 2006). As principais classes SVSP, SVMPP e PLA₂ e seus efeitos serão discutidas ao longo das sessões seguintes.

2.1.1 Serinoproteases

As serinoproteases estão entre as enzimas mais bem caracterizadas dentre as que afetam o sistema hemostático, elas possuem massa molecular entre 26 – 67 kDa variando de acordo com o conteúdo de carboidratos associados a ela (SERRANO; MAROUN, 2005). Pertencem à família S1 do clã PA, a maior família de peptidases (RAWLINGS; BARRETT, 2013). Apesar de possuírem grande similaridade de sequências entre si, as SVSPs podem agir sobre um grande número de substratos proteicos (SAJEVIC; LEONARDI; KRIŽAJ, 2011). Estas enzimas são definidas pelo sítio catalítico altamente conservado Ser 195, His 57, e Asp 102 que é altamente reativo e participa na formação de um complexo acil-enzima transitório, o qual é estabilizado pela presença de histidina e ácido aspártico (CAMPOS et al., 2013).

A maioria das SVSPs são glicoproteínas e apresentam sequências e número de sítios de glicosilações N- ou O- distintos que diferenciam umas das outras. Sua atuação na cascata de coagulação pode ser não-específica, quando

ocorre pela degradação de qualquer classe de proteínas, ou seletiva, quando ocorre pela ativação ou inibição de fatores específicos presentes no plasma relacionados a agregação de plaquetas, coagulação e fibrinólise (ITOH et al., 1987). Algumas SVSPs possuem tanto atividade fibrinogenolítica quando atua de forma semelhante a trombina, a qual possui 33% de homologia em média (CASTRO et al., 2004), quanto fibrinolítica, atuando na quebra da fibrina (liberando fibrinopeptídeo A e/ou B) reduzindo a resistência dos coágulos e facilitando a ocorrência de hemorragias (SAJEVIC; LEONARDI; KRIŽAJ, 2011).

Além de atuarem sobre o fibrinogênio, as SVSP podem participar da quebra do Fator V e a Proteína C, dois componentes da cascata de coagulação (MATSUI; FUJIMURA; TITANI, 2000). Essa quebra caso ocorra de maneira promiscua pode ocasionar a formação de um trombo friável e de fácil rompimento. Por outro lado, algumas serinoproteases possuem a capacidade de ativar o Fator V de modo semelhante a α -trombina, através da quebra de uma ligação peptídica, gerando as duas cadeias (uma leve e outra pesada) do Fator Va, promovendo a coagulação (SERRANO, 2013).

A Proteína C, é uma glicoproteína dependente de vitamina K, que está presente na circulação sob a forma de um zimogênio (STENFLO, 1976). Este zimogênio é reconhecido e ativado pela trombina em presença da trombomodulina, o que promove a quebra do Fator V, causando uma inibição da atividade coagulante. Esta ativação da Proteína C também pode ocorrer por intermédio da SVSP, que auxilia na ação hemorrágica comum à diversas peçonhas de serpentes (BRAUD, 2000).

Embora muitas serinoproteases presentes nas peçonhas possuam atividade semelhante à trombina, elas não conseguem reproduzir todos os efeitos desta (CASTRO et al., 2004). No entanto, algumas SVSP atuam ainda sobre os Fatores VIII, XIII e ainda possuem a capacidade de agregar plaquetas, como a trombina. Adicionalmente, existem as SVSP atuantes sobre o sistema Calicreína-

Cinina, liberando o peptídeo hipotensor bradicinina a partir do cininogênio (SERRANO; MAROUN, 2005). Na figura 1 abaixo é possível observar os locais de ação mais frequentes das SVSP.

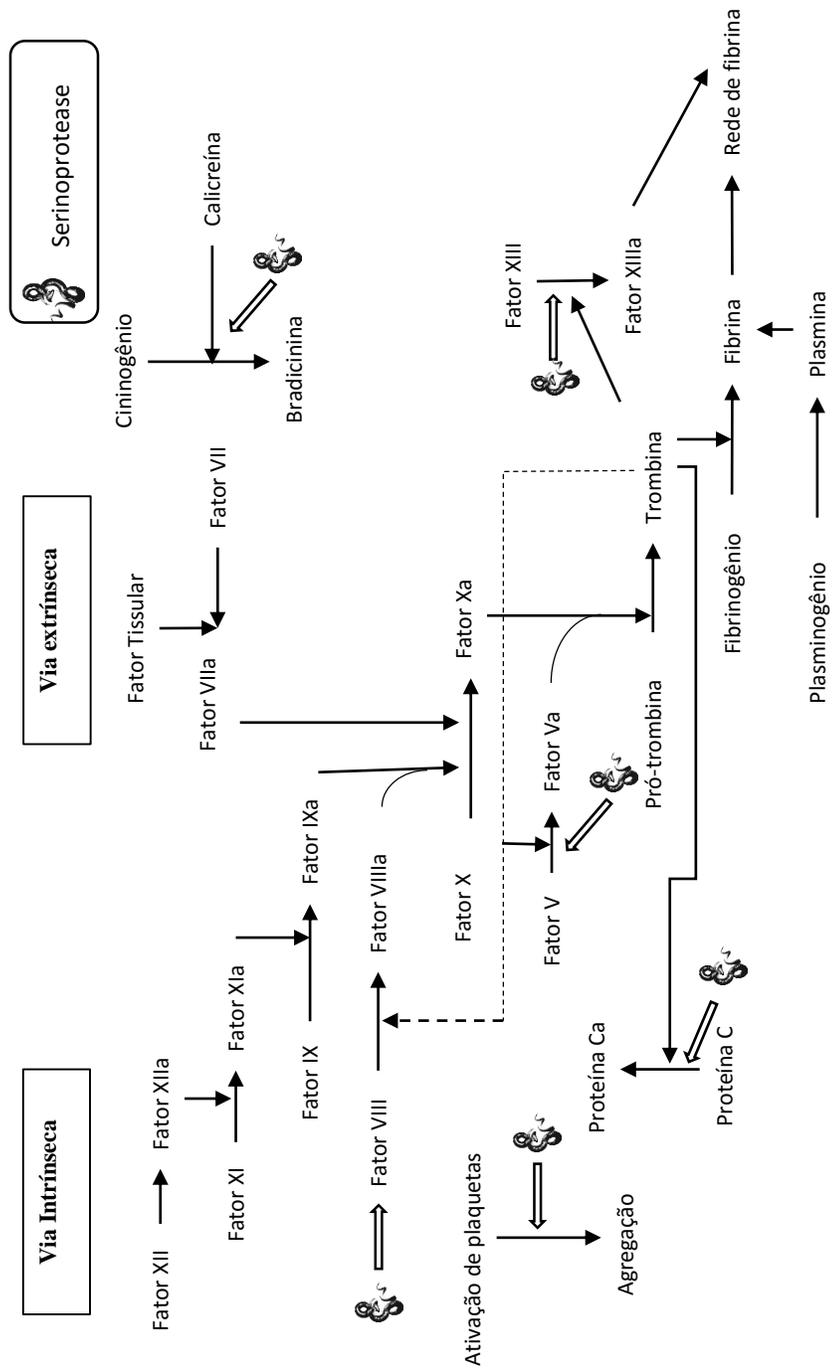


Figura 1 – Locais da via de coagulação onde atuam as serinoproteases. O ícone de serpente indica o local de atuação. Adaptado de Serrano (2013)

2.1.2 Metaloproteases

Metaloproteases são enzimas que possuem o sítio catalítico HEXXHXXGXXH altamente conservado, e dependem de íons metálicos (Zn^{++}) para exercerem sua função enzimática, e afetam principalmente, a integridade de microvasos, proteínas sanguíneas da cascata de coagulação, componentes da membrana basal e respostas imunológicas (MARCUSI et al., 2007).

As metaloproteases (SVMP) se dividem em quatro classes (MP-I a IV) de acordo com a presença de diferentes domínios, e possuem massas moleculares que variam de 25 kDa à valores um pouco maiores que 100 kDa. Entre as atividades relacionadas a elas estão hemorragias, miotoxicidade e inflamação. Hemorragia local, mionecrose e outros danos teciduais contribuem para a perda de função ou amputação do membro atingido (GUTIÉRREZ et al., 2010). Em adição, a hemorragia sistêmica contribui para o choque cardiovascular, uma das principais causas de morte derivadas do envenenamento por serpentes da família Viperidae (ESCALANTE et al., 2011).

Devido à seus efeitos farmacológicos, atuando principalmente no equilíbrio hemodinâmico, as SVMPs são alvos de grande interesse farmacêutico (GOMES et al., 2011). Assim como as serinoproteases, as metaloproteases possuem também atividade fibrino(geno)lítica, degradando porém, preferencialmente a cadeia $A\alpha$ do fibrinogênio com pouca ou nenhuma ação sobre a cadeia $B\beta$ (MARKLAND, 1998).

As metaloproteases possuem dois locais característicos de ação no sistema hemostático. O primeiro é sobre o Fator X, o qual é prontamente convertido em Fator Xa (forma ativada), promovendo uma ação coagulante. O segundo local é sobre a pró-trombina, convertendo-a em sua forma ativada, a trombina. Em adição a essas alterações, as metaloproteases de serpentes, podem atuar inibindo a agregação plaquetária (Figura 2)

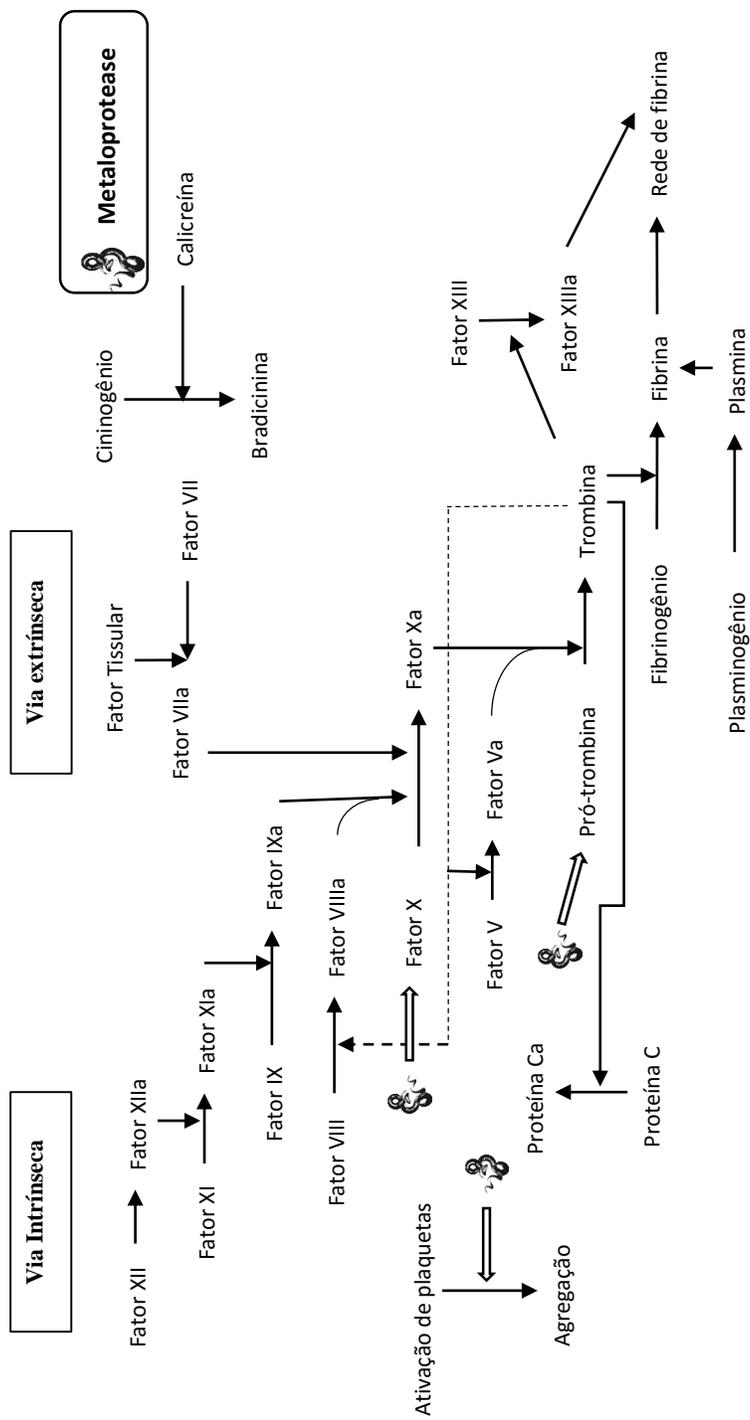


Figura 2 – Locais da via de coagulação onde atuam as metaloproteases. O ícone de serpente indica o local de atuação. Adaptado de Serrano (2013) e Markland e Swenson (2013)

2.1.3. Fosfolipases A₂

A família mais abundante de enzimas presentes nas peçonhas de *Bothrops* compreende diversas fosfolipases A₂ (PLA₂s), principais responsáveis por danos celulares, atuando por meio da hidrólise de fosfolipídios de membrana (Figura 3). São enzimas dependentes de cálcio que catalisam a hidrólise de ligações éster sn-2 de fosfoglicerídeos, levando a formação de ácidos graxos, especialmente ácido araquidônico, e lisofosfolipídeos (GARCIA DENEGRI et al., 2014; MARCUSSI et al., 2013).

As PLA₂ são classificadas até o momento em 15 famílias que variam conforme a localização ou atividade como as PLA₂s Ca⁺⁺ independentes (i PLA₂) ou PLA₂s citosólicas (cPLA₂). As fosfolipases secretadas, produzidas por espécimes pertencentes à Família Viperidae são enquadradas no grupo II e subdivididas em dois grupos principais: (i) Asp49, as quais possuem um resíduo de Asp na posição 49 compondo a tríade catalítica (Ser, His, Asp) para a coordenação do Ca²⁺, com atividade catalítica elevada; (ii) Lys49, que possuem na posição 49 um resíduo de Lys, com baixa ou nenhuma atividade catalítica (MOREIRA et al., 2011; SANTOS-FILHO et al., 2008).

A ação catalítica das PLA₂s sobre fosfolipídios resulta na liberação de ácido araquidônico (AA), um precursor para a biossíntese de muitos mediadores inflamatórios (GARCIA DENEGRI et al., 2010). O ácido araquidônico atua como um segundo mensageiro intracelular, e é captado por enzimas como cicloxigenases, lipoxigenases, prostaciclina sintetase e outras. Mediante essas reações enzimáticas o AA é então convertido em lipídios pró-inflamatórios como prostaglandinas, leucotrienos e tromboxanos (NARENDRA SHARATH CHANDRA et al., 2007). As PLA₂s estão relacionadas ao desenvolvimento de convulsões, inflamação, hipotensão, hemólise e hemorragia (PONCE-SOTO et al., 2009). Somando-se a esses fatores, a alta homologia apresentada pelas

fosfolipases de classe II, que incluem as fosfolipases de peçonhas de serpentes da família Viperidae e fosfolipases de mamíferos, permite correlacionar a funcionalidade das PLA₂s de peçonhas, com as fosfolipases endógenas humanas para obter informações sobre a fisiologia de mamíferos (VALENTIN, 2000).

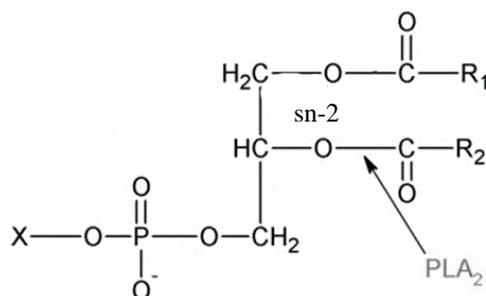


Figura 3 – Esquema do mecanismo de ação de uma fosfolipase A₂ sobre um fosfolípido. A quebra ocorre na posição sn-2, liberando um lisofosfolípido e um ácido araquidônico (GARCIA DENEGRÍ et al., 2010)

2.2 Compostos Fenólicos

Compostos fenólicos compreendem um amplo grupo de moléculas classificadas como metabólitos secundários e estão presentes em alguns organismos, com estruturas e funções diversas. Estes compostos correspondem ao mais importante e numeroso grupo de compostos presentes no reino vegetal (NACZK; SHAHIDI, 2004). São classificados como solúveis em água (ácidos fenólicos, fenilpropanoides, flavonoides e quinonas) (Figura 4) ou insolúveis em água (taninos condensados e derivados do ácido hidroxicinâmico) (Figura 5) (MÁRQUEZ, 2005). São geralmente derivados da fenilalanina ou tirosina e sua

produção ocorre em presença de estímulos específicos, como radiação UV, estresse hídrico, ataque de patógenos, variações de temperatura e chuvas (KING; YOUNG, 1999).

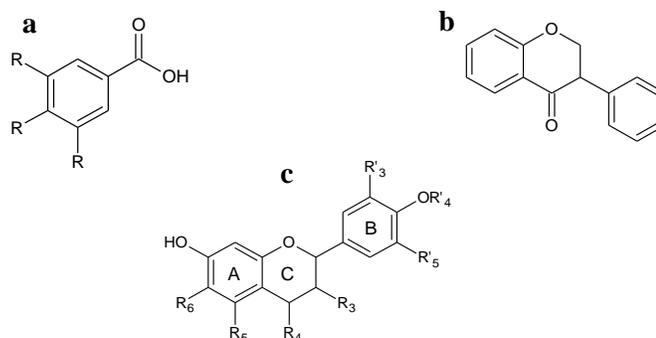


Figura 4 – Compostos solúveis em água: **a** - ácido fenólico; **b** -fenilpropanoide (ácido cinâmico) **c** – flavonoide. (OLLIS W. D., 2013)

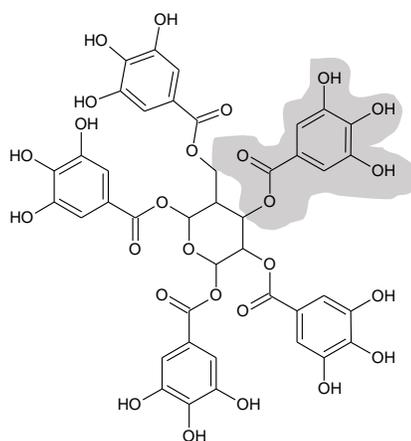


Figura 5 – Composto fenólico insolúvel em água. Um tanino condensado, formado a partir de unidades de ácido gálico (destacado em cinza). (OLLIS W. D., 2013)

Compostos fenólicos possuem ao menos um anel aromático, bem como um ou mais grupos hidroxilas e suas estruturas variam desde simples fenóis, derivados do ácido benzoico ou ácido cinâmico, compostos de grande massa molecular como os taninos e flavonoides (SOTO et al., 2011). Estes compostos atuam como antioxidantes e podem doar elétrons para radicais livres e convertê-los em moléculas estáveis e inócuas (SOTO-VACA et al., 2012).

Os compostos fenólicos apresentam um amplo espectro de atividades biológicas de interesse médico-farmacêutico-científico como, por exemplo, anticarcinogênica, relacionada principalmente à sua atividade antioxidante, e antiproliferativa quando aplicados em linhagens celulares de câncer de mama (GARCÍA-VILLALBA et al., 2010). Foi descrito recentemente, para o extrato de *Anacardium humile*, rico em ácido gálico, um alto potencial de uso no tratamento do diabetes, apresentando atividade hipoglicemiante, assim como efeitos benéficos na redução dos níveis de colesterol e da atividade da ALT (alanina aminotransferase), sugerindo também uma atividade hepatoprotetora (URZÊDA et al., 2013). No presente trabalho foram avaliados os compostos ácido p-cumárico, ácido vanílico, epicatequina e catequina, que possuem muitas aplicações em diversos setores.

O ácido fenólico p-cumárico, é um polifenol, sintetizado a partir da via do ácido hidroxicinâmico. Estudos demonstraram sua capacidade em inibir a agregação plaquetária, *in vivo* e *in vitro* (LUCERI et al., 2007). Em um estudo realizado em ratos, o ácido p-cumárico apresentou potencial anti-inflamatório, e ainda reduziu a reincidência de inflamação intestinal mediante administração de sulfato de sódio dextrana (LUCERI et al., 2004). Além disso, sua avaliação *in vivo*, em ratos, demonstrou sua capacidade de reduzir a osteoporose relacionada a deficiência de estrógeno (FOLWARCZNA et al., 2009).

Muitos estudos citam ainda o ácido p-cumárico como um quimioprotetor, neuroprotetor, cardioprotetor e com propriedades antibióticas e anticâncer

(FOLWARCZNA et al., 2009; HUDSON et al., 2000; KONG et al., 2013). As principais fontes alimentares onde é possível encontrar o ácido p-cumárico são vegetais como feijão, soja, tomate, café e milho (KING; YOUNG, 1999).

O ácido vanílico é um dos compostos majoritários extraído de *Sambucus williamsii* Hance, uma planta comumente encontrada na China, Japão e Coreia e muito usada na medicina popular para tratamento de problemas de saúde relacionados a desgaste ósseo e dores nas juntas. Xiao et al. (2014) documentaram que o ácido vanílico extraído da fração bioativa de *Sambucus williamsii* Hance possui atividade semelhante ao estrógeno e quando administrado em ratas ovariectomizadas preveniu a perda de massa óssea derivada da deficiência de estrógeno, aumentando a atividade dos osteoblastos e reduzindo a atividade osteoclástica.

Mediante a administração de concanavalina-A (con-A) em hamsters ocorre dano hepático semelhante a uma infecção viral ou hepatite autoimune, com aumento rápido dos níveis de citocinas e interleucinas pró-inflamatórias. O uso de ácido vanílico ou siríngico resultou em controle dos níveis dessas interleucinas e prevenção do dano hepático causado pela con-A e pela própria atividade inflamatória (ITOH et al., 2009).

A epicatequina, um isômero da catequina, é um flavonol capaz de melhorar as funções endoteliais, diminuir a inflamação e reduzir a resistência à insulina (KATZ; DOUGHTY; ALI, 2011). Encontrado em grandes quantidades no cacau juntamente com a catequina e procianidinas. Sua atividade principal ocorre pelo aumento da produção continuada de óxido nítrico impactando positivamente na atividade vascular e na resposta inflamatória (A LANASPA, 2014).

As catequinas presentes no chá verde são potentes antioxidantes e anti-inflamatórios (GRAHAM, 1992). Em ratos diabéticos as catequinas são capazes de retardar a progressão de mudanças funcionais e morfológicas nos rins (CAO et

al., 2009). Sardana et al. (2014) com base nesses efeitos renoprotetores descreveram que a administração dessas catequinas promoveu ação renoprotetora tanto diretamente quanto por seu potencial antioxidante.

A catequina é um fitonutriente da classe dos flavonoides, e está presente em grandes quantidades em plantas como *Camellia sinensis* e *Cocos nucifera* (LIMA et al., 2016; PITHAYANUKUL; LEANPOLCHAREANCHAI; BAVOVADA, 2010). Este composto, além de ser considerado um excelente agente antioxidante, possui propriedades que se estendem em muitas atividades farmacológicas (KATZ; DOUGHTY; ALI, 2011). A deficiência de um fator neurotrófico chamado *brain derived neurotrophic factor* (BDNF) é responsável por muitas alterações neuropsiquiátricas e neurodegenerativas, a administração de um extrato rico em catequina e ácido clorogênico em ratos foi capaz de aumentar os níveis de BDNF, sugerindo seu potencial antidepressivo (LIMA et al., 2016). Em outro estudo foi demonstrado que a catequina é capaz de modular a ação de neurônios dopaminérgicos, além de ser capaz de reduzir a ação da colinesterase (MEIRELES et al., 2015). Outras propriedades farmacológicas como anticâncer, anti-inflamatória e antibiótica também foram relacionadas ao uso desse composto fenólico (KESKIN, 2015).

2.2.1 Compostos Fenólicos na Inibição de Peçonhas

O único tratamento considerado eficaz e recomendado em casos de envenenamento por serpentes é a soroterapia antiofídica, realizada com anticorpos heterólogos de cavalos. Os soros disponíveis no Brasil atualmente são: anticrotálico, antielapídico, antibotrópico, antilaquéutico e duas formas combinadas, sendo a primeira anticrotálico-botrópico e a segunda antibotrópico-laquéutico (BRAZIL, 2014).

No entanto, em muitos acidentes, a atenção médica não é imediata, devido a ocorrência em áreas rurais ou afastadas dos grandes centros, bem como a disponibilidade desses soros nas unidades de atendimento (FERNANDES et al., 2011). Em adição, a soroterapia não mostra grande efetividade na neutralização dos efeitos locais e ainda é passível de induzir reações adversas resultantes da própria presença de anticorpos externos ao organismo das vítimas (MORAIS; MASSALDI, 2009).

Muitas plantas então, são usadas na medicina tradicional como uma alternativa ao tratamento convencional do ofidismo (GUIMARÃES et al., 2013), estando distribuídas em diversas famílias por todo o mundo. No Brasil encontram-se nas Famílias Euforbiaceae como *Jatropha gossypifolia* L. na qual utiliza-se o extrato aquoso (FÉLIX-SILVA et al., 2014), Asteraceae como *Mikania glomerata* Spreng utilizando o extrato hidroalcolico (MOURÃO et al., 2014) e *Humirianthera ampla* Miers (Icacinaeae) cujos diterpenos isolados possuem atividade antiofídica (STRAUCH et al., 2013). Podem ser citadas ainda a planta *Hypericum brasiliense* (Hypericaceae) da qual utiliza-se o extrato etanólico (ASSAFIM et al., 2011), alcaloides esteroidais de *Solanum campaniforme* Roem. & Schult. (Solanaceae) (JORGE, 2011), *Bauhinia forficata* Link, (Fabaceae) (BRONDANI et al., 2008), *Bellucia dichotoma* Cogn. (Melastomataceae) (MOURÃO DE MOURA et al., 2014), extratos de *Marsypianthes chamaedrys* (Lamiaceae) e diversas espécies pertencentes ao gênero *Piper* spp. como *Piper tuberculatum* (NASCIMENTO et al., 2012). Revisões bibliográficas relatam além destas espécies citadas, mais de 100 outras espécies de plantas utilizadas na medicina popular e muitas já com validação científica de seus efeitos, e de interesse farmacêutico por inibir os efeitos locais e sistêmicos dos acidentes ofídicos (DA SILVA et al., 2007; SOARES et al., 2004).

As interações dos fenólicos com proteínas podem levar a mudanças em algumas propriedades físico-químicas tais como: solubilidade, estabilidade

térmica e digestibilidade, pela ligação do composto com a porção lateral da cadeia de aminoácidos em pH alcalino, liberando hidrogênios que se ligam as proteínas formando pontes cruzadas de hidrogênio, por exemplo (OZDAL; CAPANOGLU; ALTAY, 2013). Essas interações podem, portanto, inativar ou reduzir a atividade de algumas enzimas presentes nas peçonhas. Outra observação interessante é que os taninos e polifenóis de plantas podem formar precipitados proteicos e complexos insolúveis com muitos íons metálicos (atuando como quelantes), essenciais para a atividade catalítica das toxinas, reduzindo assim seu potencial catalítico (QUILES et al., 2002).

