



MARIANA APARECIDA BRAGA

**POTENCIAL NUTRACÊUTICO DE EXTRATOS OBTIDOS DE
FOLHAS DE *Achyrocline satureioides*, *Echinodorus macrophyllus* E
Lippia sidoides: PARÂMETROS FARMACOLÓGICOS E
TOXICOLÓGICOS**

**LAVRAS-MG
2018**

MARIANA APARECIDA BRAGA

**POTENCIAL NUTRACÊUTICO DE EXTRATOS OBTIDOS DE FOLHAS DE
Achyrocline satureioides, *Echinodorus macrophyllus* E *Lippia sidoides*: PARÂMETROS
FARMACOLÓGICOS E TOXICOLÓGICOS**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agroquímica, área de concentração Química/Bioquímica para obtenção do título de Doutor.

Profa. Dra. Silvana Marcussi
Orientadora

Dra. Tamara Rezende Marques
Co-Orientadora

**LAVRAS-MG
2018**

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

Braga, Mariana Aparecida.

Potencial nutracêutico de extratos obtidos de folhas de
Achyrocline satureioides, *Echinodorus macrophyllus* e *Lippia*
sidoides: Parâmetros farmacológicos e toxicológicos / Mariana
Aparecida Braga. - 2018.

152 p. : il.

Orientador(a): Silvana Marcussi.

Coorientador(a): Tamara Rezende Marques.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Lavras, 2018.

Bibliografia.

1. Plantas medicinais. 2. Compostos fenólicos. 3. Peçonhas
como ferramentas de estudo. 4. Inibidores enzimáticos. I. Marcussi,
Silvana. II. Marques, Tamara Rezende. III. Título.

MARIANA APARECIDA BRAGA

**POTENCIAL NUTRACÊUTICO DE EXTRATOS OBTIDOS DE FOLHAS DE
Achyrocline satureioides, *Echinodorus macrophyllus* E *Lippia sidoides*: PARÂMETROS
FARMACOLÓGICOS E TOXICOLÓGICOS**

**NUTRACEUTICAL POTENTIAL OF EXTRACTS FROM *Achyrocline satureioides*,
Echinodorus macrophyllus AND *Lippia sidoides* LEAVES: PHARMACOLOGICAL AND
TOXICOLOGICAL PARAMETERS**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agroquímica, área de concentração Química/Bioquímica para obtenção do título de Doutor.

APROVADA em 04 de outubro de 2018.

Dr. Clayton Zambeli Oliveira	UFPB
Dra. Juliana Mesquita Freire	UFLA
Dra. Luciana Lopes Silva Pereira	UFLA
Dr. Sérgio Scherrer Thomasi	UFLA

Profa. Dra. Silvana Marcussi
Orientadora

Dra. Tamara Rezende Marques
Co-Orientadora

**LAVRAS-MG
2018**

Aos meus pais Carlos e Edwiges, por seus ensinamentos, pela confiança em mim depositada, por abdicarem de seus sonhos em prol dos meus e do meu irmão, pelo suporte e amparo nos momentos de aflição e por tanta dedicação, carinho e amor.

Ao meu irmão Carlos Henrique, por nossa amizade, pelo incentivo, compreensão e ajuda nos momentos de angústia e incerteza.

Ao meu marido Alison por nossa união, companheirismo e amor, por ser o meu maior incentivador, por acreditar nas minhas capacidades, pelo que é para mim e pelo que me faz ser quando estou ao seu lado.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Expresso minha gratidão a todos que fizeram parte deste trabalho e contribuíram para o fechamento de mais uma etapa em minha vida.

A Deus, pela oportunidade da vida, por me guiar e me dar forças, proporcionando possibilidades e sabedoria nos momentos mais difíceis.

À Professora Silvana Marcussi, por quem tenho profunda admiração e respeito. Agradeço pela orientação, generosidade em compartilhar suas experiências, confiança, espírito de colaboração, convivência e por ser um exemplo de profissional na qual me inspiro.

À Doutora Tamara Rezende Marques por sua co-orientação e amizade.

À professora Luciana Lopes Silva Pereira pelo auxílio e colaboração nos ensaios de inibição de enzimas digestivas.

Aos professores Maria das Graças Cardoso e Sérgio Scherrer Thomasi pelo auxílio na realização da triagem fitoquímica.

À Universidade Federal de Lavras (UFLA) e ao Departamento de Química, pela oportunidade concedida para a realização deste curso, ajudando-me a trilhar novos caminhos na vida acadêmica.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudos.

Aos professores do Departamento de Química, em especial os da Bioquímica, que de alguma forma contribuíram para a minha formação e o meu desenvolvimento intelectual.

Ao Sr. Paulo e, em especial ao Sr. Dico, funcionários do Horto de Plantas Medicinais da Universidade Federal de Lavras, pela ajuda e auxílio na coleta das espécies vegetais.

Ao biólogo no setor de Sistemática/Herbário ESAL, Antônio Massenssini Junior, pela grande ajuda na identificação botânica das espécies vegetais.

Ao técnico do laboratório de Genética Molecular, Lamartine de Nóbrega Filho, do departamento de Biologia, por toda disponibilidade, ajuda e dedicação durante a realização da eletroforese e do ensaio Cometa.

A técnica do Laboratório Central de Análise e Prospecção Química/CAPQ, Lidiany Mendonça Zacaroni Lima, pela ajuda com as análises cromatográficas.

Aos membros de nossa Confraria, Tatiane, Marcus, Pedro e Mateus, que compartilharam comigo este caminho, a contribuição de cada um de vocês foi essencial na realização deste trabalho.

Aos amigos do Laboratório de Bioquímica, e em especial a Tamara, Pricila, Adneia, Lucimara e Tatiane pelo companheirismo, pelos conselhos e por todo o aprendizado durante a nossa convivência.

A todos os meus familiares, e em especial, àqueles a quem dediquei este trabalho, meus reais incentivadores, que me apoiaram ao longo desta caminhada, dando-me forças nos momentos difíceis.

MUITO OBRIGADA!

RESUMO GERAL

Diversas plantas medicinais têm sido estudadas nas últimas décadas, com o intuito de serem utilizadas, pela indústria farmacêutica, para o desenvolvimento de novos medicamentos. Considerando o cenário atual de pesquisas, as espécies *Achyrocline satureioides*, *Echinodorus macrophyllus* e *Lippia sidoides* possuem grande potencial farmacológico, por serem ricas fontes de compostos bioativos, podendo estes serem uma alternativa viável para o desenvolvimento de medicamentos eficazes e seguros para auxiliar no tratamento da obesidade, doenças inflamatórias e cardiovasculares. Dessa forma, neste trabalho, objetivou-se realizar a triagem fitoquímica, caracterizar os compostos fenólicos por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) e investigar a ação dos extratos, aquoso e etanólico das folhas de *A. satureioides*, *E. macrophyllus* e *L. sidoides* sobre moléculas e células humanas, considerando parâmetros farmacológicos e toxicológicos. Para tanto, os extratos foram avaliados como possíveis moduladores de fosfolipases A₂ (no contexto da inflamação); no contexto da hemostasia, induzindo ou inibindo processos de hemólise, coagulação, trombólise e fibrinogênólise; como potenciais inibidores ou indutores de genotoxicidade e como possíveis inibidores das enzimas α -amilase, α -glicosidase, lipase e tripsina. Os resultados demonstraram a presença de substâncias de interesse farmacológico, como catequinas, flavonoides, cumarinas, saponinas e alcaloides, no extrato etanólico de todas as espécies vegetais. O extrato etanólico de *L. sidoides* apresentou o maior teor de compostos fenólicos (3,745.67 mg 100g⁻¹) detectados por HPLC. Os extratos avaliados, em diferentes proporções (peçonha:extrato, m:m), potencializaram significativamente a atividade fosfolipásica induzida pela peçonha de *Bothrops atrox*, enquanto que o extrato aquoso de *A. satureioides* e *E. macrophyllus* apresentaram ação inibitória sobre essa atividade induzida pelas peçonhas de *B. jararacussu* e *B. moojeni*. Todos os extratos de *A. satureioides*, *E. macrophyllus* e *L. sidoides* inibiram em 100% a atividade hemolítica induzida pela peçonha de *B. moojeni*, potencializaram a atividade trombolítica induzida pela peçonha de *Lachesis muta muta* e prolongaram o tempo de coagulação, induzido pelas peçonhas de *B. moojeni* e *L. muta muta*. O extrato etanólico de *A. satureioides*, nas proporções de 1:2,5 e 1:5 (m:m) exerceu 100% de inibição sobre a atividade fibrinogênolítica induzida pela peçonha de *B. moojeni*, enquanto que ambos os extratos de *E. macrophyllus* exerceram inibição sobre a quebra do fibrinogênio. Todos os extratos apresentaram ação antígeno-tóxica contra a peçonha de *L. muta muta*, no ensaio cometa. Os extratos etanólicos das espécies vegetais avaliadas inibiram as enzimas digestivas α -amilase e α -glicosidase e os extratos aquosos inibiram α -glicosidases. As lipases foram inibidas apenas pelo extrato aquoso de *A. satureioides* e *L. sidoides*. Os resultados confirmam o potencial de uso dessas espécies vegetais para fins farmacológicos, podendo seus constituintes atuar como moduladores enzimáticos e interferir em processos relacionados ao equilíbrio hemostático, como a coagulação, a dissolução de trombos e a fibrinogênólise. A inibição de enzimas digestivas sugere a ação dos extratos na diminuição da disponibilidade calórica proveniente da ingestão de carboidratos e lipídeos. Entretanto, estudos complementares devem ser conduzidos para detecção dos compostos ativos relacionados à cada atividade avaliada, dose, biodisponibilidade, eficácia e segurança, possibilitando assim a indicação de seu uso na forma de droga vegetal e/ou no desenvolvimento de fitoterápicos.

Palavras-chave: Plantas medicinais. Compostos fenólicos. Peçonhas como ferramentas de estudo. Inibidores enzimáticos. Compostos antígeno-tóxicos.

GENERAL ABSTRACT

Several medicinal plants have been studied in the last decades aiming at their use by the pharmaceutical industry to develop new medicines. Considering the current research scenario, the species *Achyrocline satureioides*, *Echinodorus macrophyllus*, and *Lippia sidoides* have great pharmacological potential because they are rich sources of bioactive compounds, and can be a viable alternative for the development of effective and safe medicines to aid in the treatment of obesity, and inflammatory and cardiovascular diseases. The objective of this work was to characterize the phenolic compounds by high performance liquid chromatography (HPLC) and to investigate the action of the aqueous and ethanolic extracts of the leaves of *A. satureioides*, *E. macrophyllus*, and *L. sidoides* on molecules and human cells using pharmacological and toxicological parameters. Therefore, the extracts were evaluated as possible phospholipase A₂ modulators (inflammation-related). In the context of hemostasis, they were assessed on inducing or inhibiting processes of hemolysis, coagulation, thrombolysis, and fibrinogenolysis. Also, both extracts were evaluated as potential inhibitors or inducers of genotoxicity and as possible inhibitors of the α -amylase, α -glycosidase, lipase, and trypsin enzymes. The results showed the presence of substances of pharmacological interest, such as catechins, flavonoids, coumarins, saponins, and alkaloids, in the ethanolic extract of all plant species. The ethanolic extract of *L. sidoides* presented the highest content of phenolic compounds (3.745,67 mg 100g⁻¹) detected by HPLC. The extracts evaluated, in different proportions (venom:extract, w:w), significantly potentiated the phospholipase activity induced by *Bothrops atrox* venom, while the aqueous extract of *A. satureioides* and *E. macrophyllus* had an inhibitory action on this activity induced by the venoms of *B. jararacussu* and *B. moojeni*. All of the extracts of *A. satureioides*, *E. macrophyllus*, and *L. sidoides* completely inhibited the hemolytic activity induced by *B. moojeni* venom. They also potentiated the thrombolytic activity induced by the *Lachesis muta muta* venom and prolonged the coagulation time induced by the venoms of *B. moojeni* and *L. muta muta*. The ethanolic extract of *A. satureioides*, in the ratios of 1:2.5 and 1:5 (w:w), exerted 100% inhibition on the fibrinogenolytic activity induced by *B. moojeni* venom, while both extracts of *E. macrophyllus* exerted inhibition on the breakdown of fibrinogen. All of the extracts evaluated in the comet assay showed anti-genotoxic action against the venom of *L. muta muta*. The ethanolic extracts of the evaluated plant species inhibited the α -amylase and α -glycosidase digestive enzymes and the aqueous extracts inhibited α -glycosidases. Lipases were inhibited only by the aqueous extract of *A. satureioides* and *L. sidoides*. The results confirm the potential use of these plant species for pharmacological purposes, as their constituents can act as enzymatic modulators and interfere in processes related to the hemostatic balance, such as coagulation, thrombus dissolution, and fibrinogenolysis. The inhibition of digestive enzymes suggests the action of the extracts in decreasing the caloric availability coming from the ingestion of carbohydrates and lipids. However, complementary studies should be conducted to detect the active compounds related to each evaluated activity and their dose, bioavailability, efficacy, and safety to use. Thus, their use as a plant-derived drug or in the development of herbal medicines should be made after further studies.

Keywords: Medicinal plants. Phenolic compounds. Venoms as tools. Enzyme inhibitors. Anti-genotoxic compounds.

LISTA DE FIGURAS

PRIMEIRA PARTE

Figura 1 – Espécie <i>Achyrocline satureioides</i> (Lam.) DC (marcela).....	22
Figura 2 – Espécie <i>Echinodorus macrophyllus</i> (Kunth) Micheli (chapéu-de-couro)	24
Figura 3 – Espécie <i>Lippia sidoides</i> Cham. (alecrim-pimenta)	25
Figura 4 – Principais rotas de biossíntese dos metabólitos secundários.....	27
Figura 5 – Estrutura química dos ácidos fenólicos.....	28
Figura 6 – Estrutura química dos flavonoides	29
Figura 7 – Estrutura do tanino hidrolisável (A) e do tanino condensado (B).....	29
Figura 8 - Locais de atuação de serinoproteases de peçonhas de serpentes que afetam a coagulação sanguínea	38
Figura 9 - Locais de atuação de metaloproteases de peçonhas de serpentes que afetam a coagulação sanguínea	39

SEGUNDA PARTE – ARTIGOS

ARTIGO 1

Figure 1 - Phospholipase activity (%) induced by <i>Bothrops atrox</i> (A), <i>Bothrops jararacussu</i> (B), and <i>Bothrops moojeni</i> (C) snake venoms, previously incubated with the aqueous and ethanolic extracts of <i>Achyrocline satureioides</i>	71
Figure 2 - Hemolytic activity (%) induced by <i>Bothrops jararacussu</i> (A), <i>Bothrops moojeni</i> (B), and <i>Crotalus durissus terrificus</i> (C) snake venoms, previously incubated with the aqueous and ethanolic extracts of <i>Achyrocline satureioides</i>	73
Figure 3 - Thrombolytic activity (%) induced by <i>Bothrops moojeni</i> (A) and <i>Lachesis muta muta</i> (B) snake venoms, previously incubated with the aqueous and ethanolic extracts of <i>Achyrocline satureioides</i>	75
Figure 4 - Examples of nucleoids evaluated.....	80

ARTIGO 2

Figure 1 - Phospholipase activity (%) induced by <i>Bothrops atrox</i> (A), <i>Bothrops jararacussu</i> (B), and <i>Bothrops moojeni</i> (C) snake venoms, previously incubated with the aqueous and ethanolic extracts from <i>Lippia sidoides</i> leaves	103
------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	-----

Figure 2 - Hemolytic activity (%) induced by <i>Bothrops jararacussu</i> (A) and <i>Bothrops moojeni</i> (B) snake venoms, previously incubated with the aqueous and ethanolic extracts from <i>Lippia sidoides</i> leaves	105
Figure 3 - Thrombolytic activity (%) induced by <i>Bothrops moojeni</i> (A) and <i>Lachesis muta muta</i> (B) snake venoms, previously incubated with the aqueous and ethanolic extracts from <i>Lippia sidoides</i> leaves	107

ARTIGO 3

Figura 1 - Imagem superior: (A) Cromatograma do extrato aquoso de folhas de <i>Echinodorus macrophyllus</i> , com identificação dos picos. (B) Expansão do cromatograma de 5 a 25 min. Imagem inferior: (A) Cromatograma do extrato etanólico de folhas de <i>Echinodorus macrophyllus</i> , com identificação dos picos. (B) Expansão do cromatograma de 5 a 12 min	130
Figura 2 - Atividade fosfolipásica (%) induzida por peçonhas de <i>Bothrops atrox</i> (A), <i>Bothrops jararacussu</i> (B) e <i>Bothrops moojeni</i> (C), previamente incubadas com os extratos aquoso e etanólico de folhas de <i>Echinodorus macrophyllus</i> . Atividade hemolítica (%) induzida por peçonhas de <i>Bothrops jararacussu</i> (D), <i>Bothrops moojeni</i> (E) e <i>Crotalus durissus terrificus</i> (F), previamente incubadas com os extratos aquoso e etanólico de folhas de <i>Echinodorus macrophyllus</i>	131
Figura 3 - Atividade trombolítica (%) induzida por peçonhas de serpentes das espécies <i>Bothrops moojeni</i> (A), <i>Lachesis muta muta</i> (B), previamente incubadas com os extratos aquoso e etanólico de folhas de <i>Echinodorus macrophyllus</i> . Atividade fibrinogenolítica: (C) Perfil eletroforético (SDS-PAGE) para avaliar o efeito dos extratos de <i>Echinodorus macrophyllus</i> sobre a fibrinogenólise induzida pela peçonha de <i>Bothrops moojeni</i>	135
Figura 4 - Ensaio cometa. (A) Frequência de danos (%). (B) Unidades arbitrárias, calculadas de acordo com Collins (2004)	141

LISTA DE TABELAS

SEGUNDA PARTE – ARTIGOS

ARTIGO 1

Table 1 - Screening phytochemical and phenolic compounds content in aqueous and ethanolic extracts of <i>Achyrocline satureioides</i>	69
Table 2 - Effect of the aqueous and ethanolic extracts of <i>Achyrocline satureioides</i> on the coagulant activity induced by <i>Bothrops moojeni</i> and <i>Lachesis muta muta</i> venoms on human citrated plasma.....	76
Table 3 - Effect of the aqueous and ethanolic extracts of <i>Achyrocline satureioides</i> on the genotoxic activity induced by the <i>Lachesis muta muta</i> venom evaluated by the comet assay	79
Table 4 - Inhibition of digestive enzymes exerted by the aqueous and ethanolic extracts of <i>A. satureioides</i> before and after exposure to simulated gastric fluid.....	81

ARTIGO 2

Table 1 - Phytochemical screening and phenolic compounds content in the aqueous and ethanolic extracts of <i>Lippia sidoides</i> leaves.....	101
Table 2 - Effect of the aqueous and ethanolic extracts from <i>Lippia sidoides</i> leaves on the coagulant activity induced by <i>Bothrops moojeni</i> and <i>Lachesis muta muta</i> venoms on the human citrated plasma.....	108
Table 3 - Effect of the aqueous and ethanolic extracts of <i>Lippia sidoides</i> leaves on the genotoxic activity induced by the venom of <i>Lachesis muta muta</i>	111
Table 4 - Inhibition of digestive enzymes by the aqueous and ethanolic extracts of <i>Lippia sidoides</i> leaves before and after exposure to simulated gastric fluid.....	112

ARTIGO 3

Tabela 1 - Teor de compostos fenólicos nos extratos aquoso e etanólico de folhas de <i>Echinodorus macrophyllus</i>	129
Tabela 2 - Efeito dos extratos aquoso e etanólico de folhas de <i>Echinodorus macrophyllus</i> sobre a atividade coagulante induzida por peçonhas de serpentes das espécies <i>Bothrops moojeni</i> e <i>Lachesis muta muta</i> , sobre plasma humano citratado	138

Tabela 3 - Média do número de nucleoides por classe de cometa após tratamento com os extratos aquoso e etanólico de folhas de <i>Echinodorus macrophyllus</i> previamente incubados com a peçonha de <i>Lachesis muta muta</i>	140
Tabela 4 - Efeito dos extratos, aquoso e etanólico de folhas de <i>Echinodorus macrophyllus</i> sobre a atividade de enzimas digestivas, avaliado antes e após a simulação do fluido gástrico.....	142

SUMÁRIO

APRESENTAÇÃO	15
PRIMEIRA PARTE.....	16
1 INTRODUÇÃO	16
2 OBJETIVO	19
2.1 Objetivo geral.....	19
2.2 Objetivos específicos.....	19
3 REFERENCIAL TEÓRICO	20
3.1 Plantas medicinais	20
3.1.1 <i>Achyrocline satureioides</i> (Lam.) DC	21
3.1.2 <i>Echinodorus macrophyllus</i> (Kunth) Micheli.....	23
3.1.3 <i>Lippia sidoides</i> Cham	25
3.2 Compostos fenólicos.....	26
3.3 Genotoxicidade.....	30
3.4 Inibidores de enzimas digestivas	32
3.5 Peçonhas de serpentes	33
3.6 Principais classes de enzimas presentes em peçonhas de serpentes destacadas como ferramentas laboratoriais no presente estudo	34
3.6.1 Fosfolipases A ₂ e seu papel na inflamação	34
3.6.2 Proteases e sua ação sobre a coagulação sanguínea	36
4 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	41
REFERÊNCIAS	42
ANEXO.....	56
SEGUNDA PARTE - ARTIGOS	59
ARTIGO 1 <i>Achyrocline satureioides</i> (Lam.) DC extracts acting as enzyme modulators: digestion, inflammation, and haemostasis.....	59
ARTIGO 2 Prospection of enzyme modulators in aqueous and ethanolic extracts of <i>Lippia sidoides</i> leaves: genotoxicity, digestion, inflammation, and hemostasis.....	92
ARTIGO 3 Tóxico ou medicinal? Nova abordagem das propriedades farmacológicas e toxicológicas de folhas de <i>Echinodorus macrophyllus</i>	121
APÊNDICE.....	150

APRESENTAÇÃO

Este trabalho de tese está dividido em duas partes:

Na primeira parte constam a Introdução, Objetivos, Referencial teórico e as Considerações finais.