Estudos de interações simuladas entre compostos vegetais e toxinas indicam a provável ligação destes inibidores aos sítios catalíticos de metaloproteases. Cavalcante et al. (2007) observaram uma redução de 40% na atividade enzimática da PLA₂ da peçonha de *Crotalus durissus terrificus*, que foi atribuída à ligação da quercetina, no sítio catalítico da PLA₂, próxima ao resíduo de Histidina da posição 48 (His48) (CAVALCANTE et al., 2007). Silva e Fernandes Júnior (2010), a partir do uso de compostos fenólicos isolados (polihidroxi benzenos e polihidroxi acetofenonas) reduziu a atividade enzimática de PLA₂s presentes na peçonha de *Crotalus adamanteus*. Foi observado além desta, redução na formação de edema. No mesmo trabalho, a partir de análises computacionais observou-se que os compostos se ligavam ao aminoácido Asp 49 e com isso desestabilizava a coordenação correta do íon cálcio no sítio catalítico, o que levava a uma redução de sua atividade, visto que essas enzimas são altamente dependentes do íon cálcio para seu devido funcionamento.

REFERÊNCIAS

A LANASPA, M. Epicatechin protects against corticosteroid induced hepatic steatosis. **Journal of Steroids & Hormonal Science**, v. 05, 2014.

ALBUQUERQUE, P. L. M. M. et al. Acute kidney injury caused by *Crotalus* and *Bothrops* snake venom: a review of epidemiology, clinical manifestations and treatment. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 55, n. 5, p. 295–301, jan. 2013.

ASSAFIM, M. et al. *Hypericum brasiliense* plant extract neutralizes some biological effects of *Bothrops jararaca* snake venom. **Journal of venom research**, v. 2, p. 11–16, jan. 2011.

INSTITUTO VITAL BRAZIL, **Soros produzidos no Brasil**. Disponível em: <http://www.vitalbrazil.rj.gov.br/soros_produzidos.html>. Acesso em: 18 set. 2014.

BRAUD S. Snake venom proteins acting on hemostasis. **Biochimie**. v. 82, n. 9-10 p.851-859, mar. 2000

BRONDANI, G. E. et al. Phosphorus nutrition in the growth of *Bauhinia forficata* L. seedlings. **Acta Scientiarum. Agronomy**, v. 30, n. 5, p. 665–671, 12 dez. 2008.

CAMPOS, L. B. et al. *In vitro* comparison of enzymatic effects among Brazilian *Bothrops* spp. venoms. **Toxicon**, v. 76, p. 1–10, 15 dez. 2013.

CAO, Y. et al. [Protective effect of catechin on renal microvessels in 5/6 nephrectomized rats and its mechanism]. **Zhong xi yi jie he xue bao = Journal of Chinese integrative medicine**, v. 7, n. 6, p. 557–62, 1 jun. 2009.

CASTRO, H. C. et al. Snake venom thrombin-like enzymes: from Reptilase to now. **Cellular and molecular life sciences**, v. 61, n. 7-8, p. 843–56, abr. 2004.

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.

CHIANG, L. C. et al. Immunomodulatory activities of flavonoids, monoterpenoids, triterpenoids, iridoid glycosides and phenolic compounds of *Plantago* species. **Planta Medica**, v. 69, n. 7, p. 600–604, jul. 2003.

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

DA SILVA, J. O. et al. Triterpenoid saponins, new metalloprotease snake venom inhibitors isolated from *Pentaclethra macroloba*. **Toxicon**, v. 50, n. 2, p. 283–91, ago. 2007.

ESCALANTE, T. et al. Key events in microvascular damage induced by snake venom hemorrhagic metalloproteinases. **Journal of proteomics**, v. 74, n. 9, p. 1781–94, 24 ago. 2011.

FÉLIX-SILVA, J. et al. Aqueous leaf extract of *Jatropha gossypifolia* L. (Euphorbiaceae) inhibits enzymatic and biological actions of *Bothrops jararaca* snake venom. **PloS one**, v. 9, n. 8, p. e104952, 15 jan. 2014.

FERNANDES, R. et al. Neutralization of pharmacological and toxic activities of *Bothrops jararacussu* snake venom and isolated myotoxins by *Serjania erecta* methanolic extract and its fractions. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v. 17, n. 1, p. 85–93, 2011.

FERNÁNDEZ CULMA, M. et al. Snake venomomics of *Bothrops punctatus*, a semiariboreal pit viper species from Antioquia, Colombia. **PeerJ**, v. 2, p. e246, 2014.

FOLWARCZNA, J. et al. Effects of natural phenolic acids on the skeletal system of ovariectomized rats. **Planta medica**, v. 75, n. 15, p. 1567–72, dez. 2009.

GARCIA DENEGRI, M. E. et al. Isolation and functional characterization of a new acidic PLA₂ Ba SpII RP4 of the *Bothrops alternatus* snake venom from Argentina. **Toxicon**, v. 56, n. 1, p. 64–74, 1 ago. 2010.

GARCIA DENEGRI, M. E. et al. Neutralisation of the pharmacological activities of *Bothrops alternatus* venom by anti-PLA₂ IgGs. **Toxicon**, v. 86, p. 89–95, ago. 2014.

GARCÍA-VILLALBA, R. et al. Characterization and quantification of phenolic compounds of extra-virgin olive oils with anticancer properties by a rapid and resolute LC-ESI-TOF MS method. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, v. 51, n. 2, p. 416–29, 20 jan. 2010.

GOMES, M. S. R. et al. Purification and functional characterization of a new metalloproteinase (BleucMP) from *Bothrops leucurus* snake venom.

Comparative biochemistry and physiology. Toxicology & pharmacology, v. 153, n. 3, p. 290–300, abr. 2011.

GRAHAM, H. N. Green tea composition, consumption, and polyphenol chemistry. **Preventive Medicine**, v. 21, n. 3, p. 334–350, maio 1992.

GUIMARÃES, C. L. S. et al. Biodiversity as a source of bioactive compounds against snakebites. **Current medicinal chemistry**, 2013.

GUTIÉRREZ, J. M. et al. Experimental pathology of local tissue damage induced by *Bothrops asper* snake venom. **Toxicon**, v. 54, n. 7, p. 958–75, 1 dez. 2009.

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**, v. 55, n. 1, p. 166–70, jan. 2010.

HUDSON, E. A. et al. Characterization of potentially chemo preventive phenols in extracts of brown rice that inhibit the growth of human breast and colon cancer cells. **Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology**, v. 9, n. 11, p. 1163–70, nov. 2000.

HUI WEN, F. et al. Snakebites and scorpion stings in the Brazilian Amazon: Identifying research priorities for a largely neglected problem. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 9, n. 5, p. e0003701, 21 mai 2015.

ITOH, A. et al. Hepatoprotective effect of syringic acid and vanillic acid on Concanavalin A-Induced Liver Injury. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 32, n. 7, p. 1215–1219, 1 jul. 2009.

ITOH, N. et al. Molecular cloning and sequence analysis of cDNA for batroxobin, a thrombin-like snake venom enzyme. **J. Biol. Chem.**, v. 262, n. 7, p. 3132–3135, 5 mar. 1987.

JORGE, R. J. B. **Inhibition of the local effects of *Bothrops pauloensis* by steroidal alkaloids from *Solanum campaniforme* Roem. & Schult. (Solanaceae)**, 2011. Disponível em: <<http://www.repositorio.ufc.br/ri/handle/riufc/2625>>. Acesso em: 17 fev. 2015

KATZ, D. L.; DOUGHTY, K.; ALI, A. Cocoa and chocolate in human health and disease. **Antioxidants & redox signaling**, v. 15, n. 10, p. 2779–811, 15 nov. 2011.

KESKIN, C. Antioxidant, anticancer and anticholinesterase activities of flower, fruit and seed extracts of *Hypericum amblysepalum* HOCHST. **Asian Pacific journal of cancer prevention**, v. 16, n. 7, p. 2763–9, 2015.

KING, A.; YOUNG, G. Characteristics and occurrence of phenolic phytochemicals. **Journal of the American Dietetic Association**, v. 99, n. 2, p. 213–8, fev. 1999.

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.

KONG, C.-S. et al. Antiangiogenic effects of p-coumaric acid in human endothelial cells. **Phytotherapy research**, v. 27, n. 3, p. 317–23, mar. 2013.

LIMA, E. B. C. et al. Antidepressant, antioxidant and neurotrophic properties of the standardized extract of *Cocos nucifera* husk fiber in mice. **Journal of Natural Medicines**, 8 fev. 2016.

LUCERI, C. et al. Plant phenolic 4-coumaric acid protects against intestinal inflammation in rats. **Scandinavian journal of gastroenterology**, v. 39, n. 11, p. 1128–33, nov. 2004.

LUCERI, C. et al. p-Coumaric acid, a common dietary phenol, inhibits platelet activity *in vitro* and *in vivo*. **The British journal of nutrition**, v. 97, n. 3, p. 458–63, mar. 2007.

MARCUSSI, S. et al. Molecular and functional characterization of a new non-hemorrhagic metalloprotease from *Bothrops jararacussu* snake venom with antiplatelet activity. **Peptides**, v. 28, n. 12, p. 2328–39, dez. 2007.

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

MARKLAND, F. S. Snake venom fibrinogenolytic and fibrinolytic enzymes: an updated inventory. Registry of Exogenous Hemostatic Factors of the Scientific and Standardization Committee of the International Society on Thrombosis and Haemostasis. **Thrombosis and haemostasis**, v. 79, n. 3, p. 668–74, mar. 1998.

MARKLAND F. S. JR.; SWENSON S. Snake venom metalloproteinases. **Toxicon**, v. 62, p. 3 - 18, set. 2013

MÁRQUEZ, A. J. (ED.). **Lotus japonicus Handbook**. Dordrecht: Springer Netherlands, 2005.

MATSUI T.; FUJIMURA Y.; TITANI K.; Snake venom proteases affecting hemostasis and thrombosis. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology**, v. 1477, n. 1-2, p. 146 - 156, mar. 2000

MEIRELES, M. et al. Flavonoids as dopaminergic neuromodulators. *Molecular Nutrition & Food Research*, p. 332-339, nov. 2015.

MORAIS, V.; MASSALDI, H. Snake antivenoms: adverse reactions and production technology. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v. 15, n. 1, p. 2–18, 2009.

MOREIRA, V. et al. A phospholipase A₂ from *Bothrops asper* snake venom activates neutrophils in culture: expression of cyclooxygenase-2 and PGE₂ biosynthesis. **Toxicon**, v. 57, n. 2, p. 288–96, mar. 2011.

MOURÃO DE MOURA, V. et al. A comparison of the ability of *Bellucia dichotoma* Cogn. (Melastomataceae) extract to inhibit the local effects of *Bothrops atrox* venom when pre-incubated and when used according to traditional methods. **Toxicon**, v. 85, p. 59–68, jul. 2014.

MOURÃO, V. B. et al. Anti-hemorrhagic effect of hydro-alcoholic extract of the leaves of *Mikania glomerata* in lesions induced by *Bothrops jararaca* venom in rats. **Acta cirúrgica brasileira / Sociedade Brasileira para Desenvolvimento Pesquisa em Cirurgia**, v. 29, n. 1, p. 30–7, jan. 2014.

NACZK, M.; SHAHIDI, F. Extraction and analysis of phenolics in food. **Journal of chromatography**, v. 1054, n. 1-2, p. 95–111, 29 out. 2004.

NARENDRA SHARATH CHANDRA, J. et al. Chemistry and structural evaluation of different phospholipase A₂ inhibitors in arachidonic acid pathway mediated inflammation and snake venom toxicity. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 7, n. 8, p. 787–800, 1 abr. 2007.

NASCIMENTO, J. C. DO et al. Occurrence, biological activities and 13C NMR data of amides from *Piper* (Piperaceae). **Química Nova**, v. 35, n. 11, p. 2288–2311, 2012.

OLLIS, William David (Ed.). **Recent developments in the chemistry of natural phenolic compounds: proceedings of the Plant Phenolics Group symposium**. Elsevier, 2013.

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.

PITHAYANUKUL, P.; LEANPOLCHAREANCHAI, J.; BAVOVADA, R. Inhibitory effect of tea polyphenols on local tissue damage induced by snake venoms. **Phytotherapy research**, v. 24 Suppl 1, p. S56–62, jan. 2010.

PONCE-SOTO, L. A. et al. Neuromuscular activity of BaTX, a presynaptic basic PLA₂ isolated from *Bothrops alternatus* snake venom. **Comparative biochemistry and physiology. Toxicology & pharmacology**, v. 150, n. 2, p. 291–7, ago. 2009.

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

RAWLINGS, N. D.; BARRETT, A. J. **Introduction: Serine peptidases and their clans. Handbook of Proteolytic Enzymes**, 2013.

SAJEVIC, T.; LEONARDI, A.; KRIŽAJ, I. Haemostatically active proteins in snake venoms. **Toxicon**, v. 57, n. 5, p. 627–45, abr. 2011.

SANTOS-FILHO, N. A. et al. A new acidic myotoxic, anti-platelet and prostaglandin I₂ inductor phospholipase A₂ isolated from *Bothrops moojeni* snake venom. **Toxicon**, v. 52, n. 8, p. 908–17, 15 dez. 2008.

SARDANA, A. et al. Nephroprotective effect of catechin on gentamicin-induced experimental nephrotoxicity. **Clinical and experimental nephrology**, v. 19, n. 2, p. 178-184, 2015 14 maio 2014.

SERRANO, S. M. T.; MAROUN, R. C. Snake venom serine proteinases: sequence homology vs. substrate specificity, a paradox to be solved. **Toxicon**, v. 45, n. 8, p. 1115–32, 15 jun. 2005.

SERRANO, S. M. T. The long road of research on snake venom serine proteinases. **Toxicon**, v. 62, p. 19-26, 23 de set. 2013.

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.

SOARES, A. M. et al. Neutralizing effects of Brazilian plants against snake venoms. **Drugs of the Future**, v. 29, n. 11, p. 1105, 2004.

SOTO, M. L. et al. Recovery, concentration and purification of phenolic compounds by adsorption: A review. **Journal of Food Engineering**, v. 105, n. 1, p. 1–27, jul. 2011.

SOTO-VACA, A. et al. Evolution of phenolic compounds from color and flavor problems to health benefits. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 60, n. 27, p. 6658–77, 11 jul. 2012.

SOUSA, R. D. S. et al. Aspectos epidemiológicos dos acidentes ofídicos no município de Mossoró, Rio Grande do Norte, no período de 2004 a 2010. **Revista de Patologia Tropical**, v. 42, n. 1, 8 abr. 2013.

STENFLO J. A new vitamin K-dependent protein. Purification from bovine plasma and preliminary characterization. **J. Biol. Chem.**, v. 251, p. 355–363, abr. 1976

STRAUCH, M. A. et al. Antiophidic activity of the extract of the Amazon plant *Humirianthera ampla* and constituents. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 145, n. 1, p. 50–58, jan. 2013.

URZÊDA, M. A. et al. Evaluation of the hypoglycemic properties of *Anacardium humile* aqueous extract. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, p. 1–8, jan. 2013.

VALENTIN, E. What can venom phospholipases A₂ tell us about the functional diversity of mammalian secreted phospholipases A₂? **Biochimie**, v. 82, n. 9-10, p. 815–831, 10 set. 2000.

CAMPBELL, Jonathan A. Lamar et al. **The venomous reptiles of the western hemisphere**. 2004.

WHO. **Rabies and envenomings: a neglected public health issue: report of a Consultative Meeting. Geneva.** Disponível em: <http://www.who.int/iris/handle/10665/43858> Acesso em: 12 de jul. 2015.

XIAO, H.-H. et al. Vanillic acid exerts oestrogen-like activities in osteoblast-like UMR 106 cells through MAP kinase (MEK/ERK)-mediated ER signaling pathway. **The Journal of steroid biochemistry and molecular biology**, v. 144 Pt B, p. 382–91, out. 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: AVALIAÇÃO DO POTENCIAL PROTETOR DE COMPOSTOS FENÓLICOS: ATIVIDADES DE PROTEASES, FOSFOLIPASES A2 E L-AMINOÁCIDO OXIDASES DE PEÇONHAS DE Bothrops E Crotalus spp. SOBRE CÉLULAS E MOLÉCULAS HUMANAS

Pesquisador: Silvana Marcussi

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 44607215.9.0000.5148

Instituição Proponente: Universidade Federal de Lavras

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.126.950

Data da Relatoria: 26/06/2015

Apresentação do Projeto:

OK

Objetivo da Pesquisa:

OK

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

OK

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

OK

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

OK

Recomendações:

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Todas as pendências éticas foram atendidas.

Situação do Parecer:

Aprovado

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: 1.126.950

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

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

LAVRAS, 26 de Junho de 2015

Assinado por:
Giancarla Aparecida Botelho Santos
(Coordenador)

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
Artigos

ARTIGO I: VANILLIC ACID POTENTIAL USE IN PHYSIOLOGIC ALTERATIONS INDUCED BY SNAKE VENOMS: A PROTEASES AND PHOSPHOLIPASES A2 INHIBITOR

Pedro Henrique Souza Cesar¹, Anderson Assaid Simão¹, Silvana Marcussi^{1*}

1. Departamento de Química, Universidade Federal de Lavras, 37200-000
Lavras, Brasil.

Artigo formatado segundo as normas da revista BMC Biochemistry

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

ABSTRACT

Enzymatic inhibition by natural compounds may represent a valuable adjuvant in snakebite serum therapy, aiming to attenuate especially local effects of envenomation. In this work, the objective was to evaluate *in vitro* possible interactions between vanillic acid and snake venoms enzymes from *Bothrops* spp. and *Crotalus durissus terrificus*. The compound presented inhibitory activity with statistical significance on phospholipase activity induced by *B. alternatus* (~25% inhibition); caseinolytic activity induced by *B. atrox* (~30% inhibition); *B. jararacussu* (~44% inhibition) and *C. d. terrificus* (~33% inhibition); fibrinogenolysis induced by *B. jararacussu*, *B. atrox* and *C. d. terrificus* (100% inhibition); serineprotease activity induced by *B. moojeni* (~45% inhibition) and *B. jararaca* (~66% inhibition); hemolytic activity induced by *B. moojeni* (~26% inhibition); thrombolysis activity induced by *B. atrox* (~30% inhibition), *B. jararacussu* (~20% inhibition) and thrombotic activity induced by *C. d. terrificus* (~8% inhibition). In addition, vanillic acid was also capable of delaying coagulation time in citrated plasma incubated with *B. moojeni*, *B. atrox* and *B. jararaca*, in 60, 35 and 75 seconds, respectively. Thus, the evaluated compound appears to be a promising candidate as an adjuvant in serum therapy, expanding perspectives for its future pharmaceutical use, considering the high homology degree among human and snake venom phospholipases A₂ and proteases.

Keywords: Phenolic compounds, snake venom, phospholipase A₂, metalloproteinase, serineprotease

1 INTRODUCTION

Snakebite is a major public health issue and it affects mostly, populations in rural areas, and in productive age, with the most affected body area being hands and feet. In many snakebite cases, the victim does not have access to health centers where serum therapy is available due to the long distance from home. Besides that, sometimes when attended they do not receive the specific serum [1].

World health organization reported 100.000 deaths per year, as well as 400.000 amputations and other severe notifications (infections, tetanus and loss of function of the affected member) caused by snakebites, that often leads to work withdrawal or hamper its reinsertion in job market [2]. In Brazil this number reaches 20 thousand cases registered in health centers, with 0.43% resulting deaths, being the genus *Bothrops* (including *Bothrocophias*) responsible for 90.5% of all ophidic accidents [3, 4].

Accidents involving snakes are very diverse when it comes to local effects, even when caused by snakes from the same genus. This occurs by a number of factors such as geographic distribution, feeding habits, age and environmental variations, which may alter the composition of snake venoms. Currently, in Brazil, the most employed treatment for snakebites is serum therapy, in which antibodies produced in immunized animals are administered to the victim [5]. Although effective in neutralizing systemic effects of snakebites, the serum therapy acts only partially on local effects, which in many cases may prove debilitating, resulting in articulations stiffening or amputations [5].

Until 2004, more than a hundred species of plants were cataloged containing biomolecules with antiophidic activity, and this number is growing each year [6]. In most of these plants, antiophidic properties are due to the presence of phenolic compounds, capable of neutralizing partially or totally local effects, and/or systemic effects caused by snake toxins [7, 8].

Phenolic compounds are molecules that possess an aromatic ring bonded to at least one hydroxyl group, having one or more substituents. They are products of secondary metabolism of plants, derived from pentose phosphate pathway, shikimate pathway and phenylpropanoids pathway [9]. These compounds are an important part of vegetal interactions with the environment and possess great physiological and morphological relevance. They take part in growing and reproduction, besides providing protection against predators, pathogens and physical agents [10].

Apart from the functions related to plant adaptations, phenolic compounds possess many pharmacological activities and nutritional functions for animal organisms. They are specially relevant due to its activities like antioxidant, antibiotic, immunomodulatory and protective for cell structures [11–15]. Phenolic compounds acts also preventing degenerative diseases, controlling diabetes and as a complementary treatment for snakebites [16–18].

In face of the exposed, the objective in this paper was to evaluate *in vitro*, the interactions between vanillic acid and the enzymes present in *Bothrops* (*B. alternatus*, *B. jararacussu*, *B. atrox*, *B. moojeni* and *B. jararaca*) and *Crotalus* (*C. durissus terrificus*) snake venoms. Also, highlighting the inhibitory activity towards serineproteases, metalloproteinases and phospholipases A₂, acting on blood cells, phospholipids and protein substrates.

2 MATERIAL AND METHODS

2.1 Blood and plasma obtention

The blood used in the erythrocytes hemolysis, thrombolysis and plasma coagulation assay were obtained by collecting aliquots from the researchers and students involved in the present work. The volunteers were both men and women, aged 20-40 years, and did not receive any medication during the 30 days that

preceded the experiments. The blood was collected by venous puncture into tubes containing anticoagulant (citrate for the coagulation and hemolysis assays), been subsequently centrifuged at $1.700 \times g$ at room temperature for 15 min in order to obtain the plasma and erythrocytes. An aliquot of blood was also collected in absence of anticoagulant to evaluation of thrombolytic activity.

The conducted experiment is in accordance with the standards of the Ethics Committee on Human Research (COEP) of Universidade Federal de Lavras, and approved by this committee (N° CAAE/44607215.9.0000.5148).

2.2 Vanillic acid and snake venoms

Lyophilized crude venoms from *B. alternatus*, *B. jararaca*, *B. moojeni*, *B. jararacussu*, *B. atrox* and *Crotalus durissus terrificus*, were obtained commercially from the Bioagents serpentarium (Batatais, São Paulo). The phenolic compound vanillic acid (4-hydroxy-3-methoxybenzoic acid) was purchased from Sigma Aldrich™.

All snake venoms used were dissolved in phosphate buffered saline (PBS) for use, at $10\mu\text{g}/\mu\text{L}$ concentration. Vanillic acid was dissolved in ethanol 5% (PBS: ethanol, v:v) at $10\mu\text{g}/\mu\text{L}$ and $5\mu\text{g}/\mu\text{L}$ concentrations, and stored away from light in a freezer ($-12\text{ }^{\circ}\text{C}$).

2.3 Phospholipase and hemolytic activity in solid medium

Phospholipase activity was evaluated according to Gutierrez et al. [19] proceeding with elaboration of a gel containing egg folk, CaCl_2 and agar. The phospholipase A_2 inhibition assay was performed using *Bothrops moojeni*, *B. jararacussu* and *B. alternatus* snake venoms to induce egg yolk phospholipids breakdown, and $30\text{ }\mu\text{g}$ of each venom was previously incubated with vanillic acid

by 30 minutes at 37°C, on the following ratios 1:0.1; 1:0.2; 1:0.4; 1:0.8; 1:1; 1:5 and 1:10 (venom: vanillic acid; w:w). These ratios were used as a screen test, in order to find the ratios which presented inhibitory activity, and extrapolate for other assays. Controls containing only venoms or vanillic acid (300 µg) alone were also evaluated.

For hemolytic assay was performed the same method for phospholipase activity, replacing egg yolk by the same volume of isolated erythrocytes. To obtaining red blood cell concentrate the blood collected (10 mL) in the presence of an anticlotting agent was immediately mixed with saline solution (2 mM NaH₂PO₄; 3 mM Na₂HPO₄; 154 mM NaCl; pH 7.4) and centrifuged at 700 g (Fanem Baby®I Model 206 BL) for ten minutes. The plasma was removed, and the red cells were suspended in 5 mmol L⁻¹ phosphate buffer, pH 7.4 and centrifuged under the same conditions. This washing procedure was repeated three times at 4°C [20]

The hemolytic activity inhibition was evaluated by previous incubation of *B. jararacussu*, *B. moojeni* and *C. d. terrificus* venoms (30 µg each) with vanillic acid for 30 minutes at 37°C, on the following ratios 1:0.04, 1:0.08; 1:0.16; 1:0.32, 1:0.4, 1:2 and 1:4 (w:w). Both activities, phospholipase and hemolysis, were evaluated by the means of the translucent halo diameter (mm) formed around the wells in gel, where the samples were placed.

2.4 Proteolytic activity on casein

In order to evaluate this activity, it was used the methodology described by Wang, Shih and Huang [21], with some modifications. The gel was made following the methodology described in the item 2.3 [19], replacing egg yolk for casein solution for 5 mg/ml of casein in 50 mM Tris-HCl buffer (pH 8.0). Snake venoms from *B. moojeni*, *B. jararacussu* and *B. alternatus* (40 µg), and vanillic

acid were previously incubated on the ratios 1:0.1, 1:0.5, 1:1, 1:5 and 1:10 (w:w) for 30 minutes at 37°C, and applied on wells made on gel surface with a cut pipette tip. Then it was followed by incubating for 18 hours at 37°C in a cellular culture chamber. Controls containing only snake venoms or vanillic acid were also carried out.

Proteolytic activity was assessed by measuring the translucent halo diameters (mm) formed around the wells on gel. These values were compared to controls containing only snake venoms corresponding to 100% of proteolytic activity.