Na segunda parte constam os resultados desta tese que estão apresentados sob a forma de artigos. Cada artigo está estruturado de acordo com as normas das revistas científicas escolhidas para a submissão dos mesmos.

PRIMEIRA PARTE

1 INTRODUÇÃO

O uso de plantas medicinais na cura e prevenção de diversas doenças é uma das mais antigas práticas que apresenta relevância histórica nas transformações da terapêutica, tanto como fonte de matérias-primas farmacêuticas, como fonte de substâncias ativas isoladas e utilizadas como protótipo de fármacos e, mais recentemente, na forma de medicamentos.

O Brasil destaca-se por sua riqueza em plantas medicinais, sendo o seu uso uma prática tradicional empregada muitas vezes como o único recurso na atenção básica de saúde, devido ao fácil acesso, baixo custo, não exigência de prescrição médica e crença de ausência de efeitos tóxicos.

As plantas são responsáveis pela síntese de compostos bioativos que muitas vezes podem ser utilizados na elaboração de uma extensa gama de fármacos. Pesquisadores da área de produtos naturais destacam a importância da natureza como fornecedora de uma ampla diversidade de produtos, considerando as inúmeras estruturas, propriedades físico-químicas e biológicas (ATANASOV et al., 2015).

Um dos grupos de compostos bioativos, responsáveis pelos efeitos benéficos à saúde, são os compostos fenólicos. Estes exercem suas propriedades farmacológicas, principalmente devido as suas interações específicas com diversas enzimas e proteínas, sua capacidade antioxidante, anti-inflamatória, seu papel protetor sobre membranas e modulador sobre a resposta imune.

Estudos sugerem que os compostos fenólicos, devido sua estrutura comum que apresenta um anel aromático hidroxilado, são capazes de inibir enzimas digestivas. A estrutura desses compostos se combina com as enzimas, proteínas e outros polímeros (carboidratos) formando complexos estáveis, impedindo a absorção dos nutrientes. A inibição das enzimas digestivas, α -amilase, α -glicosidase e lipase é benéfica para o controle da hiperglicemia associada ao diabetes *mellitus* e obesidade.

Apesar dos inúmeros efeitos benéficos, os compostos presentes em plantas medicinais, em determinadas situações, podem não ser inócuos e apresentar efeitos tóxicos, genotóxicos e carcinogênicos (BOEIRA et al., 2010; GATEVA et al., 2015), evidenciando a necessidade de

uma ampla caracterização fármaco-tóxica *in vitro* e *in vivo* dos extratos dessas plantas para comprovação de seus efeitos terapêuticos e toxicológicos.

A avaliação dos potenciais antioxidante, genotóxico e de outras propriedades terapêuticas e toxicológicas de plantas medicinais tornou-se um evento crítico e importante na busca pela saúde. Assim, a exploração de muitas plantas tradicionalmente utilizadas pela população tem recebido muita atenção nos últimos anos, devido alguns de seus constituintes biologicamente ativos serem tóxicos para o organismo e conterem substâncias químicas conhecidas como mutagênicas ou carcinogênicas.

Algumas das diversas enzimas que atuam em nosso metabolismo são homólogas estrutural e funcionalmente às enzimas presentes nas peçonhas de serpentes. As peçonhas de serpentes são ricas em fosfolipases A₂ e proteases, e estas enzimas tornaram-se importantes ferramentas de pesquisa a fim de verificar a ação de inibidores naturais, *in vitro* e *in vivo*, uma vez que apresentam um amplo espectro de ações, principalmente sobre a homeostasia, a resposta inflamatória e imunológica (BERLING; ISBISTER, 2015).

Entre as plantas apreciadas no Brasil, a *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC., conhecida como marcela ou macela, vem se destacando como fonte de compostos bioativos e por suas diversas atividades biológicas. Sob o ponto de vista farmacológico o extrato de *A. satureioides* apresenta atividades anti-inflamatória, hepatoprotetora, antioxidante, imunomoduladora, antimicrobiana, antitumoral e fotoprotetora (KADARIAN et al., 2002; RETTA et al., 2012; SALGUEIRO et al., 2016).

A espécie *Echinodorus macrophyllus* (Kunth) Micheli, conhecida como chapéu-de-couro, apresenta poucas pesquisas científicas a respeito de suas propriedades medicinais, porém suas folhas são usadas na medicina popular para o tratamento de doenças inflamatórias e respiratórias, infecções e disfunções renais (TANUS-RANGEL et al., 2010).

A espécie *Lippia sidoides* Cham., popularmente conhecida como alecrim-pimenta, apresenta uso comprovado na medicina popular, principalmente como antisséptico, antimicrobiano e anti-inflamatório. Suas folhas e flores constituem a parte medicinal desta planta e são usadas para combater infecções da garganta e da boca, para o tratamento de ferimentos na pele e no couro cabeludo, para o tratamento de acne, sarna infectada, pitiríase versicolor, dermatomicoses, caspa, mau cheiro nos pés, nas axilas e virilha (FONTENELLE, 2008).

Com base nessas informações e no cenário atual de pesquisas, essas plantas possuem grande potencial farmacológico para atuarem como adjuvantes aos medicamentos convencionais. Assim, diante da busca de alternativas terapêuticas de menor custo, fácil acesso e segurança comprovada, bem como a falta de informações científicas sobre a utilização das folhas de *A. satureioides* (Lam.) DC, *E. macrophyllus* e *L. sidoides* faz-se necessária uma investigação detalhada a respeito de seus constituintes químicos, possível toxicidade decorrente do uso contínuo e elucidações sobre o mecanismo de ação de seus constituintes.

2 OBJETIVO

2.1 Objetivo geral

O objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos dos extratos aquoso e etanólico, obtidos das folhas de *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC, *Echinodorus macrophyllus* e *Lippia sidoides* sobre atividades enzimáticas, utilizando-se de peçonhas de serpentes, como ferramentas de indução de efeitos, a fim de realizar a caracterização farmacológica e toxicológica dos extratos vegetais.

2.2 Objetivos específicos

- Realizar a triagem fitoquímica de grupos metabólitos de interesse farmacológico que constituem os extratos, aquoso e etanólico, das folhas de *A. satureioides* (Lam.) DC, *E. macrophyllus* e *L. sidoides*.

- Caracterização por cromatografia líquida de alta eficiência, dos compostos fenólicos presentes nos extratos, aquoso e etanólico, das folhas de *A. satureioides* (Lam.) DC, *E. macrophyllus* e *L. sidoides*.

- Avaliar o efeito de ambos os extratos das folhas de *A. satureioides* (Lam.) DC, *E. macrophyllus* e *L. sidoides* sobre as atividades fosfolipásica, hemolítica, trombolítica, coagulante e proteolítica (fibrinogênio), induzidas por diferentes peçonhas de serpentes.

- Avaliar o potencial genotóxico e/ou antigenotóxico dos extratos, aquoso e etanólico, das três espécies vegetais, sobre leucócitos humanos pelo ensaio cometa, utilizando a peçonha de *Lachesis muta muta* como indutora de danos.

- Avaliar a ação inibitória dos extratos, aquoso e etanólico, das três espécies vegetais sobre enzimas digestivas (α -amilase pancreática suína, α -glicosidase duodenal suína, lipase pancreática suína e tripsina pancreática suína) em condições de simulação do fluido gástrico.

- Analisar os resultados obtidos visando prospectar embasamentos para aplicações descritas popularmente para os extratos assim como complementar dados científicos, ampliando a caracterização dos extratos e possibilitando sua futura utilização terapêutica de forma eficaz e segura.

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 Plantas medicinais

Indícios do uso de plantas medicinais foram encontrados nas civilizações mais antigas, sendo considerada uma das práticas mais remotas empregadas pelo homem para cura, prevenção e tratamento de doenças, sendo as plantas importante fonte de compostos biologicamente ativos (FIRMO et al., 2011).

Baseado na tradição familiar, o consumo de plantas medicinais tornou-se prática generalizada na medicina popular. Nos últimos anos, muitos fatores têm contribuído para o aumento da utilização deste recurso, entre eles, o alto custo dos medicamentos industrializados, o difícil acesso da população à assistência médica, bem como a tendência, nos dias atuais, ao uso de produtos de origem natural (BATTISTI et al., 2013).

Para garantir o acesso seguro e gratuito às plantas medicinais, o Governo Brasileiro implementou o Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos (PNPMF) e o Ministério da Saúde, em 2009, criou a Lista Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao Sistema Único de Saúde (RENISUS) com o intuito de buscar tratamentos alternativos para doenças comuns que afetam a população (BORGES et al., 2014; MARMITT et al., 2016).

De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS) aproximadamente 80% da população mundial utiliza as espécies vegetais na busca da cura para inúmeras enfermidades, ainda sem indicação clínica. Contudo, pesquisas na área de plantas medicinais podem contribuir para o uso consciente das plantas por meio da elucidação de mecanismos de ação terapêutica e indução de toxicidade, além de propiciar o desenvolvimento de novos medicamentos (MAMEDE; PASA, 2014).

O uso de medicamentos alopáticos é recente e sua comprovação por testes clínicos é ainda mais. Enquanto os medicamentos apresentam, em sua quase totalidade, um único princípio ativo que é responsável pelo seu efeito farmacológico, os extratos vegetais, por exemplo, são constituídos por misturas multicomponentes de substâncias ativas, parcialmente ativas e inativas, que, muitas das vezes, atuam em alvos farmacológicos diferentes. A eficácia desses extratos é o resultado de seu uso empírico, durante muitos anos, por diferentes grupos étnicos (FERREIRA; PINTO, 2010).

Embora os fármacos vegetais sejam considerados mais seguros do que os alopáticos, a origem natural dos produtos vegetais não os isenta, de fato, da toxicidade potencial em seres humanos. Os efeitos prejudiciais para a saúde que podem resultar do uso indiscriminado de medicamentos naturais incluem a hepatotoxicidade (AMADI; ORISAKWE, 2018; FURBEE et al., 2006), as interações que promovem alterações no DNA e indução de mutações (GULDIKEN et al., 2018; TAMAKOU; KUETE, 2014).

As plantas são capazes de produzir diferentes substâncias tóxicas em grandes quantidades, aparentemente para sua defesa contra vírus, bactérias, fungos e animais predadores. Muitas dessas substâncias são responsáveis pelas suas propriedades medicinais e aromáticas que são utilizadas na medicina popular e despertam interesse científico pelas suas atividades biológicas (LAPA et al., 2004).

Para melhor entendimento do uso de plantas, é necessária a avaliação da relação risco/benefício do seu uso, por meio de estudos farmacodinâmicos e toxicológicos. Portanto, o uso pela medicina popular baseado no conhecimento tradicional não é suficiente para validar as plantas medicinais como fitoterápicos eficazes e seguros (FARIAS et al., 2007).

3.1.1 *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC.

A espécie *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC., pertencente à família Asteraceae (Figura 1) é uma planta nativa da América do Sul, muito encontrada no Brasil, distribuída principalmente desde o estado de Minas Gerais até o Rio Grande do Sul, sendo conhecida também como macela, marcela, marcela-do-campo, camomila-nacional, entre outros (VIEIRA et al., 2015). No sul brasileiro, essa planta medicinal é tradicionalmente coletada na Sexta-feira Santa, antes do nascer do sol e as flores naturalmente secas são utilizadas ao longo do ano para tratar vários distúrbios gastrointestinais (SIMÕES et al., 1988).

Figura 1 - Espécie *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC (marcela).



Fonte: http://www.ufrgs.br/fitoecologia/florars/open_sp.php?img=15040/ acesso: 09 mar. 2018.

A *A. satureioides* é indicada na medicina popular como um antiespasmódico em casos de infecções e distúrbios digestivos, males do fígado, epilepsia, sudorífera, como anti-inflamatória, calmante, sedativa, emenagoga, para tratar cólicas de origem nervosa e contra prisão de ventre. É amplamente utilizada para o tratamento de problemas respiratórios, incluindo asma, bronquite e infecções do trato respiratório superior e também pode ser usada como planta ornamental e no enchimento de travesseiros (ALMEIDA et al., 1998; BOLSON et al., 2015; LORENZI; MATOS, 2002; RUFFA et al., 2002; SOUZA; BASSANI; SCHAPOVAL, 2007).

Outras propriedades dessa planta são: hepatoprotetora (KADARIAN et al., 2002), antimicrobiana (CASERO et al., 2015), antioxidante (ZORZI et al., 2016); antiparasitária (BRANDELLI et al., 2009), anticancerígena (SOUZA et al., 2018), tripanocida (RITTER et al., 2017) e antivirótica (SABINI et al., 2012). Como fitocosmético a planta é empregada como estimulante da circulação capilar, contra a queda de cabelos, em peles e cabelos delicados, e como protetor solar, além de ser popularmente utilizada para clarear cabelos (BALESTRIN et al., 2016; TESKE; TRENTINI, 2001).

A espécie *A. satureioides* foi incluída oficialmente na Farmacopeia Brasileira em 2001, assim como nos países do Mercado Comum do Sul (MERCOSUL), sendo que na Argentina, produtos à base de *A. satureioides* são utilizados em medicamentos, em formulações fitoterápicas e na fabricação de produtos alimentares. No Uruguai e Paraguai, a espécie é consumida como chá

e utilizada na fabricação de cosméticos, devido suas propriedades antioxidante, anti-inflamatória e fotoprotetora (RETTA et al., 2012).

Quanto aos seus efeitos citotóxicos e genotóxicos, estudos científicos relataram ausência de genotoxicidade do extrato aquoso de *A. satureioides*, preparado a frio, quando avaliado pelo teste de *Allium cepa* L. e pelo teste do cometa (SABINI et al., 2011; 2013). Altas concentrações do extrato induziram ação citotóxica, mas este efeito foi revertido e não foi associado a mutagenicidade.

Cariddi et al. (2015) verificaram que o extrato aquoso de *A. satureioides*, preparado com aquecimento a 70 °C, apresentou efeitos citotóxicos e apoptóticos sobre células mononucleares de sangue periférico humano, afetando tanto a função mitocondrial quanto a integridade da membrana celular, e associaram estes efeitos tóxicos à presença dos flavonoides identificados: luteolina, quercetina e 3-O-metilquercetina. Resultados semelhantes foram observados por Polydoro et al. (2004) que verificaram que os extratos de *A. satureioides* com alta concentração de flavonoides, especialmente quercetina, foram tóxicos sobre células de Sertoli. Vargas, Guidobono e Henriques (1991) sugeriram que os efeitos genotóxicos do extrato aquoso de *A. satureioides*, estaria relacionado à presença de taninos e flavonoides, como quercetina e Kampferol.

Vários estudos com *A. satureioides* revelaram seu enorme potencial etnobotânico e no Brasil, essa espécie está entre as plantas medicinais mais comercializadas. No entanto, estudos mais detalhados sobre seus constituintes químicos e sobre seu modo de atuação na hemostasia e resposta inflamatória podem contribuir para um uso mais eficaz e seguro dessa planta.

3.1.2 *Echinodorus macrophyllus* (Kunth) Micheli

A espécie nativa brasileira *Echinodorus macrophyllus* (Kunth) Micheli, da família Alismataceae (Figura 2), conhecida popularmente como chapéu-de-couro, chá-mineiro, erva-de-pântano, erva-de-bugre, congonha-do-campo ou erva-do-brejo, tem sido amplamente utilizada na medicina popular nas regiões Sudeste e Centro-Oeste e na produção de um refrigerante brasileiro (NASCIMENTO et al., 2014; VIDAL et al., 2010). Suas folhas são preparadas por infusão ou decocção e têm ação diurética, depurativa, antirreumática, laxativa, anti-inflamatória e

adstringente. É indicada em tratamento de afecções cutâneas, doenças renais e das vias urinárias, além de problemas do fígado (MORETI et al., 2006).

Figura 2 - Espécie *Echinodorus macrophyllus* (Kunth) Micheli (chapéu-de-couro).



Fonte: Do autor (2016).

Estudos realizados por Portella et al. (2012) e Nascimento et al. (2014) demonstram evidências científicas de que *E. macrophyllus* possui atividade nefroprotetora, indicando suas principais aplicações terapêuticas em doenças renais. Pinto et al. (2007) também relataram que as partes aéreas de *E. macrophyllus* tem efeito imunossupressor na resposta humoral exacerbada ou respostas imunes celulares e em doenças reumáticas autoimunes.

A planta medicinal *E. macrophyllus* foi inscrita nas primeiras edições da Farmacopeia dos Estados Unidos do Brasil (1929 e 1959), porém seu uso como fitoterápico depende de ampla caracterização de suas atividades biológicas e dos mecanismos pelos quais elas são exercidas (FERNANDES et al., 2012). Estudos sobre a composição química da espécie têm demonstrado a presença de flavonoides, alcaloides, diterpenos e triterpenos (LEITE et al., 2007; TANUS-RANGEL et al., 2010).

Apesar de poucos estudos terem sido descritos na literatura, a toxicidade *in vivo* do extrato aquoso das folhas de *E. macrophyllus* foi analisada por Lopes et al. (2000), em experimentos realizados com ratos, mostrando a ausência de efeito genotóxico desse extrato. Vaz et al. (2016) também verificaram que o extrato etanólico de *E. macrophyllus* não apresentou atividade genotóxica ou mutagênica, não induziu apoptose no fígado e rim dos ratos e não induziu toxicidade aguda. Estudos farmacológicos isoladamente são insuficientes para validar o

efeito de compostos vegetais, assim aspectos toxicológicos sistemáticos são necessários para definir os critérios de seleção de uma dose segura e eficaz (MELO et al., 2011; REYES-GARCÍA, 2010).

3.1.3 *Lippia sidoides* Cham.

O gênero *Lippia* é conhecido por apresentar, principalmente, atividades antimicrobiana, anti-inflamatória, antioxidante e larvicida (BATISTA et al., 2013). A espécie *L. sidoides* Cham. da família Verbenaceae (Figura 3) é uma planta aromática encontrada na região de Caatinga do Nordeste brasileiro e é popularmente conhecida como alecrim-pimenta (GUIMARÃES et al., 2014). Estudos relataram que essa espécie apresenta flavonoides, quinonas, triterpenos, lignanas, esteroides livres e glicosilados e ácidos orgânicos (ALMEIDA et al., 2010). As folhas e flores constituem a parte medicinal desta planta. Seu óleo essencial apresenta elevado valor comercial, tendo o timol e o carvacrol como principais constituintes, os quais possuem propriedades antisséptica, antimicrobiana, antifúngica, antioxidante, anti-inflamatória e larvicida. O chá ou a tintura diluída dessa espécie são também utilizados no tratamento de problemas de pele (MATOS et al., 2004; SANTOS et al., 2015).