2.5 Enzymatic activity of serineprotease on BAPNA

Serineprotease activity was evaluated by the degradation of the chromogenic substrate N α -Benzoyl-L-arginine 4-nitroanilide hydrochloride (BAPNA), as described by Sant' Ana et al. [22]. The substrate was prepared as follows, 0.04 g of BAPNA in 1mL DMSO. Afterwards, it was added at 1% in Tris-HCl 0.1M, with addition of 0.294% CaCl₂, pH 8.1. From this solution, 200 μ L was used for each assay. Samples were organized in three groups, the first group contained vanillic acid previously incubated (for 30 minutes at 37°C) with *B. atrox* or *B. jararaca* (100 μ g) venoms (1:0.5 and 1:1 ratios; w:w), and then added to BAPNA. The second group contained only snake venoms and BAPNA (positive control). Finally, the third group (negative control) contained only the substrate (BAPNA) with vanillic acid (100 μ g). In order to standardize the experiment in terms of coloration and time, a pilot trial was performed. After adjusting time and dosage, the samples were spectrophotometrically analyzed (λ_{Max} : 415 nm). Once the reaction reaches the color standardized (citric yellow), 1 mL of 10% citric acid was added to stop enzymatic activity. For quantification,

each unity of absorbance corresponds to $0.009 \text{ U}\cdot\text{min}^{-1}$, of p-nitroanilide released per minute of reaction.

2.6 Fibrinogenolytic activity

For fibrinogenolytic activity, it was used the SDS-page method, as described by Laemmli [23]. Proteolysis inhibition assay was performed incubating previously the snake venoms (80 μg), from *B. atrox*, *B. jararacussu* e *C. d. t.* (40 μg), with vanillic acid on the ratios of 1:0.5 and 1:1 (w:w), for 30 minutes at 37°C , then the fibrinogen was added followed by another two hours of incubation at the same temperature.

Samples were analyzed in polyacrylamide gel at 12% (w:v), allowing visualization of α , β and γ chains of the control group, as well as the presence of fibrinopeptides in the samples that proteolysis was induced by snake venoms.

2.7 Snake venom activity on blood thrombi

Thrombolytic and thrombotic activities were measured on human blood clots, formed *in vitro*, according to Cintra et al. [24]. It was pipetted 200 μL of total blood in microplate wells, and left for clotting. The clots were incubated for 24 h at 37°C with samples containing crude venom (*B. atrox*, *B. jararacussu* and *C. d. terrificus*; 30 μg), PBS or snake venom previously incubated (30 minutes at 37°C) with vanillic acid on the ratios 1:0.5 and 1:1 (w:w).

The activities were estimated by percentage means of the liquid volume released by each thrombus, minus the volume obtained from the control negative group.

2.8 Coagulation activity

The clotting time of citrated plasma [25] was evaluated in assays with previous incubation of vanillic acid, for a 10-minutes period, with venom and subsequent plasma addition (200 μ L) and timekeeping. Controls containing solely vanillic acid or venoms were also performed. The citrated plasma was placed in test tubes that remained in water bath at 37°C until temperature stabilization with subsequent onset of the experiment. The minimum coagulant dose was defined as the minimum amount of venom responsible for plasma clotting in a time interval between 1 and 1.25 minutes [26]. The proportions of venom and vanillic acid within the samples were 1: 0.5 and 1: 1 (w/w).

2.9 Statistical analysis

The results are presented as the average of triplicates \pm standard deviation. The data were statistically evaluated by analysis of variance, and the means were compared using the Scott Knott test ($P < 0.05$) with the aid of the R software [27].

3 Results

3.1 Phospholipase activity

Vanillic acid did not present a statistically significant inhibitory activity, on phospholipase activity induced by *B. moojeni* and *B. jararacussu* venoms. However, it has induced inhibitory activity towards *B. alternatus* venom. The most significant being 1:1, with 25% of inhibition, 1:5 with 28.3% and 1:10, with

33.6%, in different ratios (Figure 1). The highest inhibition was obtained with 1:10 ratio (*B. alternatus* venom: vanillic acid; w:w) (Figure 1A).

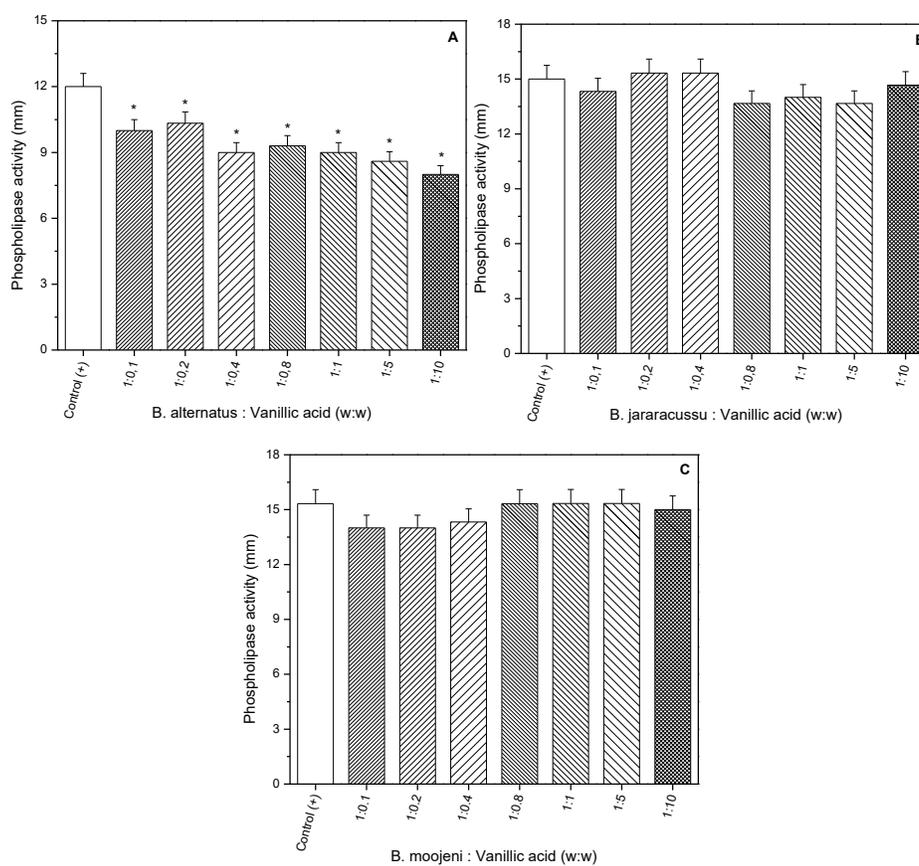


Figure 1 – Phospholipase activity (mm) of three snake venoms pre-incubated with vanillic acid in different ratios (w:w). The results are presented as the average of triplicates \pm standard deviation. * $p < 0.05$

3.2 Proteolytic activity on casein

Previous incubation of vanillic acid with *B. atrox* venom resulted in significant inhibitions on caseinolytic activity (Figure 2A). The inhibitions for *B.*

atrox were 27.5% for 1:0.32 (w:w) and 32.5% for 1:0.6 (w:w). For *C.d.t.* was approximately 25% for 1:0.32 and 31.57% for 1:0.6 (w:w) (Figure 2B). However, the highest inhibitions were observed towards *B. jararacussu* venom, in which 1:0.32 and 1:0.6 ratios (w:w) resulted in 33% and 39% inhibition, respectively (Figure 2C).

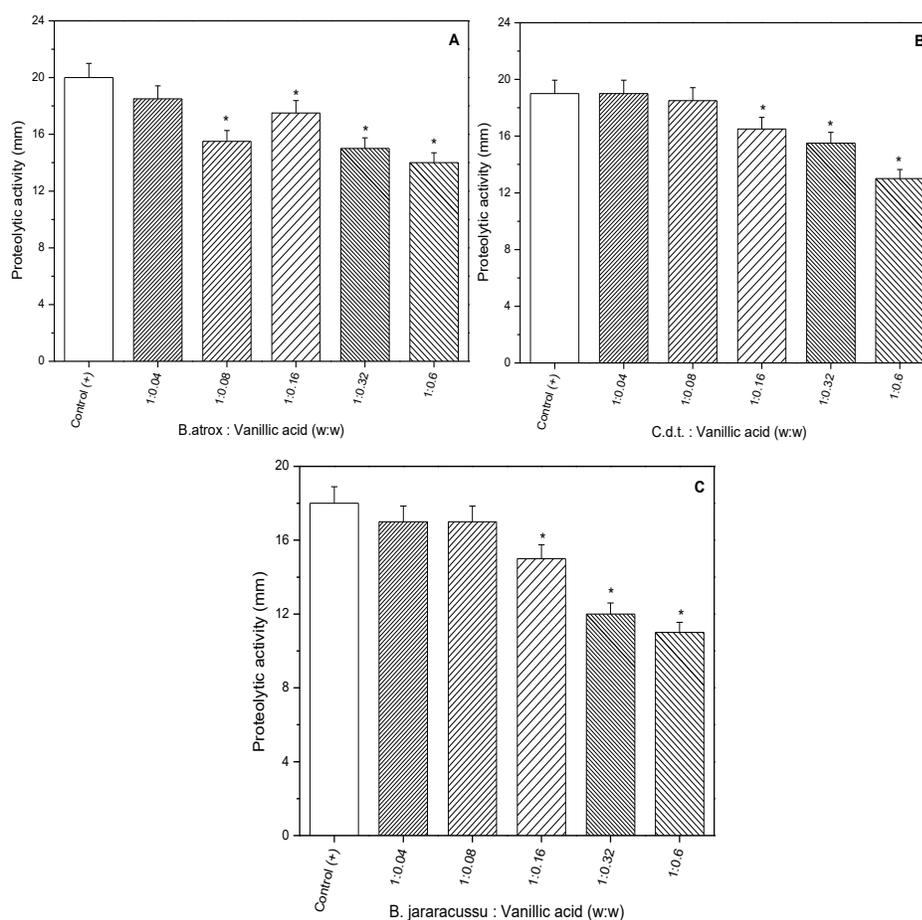


Figure 2 – Proteolytic activity (mm) of three snake venoms pre-incubated with vanillic acid in different ratios (w:w), on casein substrate. The results are presented as the average of triplicates \pm standard deviation. * $p < 0.05$

3.3 Serineprotease activity

Vanillic acid reduced serineprotease activity induced by *B. moojeni* venom in approximately 27 and 45%, when previously incubated with the venom on 1:0.5 and 1:1 ratios (w:w), respectively. The phenolic compound evaluated presented a higher inhibitory potential against *B. jararaca* venom, reducing proteolytic activity in about 64% on both proportions tested (Figure 3).

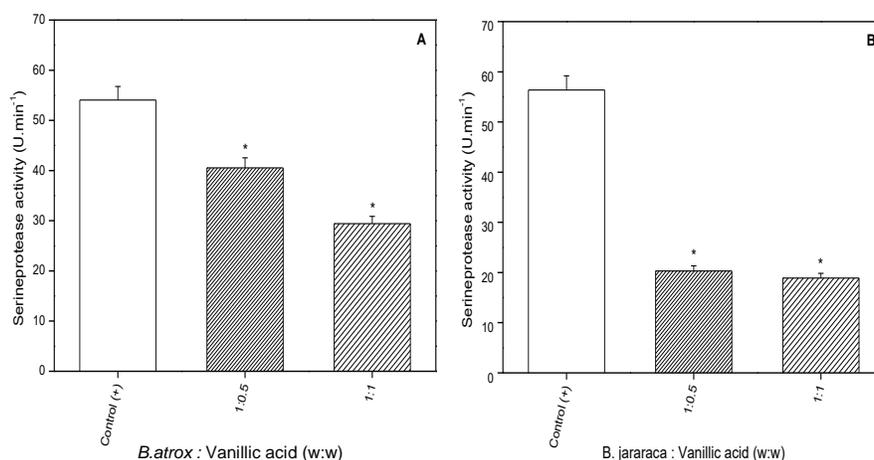


Figure 3 – Serineprotease activity of two snake venoms (A- *B. moojeni* and B- *B. jararaca*) upon BAPNA measured by release of p-nitroanilide (U.min⁻¹). The results are presented as the average of triplicates ± standard deviation. * p < 0.05.

3.4 Fibrinogenolytic activity

Previously incubation of vanillic acid with *C.d.t.* and *B. jararacussu* venoms, on 1:1 ratio (w:w), resulted in 100% inhibition of proteolytic activity towards fibrinogen, induced by these snake venoms. For 1:0.5 ratio, it was observed a partial inhibitory activity on the proteolysis of α and β chains, and

consequent reduction on the generation of fibrinopeptides, in comparison to electrophoretic profiles obtained for controls containing only snake venoms (Figure 4).

Vanillic acid was considered less effective against *B. atrox* venom proteolytic activity, being observed only partial inhibition for 1:1 ratio, and no inhibition at 1:0.5 ratio (Figure 4)

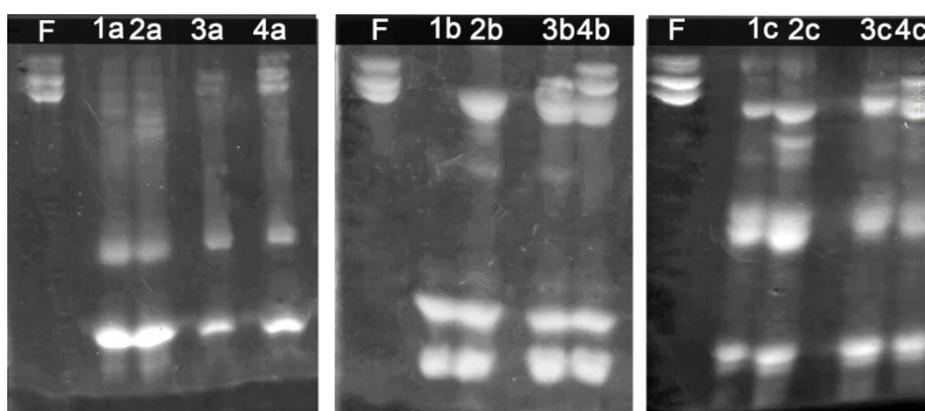


Figure 4 – Electrophoretic profile (SDS-PAGE) of the samples resulting from fibrinogenolytic activity assay. Samples: F – Fibrinogen (80µg); 1a - *B. jararacussu* (40 µg); 2a - *B. jararacussu* + fibrinogen; 3a- *B. jararacussu* + vanillic acid (1:0.5; w:w) + fibrinogen; 4a- *B. jararacussu* + vanillic acid (1:1) + fibrinogen; 1b- *C.d.t.* (40µg); 2b- *C.d.t.* + fibrinogen; 3b- *C.d.t.* + vanillic acid (1:0.5) + fibrinogen; 4b- *C.d.t.* + vanillic acid (1:1) + fibrinogen; 1c- *B. atrox* (40µg); 2c- *B. atrox* + fibrinogen; 3c- *B. atrox* + vanillic acid (1:0.5) + fibrinogen; 4c- *B. atrox* + vanillic acid (1:1) + fibrinogen. Snake venoms and vanillic acid were previously incubated for 30 minutes at 37°C, with posterior addition of fibrinogen and a two-hour incubation period at the same temperature conditions.

3.5 Hemolytic assay in solid medium

For hemolytic activity, induced mostly by proteases and phospholipases A₂, vanillic acid presented a significant inhibition only towards *B. moojeni*, on

1:0.04, 1:0.08 and 1:0.16 ratios. It was observed inhibitions ranging from 13 to 30%. Vanillic acid in higher doses was also evaluated as control, and did not show activity in both assays (Figure 5C). Hemolytic activity induced by *B. jararacussu* venom was increased after incubation with the phenolic compound, but the values were not statistically significant (Figure 5B). For *C. d. terrificus*, no significant inhibitions were observed (Figure 5A).

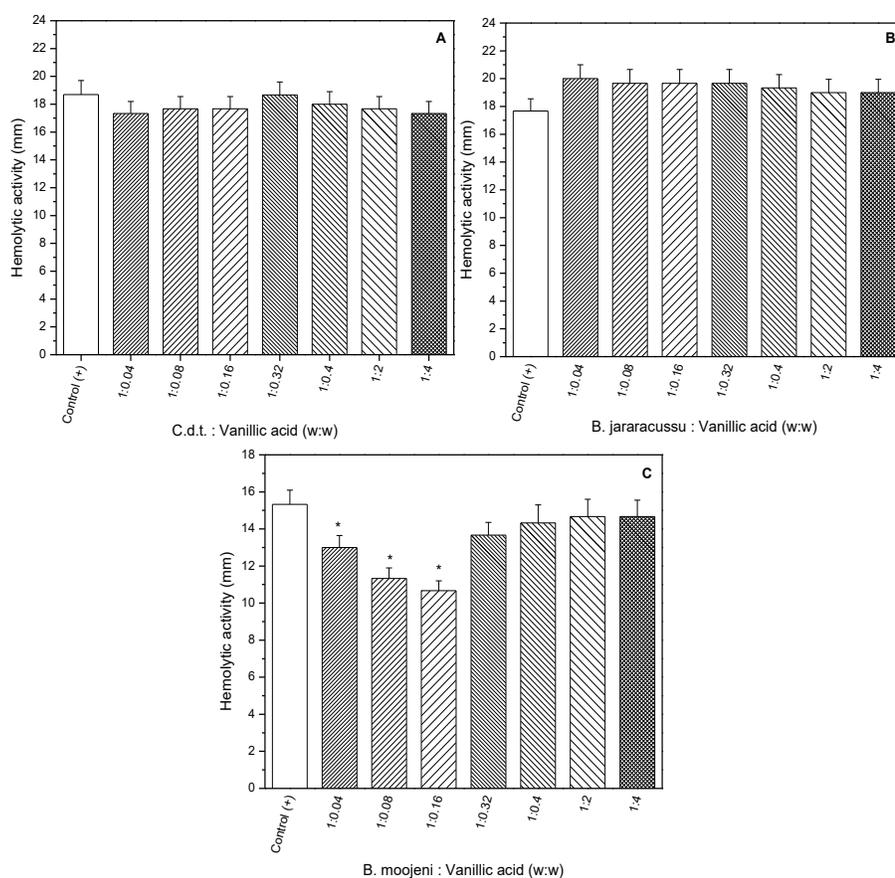


Figure 5 – Hemolytic activity (mm) of three snake venoms pre-incubated with vanillic acid in different ratios (w:w). The results are presented as the average of triplicates \pm standard deviation. * $p < 0.05$

3.6 Snake venom activity on blood thrombi

Thrombin-like enzymes acts by breaking fibrinogen, generating fibrin networks, and intensifying the formation of blood clot. In the other hand, some proteases present the opposite effect, by breaking unspecifically factors of coagulation pathway, thrombin or even fibrinogen, therefore acting as hemorrhagic toxin. In this work, *C. d. terrificus* venom presented thrombotic effect, intensifying the stiffness of thrombi, meanwhile *B. atrox* and *B. jararacussu* snake venoms induced thrombolytic effect.

Thrombolysis induced by *B. atrox* venom was reduced in about 30% after incubation of venom with vanillic acid, on the following ratios 1:0.5 and 1:1 (w:w). For *B. jararacussu*, inhibitions of 14% and 23% were observed at 1:0.5 and 1:1 ratios, respectively (Figure 6A).

Vanillic acid also interfered on thrombotic activity of *C. d. terrificus* venom, although in a lesser extent, inducing inhibitions of 8% in both proportions evaluated, 1:0.5 and 1:1 (w:w) (Figure 6B).

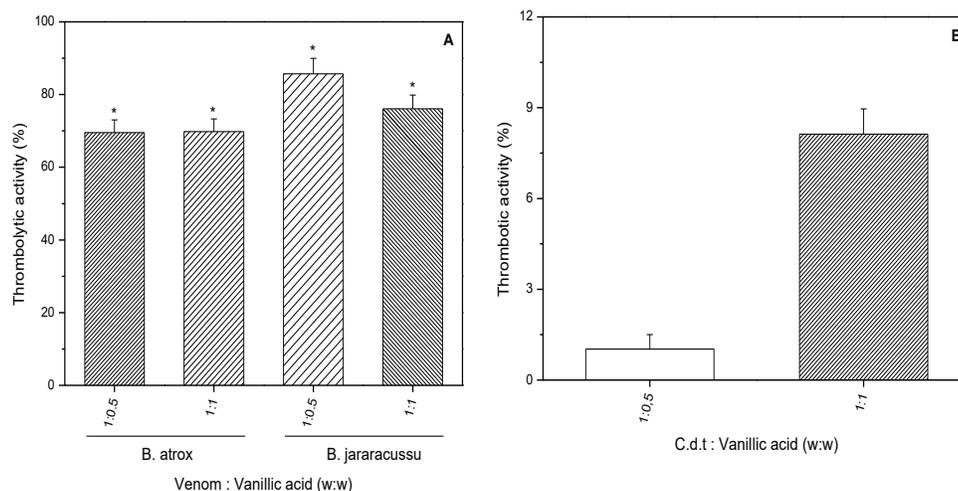


Figure 6 – Thrombolytic activity (expressed as activity percentage) of *B. atrox* e *B. jararacussu* (A) pre-incubated with vanillic acid in different ratios

(w:w). The amounts released by thrombus after incubation with the venoms (positive controls) were considered as 100% thrombolytic activity. Thrombotic activity (expressed as inhibition percentage) of *C. d. terrificus* (B) pre-incubated with vanillic acid in different ratios (w:w). In the control containing only *C.d.t.* venom rigid thrombi were observed, there was no release of fluid, as the sum of blood volume plus the volume of the sample was regarded as 100% lysis allowing the determination of the inhibition values for thrombotic activity. The results are presented as the average of triplicates \pm standard deviation. * $p < 0.05$.

3.7 Coagulant activity

Minimum coagulant doses were determined, being 10 μ g for *B. moojeni* and *B. atrox*, and 20 μ g for *B. jararaca*. Previous incubation of vanillic acid with snake venoms resulted in a delay of coagulation time for citrated plasma, especially against *B. moojeni*. The coagulation time for 1:0.5 and 1:1 ratios were 2.25 and 3 times higher, respectively, than the control group which containing only *B. moojeni* venom (Figure 7A). For *B. jararaca*, 1:0.5 and 1:1 ratios, coagulation times were 2 and 2.1 times higher than the control (Figure 7C). However, in a lesser extent, coagulation time was also delayed for *B. atrox*, previously incubated with vanillic acid, being 1.2 and 1.4 times higher than the control, at the same ratios (Figure 7B).

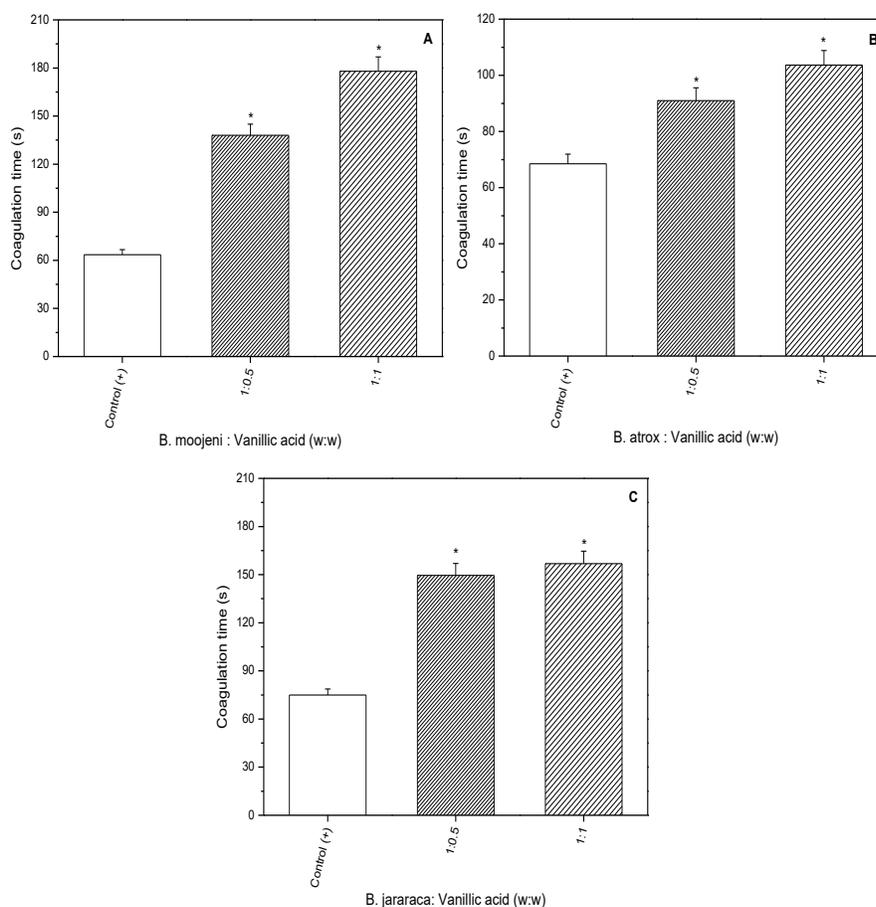


Figure 7 – Coagulant activity of three snake venoms. Venom and vanillic acid were incubated for 30 minutes at 37°C, with subsequent addition of plasma and timing. The results are presented as the average of triplicates \pm standard deviation. * $p < 0.05$

4 DISCUSSION

Based on our findings, the phenolic compound vanillic acid is able to reduce the toxic effects caused by the snake venoms here tested. There was significant inhibitions in all assays performed. We observed that vanillic acid

promotes a better inhibitory action against metalloproteinases, followed by median inhibition for serineprotease and a lesser inhibition against PLA₂s. It is important to mention that it was made controls using only vanillic acid on high dosages, and it was observed no toxic effects in any of the activities tested.

In the first assay, it was evaluated the inhibitory potential of vanillic acid against snake PLA₂s, being efficient only against *B. alternatus* venom. Pithayanukul evaluated the methanolic extract of fresh tea leaves of *Camellia sinensis* L. (Theaceae) against *Naja naja kaouthia* Lesson (Elapidae) and *Calloselasma rhodostoma* Kuhl (Viperidae) venoms and described inhibitory effects attributed to presence of phenolic compounds in the extract [7, 8]. The extract was able to inhibit the toxic action of PLA₂s, as well as proteases, hyaluronidase and L-amino acid oxidase, present in the venoms. In other study, performed by Borges et al. [28], the aqueous extract of *Casearia sylvestris* rich in ellagic acid and its derivatives was able to inhibit the phospholipase activity of different *Bothrops* snakes.

Besides the use of plant extracts, isolated phenolic compounds like 1,3-dihydroxy benzene, 1,3,5-trihydroxy benzene and 2,4,6-trihydroxy acetophenone were able to inhibit the action of *Crotalus adamanteus* PLA₂. In the literature several works points other compounds classes like flavonoids, alkaloids, and other polyhydroxy phenols, as inhibitors for snakes (group I and II) and mammals (group I) phospholipases A₂ [29–32].

Snake venom metalloproteinases (SVMP) and serineproteases (SVSP) acts on a great number of protein substrates, degrading several proteins present in the extracellular matrix from basal membrane, membrane proteins, immunoglobulins, besides affecting the immunological responses by disorganizing cell-matrix and cell-cell interactions [33]. In the present work vanillic acid inhibited the proteolytic action of snake venoms on casein, fibrinogen

and BAPNA substrates. The use of phenolic compounds from different classes such as alkaloids, flavonoids, and terpenes is reported by many authors [34–36].