Figura 3- Espécie *Lippia sidoides* Cham. (alecrim-pimenta).



Fonte: Do autor (2016).

Extratos e óleos essenciais obtidos de *Lippia* spp. têm sido amplamente testados cientificamente, devido ao potencial dos princípios bioativos. Na medicina popular, espécimes dessa planta têm sido usadas no tratamento de resfriados, bronquite e tosse (GOMES; NOGUEIRA; MORAES, 2011), bem como com função de relaxante muscular.

Estudos em diversas áreas do conhecimento vêm confirmando tais atividades terapêuticas descritas pela medicina popular. Por exemplo, foi demonstrada atividade antibacteriana em gengivite e placa dentária com uso de óleo essencial de *L. sidoides* (LOBO et al., 2011; PEREIRA et al., 2013), bem como atividade antifúngica obtida com o extrato etanólico contra cepas resistentes de *Candida* spp. (FARIAS et al., 2012), atividade anti-inflamatória avaliada em camundongos (VERAS et al., 2013) e atividade antimicrobiana contra *Mycobacterium tuberculosis* (MOTA; DANTAS; FROTA, 2018).

O Programa Nacional de Plantas Mediciniais e Fitoterápicos publicou, em janeiro de 2009, a Relação Nacional de Plantas Mediciniais de Interesse ao Sistema Único de Saúde (RENISUS). Nessa lista, constam as plantas medicinais que apresentam potencial para gerar produtos de interesse ao SUS. Entre as espécies, consta o alecrim-pimenta (*L. sidoides* Cham.) (BRASIL, 2009).

No que se refere ao efeito modulador dos extratos de *L. sidoides* sobre processos relacionados à hemostasia, escassos estudos científicos são encontrados, destacando a necessidade de estudos complementares que poderão ajudar no entendimento tóxico-farmacológico do uso interno dessa planta na prevenção e tratamento de doenças inflamatórias.

3.2 Compostos fenólicos

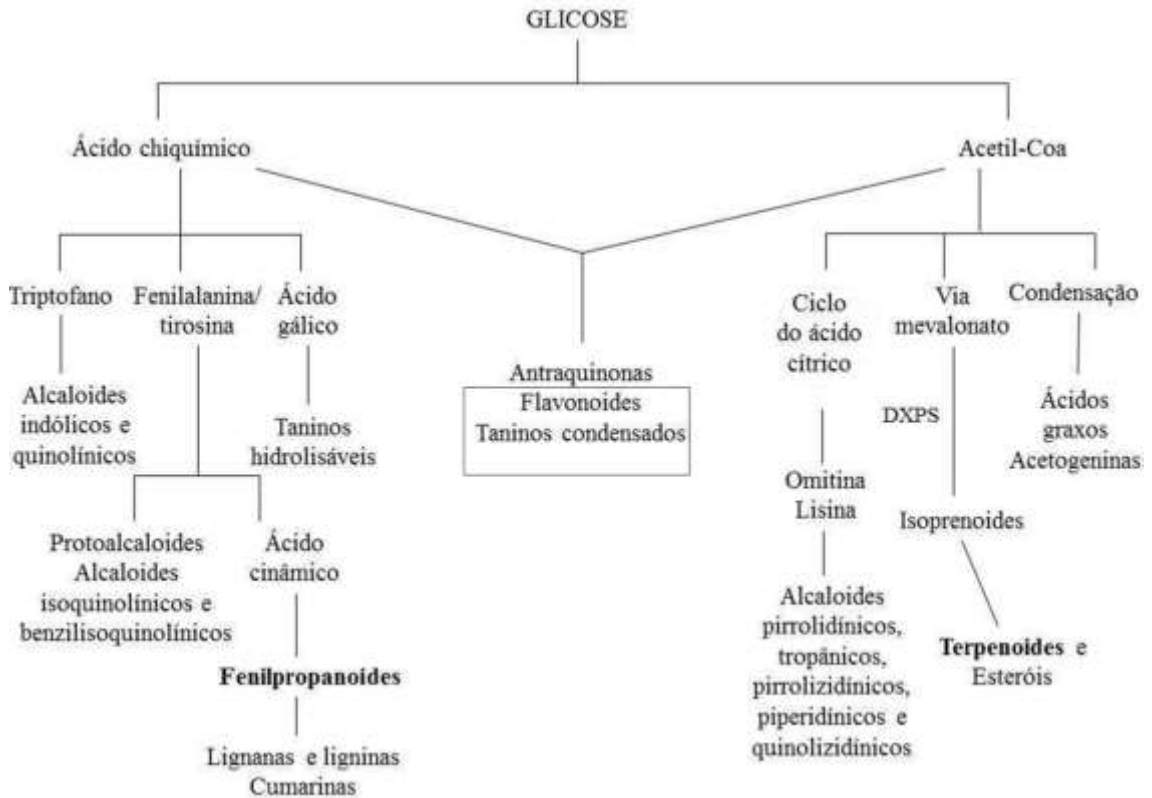
O interesse na diversidade molecular das plantas tem estimulado a busca pelo conhecimento do seu metabolismo secundário, o qual é responsável pela síntese de compostos vegetais com ampla atividade biológica. Grupos de compostos de estruturas complexas como alcaloides, terpenoides e compostos fenólicos, bem como seus derivados, têm sido alvo de investigação a respeito de suas propriedades medicinais. A diversidade, em termos de estruturas e propriedades químicas, na qual essas substâncias ocorrem na natureza, podem servir para o desenvolvimento de um grande número de produtos naturais de interesse comercial, principalmente fitofármacos (ALVES, 2001). Segundo Ahmad et al. (2012) os compostos

fenólicos são definidos como fitoquímicos naturais de plantas, que possuem atividade antioxidante, quimio-preventiva e propriedades quimioterápicas.

Os compostos fenólicos constituem um extenso e complexo grupo de fitoquímicos, com mais de 8.000 estruturas conhecidas e são definidos quimicamente, como substâncias que apresentam em sua estrutura um anel aromático, contendo um ou mais grupos hidroxilas, ou outros grupos funcionais e em sua maioria são de alta polaridade e muito reativos (DAI; MUMPER, 2010; LI et al., 2014).

A diversidade estrutural dos compostos fenólicos deve-se a sua dupla origem biossintética, com a possibilidade de uma participação simultânea das vias do ácido chiquímico e do acetato-malonato, formando compostos de origem mista, o que pode originar desde moléculas simples, como as dos ácidos fenólicos, até compostos altamente polimerizados e de grande massa molecular como os taninos e flavonoides (Figura 4) (TAIZ; ZEIGER, 2013).

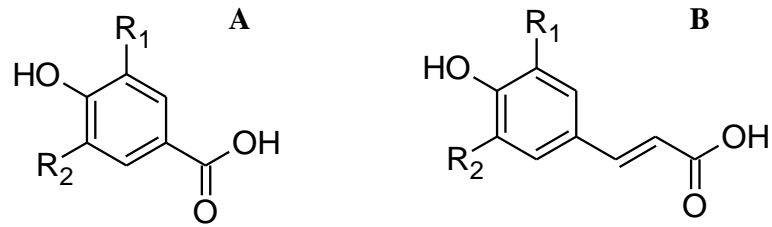
Figura 4 – Principais rotas de biossintese dos metabólitos secundários.



Fonte: Simões et al. (2007).

Os ácidos fenólicos podem ser subdivididos em dois grandes grupos: os ácidos hidroxibenzoicos, que incluem os ácidos p-hidroxibenzoico, protocatequina, vanílico, siríngico e gálico (Figura 5A) e os ácidos hidroxicinâmicos (ácidos p-cumárico, cafeico e ferúlico) (Figura 5B) (ANGELO; JORGE, 2007; SIMÕES et al., 2007).

Figura 5 – Estrutura química dos ácidos fenólicos.



Ácido p-hidroxibenzoico: $R_1 = R_2 = H$

Protocatequina: $R_1 = OH, R_2 = H$

Ácido vanílico: $R_1 = OCH_3, R_2 = H$

Ácido siríngico: $R_1 = R_2 = OCH_3$

Ácido gálico: $R_1 = R_2 = OH$

Ácido p-cumárico: $R_1 = R_2 = H$

Ácido cafeico: $R_1 = OH, R_2 = H$

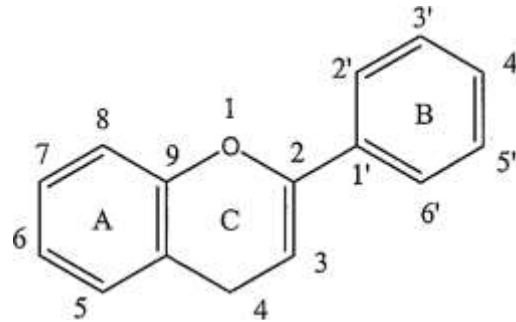
Ácido ferúlico: $R_1 = OCH_3, R_2 = H$

Legenda: A) Estrutura química dos ácidos hidroxibenzoicos e B) dos ácidos hidroxicinâmicos.

Fonte: Angelo e Jorge (2007).

Os flavonoides são os compostos fenólicos mais abundantes e quimicamente são caracterizados por possuírem um esqueleto de quinze carbonos, que consiste em dois anéis aromáticos ligados por meio de um anel pirano heterocíclico (Figura 6) (KUMAR; PANDEY, 2013). Os compostos fenólicos e, em particular, os flavonoides atuam como antioxidantes, devido as suas estruturas ideais que permitem doar elétrons para radicais livres e convertê-los em moléculas estáveis e inócuas (SOTO-VACA et al., 2012).

Figura 6 – Estrutura química dos flavonoides.

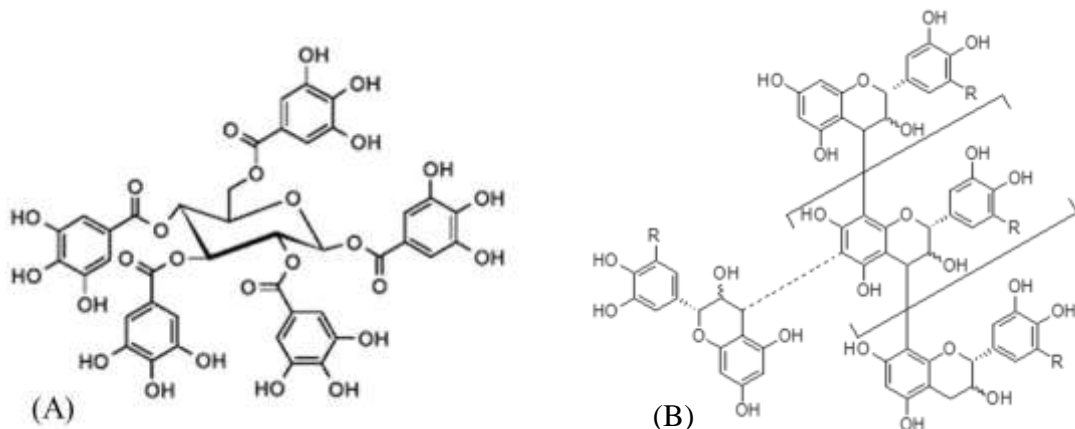


Fonte: Kumar e Pandey (2013).

Estudos têm demonstrado a ação dos flavonoides como anti-inflamatórios, sendo descritos como reguladores das atividades inflamatórias celulares e moduladores das atividades de enzimas envolvidas no metabolismo do ácido araquidônico como as cicloxigenases, lipoxigenases e fosfolipases A₂ (GABR et al., 2018; HUSSAIN et al., 2016).

Os taninos correspondem a outra classe de compostos fenólicos muito importantes e são classificados em taninos hidrolisáveis e taninos condensados (Figura 7). Estes compostos têm a capacidade de se ligar às enzimas digestivas, proteínas e carboidratos, formando complexos estáveis, interferindo na digestibilidade e, conseqüentemente, dificultando a absorção de carboidratos, lipídeos e proteínas (BARRETT; FARHADI; SMITH, 2018; SILVA et al., 2014).

Figura 7 - Estrutura do tanino hidrolisável (A) e do tanino condensado (B).



Fonte: Marques (2016) e Pell et al. (2001).

Para que se possam avaliar os efeitos biológicos dos compostos fenólicos como: disponibilidade, atividade antioxidante, interações específicas com receptores celulares e enzimas, é importante entender suas estruturas químicas (ENGLER; ENGLER, 2004).

Os compostos fenólicos apresentam um amplo espectro de atividades biológicas de interesse médico-farmacêutico-científico como, por exemplo, atividade anticarcinogênica, relacionada à sua ação antioxidante e antiproliferativa quando aplicados em células de melanoma murino (B16F10) e células leucêmicas humanas (K562) (MELO et al., 2018). Esses compostos atuam no combate aos radicais livres, que são responsáveis por causar estresse oxidativo e, conseqüentemente, danos a tecidos e biomoléculas do nosso organismo, exercendo assim, importante papel na prevenção de distúrbios patológicos, tais como câncer, desordens neurodegenerativas, doenças cardiovasculares, diabetes e outras doenças crônicas (CROFT et al., 2018; SOUZA et al., 2018; URZÊDA et al., 2013).

Muitas plantas, comestíveis ou não, sintetizam no metabolismo secundário centenas de compostos fenólicos, que possuem múltiplos efeitos biológicos, como ação anti-inflamatória (SINGH; PATRA, 2018), antimicrobiana (NUNES et al., 2016), hipolipidêmica (TENORE et al., 2013), efeito antimutagênico (SILVA et al., 2017), anticarcinogênico e quimiopreventivo (EL-HALAWANY et al., 2018). Por estas razões, um grande esforço tem sido realizado para caracterizar os compostos fenólicos presentes em diferentes plantas.

A purificação e identificação de novos compostos com atividade antioxidante, anti-inflamatória e antitumoral, oriundos de fontes naturais, como plantas medicinais que possam agir sozinhos ou em sinergismo com outros aditivos, têm recebido grande destaque, visando o uso dessas moléculas no combate as enfermidades.

3.3 Genotoxicidade

A genotoxicidade se refere a capacidade que alguns agentes têm em causar modificações na sequência do DNA de células a eles expostos. Durante o processo de replicação, quando essas modificações se fixam de forma capaz de perpetuar nas células filhas, o agente é considerado mutagênico (MÍDIO; MARTINS, 2000). Alguns trabalhos relatam que os danos no DNA geram instabilidade genética, o que pode representar os passos iniciais para o desenvolvimento do câncer, além da redução da viabilidade e fertilidade de gametas (MÍDIO; MARTINS, 2000;

RIBEIRO; SALVADORI; MARQUES, 2003). Assim, enquanto os efeitos genotóxicos podem ser transitórios, os efeitos mutagênicos são persistentes e podem ser transmitidos às gerações subsequentes (DEARFIELD et al., 2002).

O aumento no uso de plantas medicinais para a prevenção e tratamento de diversas patologias, entre elas doenças inflamatórias, cardiovasculares e câncer, tem estimulado o interesse no estudo da toxicidade. Apesar dos compostos presentes em plantas medicinais apresentarem muitos efeitos benéficos à saúde humana, quando usados cronicamente ou de forma aguda, podem induzir efeitos tóxicos, genotóxicos e carcinogênicos (GATEVA et al., 2015; PUKALSKIENĖ et al., 2018).

Do ponto de vista toxicológico, os efeitos induzidos pelo uso de extratos vegetais podem não ser imediatamente correlacionados com a sua ingestão, mas observados em longo prazo de forma assintomática, se concretizando em efeitos nefrotóxicos, neurotóxicos, hepatotóxicos ou até mesmo, carcinogênicos (LAPA et al., 2004).

Na área de toxicologia genética, o teste do cometa, também conhecido como eletroforese em gel de célula única, é um dos mais empregados para avaliar produtos naturais, cujos resultados podem ser utilizados como um indicativo de genotoxicidade e/ou antigenotoxicidade de extratos, aumentando o conhecimento sobre suas propriedades (MATIĆ et al., 2015; MENDONÇA et al., 2016).

O teste do cometa é utilizado para identificar lesões no DNA que podem ser passíveis de correção ou podem gerar mutações, após serem processadas. Também pode ser empregado para estudos de reparo do DNA, trazendo informações importantes sobre a cinética e o tipo de lesão reparada (RIBEIRO; SALVADORI; MARQUES, 2003).

Esse teste por apresentar algumas vantagens como alta sensibilidade, exigência de pequenos números de células, baixo custo e possibilidade de utilização de diferentes tipos celulares (COLLINS et al., 2008; PUKALSKIENĖ et al., 2018), tem sido aplicado nas áreas de ecotoxicologia (REIS et al., 2017), epidemiologia molecular (KRUSZEWSKI et al., 2012), nutrição (BISHOP et al., 2015), biomonitoramento humano (COLLINS et al., 2014) e na identificação do potencial genotóxico de produtos naturais (CESAR et al., 2017; SALGUEIRO et al., 2016).

3.4 Inibidores de enzimas digestivas

Os inibidores de enzimas digestivas são substâncias químicas (a maioria proteínas) presentes nos tecidos vegetais, como folhas, sementes, raízes, cascas e em animais como, por exemplo, na clara de ovo. Essas substâncias, quando ingeridas, podem inibir a ação de algumas enzimas, como as amilases e lipases, que são muito importantes para o metabolismo normal do organismo humano (GENOVESE; LAJOLO, 2001), impedindo assim, a absorção de carboidratos e lipídeos, o que pode acarretar perda de peso, podendo ser uma ferramenta importante para auxiliar no tratamento da obesidade e doenças associadas.

A α -amilase (EC 3.2.1.1), denominada como α -1,4-glucano-4-glucanohidrolase, é uma enzima que está presente na secreção salivar e pancreática e é responsável por catalisar a hidrólise das ligações glicosídicas α -1,4 presentes na parte interna do amido, convertendo-o em açúcares simples, como a maltose e maltotriose, para que possam ser completamente digeridos pelo organismo (PODSEDEK et al., 2014).

A α -glicosidase (EC 3.2.1.20) é uma enzima ligada à membrana localizada no epitélio do intestino delgado e catalisa a clivagem de ligações glicosídicas e liberação de glicose para a corrente sanguínea a partir de dissacarídeos e oligossacarídeos (JAKUBCZYK et al., 2018).

A utilização de extratos vegetais como inibidores das enzimas α -amilase e α -glicosidase vem sendo uma das estratégias promissoras para o controle da hiperglicemia associada ao diabetes *mellitus* e obesidade, pelo fato da inibição dessas enzimas atrasarem a degradação do amido e dos oligossacarídeos, o que por sua vez, causaria uma diminuição na absorção de glicose e, conseqüentemente, da glicemia pós-prandial (IRONDI et al., 2014; PEREIRA et al., 2011).

A lipase, descrita como triacilglicerol lipase (EC 3.1.1.3) é produzida principalmente no pâncreas e catalisa a hidrólise de triacilgliceróis em 2-monoacilglicerol e ácidos graxos livres que podem ser absorvidos na corrente sanguínea. Uma concentração excessiva de ácidos graxos livres no sangue pode causar aumento da resistência à insulina, formação de radicais livres ou acúmulo de tecido adiposo, o que resulta em obesidade (GROVE et al., 2012; PODSEDEK et al., 2014).

A busca de inibidores de lipase pancreática se mostra também como uma opção promissora para auxiliar no tratamento da obesidade, visto que, a inibição dessa enzima promove redução na absorção de triacilgliceróis da dieta, ocasionando diminuição do aproveitamento calórico e perda de peso (VIEGAS JÚNIOR; BOLZANI; BARREIRO, 2006).

Adicionalmente, a tripsina (EC 3.2.21.4) é uma enzima digestiva produzida pelo pâncreas na forma de seu zimogênio enzimaticamente inativo (tripsinogênio) e levado até o intestino, onde por ação enzimática da enteroquinase e/ou tripsina se torna ativa e realiza a digestão das proteínas, liberando peptídeos (BARCELOS, 2004). Os inibidores de proteases têm sido considerados como "compostos antinutricionais", devido à sua atividade inibitória sobre enzimas digestivas em humanos e animais (KOSTEKLI; KARAKAYA, 2017).

Os aminoácidos obtidos da digestão das proteínas são substâncias essenciais para o organismo, porém os inibidores de tripsina impedem que as proteínas sejam hidrolisadas e conseqüentemente que os aminoácidos sejam liberados e absorvidos. A presença desses inibidores podem causar desconforto gástrico e levar a hipertrofia ou hiperplasia pancreática (HORTON et al., 2006).

A presença de inibidores de enzimas digestivas em produtos naturais tem sido bastante estudada para a busca de medicamentos baseados no mecanismo de inibição enzimática que ocasiona alterações benéficas no metabolismo, apresentando-se como uma excelente alternativa para o desenvolvimento seguro e eficaz de medicamentos ou mesmo para uso nutracêutico (SIMÃO et al., 2017).

3.5 Peçonhas de serpentes

As peçonhas de serpentes são as mais complexas de todas as peçonhas animais até então estudadas, contendo 20 ou mais componentes diferentes, sendo que mais de 90% do seu peso seco constituem-se de proteínas, muitas das quais possuem atividade enzimática, e a parte não proteica é composta por carboidratos, lipídeos, íons metálicos (que em sua maioria tem papel fundamental na atividade das enzimas atuando como cofatores), aminoácidos livres, nucleotídeos, entre outros (VARANDA; GIANINNI, 1999). Entre os componentes presentes na peçonha de serpentes, aqueles que demonstram maior potencial como agentes biotecnológicos de estudo e também responsáveis por desordens de maior gravidade dentro do envenenamento são: as fosfolipases A₂ (PLA₂), proteases (metaloproteases e serinoproteases), lectinas tipo C, hialuronidases, desintegrinas e L-aminoácido oxidases (OLIVEIRA et al., 2016).

A combinação destes compostos proteicos está diretamente relacionada aos danos causados por essas peçonhas, cuja fisiopatologia inclui efeitos locais, como dor intensa, edema,

hemorragia e necrose, e/ou efeitos sistêmicos, tais como náuseas, coagulopatias, hipotensão, choque cardiovascular e distúrbios renais (MORAIS et al., 2012; SILVA et al., 2018). O envenenamento por serpentes é um grave problema de saúde pública, especialmente nas regiões tropicais e subtropicais do mundo. No Brasil, quase 90% dos acidentes ofídicos são provocados por serpentes do gênero *Bothrops* (BRASIL, 2016).

As misturas complexas de compostos orgânicos e inorgânicos, presentes na peçonha, agem sobre uma variedade de alvos metabólicos e fisiológicos específicos de presas ou vítimas, auxiliando na alimentação e defesa (BOLDRINI-FRANÇA et al., 2017). Algumas toxinas podem provocar desorganização fisiológica, por agirem diretamente sobre eritrócitos, miócitos, fatores da cascata de coagulação sanguínea, além de células epiteliais e do endotélio vascular. Como consequência, pode resultar em coagulação ou hemólise intravascular, predisposição para contrair doenças e/ou destruição de tecido muscular. As toxinas também podem agir induzindo injúrias em quaisquer estruturas renais através da diminuição do fluxo sanguíneo, coagulação intravascular disseminada e toxicidade vascular (SITPRIJA, 2008).

As toxinas podem apresentar diferentes atividades fisiológicas, hematológicas e neurotransmissoras no ser humano. Neste contexto, as peçonhas têm sido amplamente utilizadas como ferramentas laboratoriais na indução de atividades que simulem as exercidas por moléculas humanas, a fim de contribuir para a descoberta de vários mecanismos moleculares envolvidos nos processos fisiológicos e no desenvolvimento de doenças, com vistas ao desenvolvimento de novos agentes terapêuticos para o tratamento de doenças cardiovasculares, hematológicas e degenerativas.

3.6 Principais classes de enzimas presentes em peçonhas de serpentes destacadas como ferramentas laboratoriais no presente estudo

3.6.1 Fosfolipases A₂ e seu papel na inflamação

As fosfolipases A₂ (PLA₂s; EC 3.1.1.4) são enzimas estáveis, relativamente pequenas (~14 kDa), dependentes de cálcio e ricas em interações dissulfeto, que catalisam a hidrólise de ligações éster sn-2 de fosfoglicerídeos, levando a formação de ácidos graxos, especialmente ácido araquidônico e lisofosfolipídeos (YARLA et al., 2015). O ácido araquidônico é um precursor de

prostaglandinas, leucotrienos e tromboxanos, estando algumas dessas moléculas envolvidas no processo inflamatório (CARVALHO et al., 2013).

As vias de cicloxigenase e lipoxigenase são as duas principais vias enzimáticas na conversão do ácido araquidônico em lipídeos bioativos (REDDY et al., 2015). Em condições normais, esses lipídeos desempenham papéis importantes na função sináptica, regulação do fluxo sanguíneo cerebral, apoptose, angiogênese e expressão gênica, além de atuarem como hormônios em inúmeros processos fisiológicos. Porém em concentrações elevadas podem acarretar uma série de condições patológicas, tais como isquemia, epilepsia, Alzheimer, Parkinson, esclerose lateral amiotrófica, além de produzirem neuroinflamação envolvendo vasodilatação e vasoconstrição, agregação plaquetária e estresse oxidativo (GARG et al., 2018; PHILLIS; HORROCKS; FAROOQUI, 2006; SHUKLA et al., 2015). O principal papel dos eicosanoides, que incluem leucotrienos, prostaglandinas e tromboxanos é amplificar ou reduzir a inflamação, coordenando o recrutamento de leucócitos, citocinas e produção de quimiocinas, formação de anticorpos, proliferação e migração e apresentação de antígenos (CHIURCHIU; MACCARRON, 2016).

Atividades catalíticas elevadas de fosfolipases foram encontradas no líquido sinovial de pacientes que sofreram com artrite reumatoide, osteoartrite e artrite associada à presença de cristais. Quantidades subnormais persistentes da atividade e concentração de fosfolipases têm sido relatadas em pacientes com esclerose sistêmica (NEVALAINEN, 1993; STEFANSKI et al., 1986).

Além do seu papel bem estabelecido na inflamação, os eicosanoides também têm funções homeostáticas que variam desde a regulação do vazamento vascular e formação de barreiras, até a integridade da mucosa (CHIURCHIU; MACCARRON, 2016).

As fosfolipases estão presentes em diversas espécies animais, assim como participam no organismo humano de processos inflamatórios e resposta imune, além de estarem relacionadas ao desenvolvimento de convulsões, hipotensão, hemólise e hemorragia (CARVALHO et al., 2013; PONCE-SOTO et al., 2009).

As fosfolipases de peçonhas de serpentes têm sido investigadas não apenas por apresentar uma variedade de efeitos biológicos, geralmente responsáveis por danos musculares e outros papéis tóxicos e digestivos importantes na captura e imobilização de presas (MARCUSI et al.,

2013; SCHALOSKE; DENNIS, 2006), mas também devido à sua acessibilidade, facilidade de purificação e sua semelhança com as fosfolipases de mamíferos.

Apesar de possuírem elevada identidade e uma simplicidade molecular aparente, estas toxinas exercem inúmeros efeitos farmacológicos, através de mecanismos que podem ser dependentes e/ou independentes de sua atividade enzimática, como neurotoxicidade, cardiotoxicidade, citotoxicidade, indução de edemas, miotoxicidade, inflamação e efeito sobre plaquetas (ALMEIDA et al., 2016; CASTILLO et al., 2012; GUTIERREZ; LOMONTE, 2013).

A caracterização destas enzimas, funcionalmente versáteis, desperta o interesse médico-científico devido ao número de aplicações potenciais para a compreensão de envenenamento, fazendo diagnósticos clínicos, desenvolvendo estratégias terapêuticas e utilizando estas toxinas como ferramentas moleculares e biotecnológicas em estudos fisiopatológicos, taxonômicos e ecológicos como parâmetros para ensaios hemostáticos (ALMEIDA et al., 2016; CALDERON et al., 2014; CARVALHO et al., 2013).

Diversos extratos vegetais já foram estudados como potentes inibidores de fosfolipases, como por exemplo, *Pentaclethra maculosa* (SILVA et al., 2005), *Bauhinia forficata* (OLIVEIRA et al., 2005), *Casearia sylvestris* (SILVA et al., 2008), *Eclipta alba* (DIOGO et al., 2009), *Hypericum brasiliense* (ASSAFIM et al., 2011) e *Bellucia dichotoma* Cogn. (MOURA et al., 2017), bem como compostos isolados tais como flavonoides (BELCHOR et al., 2017; LÄTTIG et al., 2007; SOARES et al., 2005; YARLA et al., 2015), cumestanos (MORS et al., 2000; NUNOMURA et al., 2009) e alcaloides (BATINA et al., 2000). Portanto, o conhecimento estrutural e funcional destes inibidores naturais de fosfolipases possibilitaria a utilização futura como modelos para inibidores sintéticos de aplicação na indústria farmacêutica.

3.6.2 Proteases e sua ação sobre a coagulação sanguínea

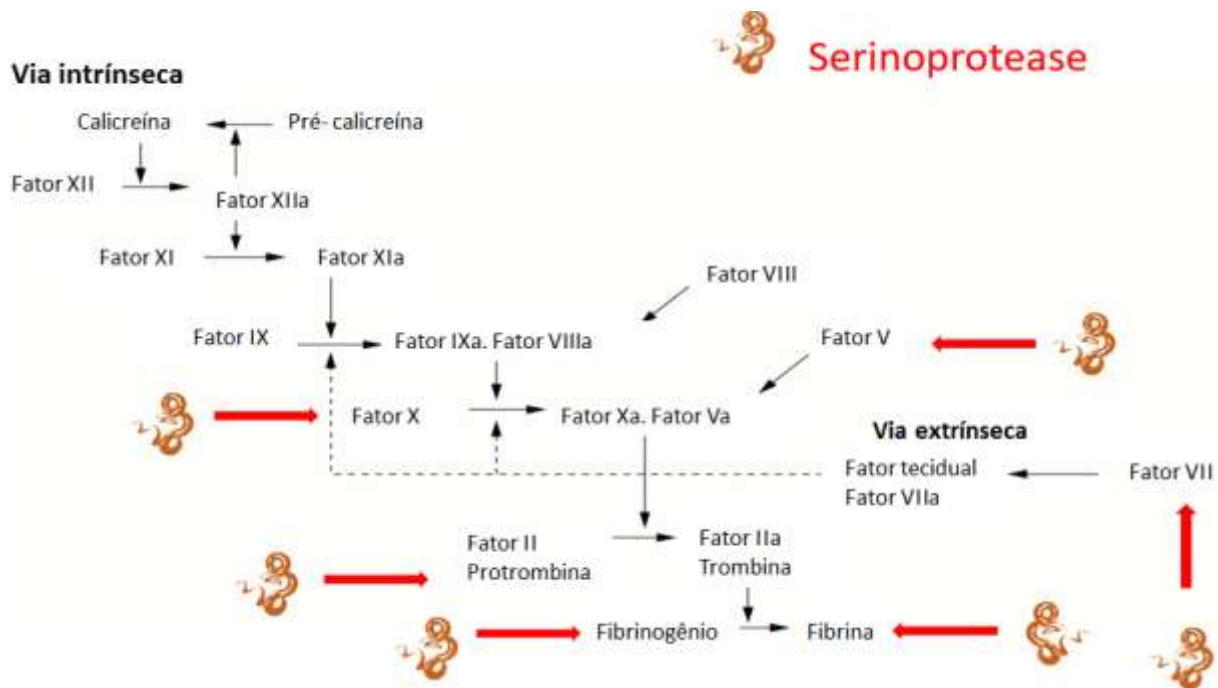
As proteases estão naturalmente presentes em peçonhas de serpentes e são responsáveis por alguns efeitos locais e sistêmicos do envenenamento, sendo normalmente capazes de promover a hidrólise das proteínas fibrinogênio e fibrina, o que resulta na incoagulabilidade do sangue e na fibrinólise, respectivamente (COSTA et al., 2010). Essas enzimas podem atuar sobre diversos substratos proteicos exercendo ação sobre componentes de membranas celulares,

proteínas sanguíneas, teciduais e àquelas que compõem a lâmina basal (ex: laminina, fibronectina e colágeno) (BALDO et al., 2010; MARKLAND JR; SWENSON, 2013).

Entre as proteases destacam-se as serinoproteases que atuam de forma seletiva sobre fatores da cascata de coagulação, com efeito na agregação plaquetária, fibrinólise e coagulação, e as metaloproteases, que são responsáveis por hemorragias, mionecrose e danos teciduais contribuindo para a perda de função ou amputação do membro atingido e inflamação local (GUTIÉRREZ et al., 2010; OLIVEIRA et al., 2016).

As serinoproteases de peçonhas de serpentes são amplamente caracterizadas quanto às suas ações sobre o sistema hemostático. Possuem massa molecular entre 26-67 kDa que varia de acordo com o conteúdo de carboidratos associados a ela (SERRANO; MAROUN, 2005). Essas enzimas apresentam um perfil farmacológico altamente diversificado, o que inclui ações sobre as proteínas da cascata de coagulação, tais como a atividade do tipo trombina sobre o fibrinogênio, a ativação do factor V e da proteína C, a fibrinogenólise, a ativação do plasminogênio e a indução da agregação plaquetária. Por atuarem diretamente na conversão do fibrinogênio plasmático em fibrina, sem o envolvimento da trombina endógena, as serinoproteases são geralmente conhecidas como trombina-like (MARKLAND, 1998; SERRANO; MAROUN, 2005). Na figura 8 estão apresentados os locais de ação mais frequentes das serinoproteases.

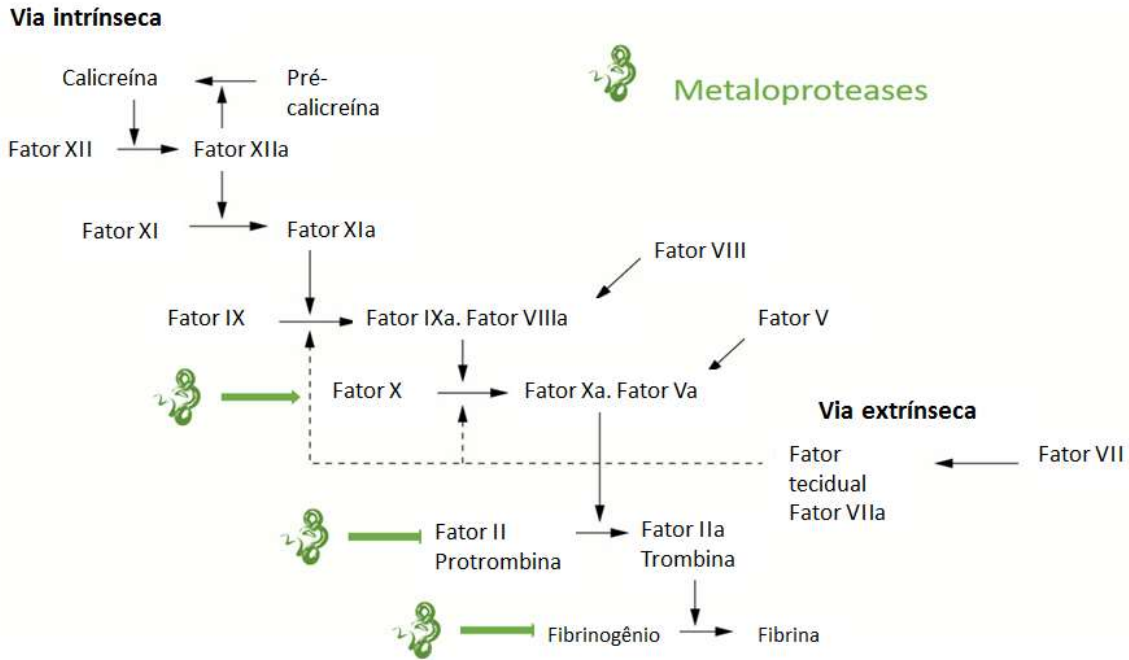
Figura 8 – Locais de atuação de serinoproteases de peçonhas de serpentes que afetam a coagulação sanguínea.



Fonte: Cesar (2016), adaptado de Serrano (2013).

As metaloproteases de peçonhas de serpentes participam do processo hemorrágico pela degradação de componentes da membrana basal da microvasculatura envolvida na manutenção da estrutura e integridade capilar, levando a ruptura de redes capilares, edema e hemorragia (ESCALANTE et al., 2011; GUTIÉRREZ et al., 2010; KINI; KOH, 2016). 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 protrombina, convertendo-a em sua forma ativada, a trombina (Figura 9).

Figura 9 – Locais de atuação de metaloproteases de peçonhas de serpentes que afetam a coagulação sanguínea.



Fonte: Cesar (2016), adaptado de Serrano (2013) e Markland Jr e Swenson (2013).

As metaloproteases são enzimas que dependem de íons metálicos (Zn^{2+}) para exercerem sua função catalítica, se dividem em três classes principais (P-I a III) de acordo com a presença de diferentes domínios, sendo que a classe P-I apresenta apenas um domínio metaloprotease, P-II apresenta domínio metaloprotease e desintegrina, P-III possui domínio metaloprotease, desintegrina e outro rico em cisteína. Possuem massas moleculares que variam de 25 kDa à valores um pouco maiores que 100 kDa (FOX; SERRANO, 2008; GUTIÉRREZ et al., 2010).

Essas enzimas apresentam atividade fibrinogenolítica, dessa forma, são susceptíveis a serem utilizadas no tratamento da trombose, uma vez que diminuem o fibrinogênio e solubilizam os coágulos de fibrina, além de serem promissoras ao tratamento de doenças cardiovasculares, que é a maior causa de mortalidade no mundo (COSTA et al., 2010; JACOB-FERREIRA et al., 2016; MARCUSSI et al., 2007).

As metaloproteases presentes nas peçonhas de serpentes apresentam funções enzimáticas similares às proteases endógenas humanas, principalmente as atuantes nos processos de coagulação e agregação de plaquetas, assim diversos trabalhos relatam a ação dessas enzimas

sobre células e moléculas que compõem o sistema hemostático (BERNARDONI et al., 2014, BRAUD; BON; WISNER, 2000, GAY et al., 2009; KINI; KOH et al., 2016), alterando a coagulação sanguínea e conseqüentemente interferindo na hemostasia (SERRANO; MAROUN, 2005; TAKEDA; TAKEYA; IWANAGA, 2012). Dessa maneira, a alta seletividade destas proteínas nos fatores individuais da coagulação sanguínea, tornam-as ferramentas potencialmente úteis para estudar os mecanismos de ação, a regulação e as relações estrutura-função dos fatores de coagulação na presença de diferentes compostos, possibilitando assim, aplicações futuras destes na terapêutica de doenças humanas.

Diversos inibidores naturais de proteases já foram isolados de plantas e animais, a fim de serem utilizados no controle de vários processos patológicos, tais como trombose, hemorragia e câncer (MELLO et al., 2006), porém os mecanismos de interações entre enzimas e compostos naturais são pouco descritos e requerem amplos estudos de caracterização estrutural e funcional (MOURA et al., 2016).

Silva et al. (2007) verificaram que o extrato de *Pentaclethra maculosa* foi capaz de neutralizar as atividades hemorrágicas, fibrinogenolíticas e proteolíticas das metaloproteases de classe P-I e P-III isoladas de peçonhas de *Bothrops neuwiedi* e *B. jararacussu*. Os extratos de *Renealmia alpinia* inibiram parcialmente a atividade hemorrágica induzida por uma metaloprotease isolada de *B. atrox* e também se mostraram eficazes contra as atividades induzidas por uma serinoprotease de *Crotalus durissus cumanensis* (PATIÑO; BENJUMEA; PEREAÑEZ, 2013).