SVMP and SVSP also acts upon protein components and factors of the coagulation pathway, among them fibrinogen, laminin, fibrin and collagen [37, 38]. In this work, we managed to reduce partially the thrombolytic effect caused by *Bothrops* snakes, but not the thrombotic effect induced by *C.d.t.* venom. This suggests a more specific inhibition towards snake venom toxins from gender *Bothrops* than *Crotalus* toxins which differs in structure and function. Besides this thrombolytic action, *Bothrops* snake venom metalloproteinases and serineproteases causes an intense coagulation. Pre-incubation of vanillic acid and human plasma resulted in a coagulation time delay. Vanillic acid promoted inhibition, being especially effective against *B. moojeni* and *B. atrox*.

Phenolic compounds exert a great number of pharmacologic effects, and, therefore, are targets of study aiming its therapeutic application. Its antioxidant activity, antibiotic, healing, immunomodulatory, antiophidic, anti-inflammatory properties and many others activities were studied by several researchers [11, 39, 40]. In most cases, these therapeutic effects are due to phenolic compounds capacity of bonding with proteins, forming precipitates, capacity of donating electrons, chelating metallic ions and impairing their coordination with the catalytic site, thereby altering protein activity. Thus, many authors reported the effects of phenolic compounds on hydrolases (e.g. hyaluronidases), proteases (metalloproteases and serineproteases) and phospholipases (phospholipases A₂) [41–44].

According to the previously mentioned by da Silva et al. [45], phospholipase activity of *Crotalus adamanteus* venom can be inhibited by the action of the phenolic compounds 3,5-trihydroxy benzene, 1,3-dihydroxy benzene, 2,4,6-trihydroxy acetophenone, 2,4-dihydroxy acetophenone and 2,6-dihydroxy acetophenone. Through computational simulations, it was possible to

observe that the phenolic compounds can bond to the active site of the phospholipase at the amino acids His48 and Asp49, impairing the bonding to the substrate, through hydrogen or hydrophobic bonds, and thus hindering calcium coordination. In this work, the presence of at least one hydroxyl group seems to be an essential pre-requisite for inhibitory activity of phospholipases A₂, as reported by other authors [42, 46].

Active site bonds are of great importance to the mechanism of inhibition, especially interactions that prevent calcium coordination with the catalytic site or promote protein precipitation. Both mechanisms are discussed in several other publications [35, 47–50].

However highly conserved, PLA₂s from Viperidae family may present amino acids substitutions, which result in different interactions with inhibitors, such as phenolic compounds. Thus, we suggested a higher degree of interaction specificity between vanillic acid and PLA₂s present in *B. alternatus*, *B. jararacussu* and *B. moojeni* venom.

Until the present it was characterized several PLA₂ inhibitors derived from natural sources, such as α -tocopherol, which promotes inhibitory action against a phospholipase from *Vipera russelli*. The inhibition occurs through interactions between its hydrocarbon tail and the hydrophobic site of the enzyme, and its hydroxyl group bonded to the aromatic ring and the residues His48 and Asp49 located at the active site of this toxin through hydrogen bonds [51]. Another inhibitor, the rosmarinic acid, present the same inhibitory mechanism observed for α -tocopherol, acting on a phospholipase A₂ from *Bothrops jararacussu*, and it was evidenced by computational simulations [52].

Based on the literature data and observed results in this work, some mechanisms may be suggested to explain the inhibitory action promoted by vanillic acid. The interaction of the phenolic compound with the catalytic site of some snake venom enzymes, could prevent its bonding with the substrate or the

coordination of ions that acts as cofactors. Another mechanism is the chelation of metallic ions making them unavailable to exert their role as cofactors and/or in stabilizing the catalytic structure. And the last hypothesis, the interference on solvation layer of enzymes making them insoluble and resulting in their precipitation [12, 44, 48, 53, 54].

In this work, we consider vanillic acid as a possible adjuvant in serum therapy, once the pre-incubation of this phenolic compound prevented the action phospholipases A₂, serineproteases and metalloproteases. Thus, several relevant physiological alterations, especially local alterations, caused by snake venom enzymes could be minimized by the action of vanillic acid, suggesting the possibility of using this phenolic compound as an adjuvant in serum therapy. However, complementary *in vivo* studies are highly necessary once they may lead to knowledge of safer, secure and effective dosage and administration routes.

5 CONCLUSION

The application of vanillic acid, a phenolic compound derived from hydroxycinnamic acid, was proved effective to inhibit biological activities induced *in vitro* by *Bothrops* and *Crotalus* snake venoms. This research field is very promising, as future studies of the interactions between phenolic compounds and isolated toxins, may lead to the use of different vegetable compounds as alternatives for improving currently available treatments for ophidism victims.

REFERENCES

1. Gutiérrez JM, Williams D, Fan HW, Warrell DA: **Snakebite envenoming from a global perspective: Towards an integrated approach.** *Toxicon* 2010, 56:1223–35.
2. Chippaux J-P: **Estimating the global burden of snakebite can help to improve management.** *PLoS Med* 2008, 5:e221.
3. Rodrigues Sgrignolli L, Florido Mendes GE, Carlos CP, Burdmann EA: **Acute kidney injury caused by *Bothrops* snake venom.** *Nephron Clin Pract* 2011, 119:c131–c137.
4. Albuquerque PLMM, Jacinto CN, Silva Junior GB, Lima JB, Veras M do SB, Daher EF: **Acute kidney injury caused by *Crotalus* and *Bothrops* snake venom: a review of epidemiology, clinical manifestations and treatment.** *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 2013, 55:295–301.
5. **Soros produzidos no Brasil**
[http://www.vitalbrazil.rj.gov.br/soros_produzidos.html]
6. Soares AM, Januário AH, Lourenço MV, Pereira AMS, Pereira PS: **Neutralizing effects of Brazilian plants against snake venoms.** *Drugs Future* 2004, 29:1105.
7. Leanpolchareanchai J, Pithayanukul P, Bavovada R: **Anti-necrosis potential of polyphenols against snake venoms.** *Immunopharmacol Immunotoxicol* 2009, 31:556–62.
8. Pithayanukul P, Leanpolchareanchai J, Bavovada R: **Inhibitory effect of tea polyphenols on local tissue damage induced by snake venoms.** *Phytother Res* 2010, 24 Suppl 1:S56–62.
9. Randhir R, Lin Y-T, Shetty K: **Phenolics, their antioxidant and antimicrobial activity in dark germinated fenugreek sprouts in response to peptide and phytochemical elicitors.** *Asia Pac J Clin Nutr* 2004, 13:295–307.
10. Balasundram N, Sundram K, Samman S: **Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses.** *Food Chem* 2006, 99:191–203.

11. Del Rio D, Rodriguez-Mateos A, Spencer JPE, Tognolini M, Borges G, Crozier A: **Dietary (Poly)phenolics in human health: Structures, bioavailability, and evidence of protective effects against chronic diseases.** *Antioxid Redox Signal* 2013, 18:1818–1892.
12. Guimarães CLS, Moreira-Dill LS, Fernandes RS, Costa TR, Hamelin LIS, Marcussi S, Carvalho BMA, da Silva SL, Fernandes CFC, Calderon LA, Soares AM, Stábili RG: **Biodiversity as a source of bioactive compounds against snakebites.** *Curr Med Chem* 2013.
13. Savoia D: **Plant-derived antimicrobial compounds: alternatives to antibiotics.** *Future Microbiol* 2012, 7:979–90.
14. Zheng W, Wang SY: **Antioxidant activity and phenolic compounds in selected herbs.** *J Agric Food Chem* 2001, 49:5165–5170.
15. Caruana M, Neuner J, Högen T, Schmidt F, Kamp F, Scerri C, Giese A, Vassallo N: **Polyphenolic compounds are novel protective agents against lipid membrane damage by α -synuclein aggregates *in vitro*.** *Biochim Biophys Acta - Biomembr* 2012, 1818:2502–2510.
16. You Q, Chen F, Wang X, Jiang Y, Lin S: **Anti-diabetic activities of phenolic compounds in muscadine against alpha-glucosidase and pancreatic lipase.** *LWT - Food Sci Technol* 2012, 46:164–168.
17. Cai Y, Luo Q, Sun M, Corke H: **Antioxidant activity and phenolic compounds of 112 traditional Chinese medicinal plants associated with anticancer.** *Life Sci* 2004, 74:2157–2184.
18. Urzêda MA, Marcussi S, Silva Pereira LL, França SC, Pereira AMS, Pereira PS, da Silva SL, Guimarães CLS, Calderon LA, Stábili RG, Soares AM, Couto LB: **Evaluation of the hypoglycemic properties of *Anacardium humile* aqueous extract.** *Evidence-Based Complement Altern Med* 2013:1–8.
19. 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* 1988, 26:411–413.
20. Preté PSC, Domingues CC, Meirelles NC, Malheiros SVP, Goñi FM, de Paula E, Schreier S: **Multiple stages of detergent-erythrocyte membrane interaction—A spin label study.** *Biochim Biophys Acta - Biomembr* 2011, 1808:164–170.

21. 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* 2004, 324:224–30.
22. Sant' Ana CD, Ticli FK, Oliveira LL, Giglio JR, Rechia CG V, Fuly AL, Selistre de Araújo HS, Franco JJ, Stabeli RG, Soares AM, Sampaio S V: **BjussuSP-I: a new thrombin-like enzyme isolated from *Bothrops jararacussu* snake venom.** *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 2008, 151:443–54.
23. Laemmli UK: **Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.** *Nature* 1970, 227:680–685.
24. Cintra ACO, De Toni LGB, Sartim MA, Franco JJ, Caetano RC, Murakami MT, Sampaio S V: **Batroxase, a new metalloproteinase from *B. atrox* snake venom with strong fibrinolytic activity.** *Toxicon* 2012, 60:70–82.
25. Rodrigues VM, Soares AM, Guerra-Sá R, Rodrigues V, Fontes MR, 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.
26. Selistre HS, Queiroz LS, Cunha OAB, De Souza GEP, Giglio JR: **Isolation and characterization of hemorrhagic, myonecrotic and edema-inducing toxins from *Bothrops insularis* (jararaca ilhoa) snake venom.** *Toxicon* 1990, 28:261–273.
27. R Core Team: **R: A Language and Environment for Statistical Computing.** *Viena: Viena: R Foundation for Statistical Computing*; 2012.
28. Borges MH, Soares AM, Rodrigues VM, Andrião-Escarso SH, Diniz H, Hamaguchi A, Quintero A, Lizano S, Gutiérrez JM, Giglio JR, Homs-Brandeburgo MI: **Effects of aqueous extract of *Casearia sylvestris* (Flacourtiaceae) on actions of snake and bee venoms and on activity of phospholipases A₂.** *Comp Biochem Physiol Part B Biochem Mol Biol* 2000, 127:21–30.
29. Lindahl M, Tagesson C: **Flavonoids as phospholipase A₂ Inhibitors: Importance of their structure for selective inhibition of group II Phospholipase A₂.** *Inflammation* 1997, 21:347–356.

30. Fawzy AA, Vishwanath BS, Franson RC: **Inhibition of human non-pancreatic phospholipases A₂ by retinoids and flavonoids. Mechanism of action.** *Agents Actions* 1988, 25:394–400.
31. Kim HP, Pham HT, Ziboh VA: **Flavonoids differentially inhibit guinea pig epidermal cytosolic phospholipase A₂.** *Prostaglandins, Leukot Essent Fat Acids* 2001, 65:281–286.
32. da Silva SL, da Silva A, Honório KM, Marangoni S, Toyama MH, da Silva ABF: **The influence of electronic, steric and hydrophobic properties of flavonoid compounds in the inhibition of the xanthine oxidase.** *J Mol Struct THEOCHEM* 2004, 684:1–7.
33. Gutiérrez JM, Escalante T, Rucavado A: **Experimental pathophysiology of systemic alterations induced by *Bothrops asper* snake venom.** *Toxicon* 2009, 54:976–87.
34. Alam MI, Gomes A: **Viper venom-induced inflammation and inhibition of free radical formation by pure compound (2-hydroxy-4-methoxy benzoic acid) isolated and purified from anantamul (*Hemidesmus indicus* R.Br) root extract.** *Toxicon* 1998, 36:207–215.
35. Leanpolchareanchai J, Pithayanukul P, Bavovada R, Saparpakorn P: **Molecular docking studies and anti-enzymatic activities of Thai mango seed kernel extract against snake venoms.** *Molecules* 2009, 14:1404–1422.
36. Cuccioloni M, Mozzicafreddo M, Bonfili L, Cecarini V, Eleuteri AM, Angeletti M: **Natural occurring polyphenols as template for drug design. focus on serine proteases.** *Chem Biol Drug Des* 2009, 74:1–15.
37. Escalante T, Rucavado A, Fox JW, Gutiérrez JM: **Key events in microvascular damage induced by snake venom hemorrhagic metalloproteinases.** *J Proteomics* 2011, 74:1781–94.
38. Serrano SMT: **The long road of research on snake venom serine proteinases.** *Toxicon* 2013, 62:19–26.
39. Dai J, Mumper RJ: **Plant phenolics: extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties.** *Molecules* 2010, 15:7313–52.

40. Malta L, Ghiraldini F, Reis R: ***In vivo* analysis of antigenotoxic and antimutagenic properties of two Brazilian Cerrado fruits and the identification of phenolic phytochemicals.** *Food Res* 49:604-611 2012.
41. Gopi K, Renu K, Sannanaik Vishwanath B, Jayaraman G: **Protective effect of *Euphorbia hirta* and its components against snake venom induced lethality.** *J Ethnopharmacol* 2015, 165:180-90.
42. Lindahl M, Tagesson C: **Flavonoids as phospholipase A₂ inhibitors: Importance of their structure for selective inhibition of group II phospholipase A₂.** *Inflammation* 1997, 21:347-356.
43. Shabbir A, Shahzad M, Masci P, Gobe GC: **Protective activity of medicinal plants and their isolated compounds against the toxic effects from the venom of *Naja* (cobra) species.** *J Ethnopharmacol* 2014, 157:222-7.
44. Havsteen BH: **The Biochemistry and Medical Significance of the Flavonoids.** Volume 96; 2002.
45. da Silva SL, Calgarotto AK, Maso V, Damico DCS, Baldasso P, Veber CL, Villar JAFP, Oliveira ARM, Comar Jr. M, Oliveira KMT: **Molecular modeling and inhibition of phospholipase A₂ by polyhydroxy phenolic compounds.** *Eur J Med Chem* 2009, 44:312-321.
46. Pereañez JA, Núñez V, Patiño AC, Londoño M, Quintana JC: **Inhibitory effects of plant phenolic compounds on enzymatic and cytotoxic activities induced by a snake venom phospholipase A₂.** *Vitae* 2011, 18:295-304.
47. Pithayanukul P, Ruenraroengsak P, Bavovada R, Pakmanee N, Suttisri R, Saen-oon S: **Inhibition of *Naja kaouthia* venom activities by plant polyphenols.** *J Ethnopharmacol* 2005, 97:527-33.
48. Pithayanukul P, Leanpolchareanchai J, Bavovada R: **Inhibitory effect of tea polyphenols on local tissue damage induced by snake venoms.** *Phyther Res* 2010, 24:S56-S62.
49. Pithayanukul P, Leanpolchareanchai J, Saparpakorn P: **Molecular docking studies and anti-snake venom metalloproteinase activity of Thai mango seed kernel extract.** *Molecules* 2009, 14:3198-3213.
50. Nirmal N, Praba GO, Velmurugan D: **Modeling studies on phospholipase A₂-inhibitor complexes.** *Indian J Biochem Biophys* 2008, 45:256-62.

51. Chandra V, Jasti J, Kaur P, Betzel C, Srinivasan A, Singh TP: **First structural evidence of a specific inhibition of phospholipase A₂ by α -Tocopherol (Vitamin E) and its implications in inflammation: Crystal structure of the complex formed between phospholipase A₂ and α -Tocopherol at 1.8Å resolution.** *J Mol Biol* 2002, 320:215–222.
52. Ticli FK, Hage LIS, Cambraia RS, Pereira PS, Magro ÂJ, Fontes MRM, Stábeli RG, Giglio JR, França SC, Soares AM, Sampaio S V.: **Rosmarinic acid, a new snake venom phospholipase A₂ inhibitor from *Cordia verbenacea* (Boraginaceae): antiserum action potentiation and molecular interaction.** *Toxicon* 2005, 46:318–327.
53. B. Mors W, Célia do Nascimento M, M. Ruppelt Pereira B, Alvares Pereira N: **Plant natural products active against snake bite — the molecular approach.** *Phytochemistry* 2000, 55:627–642.
54. Muralidhara BK, Prakash V: **Interaction of 3'-O-caffeoyl D-quinic acid with human serum albumin.** *Int J Pept Protein Res* 1995, 46:1–8.

**ARTIGO II: EPICATEQUINA E CATEQUINA COMO INIBIDORES
ENZIMÁTICOS NATURAIS: AÇÃO SOBRE
METALOPROTEASES, SERINOPROTEASES E FOSFOLIPASES**

A₂

Pedro Henrique Souza Cesar¹, Anderson Assaid Simão¹, Silvana Marcussi^{1*}

1. Departamento de Química, Universidade Federal de Lavras, 37200-000 Lavras, Brasil.

Artigo formatado segundo as normas da revista BMC Pharmacology and Toxicology

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

RESUMO

Acidentes ofídicos são considerados um problema de saúde pública mundial devido a alto índice de ocorrência e mortalidade que induzem. A ação dos compostos naturais em inibir a toxicidade de peçonhas de serpentes vem sendo amplamente investigada e muitas misturas ou moléculas isoladas têm se mostrado eficazes, principalmente na minimização de efeitos locais e seguras. A incubação da catequina e epicatequina com peçonha de *Bothrops alternatus* resultou em inibições da atividade fosfolipásica variando entre 20 e 95% (proporções peçonha:composto; 1:0,1 a 1:10; m:m). A catequina na proporção de 1:10 inibiu 42,5% a atividade hemolítica induzida por *B. moojeni* além de induzir inibições significativas também sobre *Crotalus durissus terrificus* (1:2 e 1:4) e *B. jararacussu* (1:0,04 a 1:4). A atividade hemolítica induzida por *B. jararacussu* e *B. moojeni* (1:0,32 a 1:4) foi inibida de forma significativa pela epicatequina, com reduções aproximadas de 20 e 40%, respectivamente. Sobre a trombólise induzida por *B. atrox* e *B. jararacussu* a catequina inibiu em aproximadamente 40% (1:0,5 e 1:1) e 15%, respectivamente. Contudo, para epicatequina foram observadas inibições ao redor de 30% sobre a ação trombolítica induzida por *B. atrox* e *B. jararacussu*. A coagulação induzida por *B. moojeni*, *B. atrox* e *B. jararacussu* foi significativamente inibida pela catequina e epicatequina sendo observados tempos 2 a 3 vezes maiores, após incubação prévia das peçonhas com os compostos nas proporções 1:0,5 e 1:1. Para a atividade proteolítica sobre a caseína as inibições mais significativas, ao redor de 17 e 27%, foram observadas para ambos os compostos agindo sobre as peçonhas de *B. atrox* e *B. jararacussu*, respectivamente. A catequina inibiu a ação serinoproteolítica induzida por *B. atrox* e *B. jararaca* em 64% e a epicatequina em 65%, quando incubadas na proporção 1:1. A proteólise do fibrinogênio foi totalmente inibida apenas pela

catequina agindo sobre as peçonhas de *B. atrox* e *C.d.t.*, na proporção 1:1. Assim os compostos avaliados mostram importante ação inibidora sobre proteases e fosfolipases A₂ podendo estes ser explorados como adjuvantes para a soroterapia ou ainda com fins farmacêuticos considerando sua ação sobre enzimas homólogas presentes no organismo humano, amplamente atuantes em diversos processos fisiopatológicos.

Palavras chave: epicatequina, catequina, inibidores enzimáticos, compostos fenólicos, toxinas de peçonhas de serpentes.

1 INTRODUÇÃO

O ofidismo atinge principalmente populações de áreas rurais com uma estimativa em torno de 1,2 a 5,5 milhões de pessoas picadas por ano, das quais 25 mil a 125 mil pessoas vão a óbito e aproximadamente 400 mil desenvolvem sequelas permanentes [1, 2]. No Brasil o número chega a 20 mil acidentes ofídicos registrados nos centros de saúde, com 0,43% resultando em mortes, sendo o gênero *Bothrops* (incluindo *Bothrocophias*) responsável por 90,5% dos acidentes, devido a sua ampla distribuição geográfica e comportamento agressivo dos espécimes deste gênero [3, 4].

Os acidentes envolvendo serpentes são muito variados quando se trata dos efeitos locais, mesmo que tenham sido acometidos por serpentes de uma mesma espécie ou gênero. Isto ocorre devido a fatores como distribuição geográfica, alimentação, idade e variações ambientais que podem alterar a composição da peçonha e a presença/ausência de determinadas toxinas.

O gênero *Bothrops* possui a peçonha composta principalmente por proteases (metaloproteases e serinoproteases) e fosfolipases A₂, e em menor quantidade nucleases, L-aminoácido oxidases, entre outras [5]. Essas toxinas desempenham atividades que favorecem a degradação de tecidos no local da picada e penetração e distribuição de toxinas no corpo da vítima, resultando em efeitos como taquicardia e aumento da frequência respiratória, degradação de células que compõem as paredes de vasos sanguíneos, hemorragias, miotoxicidade e formação de trombos, podendo levar a vítima ao óbito, ou resultar em sequelas permanentes.

Acidentes ofídicos requerem pronto atendimento em ambiente hospitalar e geram um elevado impacto socioeconômico [6]. Embora a soroterapia seja eficaz contra os efeitos sistêmicos, muitas sequelas permanecem, decorrentes dos efeitos locais induzidos por toxinas não neutralizadas pelo soro [7]. O

tratamento ao ofidismo também é passível de induzir graves efeitos adversos resultantes da administração de anticorpos aquinos em organismos humanos [7, 8]. Em adição, a realização do tratamento soroterápico torna-se inviável nas regiões de maior incidência uma vez que estas localizam-se em áreas de difícil acesso [9].

Dessa forma, a busca por tratamentos alternativos que possuam baixo custo e possibilidade de ampla distribuição, assim como complementares que em combinação com a soroterapia proporcionem um tratamento mais eficaz, é de grande valia dentro do contexto mundial do ofidismo.

Assim, a ciência vem buscando compostos de origem natural que possuam atividade antiofídica, seja contra toxinas isoladas ou um grupo de toxinas de diferentes classes. Neste contexto, alguns trabalhos de revisão já relataram mais de 100 espécies de plantas utilizadas na medicina popular e muitas já com validação científica de sua ação inibidora, de interesse farmacêutico, sobre toxinas ofídicas que atuam em efeitos locais e sistêmicos. Para muitas plantas descritas os efeitos terapêuticos se devem aos compostos fenólicos, que aparecem sob várias formas como flavonoides, alcaloides, taninos e ácidos fenólicos [10–13].

As propriedades farmacológicas de compostos fenólicos que apontam para seu uso terapêutico são atribuídas principalmente a sua capacidade antioxidante, a interações específicas com diversas enzimas e proteínas, bem como a seu papel protetor sobre membranas e modulador sobre a resposta imune [14–18].

Nesse contexto o presente trabalho teve como objetivo avaliar a ação inibitória dos compostos fenólicos catequina e epicatequina sobre atividades tóxicas, exercidas por diferentes classes de toxinas presentes em peçonhas de serpentes, pertencentes aos gêneros *Bothrops* e *Crotalus*.

2 Material e métodos

2.1 Obtenção de Sangue Humano

O sangue utilizado para os testes de atividade hemolítica, trombolítica e para a avaliação do tempo de coagulação foi obtido de voluntários saudáveis e que não tenham feito uso de medicação durante um período de 30 dias antes da coleta. O sangue foi coletado por punção venosa em tubos contendo citrato (para os ensaios de coagulação e atividade hemolítica) e sem anticoagulante para a atividade trombolítica.

Todos os experimentos foram realizados de acordo com 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/44607215.9.0000.5148).

2.2 Compostos fenólicos e peçonhas

As peçonhas brutas liofilizadas de *B. alternatus*, *B. jararaca*, *B. moojeni*, *B. jararacussu*, *B. atrox* e *Crotalus durissus terrificus* foram obtidas comercialmente do serpentário Bioagents (Batatais, São Paulo). Os compostos catequina e epicatequina foram obtidos da Sigma Aldrich™.

Todas as peçonhas utilizadas foram dissolvidas em salina tamponada em fosfato (PBS) para uso, na concentração de 10 µg/µL. Os compostos catequina e epicatequina foram dissolvidos em PBS nas concentrações de 10 µg/µL e 5 µg/µL, sendo as soluções armazenadas em ambiente protegido da luz a -12°C.

2.3 Atividade fosfolipásica e hemolítica em meio sólido

A atividade fosfolipásica foi avaliada conforme descrito por Gutiérrez, 1988 [19]. Os ensaios de inibição de fosfolipases A₂ foram realizados utilizando peçonhas de *Bothrops moojeni*, *B. jararacussu* e *B. alternatus* para a indução da

quebra de fosfolipídios, em que 30 µg de cada peçonha foram incubados previamente com os compostos catequina e epicatequina, por 30 minutos a 37°C, nas proporções 1:0,1; 1:0,2; 1:0,4; 1:0,8; 1:1; 1:5 e 1:10 (peçonha/fenólico, m/m). Controles contendo apenas peçonhas ou os compostos fenólicos (300µg) também foram avaliados.

Para o ensaio hemolítico foi utilizado o mesmo método descrito para a atividade fosfolipásica, com a substituição da gema de ovo por um concentrado de eritrócitos humanos em mesmo volume. Para a obtenção das hemácias o sangue foi colhido na presença de citrato, misturado em mesmo volume à solução salina (2 mM NaH₂PO₄; 3 mM Na₂HPO₄; 154 mM NaCl; pH 7.4) e centrifugado a 700g (Fanem Baby®I Modelo 206 BL) por 10 minutos. O plasma foi removido, e as hemácias foram suspensas em 5 mmol L⁻¹ de PBS, pH 7,4 e centrifugadas nas mesmas condições. Esta etapa de lavagem foi repetida três vezes conforme descrito por Preté et al., (2011)

A inibição da atividade hemolítica foi avaliada para as peçonhas de *B. jararacussu*, *B. moojeni* e *C. d. terrificus* (30µg), sendo estas previamente incubadas com a catequina e epicatequina, por 30 minutos à 37°C, nas proporções 1:0,04, 1:0,08; 1:0,16; 1:0,32, 1:0,4, 1:2 e 1:4 (m/m). Ambas as atividades foram avaliadas pela medida (mm) do halo translúcido formado ao redor dos orifícios nos géis, onde as amostras foram aplicadas.

2.4 Atividade sobre trombos sanguíneos

As atividades trombolítica e trombótica foram avaliadas sobre coágulos sanguíneos humanos formados *in vitro* de acordo Cintra et al. (2012) [21]. Os coágulos foram incubados por 24 horas a 37°C com amostras contendo peçonha bruta (*B. atrox*, *B. jararacussu* e *C. d. terrificus*; 30µg), PBS ou peçonha

previamente incubada (30 minutos à 37°C) com a catequina ou epicatequina nas proporções 1:0,5 e 1:1 (m/m).

As atividades foram estimadas pela medida do volume de líquido liberado por cada trombo.

2.5 Atividade fibrinogenolítica

Para a avaliação da atividade fibrinogenolítica foi utilizada a metodologia de eletroforese em gel de poliacrilamida previamente descrita por Laemmli (1970) [22]. Os ensaios de inibição de proteases foram realizados com incubação prévia das peçonhas de *B. atrox*, *B. jararacussu* e *C. d. t.* (40µg), com a catequina ou epicatequina nas proporções 1:0,5 e 1:1 (m/m), por período de 30 minutos à 37°C, posterior adição do fibrinogênio e subsequente incubação por mais 2h em mesma temperatura.

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 induzida pelas peçonhas.

2.6 Atividade proteolítica sobre a caseína

Para a avaliação desta atividade foi utilizada a metodologia descrita por Wang, Shih e Huang (2004) [23], com modificações. Um gel foi elaborado seguindo metodologia descrita por Gutiérrez (1988), sendo realizada a substituição da gema de ovo por solução de caseína, sendo a concentração da caseína ajustada para obter a mesma quantidade de substrato por teste, descrita por Wang, Shih e Huang (2004) [23], para atividade em meio líquido.

As peçonhas de *B. moojeni*, *B. jararacussu* e *B. alternatus* (40 µg) e a catequina ou epicatequina foram incubadas previamente nas proporções 1:0,1, 1:0,5, 1:1, 1:5 e 1:10 (m/m) por 30 minutos à 37°C, e posteriormente aplicadas à orifícios elaborados no gel, seguindo com incubação por período de 18 horas à 37°C em câmara de cultivo celular. Controles contendo apenas as peçonhas, catequina ou epicatequina também foram avaliados.

A atividade proteolítica foi avaliada pela medida dos diâmetros dos halos translúcidos, formados no gel ao redor dos orifícios, sendo os resultados expressos em porcentagem, onde os controles contendo apenas as peçonhas correspondem à 100% de atividade proteolítica.

2.7 Atividade coagulante

A avaliação do tempo de coagulação foi realizada conforme descrita por Rodrigues et al. (2000) [24], procedendo com a incubação prévia dos compostos catequina ou epicatequina com as peçonhas por um período de 30 minutos, a 37°C, nas proporções de 1:0,5 e 1:1 (peçonha: composto, m:m). Tubos contendo plasma citratado foram mantidos em banho a 37°C até a estabilização da temperatura. As amostras incubadas foram adicionadas ao plasma (200 µL) e o tempo cronometrado até formação de um coágulo rígido. Controles contendo somente as peçonhas, catequina ou epicatequina também foram realizados. A dose coagulante mínima foi definida previamente, sendo esta a quantidade mínima de peçonha capaz de induzir a coagulação do plasma em um intervalo entre 1 minuto e 1 minuto e 25 segundos [25].

2.8 Atividade enzimática de serinoproteases

A atividade das serinoproteases pode ser mensurada pela degradação do substrato cromogênico N α -Benzoyl-L-arginine 4-nitroanilide hydrochloride (BAPNA), conforme metodologia descrita por Sant'Ana et al. (2008) [26]. O substrato (0,04g de BAPNA em 1mL de DMSO) foi adicionado a 1% em Tris-HCl 0,1M preparado em PBS com adição de CaCl₂ à 0,294%, pH 8,1, sendo utilizado 200 μ L deste meio reacional para cada teste. As amostras avaliadas continham peçonha pura de *B. atrox* ou *B. jararaca* (100 μ g), apenas substrato (controle negativo) ou peçonhas previamente incubadas (30 minutos a 37°C) com a catequina ou epicatequina nas proporções 1:0.5 e 1:1 (m:m). Ensaio piloto foram realizados com diferentes doses das peçonhas, possibilitando a padronização do tempo de reação e da coloração, indicativa de atividade de serinoproteases, passível de ser aferida espectrofotometricamente (Abs.: 415 nm). As reações foram paradas com adição de 1 mL de ácido cítrico 10%. Para quantificação da atividade enzimática, os dados de absorbância foram convertidos considerando cada unidade de leitura correspondente a 0,009 U.min⁻¹, referente a quantidade do produto p-nitroanilida liberada por minuto de reação.

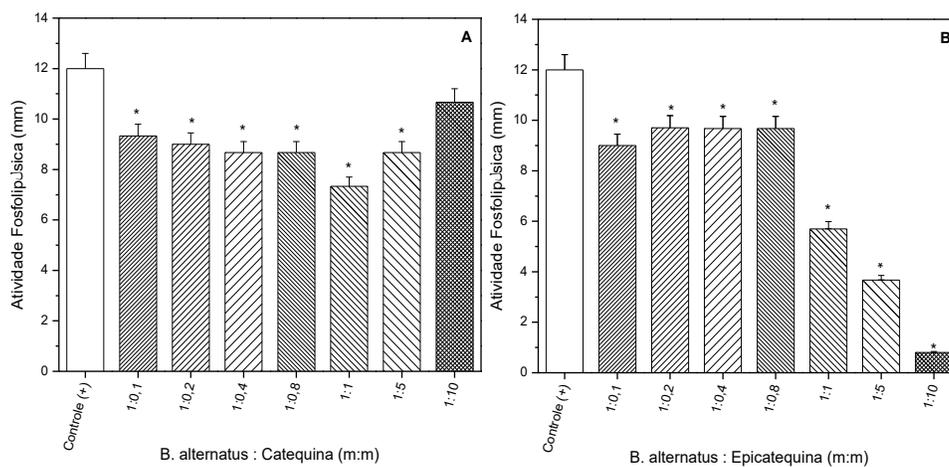
2.9 Análise estatística

Os resultados são apresentados como a média de triplicatas \pm o desvio padrão. Os dados foram avaliados estatisticamente por análise de variância, e as médias foram comparadas usando o teste Scott Knott ($p < 0,05$) com auxílio do programa estatístico R [27].

3 RESULTADOS

3.1 Atividade Fosfolipásica

Ambos os compostos avaliados, catequina e epicatequina, apresentaram inibição significativa apenas sobre a atividade fosfolipásica induzida pela peçonha de *B. alternatus* (Figura 1A e B). As incubações prévias da peçonha com catequina resultaram em inibições ao redor de 22,25 % para as proporções 1:0,1, 1:0,2, 1:0,4, 1:0,8 e 1:5 e uma inibição de 36 % para a proporção de 1:1. Para a epicatequina, foram observadas inibições variando entre 25 % (1:0,1) e 95% (1:10) (Figura 1A e B). Contudo, tal inibição, não foi observada para as peçonhas de *B. jararacussu* e *B. moojeni* (Figura 1C, D, E e F), sendo observadas apenas reduções da atividade estatisticamente não significativas.



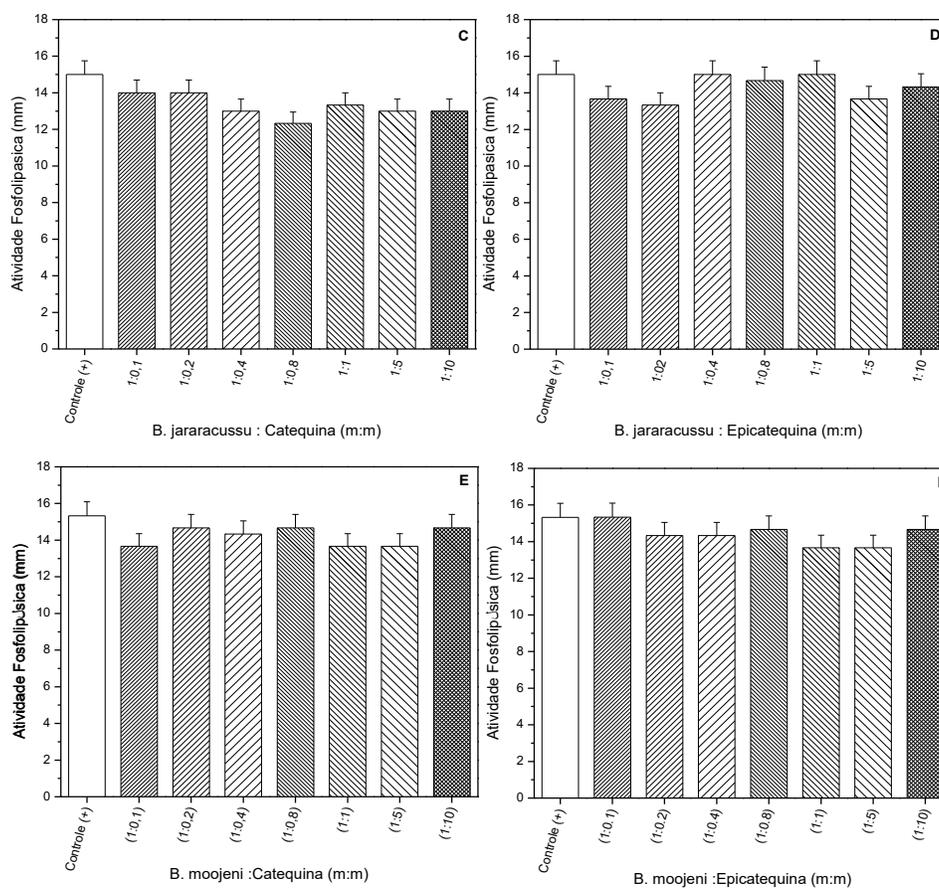


Figura 1 – Atividade fosfolipásica (mm) de peçonhas de serpentes das espécies *B. alternatus* (A e B), *B. jararacussu* (C e D) e *B. moojeni* (E e F), previamente incubadas com catequina e epicatequina. Controle (+): apenas peçonha (30 μ g). Os resultados correspondem às médias de triplicatas de dados obtidos em cada proporção (peçonha: composto fenólico, m:m) e os desvios padrão calculados, * $p < 0.05$.

3.2 Atividade Hemolítica

A atividade hemolítica em meio sólido ocorre principalmente pela ação de fosfolipases A_2 que promovem a quebra de fosfolipídeos que integram as

membranas celulares das hemácias e pela ação de proteases como serinoproteases e metaloproteases que degradam proteínas de membranas.

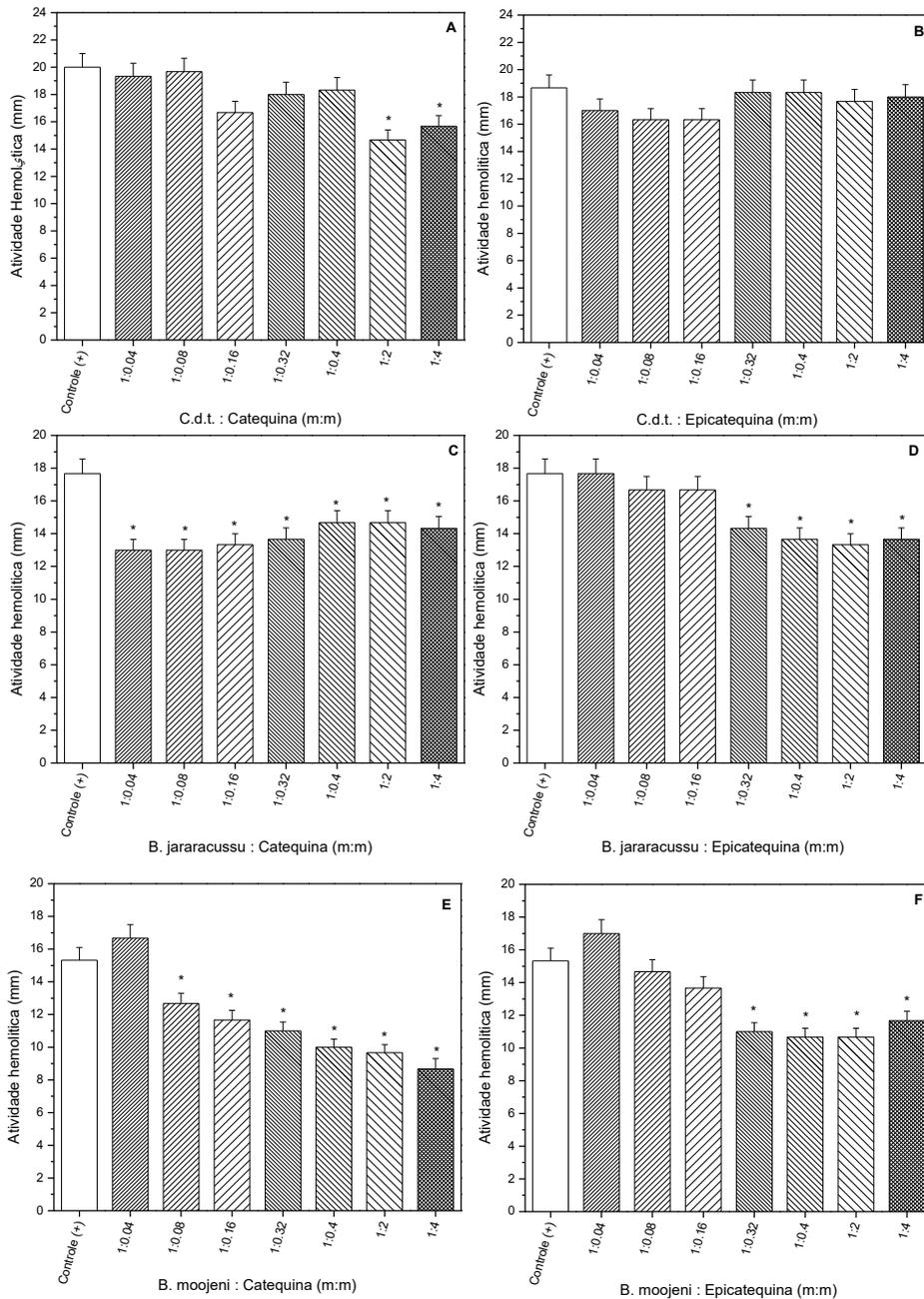


Figura 2 – Atividade hemolítica (mm) de peçonhas de serpentes das espécies *C.d.t.* (A e B), *B. jararacussu* (C e D) e *B. moojeni* (E e F), previamente incubadas com catequina e epicatequina. Controle (+): apenas peçonha (30 µg). Os resultados correspondem às médias de triplicatas de dados obtidos em cada proporção (peçonha: composto fenólico, m:m) e os desvios padrão calculados, * $p < 0.05$.

A incubação prévia do composto catequina com a peçonha de *C.d.t.* resultou em inibição de 28,5% para a proporção de 1:2 e 25% para a proporção de 1:4 (Figura 2A).

Já para a peçonha de *B. jararacussu* foram observadas inibições ao redor de 25% para todas as proporções avaliadas (1:0,04 a 1:4). A catequina apresentou maior potencial inibidor sobre a peçonha de *B. moojeni*, induzindo inibições de 15% (1:0,8), 34% (1:0,4) e 42,5% (1:4).

A incubação prévia da peçonha de *C.d.t.* com a epicatequina, em diferentes proporções, resultou em inibições estatisticamente não significativas. Contra a peçonha de *B. jararacussu*, os valores mais expressivos foram de 19%, 25% e 23% para as proporções de 1:0,32, 1:2 e 1:4, respectivamente. Enquanto que nos testes utilizando a peçonha de *B. moojeni* foram observadas inibições ao redor de 24% para as proporções de 1:0,32 a 1:4.

3.3 Atividade sobre trombos sanguíneos

A incubação prévia do composto catequina com a peçonha de *B. atrox* resultou em porcentagens de inibição de aproximadamente 37,5 e 43,75 para as proporções 1:0,5 e 1:1, respectivamente. Para a mesma peçonha, a epicatequina apresentou porcentagens de inibição ao redor de 37,5 e 31,25 para as proporções 1:0,5 e 1:1, respectivamente (Figura 3A). A lise de trombos induzida pela peçonha de *B. jararacussu* foi inibida em aproximadamente 15% na presença da catequina

e 30% na presença da epicatequina, para ambas as proporções avaliadas (Figura 3B).

Os compostos catequina e epicatequina, em ambas as proporções avaliadas, não induziram inibições estatisticamente significativas (em torno de 1,3%) sobre a atividade trombótica resultante da ação da peçonha de *C.d.t.* (Figura 3C).

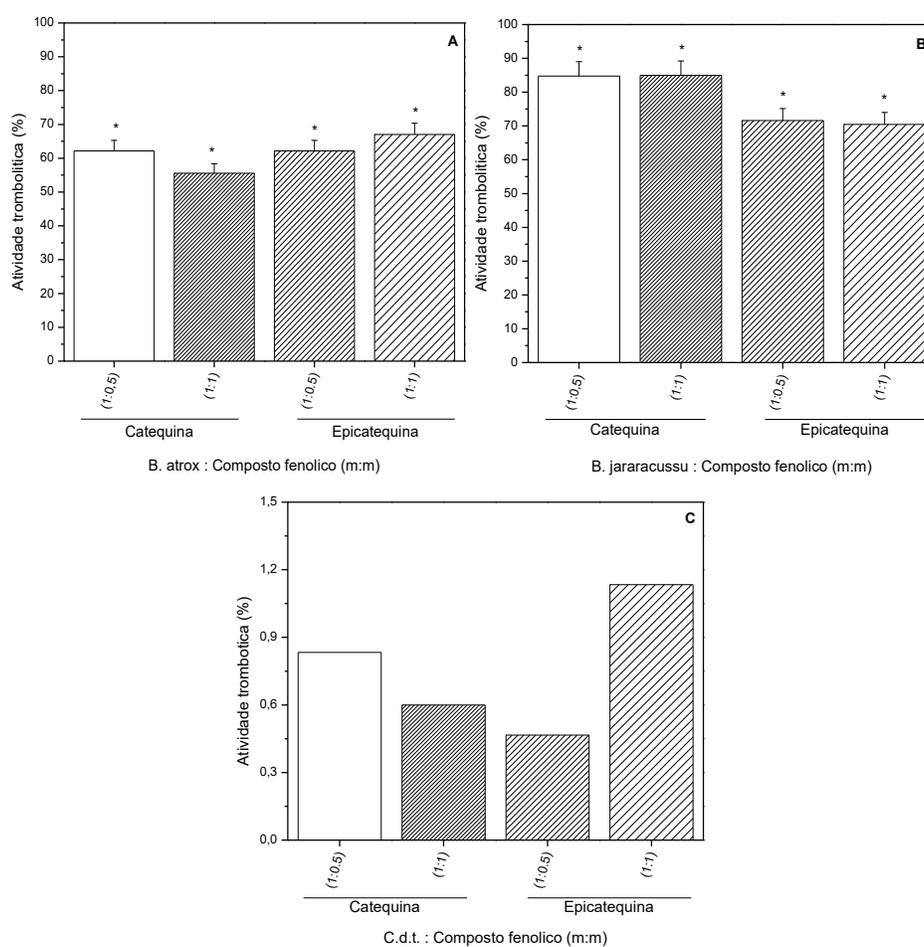


Figura 3 – Atividade trombótica (%) induzida pelas peçonhas de *B. atrox* (A) e *B. jararacussu* (B) e, inibição da atividade trombótica (%) induzida

pela peçonha de *C.d.t.*, previamente incubadas com catequina e epicatequina. Controle (+): apenas peçonha (30 µg). Os resultados correspondem às médias de triplicatas de dados obtidos em cada proporção (peçonha: composto fenólico, m:m) e os desvios padrão calculados, * $p < 0.05$.

2.4 Atividade Coagulante

O aumento no tempo de coagulação, induzido pela catequina, nas maiores inibições, mostrou-se uniforme para todas as peçonhas avaliadas, sendo observado um aumento médio de 2,75 vezes quando comparada aos controles (Figura 4). A proporção 1:0,5 induziu valores de inibição superiores a proporção (1:1). Este resultado pode ser parcialmente por hipóteses previamente descritas, uma delas seria a precipitação de toxinas pela formação de complexos com os compostos avaliados, em adição o aumento do número de moléculas vegetais no meio reacional pode ter resultado na captação de determinados íons (ex: cálcio, zinco e magnésio) por estes compostos, diminuindo a disponibilidade de cofatores enzimáticos essenciais para a atividade de algumas toxinas que atuam na cascata de coagulação.

A epicatequina inibiu a atividade coagulante induzida pela peçonha de *B. moojeni*, estendendo o tempo de coagulação em média 3,5 vezes, em relação ao controle. O tempo de coagulação resultante da ação da peçonha de *B. jararacussu* aumentou aproximadamente 3,2 vezes e o induzido por *B. atrox*, 2,8 vezes, em relação aos respectivos controles. Assim como observado para a catequina, a incubação prévia das peçonhas com a epicatequina na menor proporção (1:0,5) mostrou-se mais efetivas em inibir a atividade coagulante.

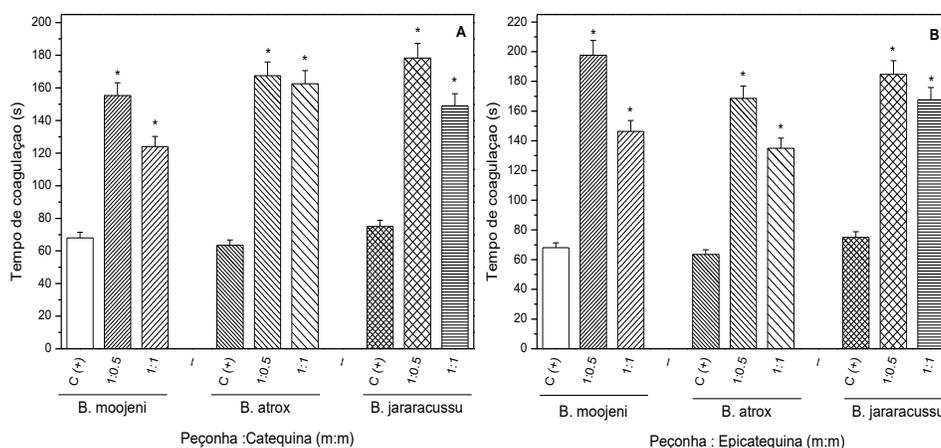


Figura 4 – Atividade coagulante (s) induzida pelas peçonhas de *B. moojeni* (DCM: 10 μ g), *B. atrox* (DCM: 10 μ g) e *B. jararacussu* (DCM: 20 μ g), previamente incubadas com catequina (A) e epicatequina (B). Os resultados correspondem às médias de triplicatas de dados obtidos em cada proporção (peçonha: composto fenólico, m:m) e os desvios padrão calculados, * p < 0.05.

2.5 Atividade Caseinolítica

A incubação prévia da catequina com a peçonha de *B. atrox* resultou em inibições significativas, com média de 18,35% para todas as proporções avaliadas. Para *B. jararacussu*, apenas as proporções 1:0,32 e 1:0,6 inibiram a ação proteolítica, com inibição média de 12,5%. E peçonha de *C.d.t.* somente foi inibida quando incubada com a maior proporção, de 1:0,6, sendo obtida uma redução de aproximadamente 13,5% da atividade proteolítica sobre a caseína (Figura 5A, C e E).

De forma similar, a epicatequina exerceu inibição de aproximadamente 13,35% para a peçonha de *B. atrox*, nas proporções que variaram entre 1:0,04 e 1:0,6. Inibições de aproximadamente 17% foram observadas para as proporções 1:0,16 e 1:0,32 e 28% para 1:0,6. Enquanto que a peçonha de *C.d.t.* foi inibida em

17%, valor estatisticamente significante, apenas quando previamente incubada com epicatequina na proporção 1:0,6 (Figura 5B, D e F).

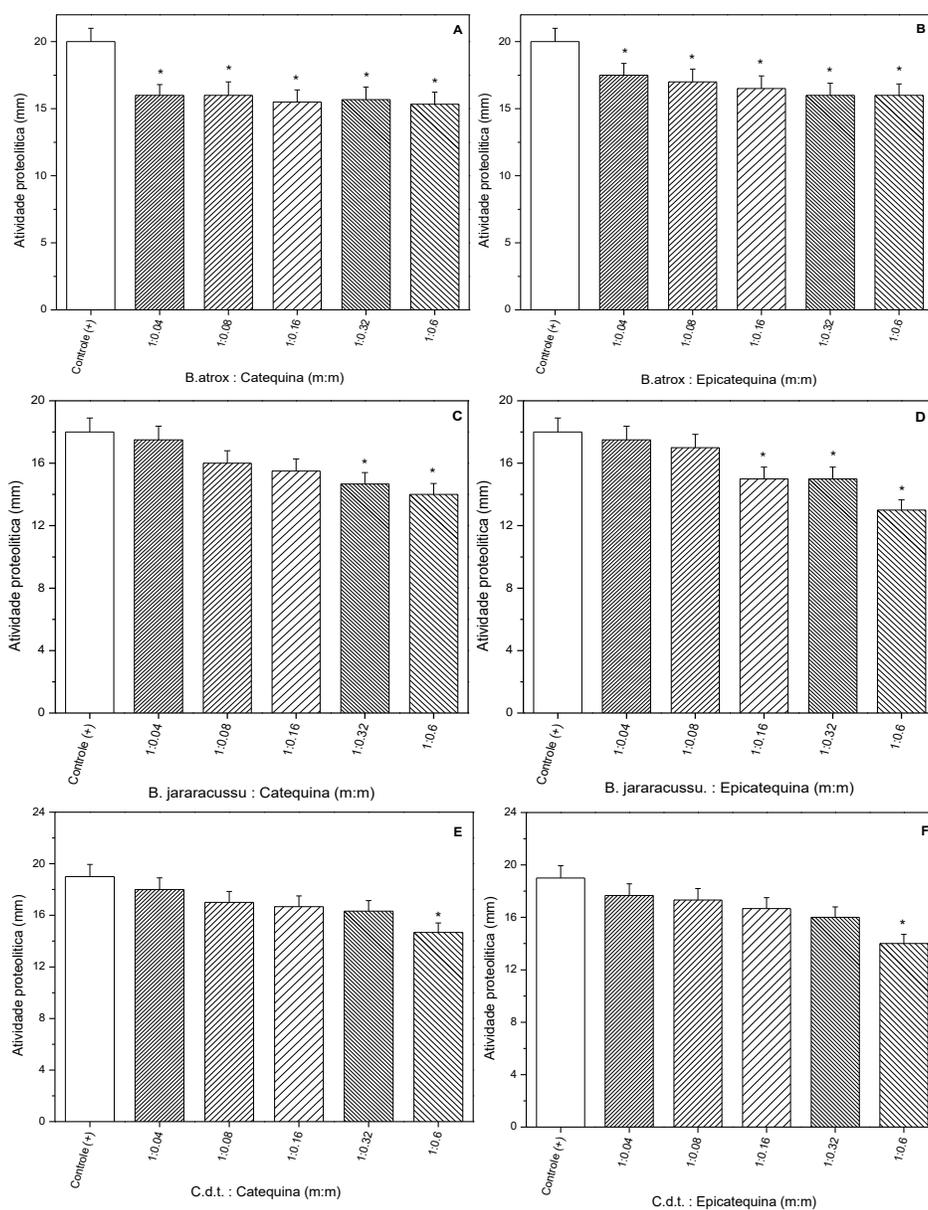


Figura 5 – Atividade proteolítica sobre a caseína (mm) induzida por peçonhas de *B. atrox* (A e B), *B. jararacussu* (C e D) e *C.d.t.* (E e F), previamente incubadas com catequina e epicatequina. Controle (+): apenas peçonha (40 μg). Os resultados correspondem às médias de triplicatas de dados obtidos em cada proporção (peçonha: composto fenólico, m:m) e os desvios padrão calculados, * $p < 0.05$.