A inibição de diferentes proteases de forma específica sugere o potencial de uso dos inibidores como agentes terapêuticos para as mais variadas enfermidades, visto que, as proteases podem atuar na hidrólise de fatores da cascata de coagulação, quebra de fibrinogênio e/ou fibrina, participam ativamente na regulação da hemostasia, estando diretamente envolvidas em processos inerentes a defesa do organismo (ex: manutenção da fluidez sanguínea e estancamento de hemorragias) assim como no desenvolvimento de diversas patologias (ex: isquemias e trombose).

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

As plantas medicinais apresentam potencial de utilização terapêutica por serem fontes ricas de compostos bioativos, sendo estes uma alternativa viável para o desenvolvimento de drogas eficazes e seguras para auxiliar na prevenção e tratamento de doenças como trombose, obesidade, diabetes e diversas outras com origem inflamatória.

Neste trabalho observou-se que os extratos, aquoso e etanólico, das espécies vegetais *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC (marcela), *Echinodorus macrophyllus* (chapéu de couro) e *Lippia sidoides* (alecrim-pimenta) mostraram grande diversidade de fitoquímicos com potenciais para serem utilizados em preparações farmacológicas com possíveis benefícios a saúde. Os compostos fenólicos presentes nessas plantas apresentaram efeitos moduladores (por inibição ou potencialização) sobre a atividade de diferentes enzimas, como as fosfolipases A₂, proteases e enzimas digestivas. A avaliação toxicológica revelou que os extratos vegetais apresentaram efeito antígeno-tóxico, nas condições avaliadas.

No entanto, estudo complementares poderão definir formas adequadas, indicação, administração e dosagem, para seu uso terapêutico de forma eficaz e segura.

REFERÊNCIAS

- AHMAD, Z. et al. Effect of structural modulation of polyphenolic compounds on the inhibition of *Escherichia coli* ATP synthase. **International Journal of Biological Macromolecules**, Guildford, v. 50, n. 3, p. 476-486, Apr. 2012.
- ALMEIDA, S. P. et al. **Cerrado: espécies vegetais úteis**. Planaltina: EMBRAPA-CPAC, 1998. 464 p.
- ALMEIDA, M. C. S. et al. Flavonoides e outras substâncias de *Lippia sidoides* e suas atividades antioxidantes. **Química Nova**, São Paulo, v. 33, n. 9, p. 1877-1881, 2010.
- ALMEIDA, J. R. et al. Biochemical and functional studies of ColTx-I, a new myotoxic phospholipase A₂ isolated from *Crotalus oreganus lutosus* (Great Basin rattlesnake) snake venom. **Toxicon**, Elmsford, v. 117, p. 1-12, July 2016.
- ALVES, H. M. A diversidade química das plantas como fonte de fitofármacos. **Cadernos Temáticos de Química Nova na Escola**, São Paulo, v. 3, p. 10-15, 2001.
- AMADI, C. N.; ORISAKWE, O. E. Herb-induced liver injuries in developing nations: An update. **Toxics**, Heslington, v. 6, n. 2, p. 1-13, Apr. 2018.
- ANGELO P. M.; JORGE, N. Compostos fenólicos em alimentos: uma breve revisão. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, v. 66, n. 1, p. 232-240, 2007.
- ASSAFIM, M. et al. *Hypericum brasiliense* plant extract neutralizes some biological effects of *Bothrops jararaca* snake venom. **Journal of Venom Research**, Oxford, v. 2, p. 11-16, May 2011.
- ATANASOV, A. G. et al. Discovery and resupply of pharmacologically active plant-derived natural products: A review. **Biotechnology Advances**, Althanstrasse, v. 33, n. 8, p. 1582-1614, Dec. 2015.
- BALDO, C. et al. Action of neuwiedase, a metalloproteinase isolated from *Bothrops neuwiedi* venom, on skeletal muscle: an ultrastructural and immunocytochemistry study. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, Botucatu, v. 16, n. 3, p. 462-469, 2010.
- BALESTRIN, L. A. et al. Protective effect of a hydrogel containing *Achyrocline satureioides* extract-loaded nanoemulsion against UV-induced skin damage. **Journal of Photochemistry and Photobiology. B: Biology**, Quebec, v. 163, p. 269-276, Oct. 2016.
- BARCELOS, M. F. P. **Substâncias tóxicas naturais em alimentos**. Lavras: Ed. UFLA, 2004. 114 p.

BARRETT, A. H.; FARHADI, N. F.; SMITH, T. J. Slowing starch digestion and inhibiting digestive enzyme activity using plant flavanols/tannins - A review of efficacy and mechanisms. **LWT - Food Science and Technology**, Georgia, v. 87, p. 394-399, Jan. 2018.

BATINA, M. F. et al. Inhibition of the lethal and myotoxic activities of *Crotalus durissus terrificus* venom by *Tabernaemontana catharinensis*: identification of one of the active components. **Planta Medica**, Stuttgart, v. 66, n. 5, p. 424- 428, June 2000.

BATISTA, R. S. A. et al. Atividade antifúngica de alecrim-pimenta (*Lippia sidoides* Cham.) sobre *Candida spp*. **Revista Agropecuária Técnica**, Areia, v. 34, n. 1, p. 40-49, 2013.

BATTISTI, C. et al. Plantas medicinais utilizadas no município de Palmeira das Missões, RS, Brasil. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 11, n. 3, p. 338-348, jul./set. 2013.

BELCHOR, M. N. et al. Evaluation of rhamnetin as an inhibitor of the pharmacological effect of secretory phospholipase A₂. **Molecules**, Basel, v. 22, n. 9, p. 1-13, Aug. 2017.

BERLING, I.; ISBISTER, G. K. Hematologic effects and complications of snake envenoming. **Transfusion Medicine Reviews**, Massachusetts, v. 29, n. 2, p. 82-89, Apr. 2015.

BERNARDONI, J. L. et al. Functional variability of snake venom metalloproteinases: Adaptive advantages in targeting different prey and implications for human envenomation. **Plos One**, San Francisco, v. 9, n.10, p. 1-13, Oct. 2014.

BISHOP, K. et al. An investigation into the association between DNA damage and dietary fatty acid in men with prostate cancer. **Nutrients**, Basel, v. 7, n. 1, p. 405–422, Jan. 2015.

BOLDRINI-FRANÇA, J. et al. Minor snake venom proteins: Structure, function and potential applications. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects**, Amsterdam, v. 1861, n. 4, p. 824–838, Apr. 2017.

BOEIRA, J. M. et al. Toxicity and genotoxicity evaluation of *Passiflora alata* Curtis (Passifloraceae). **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 128, n. 2, p. 526-532, Mar. 2010.

BOLSON, M. et al. Ethno-medicinal study of plants used for treatment of human ailments, with residents of the surrounding region of forest fragments of Paraná, Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 161, p. 1–10, Feb. 2015.

BORGES, L. L. et al. Herbal medicines in Brazil: Legal rules. **Pharmaceuticals, Policy and Law**, Granada, v. 16, n. 3-4, p. 277-281, 2014.

BRANDELLI, C. L. C. et al. Indigenous traditional medicine: *in vitro* anti-giardial activity of plants used in the treatment of diarrhea. **Parasitology Research**, Heidelberg, v. 104, n. 6, p. 1345-1349, June 2009.

BRASIL. Ministério da Saúde RENISUS. **Relação nacional de plantas medicinais de interesse ao SUS. Espécies vegetais**, 2009. Disponível em: <<http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/RENISUS.pdf>>. Acesso em: 10 dez. 2017.

BRASIL. **Acidente por animais peçonhentos - notificações registradas no Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN) - SINAN NET**. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância Sanitária, 2016. Disponível em: <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?Sinannet/cnv/animaisbr.def>. Acesso em: 05 jun. 2018.

BRAUD, S.; BON, C.; WISNER, A. Snake venom proteins acting on hemostasis. **Biochimie**, Paris, v. 82, n. (9-10), p. 851–859, Sep./Oct. 2000.

CALDERON, L. A. et al. Antitumoral activity of snake venom proteins: new trends in cancer therapy. **BioMed Research International**, London, v. 2014, p. 1-19, Feb. 2014.

CARIDDI, L. N. et al. *In vitro* and *in vivo* cytogenotoxic effects of hot aqueous extract of *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC. **BioMed Research International**, London, v. 2015, n. 1, p. 1-12, 2015.

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

CASERO, C. et al. Structure and antimicrobial activity of phloroglucinol derivatives from *Achyrocline satureioides*. **Journal of Natural Products**, Columbus, v. 78, n. 1, p. 93–102, Jan. 2015.

CASTILLO, J. et al. *In vitro* antiplasmodial activity of phospholipases A₂ and a phospholipase homologue isolated from the venom of the snake *Bothrops asper*. **Toxins**, Basel, v. 4, n. 12, p. 1500-1516, Dec. 2012.

CESAR, P. H. S. **Avaliação do potencial protetor de compostos fenólicos sobre atividades tóxicas induzidas por peçonhas de *Bothrops* spp. e *Crotalus durissus terrificus***. 2016. 124 p. Dissertação (Mestrado em Agroquímica) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2016.

CESAR, P. H. S. et al. Prospection of effects of guava leaves infusion: antigenotoxic action and enzymatic inhibition. **Natural Product Communications**, Ohio, v. 12, p. 957-960, Apr. 2017.

CHIURCHIU, V.; MACCARRONE, M. Bioactive lipids as modulators of immunity, inflammation and emotions. **Current Opinion in Pharmacology**, San Bonifacio, v. 29, p. 54–62, Aug. 2016.

COLLINS, A. R. et al. The comet assay: topical issues. **Mutagenesis**, Oxford, v. 23, n. 3, p. 143–151, May 2008.

- COLLINS, A. et al. The comet assay as a tool for human biomonitoring studies: the ComNet project. **Mutation Research/Reviews in Mutation Research**, v. 759, p. 27–39, Jan./Mar. 2014.
- COSTA, J. O. et al. Structural and functional comparison of proteolytic enzymes from plant latex and snake venoms. **Biochimie**, Paris, v. 92, n. 12, p. 1760-1765, Dec. 2010.
- CROFT, K. D. et al. Screening plant derived dietary phenolic compounds for bioactivity related to cardiovascular disease. **Fitoterapia**, Novara, v. 126, p. 22–28, Apr. 2018.
- DAI, J.; MUMPER, R. J. Plant phenolics: extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. **Molecules**, Basel, v. 15, n. 10, p. 7313-7352, Oct. 2010.
- DEARFIELD, K. L. et al. Genotoxicity risk assessment: a proposed classification strategy. **Mutation Research**, Guelph, v. 521, n. 1-2, p. 121- 135, Nov. 2002.
- DIOGO, L. C. et al. Inhibition of snake venoms and phospholipases A (2) by extracts from native and genetically modified *Eclipta alba*: isolation of active coumestans. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, Copenhagen, v.104, n. 4, p. 293-299, May 2009.
- EL-HALAWANY, A. M. et al. Phenolics from *Barleria cristata* var. Alba as carcinogenesis blockers against menadione cytotoxicity through induction and protection of quinone reductase. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, Chichester, v. 18, n. 1, p. 1-7, May 2018.
- ENGLER, M. B.; ENGLER, M. M. The vasculoprotective effects of flavonoi-rich cocoa and chocolate. **Nutrition Research**, Tarrytown, v. 24, n. 9, p. 695-706, Sept. 2004.
- ESCALANTE, T. et al. Key events in microvascular damage induced by snake venom hemorrhagic metalloproteinases. **Journal of Proteomics**, Valencia, v.74, n. 9, p.1781-1794, Aug. 2011.
- ESPÉCIE *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC (marcela). 2018. Disponível em: http://www.ufrgs.br/fitoecologia/florars/open_sp.php?img=15040/ acesso: 09 mar. 2018.
- FARIAS, E. M. F. G. et al. Avaliação da toxicidade aguda do extrato metanólico de folhas de *Lippia sidoides* Cham. (Verbenaceae) In. Congresso Brasileiro De Química, 2007, Natal, RN. **Anais...**Natal: Sociedade Brasileira de Química. 2007. Disponível: <<http://www.abq.org.br/cbq/2007/trabalhos/7/7-600-750.htm>>. Acesso em: 14 fev. 2018.
- FARIAS, E. M. F. G. et al. Antifungal activity of *Lippia sidoides* Cham. (Verbenaceae) against clinical isolates of *Candida* species. **Journal of Herbal Medicine**, London, v. 2, n. 3, p. 63-67, Sept. 2012.
- FERNANDES, D. C. et al. Antinociceptive activity of essential oil from *Echinodorus macrophyllus* (Kunth.) Micheli (Alismataceae). **Revista Fitos**, Jacarepaguá, v. 7, n. 4, p. 245-251, Oct./Dec. 2012.

FERREIRA, V. F.; PINTO, A. C. A fitoterapia no mundo atual. **Química Nova**, São Paulo, v. 33, n. 9, p.1829, 2010.

FIRMO, W. C. A. et al. Historical context, popular use and scientific conception on medicinal plants. **Cadernos de Pesquisa**, São Luís, v. 18, n. especial, p. 1-6, Dec. 2011.

FONTENELLE, R. O. S. **Efeito antifúngico de óleos essenciais de *Lippia sidoides* Cham., *Croton argyrophylloides* Muell., *Croton zenhtneri* Pax et Hoffm., *Croton nepetaefolius* Baill. e de seus principais constituintes contra e candida spp. isolados de cães.** 2008. 162 p. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias.) - Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, 2008.

FOX, J.W.; SERRANO, S. M. Insights into and speculations about snake venom metalloproteinase (SVMP) synthesis, folding and disulfide bond formation and their contribution to venom complexity. **The FEBS Journal**, Dublin, v. 275, n. 12, p. 3016–3030, June 2008.

FURBEE, R. B. et al. Hepatotoxicity associated with herbal products. **Clinics in Laboratory Medicine**, v. 26, n. 1, p. 227–241, Mar. 2006.

GABR, S. et al. Characterization and optimization of phenolics extracts from *Acacia* species in relevance to their anti-inflammatory activity. **Biochemical Systematics and Ecology**, Richmond, v. 78, p. 21-30, June 2018.

GARG, P. K. et al. Lipoprotein-associated phospholipase A₂ and risk of incident peripheral arterial disease: Findings from the Atherosclerosis Risk in Communities study (ARIC). **Atherosclerosis**, Zürich, v. 268, p. 12-18, Jan. 2018.

GATEVA, S. et al. Salvia extract can decrease DNA damage induced by zeocin. **International Journal of Pharma Medicine and Biological Sciences**, South Dakota, v. 4, n. 1, p. 1-10, Jan. 2015.

GAY, C. C. et al. Systemic alterations induced by a *Bothrops alternatus* hemorrhagic metalloproteinase (baltergin) in mice. **Toxicon**, Elmsford, v.53, n. 1, p. 53–59, Jan. 2009.

GENOVESE, L. I.; LAJOLO, F. M. Atividade inibitória de tripsina de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.): avaliação crítica dos métodos de determinação. **Arquivos Latino Americano de Nutrição**, Caracas, v. 51, n. 4, p. 386-394, 2001.

GOMES, S. V. F.; NOGUEIRA, P. C. L.; MORAES, V. R. S. Aspectos químicos e biológicos do gênero *Lippia* enfatizando *Lippia gracilis* Schauer. **Eclética Química**, São Paulo, v. 36, n. 1, p. 64-77, 2011.

GROVE, K. A. et al. (-)-Epigallocatechin-3-gallate inhibits pancreatic lipase and reduces body weight gain in high fat-fed obese mice. **Obesity (Silver Spring)**, Louisiana, v. 20, n. 11, p. 2311–2313, Nov. 2012.

GUIMARÃES, L. G. L. et al. Essential oil of *Lippia sidoides* native to Minas Gerais: Composition, secretory structures and antibacterial activity. **Revista Ciência Agronômica**, Fortaleza, v. 45, n. 2, p. 267-275, Apr./June, 2014.

GULDIKEN, B. et al. Phytochemicals of herbs and spices: Health versus toxicological effects. **Food and Chemical Toxicology**, Kearny, v. 119, p. 37-49, Sept. 2018.

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

GUTIERREZ, J. M.; LOMONTE, B. Phospholipases A₂: unveiling the secrets of a functionally versatile group of snake venom toxins. **Toxicon**, Elmsford, v. 62, p. 27-39, Feb. 2013.

HORTON, H. R. et al. **Principles of Biochemistry**. 4 ed. Upper Saddle River, NJ, USA: Pearson Prentice Hall, 2006.

HUSSAIN, T. et al. Oxidative stress and inflammation: what polyphenols can do for us? **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, London, v. 2016, p. 1-9, 2016.

IRONDI, E. A. et al. Phenolic composition and inhibitory activity of *Mangifera indica* and *Mucuna urens* seeds extracts against key enzymes linked to the pathology and complications of type 2 diabetes. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 4, n. 11, p. 903-910, 2014.

JACOB-FERREIRA, A. L. et al. Evaluation of the *in vivo* thrombolytic activity of a metalloprotease from *Bothrops atrox* venom using a model of venous thrombosis. **Toxicon**, Elmsford, v. 109, p. 18-25, Jan. 2016.

JAKUBCZYK, A. et al. Nutritional potential and inhibitory activity of bread fortified with green coffee beans against enzymes involved in metabolic syndrome pathogenesis. **LWT - Food Science and Technology**, Amsterdam, v. 95, p. 78–84, Sept. 2018.

KADARIAN, C. et al. Hepatoprotective activity of *Achyrocline satureoides* (Lam.) DC. **Pharmacological Research**, Milano, v. 45, n. 1, p. 57-61, Jan. 2002.

KINI, R. M.; KOH, C. Y. Metalloproteases affecting blood coagulation, fibrinolysis and platelet aggregation from snake venoms: definition and nomenclature of interaction sites. **Toxins**, Basel, v. 8, n. 284, p. 1-27, Sept. 2016.

KOSTEKLI, M.; KARAKAYA, S. Protease inhibitors in various flours and breads: Effect of fermentation, baking and *in vitro* digestion on trypsin and chymotrypsin inhibitory activities. **Food Chemistry**, London, v.24, p. 62-68, June 2017.

KRUSZEWSKI, M. et al., Direct use of the comet assay to study cell cycle distribution and its application to study cell cycle-dependent DNA damage formation. **Mutagenesis**, Oxford, v. 27, n. 5, p. 551–558, Sept. 2012.

KUMAR, S.; PANDEY, A. K. Chemistry and biological activities of flavonoids: an overview. **The Scientific World Journal**, London, v. 2013, n. 11-12, 2013.

LAPA, A. J. et al. Farmacologia e toxicologia de produtos naturais. In: SIMÕES, C. M. O. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5 ed. Porto Alegre: Ed. Universidade/UFRGS, 2004. p. 247-262.

LÄTTIG, J. et al. Mechanism of inhibition of human secretory phospholipase A₂ by flavonoids: rationale for lead design. **Journal of Computer-Aided Molecular Design**, Princeton, v. 21, n. 8, p. 473–483, Aug. 2007.

LEITE, J. P. V. et al. Contribuição ao estudo farmacobotânico da *Echinodorus macrophyllus* (Kunth) Micheli (chapéu-de-couro) – Alismataceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, São Paulo, v. 17, n. 2, p. 242-248, abr./jun. 2007.

LI, A. N. et al. Resources and biological activities of natural polyphenols. **Nutrients**, Adelaide, v. 6, n. 12, p. 6020-6047, Dec. 2014.

LOBO, P. L. D. et al. Dose–response evaluation of a novel essential oil against *Mutans streptococci in vivo*. **Phytomedicine**, Mainz, v. 18, n. 7, p. 551-556, May 2011.

LOPES, C. L. et al. Toxicological evaluation by *in vitro* and *in vivo* assays of an aqueous extract prepared from *Echinodorus macrophyllus* leaves. **Toxicology Letters**, Würzburg, v. 116, n. 3, p. 189-198, Aug. 2000.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas cultivadas**. Nova Odessa: Plantarum, 2002. 544 p.

MAMEDE, J. S. S.; PASA, M. C. Plantas medicinais utilizadas pela comunidade São Miguel, Zona Rural de Várzea Grande, Mato Grosso, Brasil. **FLOVET- Boletim do Grupo de Pesquisa da Flora, Vegetação e Etnobotânica**, Cuiabá, v.1, n.6, p. 6-26, 2014.

MARCUSSI, S. et al. Molecular and functional characterization of a new non-hemorrhagic metalloprotease from *Bothrops jararacussu* snake venom with antiplatelet activity. **Peptides**, Oulu, v. 28, n. 12, p. 2328–2339, Dec. 2007.

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

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

MARKLAND JR, F. S.; SWENSON, S. Snake venom metalloproteinases. **Toxicon**, Elmsford, v. 62, p. 3–18, Feb. 2013.

MARMITT, D. J. et al. Scientific production of plant species included in the Brazilian national list of medicinal plants of interest to the unified health system (RENISUS) from 2010 to 2013. **Journal of Chemical and Pharmaceutical Research**, v. 8, n. 2, p. 123-132, Jan. 2016.

MARQUES, T. R. **Extrato de bagaço de acerola: Inibição de enzimas digestivas, ação antioxidante e inseticida.** 2016. 125 p. Tese (Doutorado em Agroquímica) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2016.

MATIĆ, S. et al. *In vitro* and *in vivo* assessment of the genotoxicity and antigenotoxicity of the *Filipendula hexapetala* and *Filipendula ulmaria* methanol extracts. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 174, p. 287-292, Nov. 2015.

MATOS, F. J. A. et al. **Constituintes químicos ativos e propriedades biológicas de plantas medicinais brasileiras.** 2. ed. Fortaleza: Ed. UFC, 2004.

MELO, J. G. et al. Medicinal plants used as antitumor agents in Brazil: An ethnobotanical approach. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, New York, v. 2011, p. 1-14, 2011.

MELO, M. N. O. et al. Phenolic compounds from *Viscum album* tinctures enhanced antitumor activity in melanoma murine cancer cells. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 26, n. 3, p. 311-322, Mar. 2018.

MELLO, G. C. et al. Oedematogenic activity induced by Kunitz-type inhibitors from *Dimorphandra mollis* seeds. **Toxicon**, Elmsford, v. 47, n. 2, p. 150-155, Feb. 2006.

MENDONÇA, E. D. et al. Genotoxic, mutagenic and antigenotoxic effects of *Cecropia pachystachya* Trécul aqueous extract using *in vivo* and *in vitro* assays. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 193, p. 214-220, Dec. 2016.

MÍDIO, A. MARTINS, D. I. **Toxicologia de alimentos.** São Paulo: Varela, 2000. 295 p.

MORAIS, N. C. et al. Isolation and characterization of moojenin, an acid-active, anticoagulant metalloproteinase from *Bothrops moojeni* venom. **Toxicon**, Elmsford, v. 60, n. 7, p. 1251–1258, Dec. 2012.

MORETI, D. L. C. et al. Estudo hematológico em ratos sob ação de plantas medicinais. XXXVII. *Echinodorus macrophyllus* (Kunth.) Mitch. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, Botucatu, v. 8, n. 4, p. 162-164, 2006.

MORS, W. B. et al. Plant natural products active against snake bite – the molecular approach. **Phytochemistry**, New York, v. 55, n. 6, p. 627-642, Nov. 2000.

MOTA, A. P. P.; DANTAS, J. C. P.; FROTA, C. C. Antimicrobial activity of essential oils from *Lippia alba*, *Lippia sidoides*, *Cymbopogon citrates*, *Plectranthus amboinicus*, and *Cinnamomum zeylanicum* against *Mycobacterium tuberculosis*. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 48, n. 6, 2018.

- MOURA, V. M. et al. The inhibitory potential of the condensed-tannin-rich fraction of *Plathymenia reticulata* Benth. (Fabaceae) against *Bothrops atrox* envenomation. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 183, p. 136–142, May 2016.
- MOURA, V. M. et al. The potential of aqueous extracts of *Bellucia dichotoma* Cogn. (Melastomataceae) to inhibit the biological activities of *Bothrops atrox* venom: A comparison of specimens collected in the states of Pará and Amazonas, Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 196, p. 168-177, Jan. 2017.
- NASCIMENTO, E. L. et al. Renoprotective effect of the *Echinodorus macrophyllus* in induced renal injury. **Acta Paulista de Enfermagem**, São Paulo, v. 27, n. 1, p. 12-17, Jan./Feb. 2014.
- NEVALAINEN, T. J. Serum phospholipases A₂ in inflammatory diseases. **Clinical Chemistry**, Boston, v. 39, n. 12, p. 2453-2459, Dec. 1993.
- NUNES, B.C. et al. Antimicrobial activity, cytotoxicity and selectivity index of *Banisteriopsis laevifolia* (A. Juss.) B. Gates leaves. **Industrial Crops and Products**, North Dakota, v. 92, p. 277-289, Dec. 2016.
- NUNOMURA, R. C. S. et al. Characterization of bergenin in *Endopleura uchi* bark and its anti-inflammatory activity. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, São Paulo, v. 20, n. 6, p. 1060–1064, 2009.
- OLIVEIRA, C. Z. et al. Anticoagulant and antifibrinolytic properties of the aqueous extract from *Bauhinia forficata* against snake venoms. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 98, n. 1-2, p. 213–216, Apr. 2005.
- OLIVEIRA, C. H. M. et al. Inhibition of proteases and phospholipases A₂ from *Bothrops atrox* and *Crotalus durissus terrificus* snake venoms by ascorbic acid, vitamin E, and B-complex vitamins. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, Rio de Janeiro, v. 88, n. 3, p. 2005-2016, Oct. 2016.
- PATIÑO, A. C.; BENJUMEA, D. M.; PEREAÑEZ, J. A. Inhibition of venom serine proteinase and metalloproteinase activities by *Renealmia alpinia* (Zingiberaceae) extracts: Comparison of wild and *in vitro* propagated plants. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 149, n. 2, p. 590–596, Sept. 2013.
- PELL, A. N.; MBUGUA, D. M.; SCHOFIELD, P. Analysis of condensed tannins: a review. **Animal Feed Science and Technology**, v. 91, n. 1-2, p. 21-40, May 2001.
- PEREIRA, L. L. S. et al. Inhibitory activity and stability of the white bean flour extract on digestive enzymes in the presence of simulated gastric fluid. **Revista Brasileira de Farmácia**, Rio de Janeiro, v. 92, n. 4, p. 367-372, 2011.

PEREIRA, S. L. S. et al. Clinical effect of a gel containing *Lippia sidoides* on plaque and gingivitis control. **European Journal of Dentistry**, Isparta, v. 7, n. 1, p. 28-34, Jan. 2013.

PHILLIS, J. W.; HORROCKS, L. A.; FAROOQUI, A. A. Cyclooxygenases, lipoxygenases, and epoxygenases in CNS: Their role and involvement in neurological disorders. **Brain Research Reviews**, v. 52, n. 2, p. 201-243, Sept. 2006.

PINTO, A. C. et al. Immunosuppressive effects of *Echinodorus macrophyllus* aqueous extract. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 111, n. 2, p. 435-439, May 2007.

PODSEDEK, A. et al. *In vitro* inhibitory effect on digestive enzymes and antioxidant potential of commonly consumed fruits. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 62, n. 20, p. 4610–4617, May 2014.

POLYDORO, M. et al. Antioxidant, a pro-oxidant and cytotoxic effects of *Achyrocline satureioides* extracts. **Life Sciences**, Columbus, v. 74, n. 23, p. 2815–2826, Apr. 2004.

PONCE-SOTO, L. A. et al. Neuromuscular activity of BaTX, a presynaptic basic PLA₂ isolated from *Bothrops alternatus* snake venom. Comparative biochemistry and physiology. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C Toxicology & Pharmacology**, Florida, v. 150, n. 2, p. 291–297, June 2009.

PORTELLA, V. G. et al. Nephroprotective effect of *Echinodorus macrophyllus* Micheli on gentamicin-induced nephrotoxicity in rats. **Nephron Extra**, Basel, v. 2, n. 1, p. 177-183, Jan./Dec. 2012.

PUKALSKIENĖ, M. et al. Genotoxicity and antioxidant activity of five *Agrimonia* and *Filipendula* species plant extracts evaluated by comet and micronucleus assays in human lymphocytes and Ames *Salmonella*/microsome test. **Food and Chemical Toxicology**, Kearny, v. 113, p. 303-313, Mar. 2018.

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

REIS, G. B. D. et al. Reliability of plant root comet assay in comparison with human leukocyte comet assay for assessment environmental genotoxic agents. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, Plymouth, v. 142, p. 110-116, Aug. 2017.

RETTA, D. et al. Marcela, a promising medicinal and aromatic plant from Latin America: A review. **Industrial Crops and Products**, North Dakota, v. 38, p. 27-38, July 2012.

REYES-GARCÍA, V. The relevance of traditional knowledge systems for ethnopharmacological research: theoretical and methodological contributions. **Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine**, Pollenzo, v. 6, n. 3, p. 1-12, Nov. 2010.

- RIBEIRO, L. R.; SALVADORI, D. M. F.; MARQUES, E. K. **Mutagênese ambiental**. Canoas-RS: Ed. ULBRA, 2003. 356 p.
- RITTER, C. S. et al. *Achyrocline satureioides* essential oil-loaded in nanocapsules reduces cytotoxic damage in liver of rats infected by *Trypanosoma evansi*. **Microbial Pathogenesis**, Marseille, v. 103, p. 149-154, Feb. 2017.
- RUFFA, M. J. et al. Cytotoxic effect of Argentina medicinal plant extracts on human hepatocellular carcinoma cell line. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 79, n. 3, p. 335-339, Mar. 2002.
- SABINI, M. C. et al. Evaluation of cytogenotoxic effects of cold aqueous extract from *Achyrocline satureioides* by *Allium cepa* L test. **Natural Product Communications**, Westerville, v. 6, n. 7, p. 995–998, July 2011.
- SABINI, M. C. et al. Evaluation of antiviral activity of aqueous extracts from *Achyrocline satureioides* against Western equine encephalitis virus. **Natural Product Communications**, Westerville, v. 26, n. 5, p. 405–415, 2012.
- SABINI, M. C. et al. Evaluation of the cytotoxicity, genotoxicity and apoptotic induction of an aqueous extract of *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC. **Food and Chemical Toxicology**, Kearny, v. 60, p. 463–470, Oct. 2013.
- SALGUEIRO, A. C. F. et al. *In vitro* and *in silico* antioxidante and toxicological activities of *Achyrocline satureioides*. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 194, p. 6–14, Dec. 2016.
- SANTOS, A. et al. Uso popular de espécies medicinais da família Verbenaceae no Brasil. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 17, n. 4, p. 980-991, 2015.
- SCHALOSKE, R. H.; DENNIS, E. A. The phospholipase A₂ superfamily and its group numbering system. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids**, Amsterdam, v.1761, n. 11, p. 1246-1259, Nov. 2006.
- SERRANO, S. M. T.; MAROUN, R. C. Snake venom serine proteinases: sequence homology vs. substrate specificity, a paradox to be solved. **Toxicon**, Elmsford, v. 45, n. 8, p. 1115–1132, June 2005.
- SERRANO, S. M. T. The long road of research on snake venom serine proteinases. **Toxicon**, Elmsford, v. 62, p. 19-26, Sept. 2013.
- SHUKLA, P. K. et al. Structures and binding studies of the complexes of phospholipase A₂ with five inhibitors. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins & Proteomics**, Amsterdam, v. 1854, n. 4, p. 269–277, Dec. 2015.

- SILVA, J. O. et al. Antihemorrhagic, antinucleolytic and other antiophidian properties of the aqueous extract from *Pentaclethra macroloba*. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 100, n. 1-2, p. 145–152, Aug. 2005.
- SILVA, J. O. et al. Triterpenoid saponins, new metalloprotease snake venom inhibitors isolated from *Pentaclethra macroloba*. **Toxicon**, Elmsford, v. 50, n. 2, p. 283–291, Aug. 2007.
- SILVA, S. L. et al. Isolation and characterization of ellagic acid derivatives isolated from *Casearia sylvestris* SW aqueous extract with anti-PLA (2) activity. **Toxicon**, Elmsford, v. 52, n. 6, p. 655-666, Nov. 2008.
- SILVA, S. M. et al. Inhibition of salivary and pancreatic α -amylases by a pinhão coat (*Araucaria angustifolia*) extract rich in condensed tannin. **Food Research International**, Campinas, v. 56, p. 1–8, Feb. 2014.
- SILVA, I. C. et al. Evaluation of cytotoxic, apoptotic, mutagenic, and chemopreventive activities of semi-synthetic esters of gallic acid. **Food and Chemical Toxicology**, Kearny, v. 105, p. 300-307, July 2017.
- SILVA, L. M. G. et al. Photobiomodulation therapy on *Bothrops* snake venom-induced local pathological effects: A systematic review. **Toxicon**, Elmsford, v. 152, p. 23–29, July 2018.
- SIMÃO, A. A. et al. Aqueous extract of *Psidium guajava* leaves: phenolic compounds and inhibitory potential on digestive enzymes. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, Rio de Janeiro, v. 89, p. 2155-2165, 2017.
- SIMÕES, C. M. O. et al. Pharmacological investigations on *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC., compositae. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 22, n. 3, p. 281-293, Apr. 1988.
- SIMÕES, C. M. O. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6. ed. Porto Alegre: UFSC/UFRGS, 2007. 1104 p.
- SINGH, S. K.; PATRA, A. Evaluation of phenolic composition, antioxidant, anti-inflammatory and anticancer activities of *Polygonatum verticillatum* (L.). **Journal of Integrative Medicine**, Hong Kong, v. 16, n. 4, p. 273-282, July 2018.
- SITPRIJA, V. Animal toxins and the kidney. **Nature Clinical Practice Nephrology**, v. 4, n. 11, p. 616-627, Nov. 2008.
- SOARES, A. M. et al. Medicinal plants with inhibitory properties against snake venoms. **Current Medicinal Chemistry**, Schiph, v. 12, n. 22, p. 2625–2641, 2005.
- SOTO-VACA, A. et al. Evolution of phenolic compounds from color and flavor problems to health benefits. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 60, n. 27, p. 6658–77, July 2012.

SOUZA, K. C. B.; BASSANI, V. L.; SCHAPOVAL, E. E. S. Influence of excipients and technological process anti-inflammatory activity of quercetin and *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC. extracts by oral route. **Phytomedicine**, Mainz, v. 14, n. 2-3, p. 102-108, Feb. 2007.

SOUZA, P. O. de. et al. Anticancer activity of flavonoids isolated from *Achyrocline satureioides* in gliomas cell lines. **Toxicology in Vitro**, New York, v. 51, p. 23-33, Sept. 2018.

STEFANSKI, E. et al. Purification of a soluble phospholipase A₂ from synovial fluid in rheumatoid arthritis. **The Journal of Biochemistry**, Nagoya, v. 100, n. 5, p. 1297-1303, Oct. 1986.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2013. 918 p.

TAKEDA, S.; TAKEYA, H.; IWANAGA, S. Snake venom metalloproteinases: Structure, function and relevance to the mammalian ADAM/ADAMTS family proteins. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics**, Amsterdam, v. 1824, n. 1, p. 164–176, Jan. 2012.

TAMAKOU, J.; KUETE, V. Mutagenicity and carcinogenicity of African medicinal plants. In: **Toxicological Survey of African Medicinal Plants**. Elsevier Editors: Victor Kuete, 2014. p. 277-322.

TANUS-RANGEL, E. et al. Topical and systemic anti-inflammatory effects of *Echinodorus macrophyllus* (Kunth) Micheli (Alismataceae). **Journal of Medicinal Food**, Florida, v. 13, n. 5, p. 1161-1166, Oct. 2010.

TENORE, G. C. et al. *In vitro* hypoglycaemic and hypolipidemic potential of white tea polyphenols. **Food Chemistry**, London, v. 141, n. 3, p. 2379-2384, Dec. 2013.

TESKE, M.; TRENTINI, A. M. M. **Herbarium compêndio de fitoterapia**. 4. ed. Curitiba: Ed. Herbarium, 2001.

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

VARGAS, V. M.; GUIDOBONO, R. R.; HENRIQUES, J. A. Genotoxicity of plant extracts. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 86, n. 2, p. 67-70, 1991.

VARANDA, E. A.; GIANNINI, M. J. S. Bioquímica de venenos de serpentes. In: BARRAVIERA, B. (Org.). **Venenos. Aspectos clínicos e terapêuticos dos acidentes por animais peçonhentos**. Rio de Janeiro: EPUB, 1999. p. 205–223.

VAZ, M. S. M. et al. Evaluation of the toxicokinetics and apoptotic potential of ethanol extract from *Echinodorus macrophyllus* leaves *in vivo*. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, Maryland, v. 82, p. 32-38, Dec. 2016.

VERAS, H. N. H. et al. Topical anti-inflammatory activity of essential oil of *Lippia sidoides* Cham: possible mechanism of action. **Phytotherapy Research**, London, v. 27, n. 2, p. 179–185, Feb. 2013.

VIDAL, L. S. et al. Genotoxicity and mutagenicity of *Echinodorus macrophyllus* (chapéu-de-couro) extracts. **Genetics and Molecular Biology**, São Paulo, v. 33, n. 3, p. 549–557, July 2010.

VIEGAS JÚNIOR, C.; BOLZANI, V. S.; BARREIRO, E. J. Os produtos naturais e a química medicinal moderna. **Química Nova**, São Paulo, v. 29, n. 2, p. 326-337, mar./abr. 2006.

VIEIRA, M. C. et al. Adubação fosfatada associada à cama de frango e sua influência na produtividade e no teor de flavonoides da marcela (*Achyrocline satureioides* (Lam.) DC.) em duas épocas de colheita. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Campinas, v. 17, n. 2, p. 246-253, abr./jun. 2015.

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

ZORZI, G. K. et al. Antioxidant effect of nanoemulsions containing extract of *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC. - Asteraceae. **AAPS Pharm SciTech**, Arlington, v. 17, n. 4, p. 844–850, Aug. 2016.

ANEXO

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



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: AVALIAÇÃO DO POTENCIAL NUTRACÊUTICO DE EXTRATOS OBTIDOS DAS ESPÉCIES *Achyrocline satureioides*, *Echinodorus macrophyllus* E *Lippia sidoides*; PARÂMETROS FARMACOLÓGICOS E TOXICOLÓGICOS

Pesquisador: Silvana Marcussi

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 56628316.0.0000.5148

Instituição Proponente: Universidade Federal de Lavras

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.687.087

Apresentação do Projeto:

Apresentado e avaliado anteriormente.

Objetivo da Pesquisa:

Apresentado e avaliado anteriormente.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Apresentado e avaliado anteriormente.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Apresentado e avaliado anteriormente.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Apresentado e avaliado anteriormente.

Recomendações:

1. Os pesquisadores deverão discriminar no cronograma do formulário básico todas as etapas da pesquisa.
3. Os autores deverão reescrever os critérios de exclusão. Os critérios de exclusão são aquelas condições que retiraria o sujeito da pesquisa uma vez que este preenchesse os critérios de inclusão. Assim, os critérios de exclusão não podem ser uma negativa dos critérios de inclusão, o

Endereço: Campus Universitário Cx Postal 3037

Bairro: PRP/COEP

UF: MG

Município: LAVRAS

CEP: 37.200-000

Telefone: (35)3829-5182

E-mail: coep@nintec.ufla.br

Continuação do Parecer: 1.667.087

que levaria a uma contradição, pois se eu incluo o indivíduo por uma razão X, não será esta a mesma a excluí-lo.

4. Os pesquisadores afirmam que os participantes da pesquisa serão alunos e/ou técnicos da UFLA. Sendo assim, deverão apresentar também autorização da PRGDP. Fazer a adequação excluindo do formulário básico a participação dos técnicos.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

De acordo com a metodologia este comitê entende que são critérios de exclusão na presente pesquisa: voluntários com mal estar e/ou outro qualquer tipo de desconforto.