2.6 Atividade enzimática de serinoproteases

A catequina induziu reduções na atividade de serinoproteases de aproximadamente 32% para a proporção 1:0,5 e 62% para a proporção 1:1, quando previamente incubada com a peçonha de *B. atrox*. Já para *B. jararaca*, as inibições foram de aproximadamente 50% na proporção 1:0,5 e 64% para a proporção 1:1 (Figura 6A).

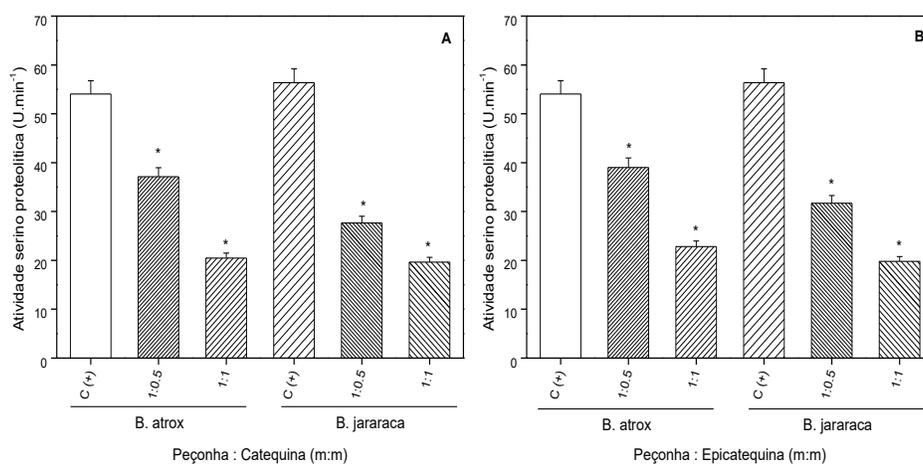


Figura 6 – Atividade serinoproteolítica (U.min⁻¹) induzida por peçonhas de *B. atrox* e *B. jararaca*, previamente incubadas com catequina (A) e epicatequina (B). Controle (+): apenas peçonha (100 μg). Os resultados correspondem às médias de triplicatas de dados obtidos em

cada proporção (peçonha: composto fenólico, m:m) e os desvios padrão calculados, * $p < 0.05$.

A epicatequina induziu redução da atividade serinoproteolítica de aproximadamente 27% quando previamente incubada com a peçonha de *B. atrox*, na proporção 1:0,5, e 56% para a proporção 1:1. Sobre a peçonha de *B. jararaca*, os valores de inibição foram de 43% e 65% para as proporções 1:0,5 e 1:1, respectivamente (Figura 6B).

2.7 Atividade proteolítica sobre o fibrinogênio

A incubação prévia da catequina com a peçonha de *B. atrox*, na proporção 1:1, resultou em 100% de inibição da atividade fibrinogenolítica, sendo observadas íntegras as cadeias α e β (Figura 7, linha 4b). A catequina exerceu efeito inibidor parcial, na proporção 1:0,5, sobre a atividade fibrinogenolítica induzida por peçonha de *C.d.t.*, sendo observada degradação apenas das cadeias α das moléculas de fibrinogênio. (Figura 7, linha 3C). Enquanto que na proporção 1:1 a atividade de *C.d.t.* foi 100% inibida (Figura 7, linha 4C).

Sobre a fibrinogenólise induzida por peçonha de *B. jararacussu* a catequina se mostrou sem efeito (Figura 7, linhas 3A e 4A).

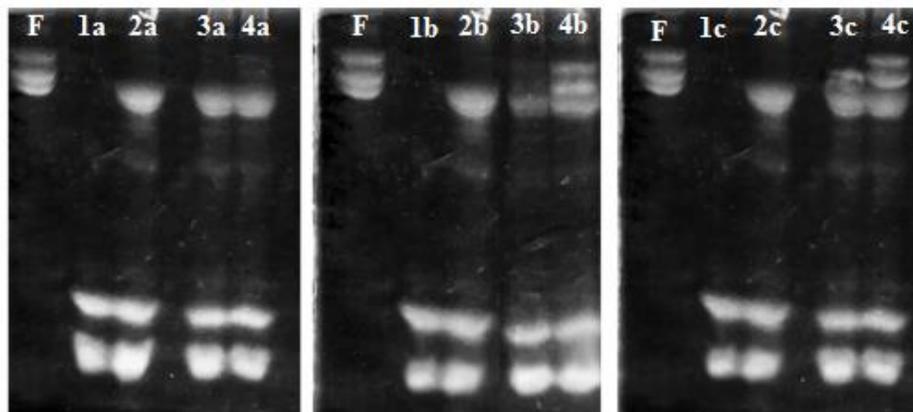


Figura 7 – Perfil eletroforético (SDS-PAGE) da ação proteolítica de peçonhas de serpentes sobre o fibrinogênio. F: fibrinogênio (80 μ g); 1a: *B. jararacussu* (40 μ g); 2a: *B. jararacussu*+fibrinogênio; 3a: *B. jararacussu*+fibrinogênio+catequina (1:0,5, m:m); 4a: *B. jararacussu*+fibrinogênio+catequina (1:1, m:m). 1b: *B. atrox* (40 μ g); 2b: *B. atrox*+fibrinogênio; 3b: *B. atrox*+fibrinogênio+catequina (1:0,5, m:m); 4b: *B. atrox*+fibrinogênio+catequina (1:1, m:m). 1c: *C.d.t.* (40 μ g); 2c: *C.d.t.* +fibrinogênio; 3c: *C.d.t.* +fibrinogênio+catequina (1:0,5, m:m); 4c: *C.d.t.* +fibrinogênio+catequina (1:1, m:m).

Diferentemente, a epicatequina foi eficaz em inibir a ação proteolítica induzida por peçonha de *B. jararacussu*, quando avaliada na proporção 1:1, mas não inibiu a ação fibrinogenolítica das peçonhas de *B. atrox* e *C.d.t.*, nas condições avaliadas (Figura 8, linhas 3A e 4A).

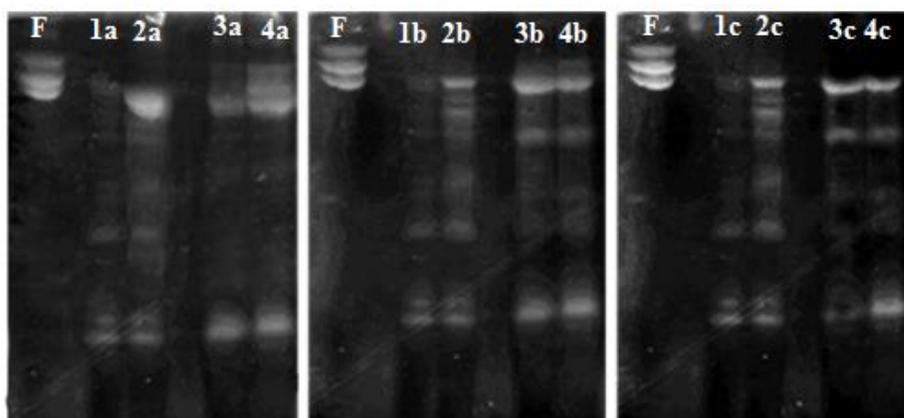


Figura 8 - Perfil eletroforético (SDS-PAGE) da ação proteolítica de peçonhas de serpentes sobre o fibrinogênio. F: fibrinogênio (80 μ g); 1a: *B. jararacussu* (40 μ g); 2a: *B. jararacussu*+fibrinogênio; 3a: *B. jararacussu*+fibrinogênio+epicatequina (1:0,5, m:m); 4a: *B. jararacussu*+fibrinogênio+epicatequina (1:1, m:m). 1b: *B. atrox* (40 μ g); 2b: *B. atrox*+fibrinogênio; 3b: *B. atrox*+fibrinogênio+epicatequina (1:0,5, m:m); 4b: *B. atrox*+fibrinogênio+epicatequina (1:1, m:m). 1c: *C.d.t.* (40 μ g); 2c: *C.d.t.* +fibrinogênio; 3c: *C.d.t.* +fibrinogênio+epicatequina (1:0,5, m:m); 4c: *C.d.t.* +fibrinogênio+epicatequina (1:1, m:m).

4 DISCUSSÃO

As peçonhas de serpentes são misturas complexas de diferentes compostos dos quais 70 - 90% são proteínas [28, 29]. Muitas dessas proteínas possuem atividade enzimática e desempenham uma ação digestiva sobre vários substratos. Tais ações são induzidas principalmente por três classes de toxinas, muito abundantes nas peçonhas de serpentes dos gêneros *Bothrops* e *Crotalus*, as fosfolipases A₂ (PLA₂S), metaloproteases (SVMP) e serinoproteases (SVSP). Estas moléculas são responsáveis por alterações fisiológicas como desregulação do equilíbrio hemostático, das respostas imunológicas e do sistema neuroendócrino [30–33].

Devido ao amplo espectro de ação das peçonhas ofídicas e o grande número de vítimas acometidas pelo ofidismo todos os anos, a soroterapia convencional mostra-se insuficiente tanto considerando a alta demanda, quanto destacando os efeitos locais, altamente danosos e que levam muitas vítimas à invalidez ou a sérios problemas de saúde [6, 34]. Dentre as deficiências do tratamento soroterápico destacam-se ainda as reações adversas e a falta de especificidade do soro administrado quando a espécie ou gênero do animal agressor não são identificados.

Assim, o uso de compostos naturais que possam auxiliar a soroterapia minimizando efeitos locais e sistêmicos, de maneira genérica é altamente desejado.

O uso de compostos naturais na inibição de toxinas de peçonhas de serpentes tem sido amplamente estudado, como por exemplo, os compostos fenólicos, devido a sua ampla diversidade de efeitos farmacológicos [18, 35–37]. O flavonóide rutina, por exemplo, foi previamente descrito inibindo de forma eficiente a ação de fosfolipases A₂ do grupo II, porém apresentando menor ação

sobre PLA₂s do grupo I, isoladas de peçonhas de *Vipera russelli* e *Crotalus atrox* [38].

Fenólicos como o ácido gálico, ácido ferúlico, ácido cafeico, propilgalato e epigalocatequina galato também se mostraram eficazes na inibição das atividades enzimática e miotóxica exercidas por PLA₂s [36, 39, 40].

Diversos trabalhos tratam da inibição de outras classes de toxinas como metaloproteases e serinoproteases empregando compostos fenólicos. As SVMPs, enzimas dependentes de zinco, e as SVSP, enzimas pertencentes a família da tripsina (S1, do clã SA), são comuns nas serpentes das famílias Viperidae e Colubridae [21, 41]. Essas enzimas atuam na degradação de substratos como imunoglobulinas, componentes da membrana basal e proteínas plasmáticas (p.e., cascata de coagulação). Seus efeitos mais severos nos acidentes ofídicos estão relacionados a alterações no equilíbrio hemostático como hemorragias ou indução de um estado hipercoagulado, que podem levar a vítima a óbito em um curto espaço de tempo [42].

Na literatura encontram-se muitos dados científicos, demonstrando inibição total ou parcial de efeitos tóxicos resultantes dos envenenamentos ofídicos, utilizando plantas medicinais e/ou princípios ativos isolados com especial enfoque aos compostos fenólicos. Nos trabalhos que relatam inibição de SVMP destacam-se ácidos fenólicos como o ácido 2-hidroxi-4-metoxi benzoico, ácido anísico e ácido rosmarínico [43, 44], fenóis como pentagalolil, metil galato e ácido gálico [45], e flavonoides como a isoquercetina, galocatequina e miricetin-3-O-glicosídeo, e a catequina [46–48]. Embora se mostrem mais escassos, alguns trabalhos descrevem inibidores de SVSP, destacando-se o extrato de *Renalmia alpinia*, rico em taninos, flavonoides e terpenoides, capaz de inibir as atividades hemorrágica, fibrinogenolítica e edematogênica induzidas pela toxina Cdc SII isolada de *Crotalus durissus cumanensis* [49].

Um dos prováveis mecanismos de ação dos compostos fenólicos é sua complexação com algumas toxinas. Neste fenômeno de superfície, geralmente reversível, ocorrem interações dinâmicas e temporais entre as estruturas dos fenólicos e das proteínas. Os polifenóis, através dos seus núcleos aromáticos e fenólicos, agem se ligando à superfície das proteínas, principalmente por meio de interações hidrofóbicas e ligações de hidrogênio [50]. Entretanto, para os compostos avaliados no presente trabalho as interações hidrofóbicas não correspondem a uma provável hipótese de interação considerando que a catequina e a epicatequina são moléculas hidrossolúveis, contando apenas com as ligações de hidrogênio para realizar a complexação com as toxinas.

O segundo mecanismo se baseia na capacidade de quelar íons metálicos, que são cofatores essenciais à atividade das toxinas, como o zinco e o cálcio, por exemplo, [51–53]. As regiões atuantes neste mecanismo de ação encontram-se geralmente entre as posições 5-OH e o grupo 4-oxo, ou entre as hidroxilas 3'- e 4'-OH dos compostos [54]. Contudo, a propriedade quelante exercida pelos flavonoides não exclui a ação de outros mecanismos, podendo ocorrer um sinergismo entre diferentes mecanismos.

Uma terceira hipótese considera possíveis interações dos compostos vegetais a aminoácidos das proteínas, responsáveis pela coordenação dos íons metálicos, dificultando ou impedindo a ligação ao cofator com consequente perda da ação catalítica. Adicionalmente, os compostos catequina e epicatequina também poderiam estar interagindo diretamente com o sítio catalítico das toxinas [55] resultando em diminuições de atividades parcialmente dependentes da ação enzimática. Esta hipótese encontra embasamento em alguns trabalhos, como o de Silva et al. (2009) [40], onde a inibição de uma fosfolipase A₂ ocorre pela interação desta com compostos fenólicos como 3,5-trihidroxi benzeno, 1,3-dihidroxi benzeno, 2,4,6-trihidroxi acetofenona, 2,4-dihidroxi acetofenona e 2,6-dihidroxi acetofenona. Esta hipótese pode ser observada através de estudos

computacionais que demonstram a ligação desses compostos no sítio ativo de maneira energeticamente favorável, tendo como pré-requisito mínimo a presença de pelo menos uma hidroxila [56].

Muitas plantas com atividade antiofídica foram descritas cientificamente e compiladas em artigos de revisão [10, 36, 57, 58], visando ampla divulgação de suas propriedades e aumentando as chances de aplicação das mesmas. Dessas, mais de 700 plantas distribuídas em várias famílias apresentam capacidade neutralizadora contra peçonhas brutas e toxinas isoladas. Esses efeitos são em grande resultantes da ação de metabolitos secundários como ácidos fenólicos, flavonoides, retinoides e taninos [59–61].

Neste contexto, diversas alterações fisiopatológicas relevantes, resultantes da atividade de diferentes classes de enzimas, primariamente de ação local, podem ser minimizadas pela ação dos flavonoides catequina e epicatequina como adjuvantes da soroterapia, sendo necessários estudos complementares que possibilitem direcionar doses e formas de administração efetivas e seguras.

5 CONCLUSÃO

Neste estudo, os flavonoides catequina e epicatequina foram capazes de neutralizar e/ou inibir parcialmente atividades exercidas por proteases e fosfolipases A₂, presentes nas peçonhas de serpentes do gênero *Bothrops*, e da espécie *Crotalus durissus terrificus*, sobre diferentes substratos. As atividades avaliadas relacionam-se a diferentes processos como lise celular, coagulação sanguínea, hemorragia, processo inflamatório, dentre outros, os quais são induzidos durante o envenenamento ofídico assim como podem ser decorrentes da ação de proteínas humanas homólogas às toxinas e, portanto, passíveis de terem sua funcionalidade alterada pelos flavonoides.

O emprego de compostos do metabolismo secundário vegetal para fins farmacêuticos é de grande interesse médico-científico, devido à sua facilidade de obtenção, o baixo custo, a baixa ou ausente toxicidade e o amplo espectro de propriedades medicinais que desempenham em organismos animais. Assim, pesquisas que contribuam para a construção de bases científicas sólidas acerca das propriedades medicinais destes compostos, e que apontem doses de uso e formas de administração seguras e eficazes são de grande valia no contexto atual que visa novas aplicações para moléculas parcialmente estudadas.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Kasturiratne A, Wickremasinghe AR, de Silva N, Gunawardena NK, Pathmeswaran A, Premaratna R, Savioli L, Lalloo DG, de Silva HJ: **The Global burden of snakebite: A literature analysis and modelling based on regional estimates of envenoming and deaths.** *PLoS Med* 2008, **5**:e218.
2. Williams D, Gutiérrez JM, Harrison R, Warrell DA, White J, Winkel KD, Gopalakrishnakone P: **The Global Snake Bite Initiative: an antidote for snake bite.** *Lancet* 2010, **375**:89–91.
3. Albuquerque PLMM, Jacinto CN, Silva Junior GB, Lima JB, Veras M do SB, Daher EF: **Acute kidney injury caused by *Crotalus* and *Bothrops* snake venom: a review of epidemiology, clinical manifestations and treatment.** *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 2013, **55**:295–301.
4. Rodrigues Sgrignolli L, Florido Mendes GE, Carlos CP, Burdmann EA: **Acute kidney injury caused by *Bothrops* snake venom.** *Nephron Clin Pract* 2011, **119**:c131–c137.
5. Fernández Culma M, Andrés Pereañez J, Núñez Rangel V, Lomonte B: **Snake venomics of *Bothrops punctatus*, a semiarboreal pitviper species from Antioquia, Colombia.** *PeerJ* 2014, **2**:e246.
6. Hui Wen F, Monteiro WM, Moura da Silva AM, Tambourgi D V., Mendonça da Silva I, Sampaio VS, dos Santos MC, Sachett J, Ferreira LCL, Kalil J, Lacerda M: **Snakebites and scorpion stings in the Brazilian Amazon: Identifying research priorities for a largely neglected problem.** *PLoS Negl Trop Dis* 2015, **9**:e0003701.
7. Habib AG, Lamorde M, Dalhat MM, Habib ZG, Kuznik A: **Cost-effectiveness of antivenoms for snakebite envenoming in Nigeria.** *PLoS Negl Trop Dis* 2015, **9**:e3381.
8. Deshpande RP, Motghare VM, Padwal SL, Pore RR, Bhamare CG, Deshmukh VS, Pise HN: **Adverse drug reaction profile of anti-snake venom in a rural tertiary care teaching hospital.** *J Young Pharm* 2013, **5**:41–45.
9. Sharma SK, Bovier P, Jha N, Alirol E, Loutan L, Chappuis F: **Effectiveness of rapid transport of victims and community health education on snake bite fatalities in rural Nepal.** *Am J Trop Med Hyg* 2013, **89**:145–150.

10. Soares AM, Januário AH, Lourenço MV, Pereira AMS, Pereira PS: **Neutralizing effects of Brazilian plants against snake venoms.** *Drugs Future* 2004, **29**:1105.
11. Souza Brito AARM, Souza Brito AARM, Brito a R a, Brito a R a: **Forty years of Brazilian medicinal plant research.** *J Ethnopharmacol* 1993, **39**:53–67.
12. Mors WB, do Nascimento MC, Parente J, da Silva MH, Melo PA, Suarez-Kurtz G: **Neutralization of lethal and myotoxic activities of South American rattlesnake venom by extracts and constituents of the plant *Eclipta prostrata* (Asteraceae).** *Toxicon* 1989, **27**:1003–1009.
13. da Silva JO, Fernandes RS, Ticli FK, Oliveira CZ, Mazzi M V, Franco JJ, Giuliatti S, Pereira PS, Soares AM, Sampaio S V: **Triterpenoid saponins, new metalloprotease snake venom inhibitors isolated from *Pentaclethra macroleoba*.** *Toxicon* 2007, **50**:283–91.
14. Randhir R, Lin Y-T, Shetty K: **Phenolics, their antioxidant and antimicrobial activity in dark germinated fenugreek sprouts in response to peptide and phytochemical elicitors.** *Asia Pac J Clin Nutr* 2004, **13**:295–307.
15. da Silva SL, Calgarotto AK, Maso V, Damico DCS, Baldasso P, Veber CL, Villar JAFP, Oliveira ARM, Comar M, Oliveira KMT, Marangoni S: **Molecular modeling and inhibition of phospholipase A₂ by polyhydroxy phenolic compounds.** *Eur J Med Chem* 2009, **44**:312–21.
16. Ozdal T, Capanoglu E, Altay F: **A review on protein–phenolic interactions and associated changes.** *Food Res Int* 2013, **51**:954–970.
17. Caruana M, Neuner J, Högen T, Schmidt F, Kamp F, Scerri C, Giese A, Vassallo N: **Polyphenolic compounds are novel protective agents against lipid membrane damage by α -synuclein aggregates *in vitro*.** *Biochim Biophys Acta - Biomembr* 2012, **1818**:2502–2510.
18. Chiang LC, Ng LT, Chiang W, Chang MY, Lin CC: **Immunomodulatory activities of flavonoids, monoterpenoids, triterpenoids, iridoid glycosides and phenolic compounds of *Plantago* species.** *Planta Med* 2003, **69**:600–604.
19. 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* 1988, **26**:411–413.

20. Preté PSC, Domingues CC, Meirelles NC, Malheiros SVP, Goñi FM, de Paula E, Schreier S: **Multiple stages of detergent-erythrocyte membrane interaction—A spin label study.** *Biochim Biophys Acta - Biomembr* 2011, **1808**:164–170.
21. Cintra ACO, De Toni LGB, Sartim MA, Franco JJ, Caetano RC, Murakami MT, Sampaio S V: **Batroxase, a new metalloproteinase from *Bothrops atrox* snake venom with strong fibrinolytic activity.** *Toxicon* 2012, **60**:70–82.
22. Laemmli UK: **Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4.** *Nature* 1970, **227**:680–685.
23. 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* 2004, **324**:224–30.
24. Rodrigues VM, Soares AM, Guerra-Sá R, Rodrigues V, Fontes MR, 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.
25. Selistre HS, Queiroz LS, Cunha OAB, De Souza GEP, Giglio JR: **Isolation and characterization of hemorrhagic, myonecrotic and edema-inducing toxins from *Bothrops insularis* (jararaca ilhoa) snake venom.** *Toxicon* 1990, **28**:261–273.
26. Sant' Ana CD, Tieli FK, Oliveira LL, Giglio JR, Rechia CG V, Fuly AL, Selistre de Araújo HS, Franco JJ, Stabeli RG, Soares AM, Sampaio S V: **BjussuSP-I: a new thrombin-like enzyme isolated from *Bothrops jararacussu* snake venom.** *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 2008, **151**:443–54.
27. R Core Team: *R: A Language and Environment for Statistical Computing.* Viena: Viena: R Foundation for Statistical Computing; 2012.
28. Queiroz GP, Pessoa LA, Portaro FCV, Furtado M de FD, Tambourgi D V.: **Interspecific variation in venom composition and toxicity of Brazilian snakes from *Bothrops* genus.** *Toxicon* 2008, **52**:842–851.
29. Fox JW, Ma L, Nelson K, Sherman NE, Serrano SMT: **Comparison of indirect and direct approaches using ion-trap and Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry for exploring viperid venom proteomes.** *Toxicon* 2006, **47**:700–714.

30. Castro HC, Zingali RB, Albuquerque MG, Pujol-Luz M, Rodrigues CR: **Snake venom thrombin-like enzymes: from reptilase to now.** *Cell Mol Life Sci* 2004, **61**:843–56.
31. Sajevic T, Leonardi A, Križaj I: **Haemostatically active proteins in snake venoms.** *Toxicon* 2011, **57**:627–45.
32. Wilson HI, Nicholson GM: **Presynaptic snake β -neurotoxins produce tetanic fade and endplate potential run-down during neuromuscular blockade in mouse diaphragm.** 2007:626–634.
33. Ferreira FB, Gomes MSR, de Souza DLN, Gimenes SNC, Castanheira LE, Borges MH, Rodrigues RS, Yoneyama KAG, Brandeburgo MIH, Rodrigues VM: **Molecular cloning and pharmacological properties of an acidic PLA₂ from *Bothrops pauloensis* snake venom.** *Toxins (Basel)* 2013, **5**:2403–19.
34. Gutiérrez JM, Burnouf T, Harrison RA, Calvete JJ, Brown N, Jensen SD, Warrell DA, Williams DJ: **A Call for Incorporating Social Research in the Global Struggle against Snakebite.** *PLoS Negl Trop Dis* 2015, **9**:e0003960.
35. B. Mors W, Célia do Nascimento M, M. Ruppelt Pereira B, Alvares Pereira N: **Plant natural products active against snake bite — the molecular approach.** *Phytochemistry* 2000, **55**:627–642.
36. Guimarães CLS, Moreira-Dill LS, Fernandes RS, Costa TR, Hamelin LIS, Marcussi S, Carvalho BMA, da Silva SL, Fernandes CFC, Calderon LA, Soares AM, Stábili RG: **Biodiversity as a source of bioactive compounds against snakebites.** *Curr Med Chem* 2013.
37. Toyama D de O, Diz Filho EB dos S, Cavada BS, da Rocha BAM, de Oliveira SCB, Cotrim CA, Soares VCG, Delatorre P, Marangoni S, Toyama MH: **Umbelliferone induces changes in the structure and pharmacological activities of Bn IV, a phospholipase A₂ isoform isolated from *Bothrops neuwiedi*.** *Toxicon* 2011, **57**:851–60.
38. Chippaux JP, Rakotonirina VS, Rakotonirina A, Dzikouk G: **[Drug or plant substances which antagonize venoms or potentiate antivenins].** *Bull la Société Pathol Exot* 1997, **90**:282–5.
39. Pereanez JA, Nunez V, Patino AC, Londono M, Quintana JC: **Inhibitory effects of plant phenolic compounds on enzymatic and cytotoxic activities induced by a snake venom phospholipase A₂.** *Vitae* 2011, **18**:295–304.

40. da Silva SL, Calgarotto AK, Maso V, Damico DCS, Baldasso P, Veber CL, Villar JAFP, Oliveira ARM, Comar Jr. M, Oliveira KMT: **Molecular modeling and inhibition of phospholipase A₂ by polyhydroxy phenolic compounds.** *Eur J Med Chem* 2009, **44**:312–321.
41. Serrano SMT: **The long road of research on snake venom serine proteinases.** *Toxicon* 2013, **62**:19–26.
42. Gutiérrez JM, Escalante T, Rucavado A: **Experimental pathophysiology of systemic alterations induced by *Bothrops asper* snake venom.** *Toxicon* 2009, **54**:976–87.
43. Aung HT, Nikai T, Niwa M, Takaya Y: **Rosmarinic acid in *Argusia argentea* inhibits snake venom-induced hemorrhage.** *J Nat Med* 2010, **64**:482–486.
44. Alam MI, Gomes A: **Viper venom-induced inflammation and inhibition of free radical formation by pure compound (2-hydroxy-4-methoxy benzoic acid) isolated and purified from anantamul (*Hemidesmus indicus* R.Br) root extract.** *Toxicon* 1998, **36**:207–215.
45. Pithayanukul P, Leanpolchareanchai J, Saparpakorn P: **Molecular Docking Studies and Anti-Snake Venom Metalloproteinase Activity of Thai Mango Seed Kernel Extract.** *Molecules* 2009, **14**:3198–3213.
46. Henrique F, Vale L, M. Mendes M, S. Fernandes R, R. Costa T, I. S.Hage-Melim L, A. Sousa M, Hamaguchi A, I. Honsi-Brandeburgo M, C. Franca S, H. T. P. Silva C, S. Pereira P, M. Soares A, M. Rodrigues V: **Protective Effect of *Schizolobium parahyba* Flavonoids Against Snake Venoms and Isolated Toxins.** *Curr Top Med Chem* 2011, **11**:2566–2577.
47. Sarkhel S, Chakravarty AK, Das R, Gomes A, Gomes A: **Snake venom neutralising factor from the root extract of *Emblia officinalis* Linn.** *Orient Pharm Exp Med* 2011, **11**:25–33.
48. Chatterjee I, Chakravarty AK, Gomes A: **Antisnake venom activity of ethanolic seed extract of *Strychnos nux vomica* Linn.** *Indian J Exp Biol* 2004, **42**:468–75.
49. Camilo Patiño A, María Benjumea D, Andrés Pereañez J: **Inhibition of venom serine proteinase and metalloproteinase activities by *Renalemia alpinia* (Zingiberaceae) extracts: Comparison of wild and *in vitro* propagated plants.** *J Ethnopharmacol* 2013, **149**:590–596.

50. Haslam E: **Natural polyphenols (vegetable tannins) as drugs: possible modes of action.** *J Nat Prod* 1996, **59**:205–15.
51. Pithayanukul P, Leanpolchareanchai J, Bavovada R: **Inhibitory effect of tea polyphenols on local tissue damage induced by snake venoms.** *Phytother Res* 2010, **24 Suppl 1**:S56–62.
52. Mourão de Moura V, Serra Bezerra AN, Veras Mourão RH, Varjão Lameiras JL, Almeida Raposo JD, Luckwu de Sousa R, Boechat AL, Bezerra de Oliveira R, de Menezes Chalkidis H, Dos-Santos MC: **A comparison of the ability of *Bellucia dichotoma* Cogn. (Melastomataceae) extract to inhibit the local effects of *Bothrops atrox* venom when pre-incubated and when used according to traditional methods.** *Toxicon* 2014, **85**:59–68.
53. Stephen O: **Ethanol leaf extract of *Psidium guajava*: Phyto-chemical and trypanocidal activity in rats infected with *Trypanosoma brucei brucei*.** 2009, **3**:420–423.
54. Cheng IF, Breen K: **On the ability of four flavonoids, baicilein, luteolin, naringenin, and quercetin, to suppress the fenton reaction of the iron-ATP complex.** *BioMetals* 2000, **13**:77–83.
55. Sebastin Santhosh M, Hemshekhar M, Sunitha K, M. Thushara R, Jnaneshwari S, Kemparaju K, S. Girish K: **Snake Venom Induced Local Toxicities: Plant Secondary Metabolites as an Auxiliary Therapy.** *Mini Rev Med Chem* 2013, **13**:106–123.
56. Havsteen BH: **The biochemistry and medical significance of the flavonoids.** *Pharmacol Ther* 2002, **96**:67–202.
57. Alam M., Gomes A: **Snake venom neutralization by Indian medicinal plants (*Vitex negundo* and *Emblica officinalis*) root extracts.** *J Ethnopharmacol* 2003, **86**:75–80.
58. Balasundram N, Sundram K, Samman S: **Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses.** *Food Chem* 2006, **99**:191–203.
59. da Silva JO, Fernandes RS, Ticli FK, Oliveira CZ, Mazzi M V., Franco JJ, Giuliatti S, Pereira PS, Soares AM, Sampaio S V.: **Triterpenoid saponins, new metalloprotease snake venom inhibitors isolated from *Pentaclethra macroloba*.** *Toxicon* 2007, **50**:283–291.

60. Núñez V, Castro V, Murillo R, Ponce-Soto LA, Merfort I, Lomonte B: **Inhibitory effects of *Piper umbellatum* and *Piper peltatum* extracts towards myotoxic phospholipases A₂ from *Bothrops* snake venoms: Isolation of 4-nerolidylcatechol as active principle.** *Phytochemistry* 2005, **66**:1017–1025.
61. Reyes-Chilpa R, Gómez-Garibay F, Quijano L, Magos-Guerrero GA, Ríos T: **Preliminary results on the protective effect of (-)-edunol, a pterocarpan from *Brongniartia podalyrioides* (Leguminosae), against *Bothrops atrox* venom in mice.** *J Ethnopharmacol* 1994, **42**:199–203.

ARTIGO III: Ácido *p*-cumárico e toxinas de serpentes: Interações bioquímicas

Pedro Henrique Souza Cesar¹, Anderson Assaid Simão¹, Silvana Marcussi^{1*}

1. Departamento de Química, Universidade Federal de Lavras, 37200-000 Lavras, Brasil.

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

RESUMO

Apesar do alto grau de incidência dos acidentes ofídicos e das sequelas graves decorrentes da ação das toxinas presentes nas peçonhas, o ofidismo é ainda negligenciado pelos sistemas públicos de saúde e os governos. Compostos naturais têm sido amplamente utilizados de forma popular com o objetivo de minimizar os efeitos do envenenamento ofídico, assim como, mostram-se promissores no âmbito médico-científico. No presente trabalho, o composto fenólico ácido p-cumárico foi capaz de inibir 31% da atividade fosfolipásica induzida por peçonha de *Bothrops alternatus*, 27% a ação hemolítica de *Bothrops moojeni*, 62,5% a ação trombolítica de *Bothrops jararacussu* e aproximadamente 27% a atividade trombótica de *C.d.t*. A incubação prévia do ácido p-cumárico com as peçonhas de *Bothrops atrox* e *B. jararacussu* resultou em aumentar do tempo de coagulação em 2,18 e 2,16 vezes, respectivamente. Foram observadas também reduções de 60% e 66,34% da atividade de serinoproteases para as peçonhas de *B. atrox* e *B. jararacussu*. Assim, o composto avaliado se destaca como possível adjuvante na soroterapia, além de apresentar amplo potencial de aplicação farmacêutica uma vez que, as proteínas de peçonhas por ele inibidas neste trabalho apresentam alta homologia com proteínas endógenas humanas.

Palavras-chave: natural inhibitor, p-cumaric acid, phenolic compound, *Bothrops* venom, *Crotalus* venom.

1 INTRODUÇÃO

Acidentes ofídicos são considerados como problema grave de saúde pública que resulta em prejuízos socioeconômicos. Os principais danos estão relacionados à mortalidade, alta incidência e sequelas físicas com consequente afastamento da vítima de suas atividades de trabalho.

Os dados epidemiológicos existentes são subestimados, diminuindo a importância do problema, visto que muitas das vítimas do ofidismo não procuram atendimento médico. Diversas populações que habitam áreas de risco não possuem acesso aos centros que realizam a soroterapia. Em adição, nos casos em que a espécie ou gênero da serpente não foram identificados a vítima pode receber um soro composto por uma mistura de anticorpos produzidos contra diferentes peçonhas, resultando em um tratamento pouco efetivo [1].

Estimativas apontam que 1,2 a 5,5 milhões de pessoas são picadas por serpentes anualmente, resultando em mortalidade variável entre 25 mil a 125 mil e aproximadamente 400 mil indivíduos com sequelas permanentes [2]. Os acidentes ofídicos foram incluídos pela WHO (organização mundial de saúde) na lista de doenças tropicais negligenciadas, somente em 2009, equiparando sua gravidade a doenças tropicais como dengue, malária e febre hemorrágica [3].

Embora o soro antiofídico atue de forma efetiva contra os efeitos sistêmicos induzidos pelo envenenamento, sua ação sobre os efeitos locais é restrita resultando apenas em inibições parciais. Devido às limitações da soroterapia diversos pesquisadores têm estudado alternativas ou complementos para o tratamento do ofidismo, investigando o potencial inibidor de extratos vegetais e compostos naturais isolados. Dentre os compostos naturais isolados destacam-se os compostos fenólicos cujas propriedades físico-químicas permitem o desempenho de diversas atividades farmacológicas como antioxidante, imunomoduladora e antiofídica. Assim, o objetivo no presente trabalho foi avaliar

possíveis interações bioquímicas entre o composto ácido p-cumárico e peçonhas de serpentes do gênero *Bothrops* e da espécie *Crotalus durissus terrificus*, utilizando para tanto diferentes ensaios *in vitro* com células e moléculas variadas.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Obtenção de Sangue e Plasma Humano

O sangue utilizado para os testes de atividade hemolítica, trombolítica e para a avaliação do tempo de coagulação foi obtido de voluntários saudáveis, de ambos os sexos e com faixa etária entre 20 e 40 anos, que declararam não ter feito uso de medicação durante um período de 30 dias antes da coleta de sangue. O sangue foi coletado por punção venosa em tubos contendo citrato para os ensaios de coagulação e atividade hemolítica, ou 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/44607215.9.0000.5148).

2.2 Ácido p-cumárico e peçonhas

As peçonhas brutas liofilizadas de *B. alternatus*, *B. jararaca*, *B. moojeni*, *B. jararacussu*, *B. atrox* e *Crotalus durissus terrificus* foram obtidas comercialmente do serpentário Bioagents (Batatais, São Paulo). O composto ácido p-cumárico foi obtido da empresa Sigma Aldrich™.

Todas as peçonhas utilizadas foram dissolvidas em salina tamponada em fosfato (PBS) para uso, na concentração de 10 µg/µL. O ácido p-cumárico foi

dissolvido em uma solução alcoólica de etanol:PBS 20%, nas concentrações de 10 µg/µL e 5 µg/µL, sendo as amostras armazenadas em ambiente protegido da luz a -12°C.

2.3 Atividade fosfolipásica e hemolítica em meio sólido

A atividade fosfolipásica foi avaliada conforme descrito por Gutiérrez (1988) [4]. Os ensaios de inibição de fosfolipases A₂ foram realizados utilizando peçonhas de *Bothrops moojeni*, *B. jararacussu* e *B. alternatus* (30 µg) sendo estas previamente incubadas com o ácido p-cumárico, por 30 minutos a 37°C, nas proporções 1:0,1; 1:0,2; 1:0,4; 1:0,8; 1:1; 1:5 e 1:10 (peçonha/ ácido p-cumárico, m/m) e as misturas aplicadas sobre o meio contendo gema de ovo como fonte de fosfolipídeos. Controles contendo apenas peçonhas (30 µg) ou o composto fenólico (300µg) também foram avaliados.

Para o ensaio hemolítico foi utilizado o mesmo método descrito por Gutiérrez (1988) [4] com a substituição da gema de ovo 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 700g (Fanem Baby®I Modelo 206 BL) por 10 minutos. O plasma foi removido, e as hemácias foram suspensas em 5 mmol L⁻¹ de PBS, pH 7,4 e centrifugadas nas mesmas condições, sendo esta etapa repetida três vezes conforme descrito por Preté et al., (2011) [5].

A inibição da atividade hemolítica foi avaliada para as peçonhas de *B. jararacussu*, *B. moojeni* e *C. d. terrificus* (30µg) previamente incubadas com o ácido p-cumárico, por 30 minutos à 37°C, nas proporções 1:0,04, 1:0,08; 1:0,16; 1:0,32, 1:0,4, 1:2 e 1:4 (m/m).

Tanto a atividade fosfolipásica quanto a hemolítica foram avaliadas pela medida (mm) do halo translúcido formado ao redor dos orifícios nos géis, onde as amostras foram aplicadas.

2.4 Atividade sobre trombos sanguíneos

As atividades trombolítica e trombótica foram avaliadas sobre coágulos sanguíneos humanos formados *in vitro* de acordo Cintra et al. (2012) [6]. Os coágulos foram incubados por 24 horas a 37°C com amostras contendo peçonha bruta (*B. atrox*, *B. jararacussu* e *C. d. terrificus*; 30µg), PBS ou peçonha previamente incubada (30 minutos à 37°C) com o ácido p-cumárico nas proporções 1:0,5 e 1:1 (m/m). As atividades trombolítica (induzida pelas peçonhas de *B. atrox*, *B. jararacussu*) e trombótica (induzida pela peçonha de *C. d. terrificus*) foram estimadas pela medida do volume de líquido liberado por cada trombo.

2.5 Atividade fibrinogenolítica

Para a avaliação da atividade fibrinogenolítica foi utilizada a metodologia de eletroforese em gel de poliacrilamida conforme descrito por Laemmly (1970) [7]. Os ensaios de inibição de proteases foram realizados com incubação prévia das peçonhas de *B. atrox*, *B. jararacussu* e *C. d. t.* (40µg) com o ácido p-cumárico nas proporções 1:0,5 e 1:1 (m/m), 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, peçonhas ou ácido p-cumárico 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 induzida pelas peçonhas.

2.6 Atividade proteolítica sobre a caseína

Para a avaliação desta atividade foi utilizada a metodologia descrita por Gutiérrez (1988) [4], sendo realizada a substituição da gema de ovo por solução de caseína, utilizando este substrato na concentração descrita por Wang, Shih e Huang (2004) para o teste caseinolítico em meio líquido [8].

As peçonhas de *B. atrox*, *B. jararacussu* e *C.d.t.* (40 µg) e o ácido p-cumárico foram incubados previamente nas proporções 1:0,1, 1:0,5, 1:1, 1:5 e 1:10 (m/m) por 30 minutos à 37°C, e posteriormente aplicados 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 peçonhas ou o ácido p-cumárico 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 os controles contendo apenas as peçonhas correspondem a 100% de atividade proteolítica.

2.7 Atividade coagulante

A metodologia para a avaliação do tempo de coagulação de plasma humano citratado foi realizada conforme descrita por Rodrigues (2000) [9]. O ácido p-cumárico foi previamente incubado com as peçonhas de *B. moojeni*, *B. atrox* e *B. jararacussu*, nas proporções 1:0,5 e 1:1 (peçonha: composto, m:m) por período de 30 minutos 37°C. As misturas 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 o ácido p-cumárico ou as peçonhas isoladamente foram também realizados. A dose coagulante mínima foi definida previamente, sendo esta a quantidade mínima de peçonha capaz de induzir a coagulação do plasma em um intervalo entre 1 minuto e 1 minuto e 25 segundos [10].

2.8 Atividade enzimática de serinoproteases

A atividade de serinoproteases foi mensurada pela degradação do substrato cromogênico $\text{N}\alpha$ -Benzoil-L-arginina 4-nitroanilide hidrocloreto (BAPNA), conforme metodologia descrita por Sant'Ana et al. (2008) [11]. O substrato (0,04g de BAPNA em 1mL de DMSO) foi adicionado a 1% em Tris-HCl 0,1M preparado em PBS com adição de CaCl_2 à 0,294%, pH 8,1, sendo utilizado 200 μL deste meio reacional para cada teste. As amostras avaliadas continham peçonha pura de *B. atrox* ou *B. jararaca* (100 μg), apenas substrato (controle negativo) ou peçonhas previamente incubadas (30 minutos a 37°C) com o ácido p-cumárico nas proporções 1:0,5 e 1:1 (m:m).

Ensaio piloto foram realizados com diferentes doses das peçonhas, possibilitando a padronização do tempo de reação e da coloração, indicativa de atividade, passível de ser aferida espectrofotometricamente (Abs.: 415 nm). As reações foram paradas com adição de 1 mL de ácido cítrico 10%. Para quantificação da atividade enzimática, os dados de absorbância foram convertidos considerando cada unidade de leitura correspondente a 0,009 $\text{U}\cdot\text{min}^{-1}$, referente a quantidade do produto p-nitroanilida liberada por minuto de reação.

2.8 Análise estatística

Os resultados são apresentados como a média de triplicatas \pm o desvio padrão. Os dados foram avaliados estatisticamente por análise de variância, e as médias foram comparadas usando o teste Scott Knott ($p < 0,05$) com auxílio do programa estatístico R [12].

3 RESULTADOS

3.1 Atividade fosfolipásica

A atividade fosfolipásica induzida pela peçonha de *B. alternatus* foi inibida em aproximadamente 31% pelo ácido p-cumárico em todas as proporções avaliadas (Figura 1A), no entanto para as peçonhas de *B. jararacussu* (Figura 1B) e *B. moojeni* (Figura 1C) não foram observadas inibições significativas.

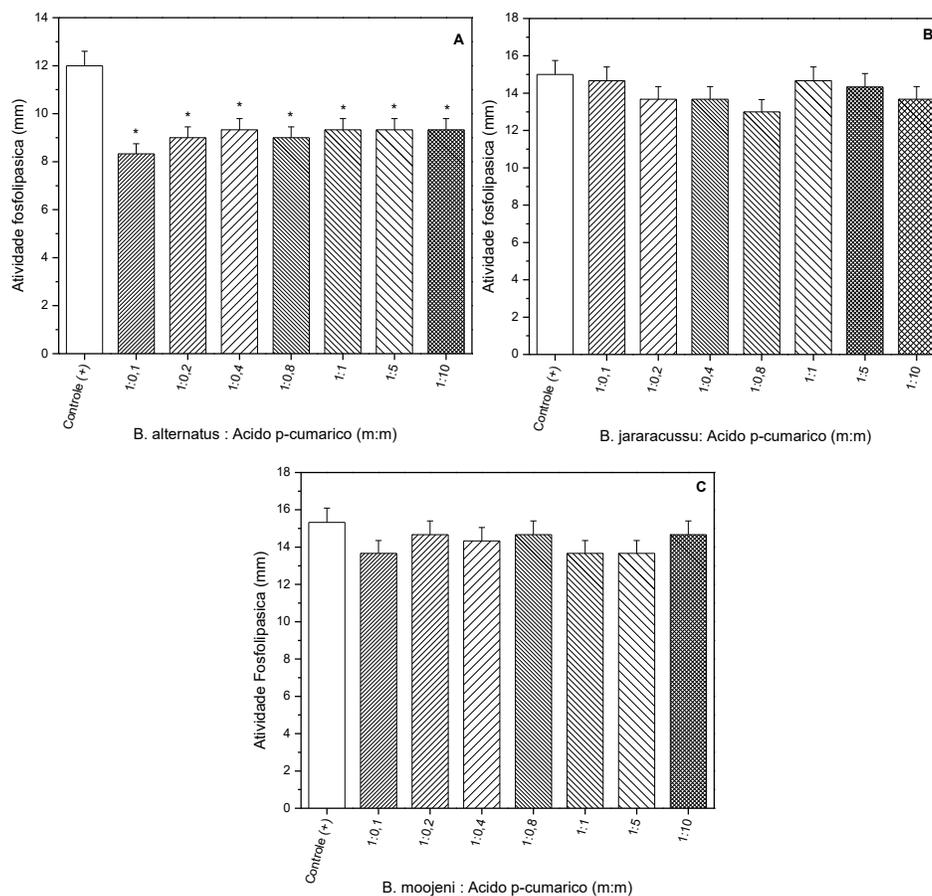


Figura 1 – Atividade fosfolipásica (mm) de peçonhas de serpentes das espécies *B. alternatus* (A), *B. jararacussu* (B) e *B. moojeni* (C) previamente incubadas com o ácido p-cumárico. Controle (+): apenas peçonha (30 µg). Os resultados correspondem às médias de triplicatas de dados obtidos em cada proporção (peçonha: ácido p-cumárico, m:m) e os desvios padrão calculados, * $p < 0.05$.

3.2 Atividade Hemolítica

A ação de fosfolipases A_2 e proteases presentes nas peçonhas resulta em quebra de componentes das membranas celulares resultando, por exemplo, em lise

de hemácias[13]. Em adição, a quebra de fosfolipídios de membranas resulta na geração do ácido araquidônico que é precursor de eicosanoides, que correspondem a lipídios bioativos (ex: prostaglandinas, leucotrienos e tromboxanos), atuantes principalmente na resposta inflamatória e processos de coagulação sanguínea [14].

A incubação prévia da peçonha de *C. d. t.* com o ácido p-cumárico, em diferentes proporções (Figura 2A), não resultou em inibição significativa da atividade hemolítica. Contudo, inibições estatisticamente significativas, variando entre 19 e 26% para a peçonha de *B. jararacussu* (Figura 2 B) e de aproximadamente 27% para a peçonha de *B. moojeni* (Figura 2 C), foram observadas.

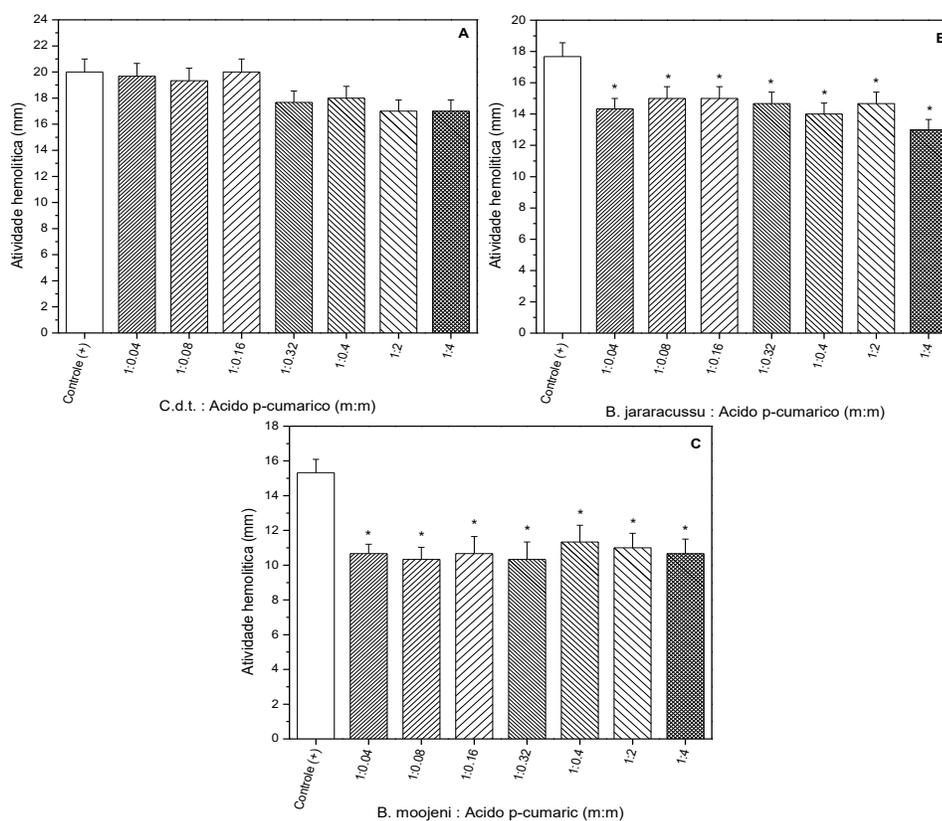


Figura 2 – Atividade hemolítica de peçonhas de serpentes das espécies *C.d.t.* (A), *B. jararacussu* (B) e *B. moojeni* (C) previamente incubadas com o ácido p-cumárico. Controle (+): apenas peçonha (30 µg). Os resultados correspondem às médias de triplicatas de dados obtidos em cada proporção (peçonha: ácido p-cumárico, m:m) e os desvios padrão calculados, * $p < 0.05$.

3.3 Atividade sobre trombos sanguíneos

As enzimas presentes nas peçonhas, em especial metaloproteases, serinoproteases, fosfolipases A₂ e lectinas podem atuar sobre diversos

componentes da cascata de coagulação, receptores e componentes da matriz extracelular e da membrana basal, assim como sobre componentes das membranas de plaquetas[15, 16]. Desta forma, alterações na viscosidade do sangue e na formação e dissolução de trombos são possíveis efeitos da atuação das diversas classes de toxinas.

Foram realizados testes piloto, para padronização das doses mínimas de cada peçonha, indutoras de efeitos sobre trombos obtidos de sangue humano. Os resultados demonstraram atividade trombótica para a peçonha de *C.d.t.* e trombolítica para as peçonhas de *B. atrox* e *B. jararacussu*.

A incubação prévia do composto fenólico com as peçonhas de *B. atrox* e *B. jararacussu*, foi eficaz em inibir a dissolução dos trombos induzida por ambas às peçonhas. Os volumes coletados após a dissolução dos trombos pelas peçonhas botrópicas foram considerados como 100% de atividade trombolítica, sendo os valores obtidos para os incubados calculados como porcentagem de inibição da atividade.

Assim, o ácido p-cumárico inibiu a atividade de *B. jararacussu* em aproximadamente 28% na proporção de 1:1, além de reduzir a atividade de *B. atrox* em aproximadamente 37,5 e 34%, nas proporções 1:0,5 e 1:1 (m:m), respectivamente (Figura 3A). A atividade trombótica induzida pela peçonha de *C.d.t.* foi inibida pelo ácido p-cumárico em aproximadamente 35% e 25%, após incubação prévia nas proporções 1:0,5 e 1:1 (m:m), respectivamente (Figura 3B).