Considerações Finais a critério do CEP:

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

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BASICAS_DO_PROJETO_729551.pdf	19/07/2016 10:55:31		Aceito
Outros	MARIANAComentarioseticos.docx	19/07/2016 10:55:02	Silvana Marcussi	Aceito
Outros	CartarespostaCOEPMari.pdf	19/07/2016 10:53:43	Silvana Marcussi	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	ProjetoCOEPMari.docx	19/07/2016 10:53:23	Silvana Marcussi	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_UFLA_mary_2016.doc	19/07/2016 10:52:34	Silvana Marcussi	Aceito
Declaração de Pesquisadores	DeclaracaopesquisadorMariana_2016.pdf	01/06/2016 15:37:35	Silvana Marcussi	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	autorizacao_PRG_Mary_2016.pdf	01/06/2016 15:37:20	Silvana Marcussi	Aceito
Folha de Rosto	folhaderostomary.pdf	01/06/2016 15:36:01	Silvana Marcussi	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

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.ufa.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
LAVRAS



Continuação do Parecer: 1.667.067

LAVRAS, 19 de Agosto de 2016

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 1*****Achyrocline satureioides* (Lam.) DC EXTRACTS ACTING AS ENZYME MODULATORS:
DIGESTION, INFLAMMATION, AND HAEMOSTASIS**

Mariana Aparecida Braga^a, Tatiane Silva Abreu^a, Marcus Vinicius Cardoso Trento^a, Pedro Henrique Souza Cesar^a, Tamara Rezende Marques^a, Sérgio Scherrer Thomasi^b, Silvana Marcussi^{a*}

^a*Department of Chemistry, Biochemistry Laboratory, Universidade Federal de Lavras (UFLA), Campus Universitario, Lavras, Minas Gerais, 37200-000, Brazil.*

^b*Department of Chemistry, Organic Chemistry Laboratory, Universidade Federal de Lavras (UFLA), Campus Universitario, Lavras, Minas Gerais, 37200-000, Brazil.*

Artigo submetido ao Conselho Editorial do periódico “Medicinal Chemistry” e formatado conforme normas do referido periódico.

Abstract: Medicinal plants have been widely studied for the development of new drugs. The large number of therapeutic indications and the efficacy of these materials results in a basis for the scientific evaluation, aiming to validate formulations, dosages, and forms of administration that are beneficial and safe for human health. *Achyrocline satureioides* is popularly known by its richness in phenolic compounds and by its medicinal properties (anti-inflammatory, analgesic, and hepatoprotective). In the present study, aiming to broaden the knowledge about the pharmacological potential exerted by these extracts, aqueous and ethanolic extracts of *A. satureioides* were characterized by HPLC and tested for their modulatory action on phospholipases A₂ and proteases of snake venoms (involved in inflammatory processes and blood coagulation). In addition, it has also been tested on activities of digestive enzymes. Snake venoms were used as tools since they have enzymes with high functional and structural homology to human enzymes. The results demonstrate that the extracts of *A. satureioides* work as enzymatic inhibitors or potentiators, interfering in processes related to the homeostasis, such as coagulation, thrombus dissolution, and fibrinogenolysis. In addition, they highlights its anti-genotoxic potential and the inhibitions exerted on digestive enzymes directing their potential of use in the prevention and/or treatment of several pathologies. New studies could provide information on the mechanisms of interactions between the compounds present in the extracts and the different enzymes, allowing human consumption of these to be effective and safe.

Keywords: medicinal plants, enzymatic inhibitors, toxins as tools, comet assay, hemostasis.

1. INTRODUCTION

The plants are responsible for the synthesis of bioactive compounds that can often be used in the elaboration of an extensive range of drugs. Several are the mechanisms by which these compounds exert their effects, and among them, the antioxidant, the anti-inflammatory, the enzyme-inhibiting, and the protective actions on the genetic material stand out. Although the compounds present in medicinal plants have many beneficial effects on human health, in some situations they may induce toxic, genotoxic, and carcinogenic effects [1, 2].

Bioactive compounds, as they have pharmacological properties, have been investigated as enzymatic modulators, aiming at therapeutic applications in the prevention and treatment of several diseases.

Venoms are mainly composed of enzymes such as phospholipases A₂, metalloproteases, and serine proteases. They affect vital physiological functions, by altering the hemostasis, and the inflammatory and immune responses [3]. In addition, many of these enzymes have a high degree of structural and functional homology with the ones present in the human organism, thus allowing their use as tools to simulate possible interactions of natural compounds with different enzymes.

Among the plants in Brazil, *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC (family Asteraceae), known as 'marcela' or 'macela,' is widely used in folk medicine in the form of tea for the treatment of digestive and inflammatory problems. From a pharmacological point of view, the extract of *A. satureioides* presents anti-inflammatory and analgesic activities and sedative effect, being also indicated for the treatment of gastrointestinal dysfunctions due to its hepatoprotective and antispasmodic activities [4, 5]. Thus, the species *A. satureioides* can be used as an alternative to some conventional medicines.

In order to increase this knowledge, the effects of its extracts on hemostasis and enzymatic activities (phospholipases A₂, proteases and digestive enzymes) were evaluated. Thus, a toxic-pharmacological characterization of the aqueous and ethanolic extracts of leaves of *A. satureioides* was carried out in the present work.

2. MATERIALS AND METHOD

2.1. Sample collection and preparation of aqueous and ethanolic extracts

Dry leaves of *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC were purchased at a local commerce in Lavras-MG (21° 14'S, 45° 00'W and 918 m altitude), in April 2016 (lot number 1511122293). The leaves were milled in a Wiley mill and the obtained flour was used to prepare the extracts in two different solvents: water (30 minutes infusion in ratio 1:25; w:v) and 70% ethanol (at room temperature by static maceration during 15 days). The extracts were filtered and the supernatants collected. The aqueous extract was frozen and then lyophilized. The hydroalcoholic extract was subjected to removal of the solvent on a rotary evaporator (at 45 °C), then frozen and lyophilized.

2.2. Phytochemical screening

The aqueous and ethanolic extracts of *A. satureioides* (Lam.) DC leaves were submitted to phytochemical screening, using specific reagents for each chemical group and chemical reactions that resulted in coloration and/or precipitation that was characteristic for each class of substances [6]. Organic acids, alkaloids, azulenes, carotenoids, catechins, depsides and depsidones, coumarin derivatives, steroids and triterpenoids, flavonoids, cardiac glycosides, sesquiterpene lactones and other lactones, saponins, purines, and tannins were investigated.

2.3. Determination of the extracts phenolic composition by HPLC

Chromatographic analysis was performed using a Shimadzu HPLC high-performance liquid chromatograph system, equipped with two LC-20AT high-pressure pumps, a UV-visible detector model SPD-M20A, oven model CTO-20AC, an interface model CBM-20A, and an automatic injector with auto-sampler model SIL-20A. Separations were performed using a Shim-pack VP-ODS-C18 (250 mm x 4.6 mm) column connected to a Shim-pack Column Holder (10 mm x 4.6 mm) pre-column.

The lyophilized extracts, dissolved in water (1:20, w:v), and the phenolic standards were filtrated in a 0.45µm membrane (Millipore®) and injected into the chromatograph. The analyzes were carried out according to Marques et al. [7].

The phenolic compounds were identified by comparison with the retention times of the standards. The standards used were: ferulic acid, salicylic acid, syringic acid, gallic acid, caffeic acid, p-coumaric acid, vanillic acid, chlorogenic acid, epicatechin, catechin, epigallocatechin

gallate, resveratrol, and quercetin. The quantification was performed through the construction of analytical curves obtained by linear regression, considering the coefficient of determination (R^2) of 0.99.

2.4. Snake venoms

The crystallized crude venoms were commercially purchased from the serpentarium Bioagents (Batatais-SP). The venoms were weighed and dissolved in phosphate buffered saline (PBS, pH 7.4) to perform the assays.

All the venoms were previously evaluated in different doses, in all the tests, to define the minimum doses that induce the activities. Thus, different venoms were assigned to evaluate the inhibitory effect of *A. satureioides* extracts, considering the most effective ones for each assay.

2.5. Obtaining human blood

The blood used to the hemolytic, thrombolytic, and coagulation activities and the comet assay were obtained from healthy volunteers, and collected in tubes containing heparin (for hemolytic activity and comet test), citrate (for coagulant activity), or without anticoagulant (for thrombolytic activity).

All tests using human cells or blood components were carried out with the prior authorization of the Ethics Committee on Human Research (COEP) of the Federal University of Lavras (UFLA), under the registration number: CAAE:56628316.0.0000.5148.

2.6. Phospholipase and hemolytic activity

The phospholipase and hemolytic activities were evaluated in a solid medium as described by Gutiérrez et al. [8]. The gel for the evaluation of the phospholipase activity was prepared with 0.01 mol L⁻¹ CaCl₂; egg yolk lecithins 1:3 (v:v); phosphate buffer saline (PBS), pH 7.4; 1% bacteriological agar; and 0.005% sodium azide, with the medium being poured at 45-50 °C into Petri dishes. After gel solidification, treatments were applied in small holes made in the gel and the plates were maintained in cell culture chamber for 12 hours at 37 °C.

Phospholipase A₂ assays were performed using venoms of *Bothrops atrox*, *B. jararacussu*, and *B. moojeni* (30 µg). Each venom was preincubated with the aqueous or

ethanolic extracts of *A. satureioides* (Lam.) DC for 30 minutes at 37 °C in the ratios of 1:0.1, 1:0.5, 1:1, 1:2.5, 1:5, 1:10, and 1:20 (venom:extract, w:w).

For the hemolytic activity, the gel was prepared by replacing the egg yolk lecithins with a concentrate of erythrocytes obtaining a hematocrit of 1%. The blood was centrifuged at 700 x g for 5 minutes. Plasma was then removed, and the erythrocytes were suspended in 5 mmol L⁻¹ of PBS, pH 7.4 and centrifuged under the same conditions. This washing step was repeated twice, in order to obtain the erythrocytes concentrate. Inhibition of hemolytic activity was evaluated for the *B. jararacussu*, *B. moojeni*, and *Crotalus durissus terrificus* venoms (50 µg) preincubated with the extracts of *A. satureioides* (Lam.) DC for 30 minutes at 37 °C in the ratios of 1:0.05, 1:0.1; 1:0.5; 1:1, 1:2.5, and 1:5 (w:w).

For both tests, controls containing only venom or plant extract (600 µg) were evaluated. The diameter of translucent halo around the hole in the gel was measured and the results were converted in percentage (%). The controls containing only venoms, were considered as 100% of activity.

2.7. Thrombolytic activity

The thrombolytic activity was assessed on human blood clots formed *in vitro* according to the methodology described by Cintra et al. [9]. The clots were incubated for 24 hours at 37 °C with samples containing *B. moojeni* and *Lachesis muta muta* (40 µg), PBS, or venom previously incubated (30 minutes at 37 °C) with extracts of *A. satureioides* in the ratios of 1:0.5, 1:1, 1:2.5, and 1:5 (venom:extract, w:w). The activities were estimated by measuring the volume of fluid released by each thrombus. Controls containing only venoms were considered as 100% of activity and the average value obtained in the negative control (PBS) was subtracted from other treatments. Controls containing only extracts were also evaluated.

2.8. Coagulant activity

To evaluate the effects of *A. satureioides* extracts on venom-induced coagulation, the extracts were preincubated with *B. moojeni* and *L. muta muta* venoms for a period of 10 minutes at 37 °C in the ratios of 1:0.5, 1:1, 1:2.5, 1:5, and 1:10 (venom:extract, w:w). Then, the incubated samples were added to the citrated plasma (200 µL; 37 °C water bath) and timed until clot formation [10]. Controls containing only extracts were also evaluated. The minimum coagulant

dose for each venom was previously defined as the smaller amount of venom capable of inducing coagulation in a range between 50 and 180 seconds [11].

The results of the treatments different from the controls in values equal to or greater than 10 seconds were considered as significant, since this time is enough to trigger the activation of prothrombin (10 to 14 seconds, according to a coagulogram data).

2.9. Fibrinogenolytic activity

A reducing polyacrylamide gel electrophoresis was used for the evaluation of the fibrinogenolysis, previously described by Laemmli [12]. Protease inhibition assays were performed with the preincubation of the *B. moojeni* venom (50 µg) with the extracts of *A. satureioides* in the ratios of 1:0.5, 1:1, 1:2.5, and 1:5 (venom:extract; w:w), for 30 minutes at 37°C. Fibrinogen was then added to the samples and remained in the water bath, for another 90 minutes. The samples were analyzed in 12% polyacrylamide gel (w:v), allowing observation of the α , β , and γ chains of the fibrinogen. Controls containing venom and fibrinogen or only fibrinogen were also evaluated.

2.10. Comet assay

The comet assay was used to detect damage to DNA molecules of leukocytes. The treatments containing *L. muta muta* venom (50 µg in 300 µL of PBS) with the extracts of *A. satureioides* in the ratios of 1:0.5 and 1:1 (venom:extract; w:w), previously incubated for 30 minutes at 37 °C. The treatments were then added to 300 µL of blood and kept in a cell culture chamber for 4 hours at 37 °C. From the incubated, 75 µL aliquots were transferred to tubes containing 225 µL of LMP agarose (low melting point). 3 slides per treatment, 100 µL per slide, were prepared, as described by Nandhakumar et al. [13]. The slides were submitted to osmotic lysis following with electrophoresis run at 30V and 300mA for 30 minutes. After that, the nucleoids remained in neutralization solution (0.4 M Tris-HCl, pH 7.4) for 25 minutes and then were fixed with ethanol and visualized after staining with propidium iodide using a epifluorescence microscopy. Analysis of nucleotide fragmentation levels was performed according to classes described by Collins et al. [14], with some adaptations: class 0, damages \leq 5%; class 1, damages between 5 and 20%; class 2, damages between 20 and 40%; class 3, damages between 40 and 85%; and class 4, damages \geq 85%.

2.11. Kinetic tests with digestive enzymes: with or without simulated gastric fluid

2.11.1. Obtaining Enzymes

The following enzymes were used in these assays: porcine pancreatic lipase (EC 3.1.1.3) type II, Sigma; porcine pancreatic α -amylase (EC 3.2.1.1) type VI B, Sigma; and porcine pancreatic trypsin (EC 3.4.21.4), Merck. The α -glycosidase (EC 3.2.1.20) was obtained from fresh porcine duodenum according to Simão et al. [15]. The aqueous and ethanolic extracts of *A. satureioides* were prepared at the concentration of 25 g L⁻¹.

2.11.2. α -Amylase Activity

The α -amylase activity was determined according to the methodology described by Noelting and Bernfeld [16]. 50 μ L of the aqueous and ethanolic extracts of *A. satureioides* were preincubated with 50 μ L of the α -amylase enzyme for 20 minutes in a water bath at 37 °C. The substrate was 1% starch, prepared in 0.05 mol L⁻¹ Tris buffer, pH 7.0, with 38 mmol L⁻¹ NaCl and 0.1 mmol L⁻¹ CaCl₂. After that, 100 μ L of the substrate was added and the mixture was incubated for four different time periods (10, 20, 30, and 40 minutes). The reaction was interrupted with the addition of 200 μ L of 3,5-dinitrosalicylic acid and the product measured in a spectrophotometer at the wavelength of 540 nm.

2.11.3. α -Glycosidase Activity

The α -glycosidase activity was determined according to Kwon et al. [17], using 5 mmol L⁻¹ *p*-nitrophenyl- α -D-glucopyranoside in a 0.1 mol L⁻¹ citrate-phosphate buffer, pH 7.0, as substrate. In the assay, the aqueous and ethanolic extracts and the α -glycosidase enzyme were incubated in a water bath, at 37 °C, for four different time periods (10, 20, 30, and 40 minutes). Only then the substrate was added. The reaction was interrupted adding 1,000 μ L of 0.05 mol L⁻¹ NaOH and the product (*p*-nitrophenol) was measured in a spectrophotometer at the wavelength of 410 nm.

2.11.4. Lipase Activity

The lipase activity was determined according to Souza et al. [18], using 8 mmol L⁻¹ *p*-nitrophenylpalmitate in a 0.05 mmol L⁻¹ Tris-HCl buffer, pH 8.0, containing 0.5% Triton X-100, as substrate. In the assay, the extracts and the lipase enzyme was incubated in a water bath, at

37°C, for four different time periods (10, 20, 30, and 40 minutes). After the incubation, the substrate was added. The reaction was stopped transferring the tubes to an ice bath and adding 0.05 mmol L⁻¹ Tris-HCl buffer, pH 8.0. The *p*-nitrophenol (yellow-colored product of the lipase action on *p*-nitrophenylpalmitate) was measured in a spectrophotometer at the wavelength of 410 nm.

2.11.5. Trypsin Activity

The trypsin activity was determined according to the methodology described by Erlanger et al. [19]. Thus, the aqueous and ethanolic extracts and the trypsin were incubated in a water bath at 37 °C, for different time periods (10, 20, 30, and 40 minutes). Only then, the *p*-benzoyl-D-L-arginine-*p*-nitroanilide (BAPNA) substrate, prepared in 0.05 mol L⁻¹ Tris, pH 8.2, was added. The reaction was interrupted adding 200 µL of 30% acetic acid and the product was measured in a spectrophotometer at a wavelength of 410 nm.

2.11.6. Preparation of Simulated Gastric Fluid

In the presence of a simulated gastric fluid, *in vitro* enzymatic activity were also carried out in order to simulate the digestion process in the stomach. Thus, the extracts were incubated with the simulated gastric fluid prepared according to The United States and Pharmacopeia [20], for 1h in a water bath at 37 °C. Subsequently, it was neutralized (pH 7.2) with sodium bicarbonate salt and only then the activity assays were performed.

2.11.7. Data Analysis

To obtain 40 to 80% of enzyme inhibition on each enzymatic activity assay, the concentrations and dilutions of the aqueous and ethanolic extracts were different.

The enzymes inhibition were obtained from the determination of the slopes of the straight lines (absorbance x time) corresponding to values obtained for the control enzyme (without extracts) and enzymes + inhibitor (with aqueous or ethanolic extracts) in the activity assays. The slope of the straight line corresponds to the speed of product formation per minute of reaction, and the presence of the inhibitor causes a decrease of this inclination. The absorbance values were converted into micromoles of product based on data obtained from a standard curve elaborated with glucose for the amylase and with *p*-nitrophenol for glycosidase and lipase. For

trypsin, the molar extinction coefficient of BAPNA was determined according to Erlanger et al. [19].

2.12. Statistical analysis

The results were presented as the mean of the triplicates \pm standard deviation obtained in three independent assays. The significance of the difference between the means was determined by the analysis of variance, followed by Tukey's test when the treatments were compared with the control, with the help of the statistical software [21]. The results were considered statistically significant when $p < 0.05$.

3. RESULTS AND DISCUSSIONS

The phytochemical analysis of the species *Achyrocline satureioides* carried out in other works showed that this plant is rich in flavonoids [22, 23] and saponins [24]. The results of the phytochemical screening showed the presence of different groups of metabolites, in the ethanolic extract of *A. satureioides*, which have pharmacological interest, in which catechins, flavonoids, coumarins, alkaloids, and saponins are among them. On the other hand, only flavonoids, depsides, and depsidones were detected in the aqueous extract (Table 1).

The contents of phenolic compounds in the aqueous and ethanolic extracts of *A. satureioides*, obtained by HPLC analysis, are also shown in Table 1. The aqueous extract presented higher phenolic contents than those obtained for the ethanolic extract but had a different chemical composition, represented by the absence of chlorogenic acid, catechins, derivatives of coumarins, saponins, and alkaloids (Table 1).

Table 1. Screening phytochemical and phenolic compounds content in aqueous and ethanolic extracts of *Achyrocline satureioides*.

Classes of secondary metabolites detected in <i>Achyrocline satureioides</i> extracts by phytochemical screening		
Chemical constituents	Aqueous extract	Ethanolic extract
Organic acids	(-)	(-)
Polysaccharides	(-)	(-)
Tannins	(-)	(-)
Catechins	(-)	(+)
Flavonoids	(+)	(+)
Cardiac glycosides	(-)	(-)
Azulenes	(-)	(-)
Carotenoids	(-)	(-)
Sesquiterpene lactones and other lactones	(-)	(-)
Steroids and triterpenes	(-)	(-)
Depsidies and depsidones	(+)	(-)
Coumarin derivatives	(-)	(+)
Saponins	(-)	(+)
Alkaloids	(-)	(+)
Purine	(-)	(-)
Phenolic compounds identified in <i>Achyrocline satureioides</i> extracts by HPLC		
Phenolic Compounds (mg 100g⁻¹)	Aqueous extract	Ethanolic extract
Gallic Acid	14.05 ± 0.11	0.98 ± 0.03
Catechin	75.98 ± 0.90	53.90 ± 0.27
Epigallocatechin Gallate	577.06 ± 14.89	162.44 ± 3.59
Chlorogenic Acid	n.i	76.48 ± 1.46
Caffeic Acid	53.14 ± 2.05	121.41 ± 1.99
Syringic Acid	5.54 ± 0.11	4.75 ± 0.71
p-Coumaric Acid	34.92 ± 1.41	0.95 ± 0.01
Salicylic Acid	1,370.40 ± 12.02	139.82 ± 1.69
Quercetin	0.08 ± 0.00	0.26 ± 0.00
∑ Phenolic Compounds	2,131.17	560.99

The results correspond to the means of triplicates and the calculated standard deviations. n.i = not identified.