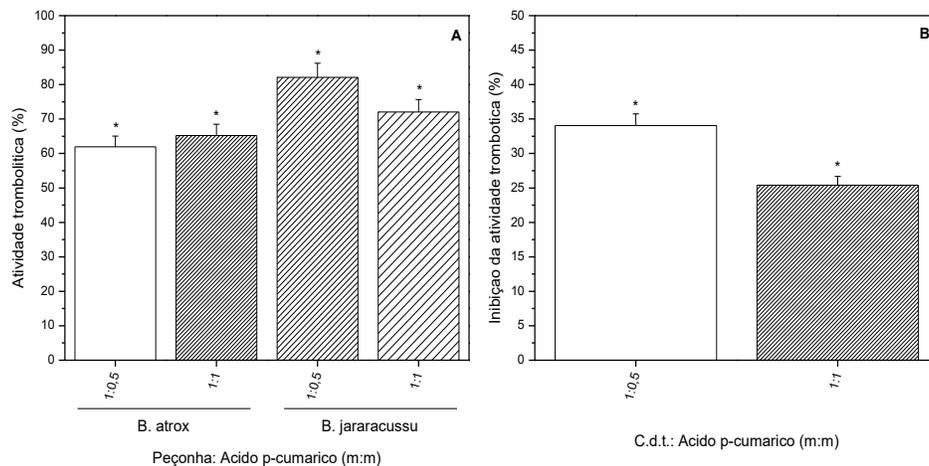


Figura 3 – Atividades trombolítica e trombótica induzidas pelas peçonhas de *B. atrox* e *B. jararacussu* (A) e pela peçonha de *C.d.t.* (B), respectivamente, previamente incubadas com o ácido p-cumárico. Controle (+): apenas peçonha (30 µg). Os resultados correspondem às médias de triplicatas de dados obtidos em cada proporção (peçonha: ácido p-cumárico, m:m) e os desvios padrão calculados, * $p < 0.05$.

3.4 Atividade coagulante

A ação de fosfolipases A_2 e proteases sobre os componentes (celulares e humorais) da cascata de coagulação pode resultar em formação de coágulos ou atividade anticoagulante [17–19]. Fosfolipases A_2 podem clivar fosfolipídeos carregados negativamente que atuam como cofatores para a ativação da protrombinase e tenase. Estas moléculas podem também atuar sobre os fosfolipídeos de membranas de plaquetas produzindo ácido araquidônico e/ou fator ativador de plaquetas [20]. Muitas metaloproteinases e serinoproteases são conhecidas por afetar a hemostasia, atuando sobre fatores de coagulação sanguínea, sobre proteínas endoteliais, ou clivando seletivamente os substratos da cascata de coagulação de modo similar as enzimas de mamíferos [21–24].

A dose coagulante mínima (DMC) determinada para *B. moojeni* e *B. atrox* foi de 10 µg e 20 µg para *B. jararacussu*. A incubação prévia das peçonhas com o ácido p-cumárico nas proporções de 1:0,5 e 1:1, resultaram em aumento do tempo até a formação do coágulo, sendo observados tempos 2,34 e 1,96 vezes maiores para a peçonha de *B. moojeni*, para as respectivas proporções. Para a peçonha de *B. atrox* foram observados aumentos de 3,14 e 2,18 vezes para as proporções de 1:0,5 e 1:1, respectivamente. Enquanto que para a peçonha de *B. jararacussu* as mesmas proporções resultaram em tempos 2,16 e 1,72 vezes maiores.

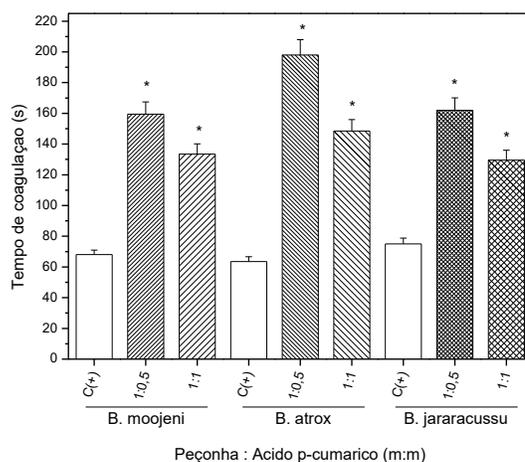


Figura 4 – Atividade coagulante induzida pelas peçonhas de *B. moojeni*, *B. atrox* (10µg) e *B. jararacussu* (20µg), previamente incubadas com o ácido p-cumárico. Controle (+): apenas peçonha. Os resultados correspondem às médias de triplicatas de dados obtidos em cada proporção (peçonha: ácido p-cumárico, m:m) e os desvios padrão calculados, * p < 0.05.

3.5 Atividade proteolítica sobre a caseína

A incubação prévia do ácido p-cumárico com a peçonha de *B. jararacussu* resultou em inibições da proteólise da ordem de 16% para as proporções 1:0,8, 1:0,16 e 1:0,32 e aproximadamente 33% para a proporção de 1:0,6 (Figura 5A). Para *B. atrox* (Figura 5B) e *C. d. t.* (Figura 5C) as inibições foram de aproximadamente 16,5% e 15,7%, respectivamente, para todas as proporções avaliadas.

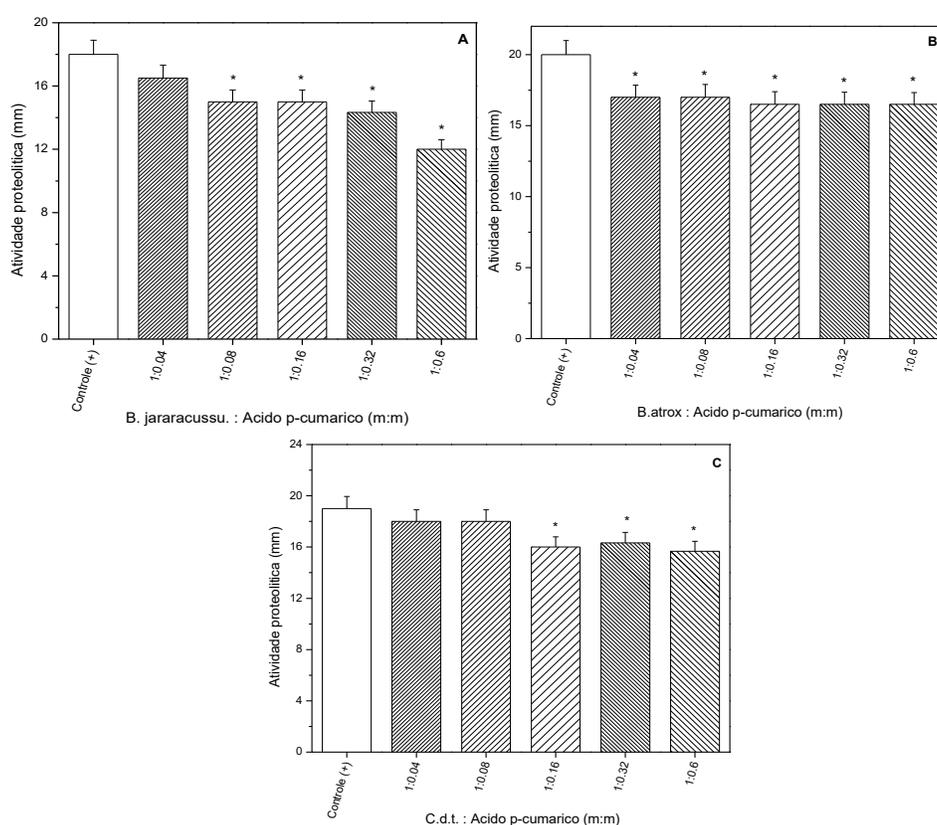


Figura 5 – Atividade proteolítica (mm) sobre a caseína, induzida pelas peçonhas de *B. jararacussu*, *B. atrox* e *C.d.t.* previamente incubadas com o ácido p-cumárico. Controle (+): apenas peçonha (40µg). Os resultados correspondem às médias de triplicatas de dados obtidos em cada

proporção (peçonha: ácido p-cumárico, m:m) e os desvios padrão calculados, * $p < 0.05$.

3.6 Atividade de serinoproteases

O BAPNA é um substrato cromogênio, reconhecido por endopeptidases que clivam a ligação formada entre a arginina e a p-nitroanilina, liberando este último, que possui uma cor amarelada e é utilizada para a quantificação da atividade de serinoproteases. A atividade de serinoproteases induzida pela peçonha *B. atrox*, foi inibida pelo ácido p-cumárico em 38% e 60,37% para a proporção de 1:0,5 e 1:1, respectivamente. Contra a peçonha de *B. jararaca* também houve inibições significativas, sendo elas de 53% para 1:0,5 e 66,34% para 1:1.

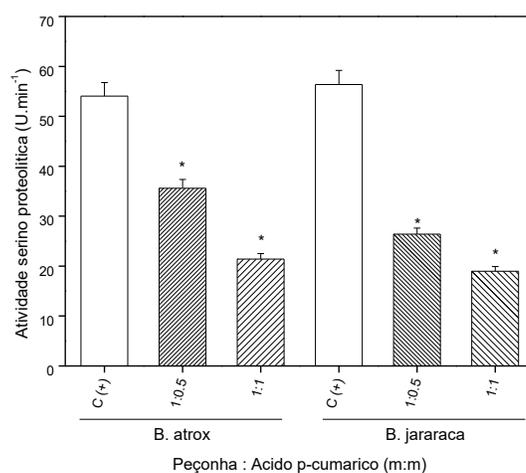


Figura 6 – Atividade serinoproteolítica (U.min⁻¹) induzida pelas peçonhas de *B. jararaca* e *B. atrox*, previamente incubadas com o ácido p-cumárico. Controle (+): apenas peçonha (100µg). Os resultados correspondem às médias de triplicatas de dados obtidos em cada proporção (peçonha: ácido p-cumárico, m:m) e os desvios padrão calculados, * $p < 0.05$.

3.7 Atividade fibrinogenolítica

O fibrinogênio é uma proteína que atua em vários processos biológicos, especialmente na cascata da coagulação sanguínea, com ênfase para a formação de trombos e contenção de hemorragias assim como para a recuperação tecidual. Moléculas de fibrinogênio são formadas por três cadeias polipeptídicas (α , β e γ) que podem ser degradadas pela ação de proteases, principalmente as cadeias α e β , gerando fibrinogéptídeos.

A incubação prévia das peçonhas de *B. jararacussu*, *B. atrox* e *C.d.t.* com o composto ácido p-cumárico, nas proporções de 1:0,5 e 1:1 não resultou em inibição da proteólise das moléculas de fibrinogênio (Figura 7).

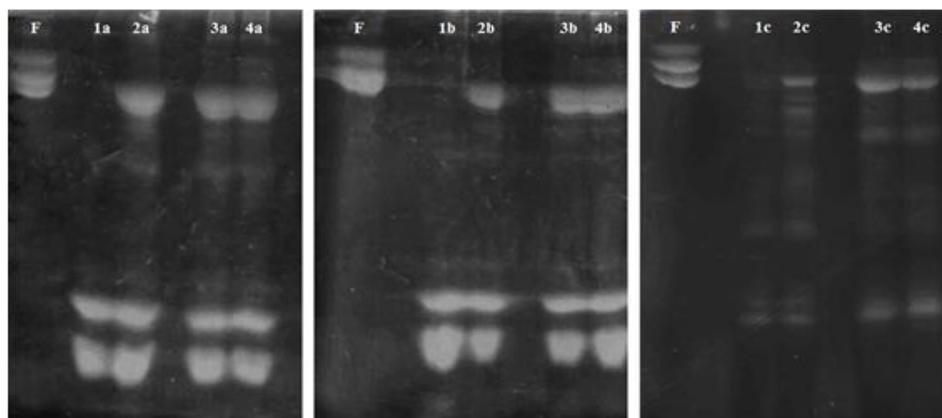


Figura 7 – Perfil eletroforético (SDS-PAGE) das amostras incubadas durante a atividade fibrinogenolítica. F: fibrinogênio (80µg); 1a: *B. jararacussu* (40µg); 2a: *B. jararacussu*+fibrinogênio; 3a: *B. jararacussu*+fibrinogênio+ácido p-cumárico (1:0,5, m:m); 4a: *B. jararacussu*+fibrinogênio+ácido p-cumárico (1:1, m:m). 1b: *B. atrox* (40µg); 2b: *B. atrox*+fibrinogênio; 3b: *B. atrox*+fibrinogênio+ácido p-cumárico (1:0,5, m:m); 4b: *B. atrox*+fibrinogênio+ácido p-cumárico (1:1, m:m). 1c: *C.d.t.* (40µg); 2c: *C.d.t.*+fibrinogênio; 3c: *C.d.t.*+fibrinogênio+ácido p-cumárico (1:0,5, m:m); 4c: *C.d.t.*+fibrinogênio+ácido p-cumárico (1:1, m:m).

4 DISCUSSÃO

Acidentes ofídicos, ainda hoje, são considerados como problemas graves de saúde pública [1, 2, 25]. As serpentes da família *Viperidae*, são responsáveis pela maior parte dos acidentes nas Américas, e tem como características patofisiológicas tanto manifestações locais quanto sistêmicas [15]. Essas alterações estão associadas com hemorragias, necrose, formação de edemas, hipovolemia, coagulopatia e choque cardiovascular [26]. Esse grande número de complicações clínicas são resultado da ação de vários componentes da peçonha, destacando-se enzimas das classes fosfolipases A₂, metaloproteases e serinoproteases.

Embora o tratamento mais indicado para os acidentes ofídicos seja a soroterapia, esta se mostra limitada quando consideramos a baixa efetividade em inibir efeitos locais, o alto custo e as dificuldades de distribuição e administração em regiões de difícil acesso. Assim, o uso de alternativas como compostos naturais na inibição de toxinas de serpentes tem sido amplamente estudado com vistas à comprovação científica da ação antiofídica relatada popularmente. Neste contexto, os compostos fenólicos se destacam pela ampla diversidade de efeitos farmacológicos que exercem em organismos animais podendo ter aplicação como adjuvantes ou mesmo em alguns casos como substitutos da soroterapia [27].

Como observado no presente trabalho, o fenólico ácido p-cumárico, derivado da rota do ácido hidroxibenzoico, foi capaz de inibir a ação de fosfolipases A₂ e proteases presentes nas peçonhas de serpentes do gênero *Bothrops* e da espécie *Crotalus durissus terrificus*. Essas inibições possivelmente estão relacionadas a aspectos estruturais comuns aos compostos fenólicos [28].

Algumas hipóteses sobre a inibição da atividade tóxica das peçonhas serão abordadas. A primeira delas está relacionada à capacidade de sequestrar íons metálicos, que são cofatores enzimáticos, essenciais para a ação catalítica das

diversas classes de enzimas presentes nas peçonhas, tais como o zinco, cobre, cálcio, magnésio, manganês e ferro [29–32]. Pithayanukul e colaboradores [33] conseguiram reduzir parte da ação proteolítica de metaloproteases, presentes nas peçonhas das serpentes *Calloselasma rhodostoma* e *Naja kaouthia*, a partir do uso do extrato do embrião da semente de *Mangifera indica* (L. cv. 'Fahlun') (Anacardiaceae), rico em compostos fenólicos como ácido gálico, metil galato e pentagaloliglicopiranosse. A ação quelante dos compostos fenólicos presentes no extrato avaliado foi apontada como a principal causa da inibição observada. O mesmo grupo de pesquisa encontrou resultados similares para o extrato de *Camellia sinensis* L. (Theaceae) quando avaliaram sua ação inibidora sobre PLA₂s e proteases presentes nas peçonhas de *Naja naja kaouthia*[29] e *Calloselasma rhodostoma* [23,24]. Além disso, a propriedade quelante dos compostos fenólicos não exclui a presença de outros mecanismos de ação, que podem atuar isoladamente sobre algumas classes de enzimas ou em sinergismo ao sequestro de íons.

A complexação dos compostos fenólicos com proteínas também tem sido descrita e se baseia na ligação aos sítios expostos em sua superfície. Neste mecanismo, as moléculas vegetais recobrem as proteínas ofídicas resultando na formação de compostos estáveis que precipitam. Esta complexação ocorre de maneira reversível e as forças atuantes neste mecanismo são as interações hidrofóbicas e ligações de hidrogênio [28].

Por fim, a terceira hipótese para a inibição das toxinas é a ligação direta aos sítios catalíticos, impedindo ou dificultado a ligação ao substrato. Esta hipótese encontra embasamento em alguns trabalhos, como o de Silva et al. (2009) [35], onde a inibição de uma fosfolipase A₂ ocorre pela interação de compostos fenólicos como 3,5-trihidroxi benzeno, 1,3-dihidroxi benzeno, 2,4,6-trihidroxi acetofenona, 2,4-dihidroxi acetofenona e 2,6-dihidroxi acetofenona, com o sítio ativo das enzimas. Esta última hipótese fundamenta-se em estudos

computacionais que demonstram a ligação desses compostos no sítio ativo de maneira energeticamente favorável, tendo como pré-requisito mínimo a presença de pelo menos uma hidroxila [36].

Não é possível dizer qual o mecanismo exato pelo qual ocorre a inibição de cada atividade demonstrada no presente trabalho, no entanto, uma ou mais das hipóteses mencionadas são válidas para explicar os diferentes níveis de inibição obtidos para cada experimento e cada peçonha. O uso de compostos naturais, como os compostos fenólicos, na inibição de toxinas de serpentes têm sido foco de alguns grupos de pesquisas [27, 37–39]. Estes estudos, que se mostram crescentes, são de grande valia não apenas visando avanços para o tratamento do ofidismo, mas também objetivando futuras aplicações farmacêutico/cosméticas uma vez que as proteínas presentes nas peçonhas apresentam alto grau de homologia às proteínas encontradas em mamíferos e outros organismos, que atuam em diversos processos como imunidade, inflamação e desenvolvimento de doenças.

5 CONCLUSÕES

O composto ácido p-cumárico foi capaz de inibir de forma significativa a atividade enzimática de fosfolipases A₂, serinoproteases e metaloproteases. Com base nos diferentes níveis de inibição observados, novos testes serão necessários visando determinar doses seguras e mais eficazes, assim como diferentes formas de administração que sejam futuramente aplicáveis como alternativas ou adjuvantes ao tratamento do ofidismo. Em adição, os resultados obtidos no presente trabalho apontam para diversos ramos de pesquisa que podem ser expandidos com vistas a exploração do ácido p-cumárico para fins farmacêuticos.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Gutiérrez JM, Williams D, Fan HW, Warrell DA: **Snakebite envenoming from a global perspective: Towards an integrated approach.** *Toxicon* 2010, **56**:1223–35.
2. Kasturiratne A, Wickremasinghe AR, de Silva N, Gunawardena NK, Pathmeswaran A, Premaratna R, Savioli L, Lalloo DG, de Silva HJ: **The Global Burden of Snakebite: A Literature Analysis and Modelling Based on Regional Estimates of Envenoming and Deaths.** *PLoS Med* 2008, **5**:e218.
3. Williams D, Gutiérrez JM, Harrison R, Warrell DA, White J, Winkel KD, Gopalakrishnakone P: **The Global Snake Bite Initiative: an antidote for snake bite.** *Lancet* 2010, **375**:89–91.
4. 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* 1988, **26**:411–413.
5. Preté PSC, Domingues CC, Meirelles NC, Malheiros SVP, Goñi FM, de Paula E, Schreier S: **Multiple stages of detergent-erythrocyte membrane interaction—A spin label study.** *Biochim Biophys Acta - Biomembr* 2011, **1808**:164–170.
6. Cintra ACO, De Toni LGB, Sartim MA, Franco JJ, Caetano RC, Murakami MT, Sampaio S V: **Batroxase, a new metalloproteinase from *B. atrox* snake venom with strong fibrinolytic activity.** *Toxicon* 2012, **60**:70–82.
7. Laemmli UK: **Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4.** *Nature* 1970, **227**:680–685.
8. 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* 2004, **324**:224–30.
9. Rodrigues VM, Soares AM, Guerra-Sá R, Rodrigues V, Fontes MR, 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.
10. Selistre HS, Queiroz LS, Cunha OAB, De Souza GEP, Giglio JR: **Isolation and characterization of hemorrhagic, myonecrotic and edema-inducing**

toxins from *Bothrops insularis* (jararaca ilhoa) snake venom. *Toxicon* 1990, **28**:261–273.

11. Sant' Ana CD, Ticli FK, Oliveira LL, Giglio JR, Rechia CG V, Fuly AL, Selistre de Araújo HS, Franco JJ, Stabeli RG, Soares AM, Sampaio S V: **BjussuSP-I: a new thrombin-like enzyme isolated from *Bothrops jararacussu* snake venom.** *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 2008, **151**:443–54.

12. R Core Team: *R: A Language and Environment for Statistical Computing*. Viena: Viena: R Foundation for Statistical Computing; 2012.

13. Garcia Denegri ME, Acosta OC, Huancahuire-Vega S, Martins-de-Souza D, Marangoni S, Maruñak SL, Teibler GP, Leiva LC, Ponce-Soto LA: **Isolation and functional characterization of a new acidic PLA₂ Ba SpII RP4 of the *Bothrops alternatus* snake venom from Argentina.** *Toxicon* 2010, **56**:64–74.

14. Nirmal N, Praba GO, Velmurugan D: **Modeling studies on phospholipase A₂-inhibitor complexes.** *Indian J Biochem Biophys* 2008, **45**:256–62.

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

16. Sajevic T, Leonardi A, Križaj I: **Haemostatically active proteins in snake venoms.** *Toxicon* 2011, **57**:627–45.

17. Santos-Filho NA, Silveira LB, Oliveira CZ, Bernardes CP, Menaldo DL, Fuly AL, Arantes EC, Sampaio S V, Mamede CCN, Beletti ME, de Oliveira F, Soares AM: **A new acidic myotoxic, anti-platelet and prostaglandin I₂ inductor phospholipase A₂ isolated from *Bothrops moojeni* snake venom.** *Toxicon* 2008, **52**:908–17.

18. Ferreira FB, Gomes MSR, de Souza DLN, Gimenes SNC, Castanheira LE, Borges MH, Rodrigues RS, Yoneyama KAG, Brandeburgo MIH, Rodrigues VM: **Molecular cloning and pharmacological properties of an acidic PLA₂ from *Bothrops pauloensis* snake venom.** *Toxins (Basel)* 2013, **5**:2403–19.

19. Arce-Bejarano R, Lomonte B, Gutiérrez JM: **Intravascular hemolysis induced by the venom of the Eastern coral snake, *Micrurus fulvius*, in a mouse model: identification of directly hemolytic phospholipases A₂.** *Toxicon* 2014, **90**:26–35.

20. Zouari-Kessentini R, Luis J, Karray A, Kallech-Ziri O, Srairi-Abid N, Bazaa

- A, Loret E, Bezzine S, El Ayeb M, Marrakchi N: **Two purified and characterized phospholipases A₂ from *Cerastes cerastes* venom, that inhibit cancerous cell adhesion and migration.** *Toxicon* 2009, **53**:444–53.
21. Nathan I, Dvilansky A, Yirmiyahu T, Aharon M, Livne A: **Impairment of platelet aggregation by *Echis colorata* venom mediated by L-amino acid oxidase or H₂O₂.** *Thromb Haemost* 1982, **48**:277–82.
22. Serrano SMT, Maroun RC: **Snake venom serine proteinases: sequence homology vs. substrate specificity, a paradox to be solved.** *Toxicon* 2005, **45**:1115–32.
23. Escalante T, Rucavado A, Fox JW, Gutiérrez JM: **Key events in microvascular damage induced by snake venom hemorrhagic metalloproteinases.** *J Proteomics* 2011, **74**:1781–94.
24. Campos LB, Pucca MB, Roncolato EC, Netto JC, Barbosa JE: **Analysis of phospholipase A₂, L-amino acid oxidase, and proteinase enzymatic activities of the *Lachesis muta rhombeata* venom.** *J Biochem Mol Toxicol* 2012, **26**:308–14.
25. Chippaux J-P: **Estimating the global burden of snakebite can help to improve management.** *PLoS Med* 2008, **5**:e221.
26. Warrell DA, Campbell JA, Lamar WW: **The venomous reptiles of the Western Hemisphere.** *Venom Reptil West Hemisph* 2004.
27. Guimarães CLS, Moreira-Dill LS, Fernandes RS, Costa TR, Hamelin LIS, Marcussi S, Carvalho BMA, da Silva SL, Fernandes CFC, Calderon LA, Soares AM, Stábili RG: **Biodiversity as a source of bioactive compounds against snakebites.** *Curr Med Chem* 2013.
28. Haslam E: **Natural polyphenols (vegetable tannins) as drugs: possible modes of action.** *J Nat Prod* 1996, **59**:205–15.
29. Pithayanukul P, Leanpolchareanchai J, Bavovada R: **Inhibitory effect of tea polyphenols on local tissue damage induced by snake venoms.** *Phytother Res* 2010, **24 Suppl 1**:S56–62.
30. Mourão de Moura V, Serra Bezerra AN, Veras Mourão RH, Varjão Lameiras JL, Almeida Raposo JD, Luckwu de Sousa R, Boechat AL, Bezerra de Oliveira R, de Menezes Chalkidis H, Dos-Santos MC: **A comparison of the ability of**

***Bellucia dichotoma* Cogn. (Melastomataceae) extract to inhibit the local effects of *Bothrops atrox* venom when pre-incubated and when used according to traditional methods.** *Toxicon* 2014, **85**:59–68.

31. Stephen O: **Ethanollic leaf extract of *Psidium guajava* : Phyto-chemical and trypanocidal activity in rats infected with *Trypanosoma brucei brucei*.** 2009, **3**:420–423.

32. Fernandez MT, Mira ML, Florêncio MH, Jennings KR: **Iron and copper chelation by flavonoids: an electrospray mass spectrometry study.** *J Inorg Biochem* 2002, **92**:105–111.

33. Pithayanukul P, Leanpolchareanchai J, Saparpakorn P: **Molecular docking studies and anti-snake venom metalloproteinase activity of Thai mango seed kernel extract.** *Molecules* 2009, **14**:3198–3213.

34. Leanpolchareanchai J, Pithayanukul P, Bavovada R: **Anti-necrosis potential of polyphenols against snake venoms.** *Immunopharmacol Immunotoxicol* 2009, **31**:556–62.

35. da Silva SL, Calgarotto AK, Maso V, Damico DCS, Baldasso P, Veber CL, Villar JAFP, Oliveira ARM, Comar Jr. M, Oliveira KMT: **Molecular modeling and inhibition of phospholipase A₂ by polyhydroxy phenolic compounds.** *Eur J Med Chem* 2009, **44**:312–321.

36. Havsteen BH: **The biochemistry and medical significance of the flavonoids.** *Pharmacol Ther* 2002, **96**:67–202.

37. B. Mors W, Célia do Nascimento M, M. Ruppelt Pereira B, Alvares Pereira N: **Plant natural products active against snake bite — the molecular approach.** *Phytochemistry* 2000, **55**:627–642.

38. Chiang LC, Ng LT, Chiang W, Chang MY, Lin CC: **Immunomodulatory activities of flavonoids, monoterpenoids, triterpenoids, iridoid glycosides and phenolic compounds of *Plantago* species.** *Planta Med* 2003, **69**:600–604.

39. Toyama D de O, Diz Filho EB dos S, Cavada BS, da Rocha BAM, de Oliveira SCB, Cotrim CA, Soares VCG, Delatorre P, Marangoni S, Toyama MH: **Umbelliferone induces changes in the structure and pharmacological activities of Bn IV, a phospholipase A₂ isoform isolated from *Bothrops neuwiedi*.** *Toxicon* 2011, **57**:851–60.