The aqueous extract had a greater content of salicylic acid, followed by epigallocatechin gallate and catechin. On the other hand, the ethanolic extract had a higher content of epigallocatechin gallate, followed by salicylic acid and caffeic acid (Table 1). Salgueiro et al. [23] identified the phenolic compounds isoquercitrin, quercetin, and caffeic acid as major

phenolic compounds present in the aqueous extract of *A. satureioides* collected in the Brazilian Pampa biome, on the Brazilian-Uruguay-Argentina border.

Phenolic compounds, due to their antioxidant properties, have played an essential role in protecting against diseases such as cancer, diabetes, degenerative diseases, as well as reducing the risk of gastrointestinal and cardiovascular diseases [25, 26]. These compounds have also been investigated as powerful enzyme inhibitors on the toxic and/or pharmacological effects induced by snake venoms [27, 28].

Among the phenolic compounds, flavonoids have high medical-scientific interest because of their anti-inflammatory, and hypocholesterolemic properties. Thus, they have the ability to inhibit specific enzymes, stimulate certain hormones and neurotransmitters, and attack free radicals [29].

The flavonoid epigallocatechin gallate is able to inhibit enzymatic activities and signal transduction pathways that have important roles in inflammation and destruction of joints in arthritis [30]. Quercetin and catechin have anti-inflammatory and antithrombogenic properties. The interaction with different enzymatic systems and the elimination of free radicals, in addition to the inhibition of the arachidonic acid metabolism, are the main anti-inflammatory effects of flavonoids [31]. Regarding the antithrombogenic effects, the flavonoids act inserting themselves in the active site of the thrombin and blocking its activity [32].

3.1. Phospholipase and hemolytic activity

The phospholipase activity (%) induced by *B. atrox* (A), *B. jararacussu* (B), and *B. moojeni* (C) snake venoms previously incubated with aqueous and ethanolic extracts of *Achyrocline satureioides*, is shown in Figure 1. The aqueous extract, in the lowest ratios (1:0.1, 1:0.5, and 1:1, w:w), increased the phospholipase activity (between 8 and 25%) induced by the *B. atrox* venom. However, in the highest ratios (1:10 and 1:20), it exerted an inhibition of 13% of activity induced by this venom. The ethanolic extract increased the effect of the same venom in 6.5%, 25%, and 12.5% when evaluated in the ratios of 1:0.5, 1:1, and 1:2.5 (w:w), respectively (Figure 1A).

For the phospholipase activity induced by the *B. jararacussu* venom, the aqueous extract of *A. satureioides* presented significant inhibition (7%) only in the ratio of 1:0.5 (w:w). However, the ethanolic extract increased the activity of this venom by 7% in the ratio of 1:20 (Figure 1B).

Significant inhibitions (6% and 12%) were observed to the *B. moojeni* venom after incubation with the aqueous extract in the ratios of 1:10 and 1:20 (w:w), respectively. However, the ethanolic extract increased the activity of this venom by 6% in all ratios evaluated (Figure 1C).

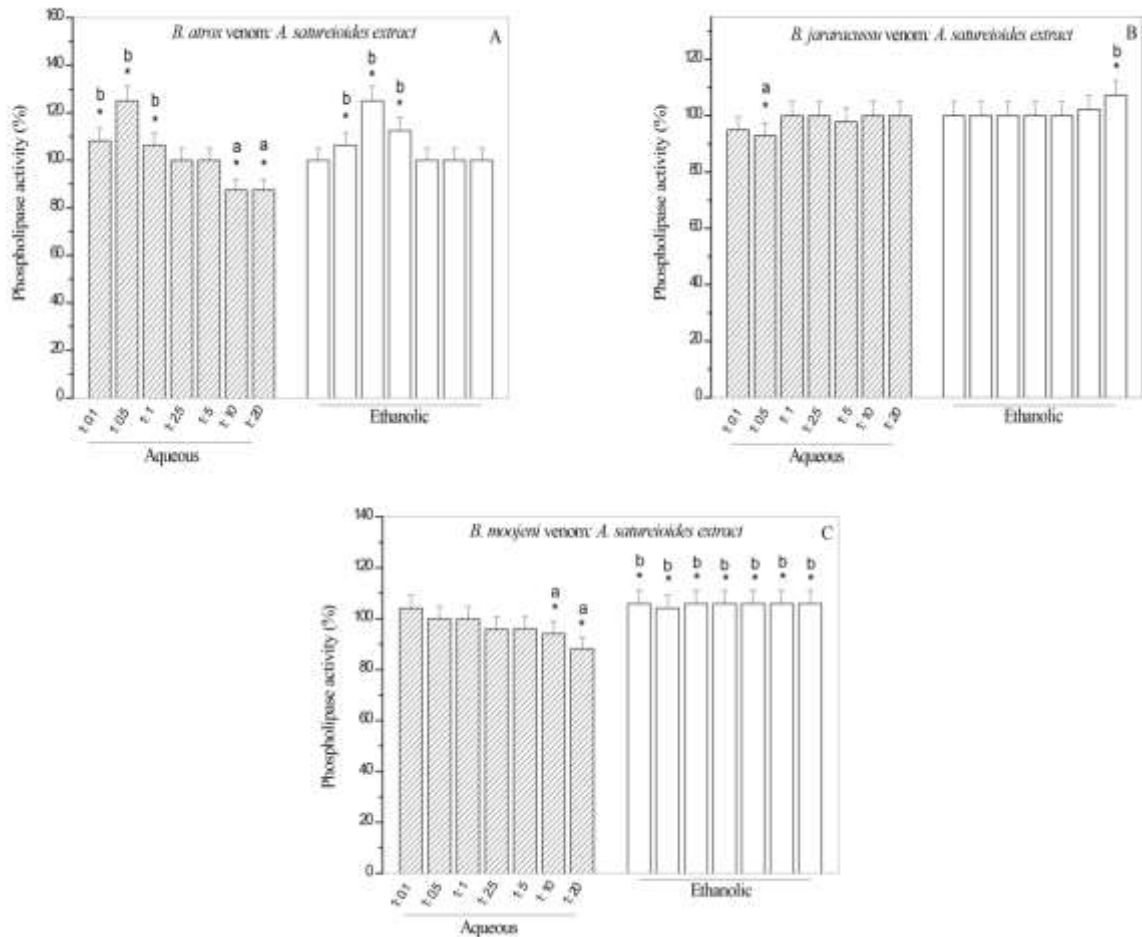


Figure 1. Phospholipase activity (%) induced by *Bothrops atrox* (A), *Bothrops jararacussu* (B), and *Bothrops moojeni* (C) snake venoms, previously incubated with the aqueous and ethanolic extracts of *Achyrocline satureioides*. Controls (+) containing only the venoms (30 μ g) were considered as 100% activity. The results correspond to the means of the triplicates obtained to each ratio (venom:extract, w:w) and their standard deviations. * statistically different from its respective positive control by the Tukey test ($p < 0.05$). a. Inhibitory effect on the venom activity. b. Potentiating effect on the venom activity.

Phospholipases A₂ are considered as important regulators of the arachidonic acid pathway through which pro-inflammatory mediators such as prostaglandins, leukotrienes, and thromboxanes are released. They are responsible for triggering inflammatory processes and

changes in hemostasis [33]. These enzymes are also involved in several diseases such as cancer [34], atherosclerosis [35], and neurodegenerative diseases [36].

Several plant extracts have already been described to have inhibitory activity on phospholipases, such as *Jatropha gossypifolia* [37], *Bellucia dichotoma* Cogn. [38], and *Psidium guajava* [39]. Groups of isolated metabolites have also been studied and showed powerful inhibitions of phospholipases. For example, tannins [40], alkaloids [41], and flavonoids [42] are among them. According to Moura et al. [40], tannins can form complexes with calcium, which is a cofactor of phospholipases A₂ and various enzymes involved in the coagulation cascade. On the other hand, flavonoids have the ability to bind to the amide groups of different proteins by strong hydrogen bonds [43].

In this context, the inhibition of phospholipases A₂ by natural compounds is of great scientific importance, as it makes it possible to prospect mechanisms of action of plant molecules present in therapeutic formulations used for the treatment of various diseases.

The cytotoxicity test on human erythrocytes was performed with the extracts and, under the conditions evaluated, no induction of hemolysis was detected. Subsequently, changes in the hemolytic activity induced by snake venoms were observed (Figure 2).

The aqueous extract of *A. satureioides* increased the hemolysis induced by the venom of *B. jararacussu* by 67% when evaluated in a ratio of 1:0.5 (w:w) and by 75% in the ratios of 1:1 and 1:2.5 (w:w). However, this activity was partially inhibited (18%) when evaluated in the ratio of 1:5 (w:w). Although significant changes in the activity of the venom in the presence of the aqueous extract were observed, the ethanolic extract had a greater modulatory potential on the hemolytic action induced by this venom, inhibiting 100% of its activity in all ratios analyzed (Figure 2A).

Previous incubation of the *A. satureioides* aqueous extract with the *B. moojeni* venom resulted in inhibition of approximately 100% in all the ratios between 1:0.05 and 1:2.5 (w:w) and 50% in a ratio of 1:5 (w:w). However, its ethanolic extract exerted significant inhibitions of 25%, 27%, 29%, and 31% in the ratios of 1:0.05, 1:0.1, 1:0.5, 1:1 (w:w), respectively, and 100% in proportions of 1:2.5 and 1:5 (w:w) (Figure 2B).

For the venom of *C. durissus terrificus*, the aqueous extract of *A. satureioides* enhanced the venom-induced hemolytic activity at the lowest ratios (1:0.05 and 1:0.1; w:w) by 88%, but

exerted 100% inhibition in the ratios of 1:1, 1:2.5, and 1: 5 (w:w). The ethanolic extract, on the other hand, induced inhibitions close to 100% in all proportions evaluated (Figure 2C).

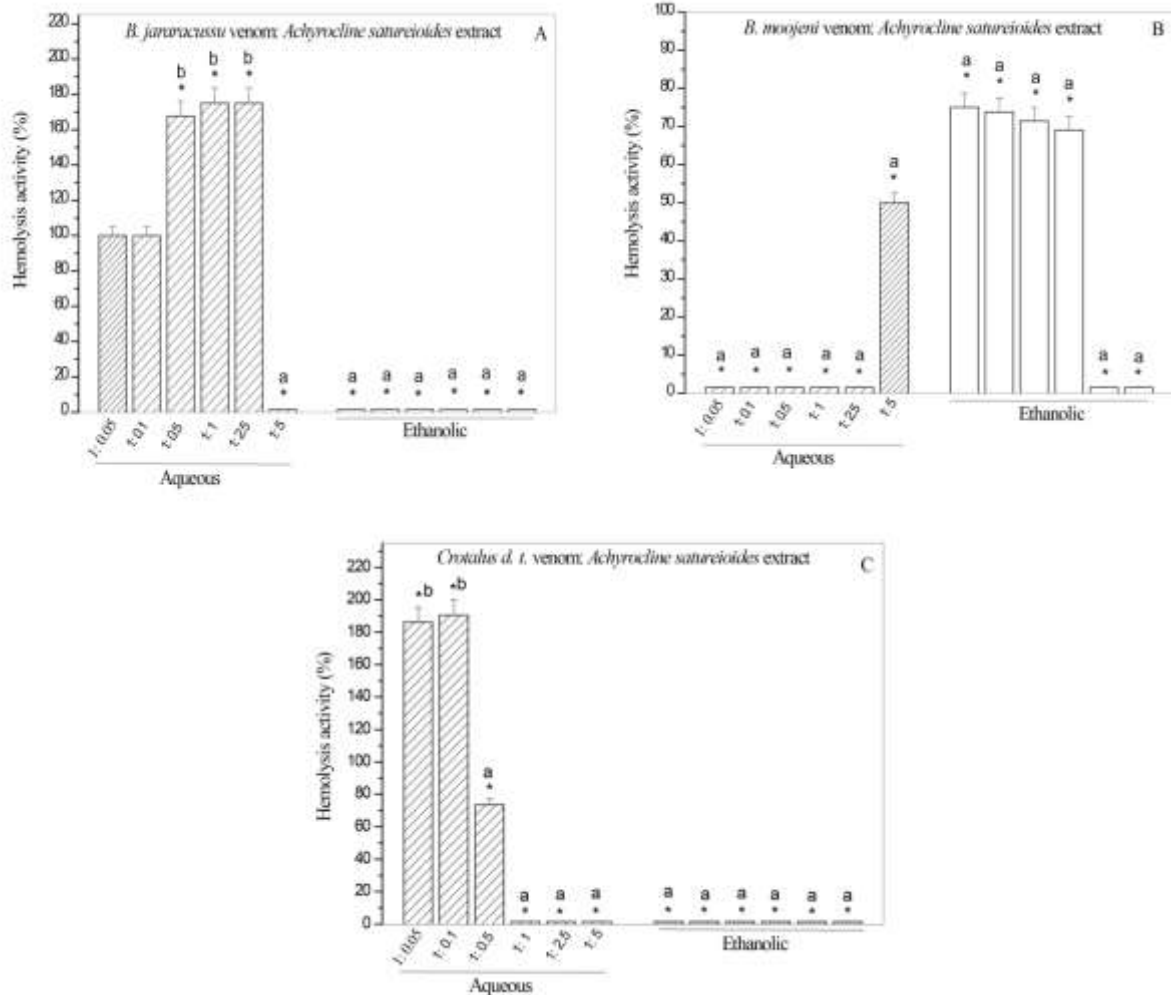


Figure 2. Hemolytic activity (%) induced by *Bothrops jararacussu* (A), *Bothrops moojeni* (B), and *Crotalus durissus terrificus* (C) snake venoms, previously incubated with the aqueous and ethanolic extracts of *Achyrocline satureioides*. Controls (+) containing only the venoms (50 μ g) were considered as 100% activity. The results correspond to the means of the triplicates obtained to each ratio (venom:extract, w:w) and their standard deviations. * statistically different from its respective positive control by the Tukey test ($p < 0.05$). a. Inhibitory effect on the venom activity. b. Potentiating effect on the venom activity.

The enzymes involved in the hemolytic activity are the phospholipases A₂ (responsible for the breakdown of phospholipids that make up the cell membranes) and serine proteases and metalloproteases, that degrade membrane proteins. The action of these enzymes destabilizes the membrane structure and modify the flow of ions and the intracellular metabolism, causing the

rupture of the erythrocytes [33]. Therefore, the inhibition of hemolytic activity is also a proof of the action potential of the extracts evaluated on the inflammatory response and the blood coagulation cascade.

The inhibition of the hemolysis by *A. satureioides* extracts can be exerted by different compounds present in this plant, which can act in synergism and through different mechanisms. Considering the mechanisms described in literature, we can suggest: the chelation of divalent ions; the formation of complexes with ions such as Zn^{2+} and Ca^{2+} that act as cofactors for several enzyme classes; the direct binding of the compounds to the catalytic site or to other regions of the enzymes impeding the binding to the cofactor or altering other biological activities exercised by them [44].

3.2. Thrombolytic activity

The thrombolytic activity induced by snake venoms of the species *B. moojeni* and *Lachesis muta muta*, previously incubated with the aqueous and ethanolic extracts of *A. satureioides*, is shown in Figure 3. The *A. satureioides* aqueous extract promotes inhibitions of 37% and 47%, at the ratios of 1:2.5 and 1:5 (w:w), respectively on the activity induced by *B. moojeni* venom. However, the ethanolic extract induced an increased the thrombolytic activity by 46% and 65% for the ratios of 1:2.5 and 1:5 (w:w), respectively (Figure 3A).

The aqueous extract of *A. satureioides* significantly inhibited thrombi lysis induced by the *L. muta muta* venom in 41% and 54% at the ratios of 1:2.5 and 1:5 (w:w), respectively. The highest concentrations were responsible for the most significant inhibitions, possibly due to the concomitant increase in the concentration of the phenolic compounds present in the extract. On the other hand, the ethanolic extract significantly enhanced the thrombolytic activity induced by the same venom in the lowest evaluated ratios, thus demonstrating modulating action on proteases present in this venom (Figure 3B).

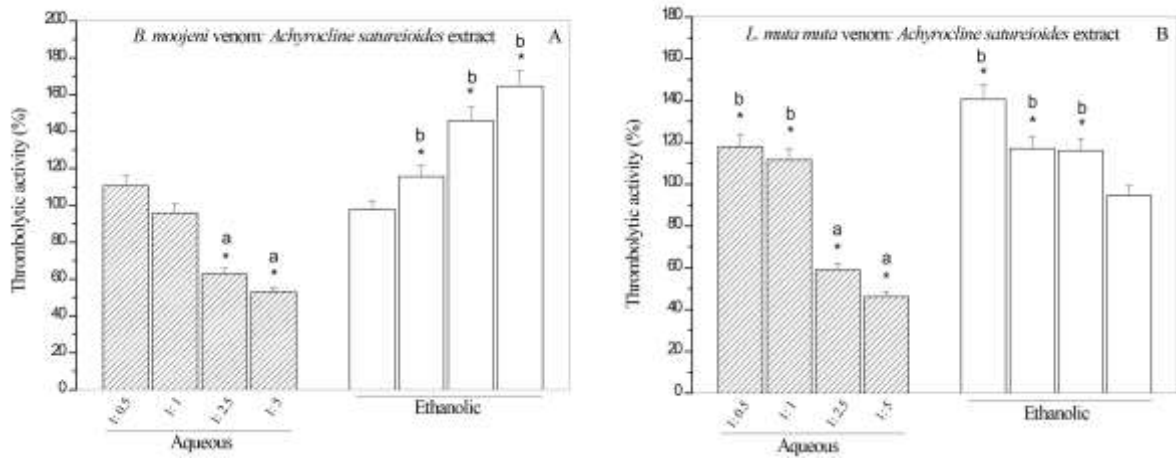


Figure 3. Thrombolytic activity (%) induced by *Bothrops moojeni* (A) and *Lachesis muta muta* (B) snake venoms, previously incubated with the aqueous and ethanolic extracts of *Achyrocline satureioides*. Controls (+) containing only the venoms (40 µg) were considered as 100% activity. The results correspond to the means of the triplicates obtained to each ratio (venom:extract, w:w) and their standard deviations. * statistically different from its respective positive control by the Tukey test ($p < 0.05$). a. Inhibitory effect on the venom activity. b. Potentiating effect on the venom activity.

Thrombosis occurs when a blood clot is formed inside the blood vessels from abnormal hemostatic conditions, due to the uncontrolled action of thrombin on fibrinogen or excess production of thrombin [45]. These disorders, related to the imbalance between fibrin formation and fibrinolysis, are the main responsible for the high rate of morbidity and mortality. Thus, it is necessary to evaluate natural compounds that act inhibiting the enzymes, such as thrombin, as well as phospholipases A₂, whose enzymatic activity can generate lyso-PAF (platelet aggregating factor) by lipoxygenase pathway. Since some proteases present in snake venom can break coagulation factors or exert thrombin-simile function, they present high homology with human enzymes [46, 47]. Therefore, their inhibition by natural compounds can simulate the anticoagulant and antithrombotic effects on animals.

Elumalai et al. [48] described the induction of thrombolytic activity by the methanolic extract of *Bougainvillea glabra*. According to these researchers, the metabolite groups present in the extracts (tannins, flavonoids, saponins, glycosides, and terpenes) could be related to the dissolution of the thrombi through a synergism between the compounds. The flavonoids present in the methanolic extract of *Laguncularia racemosa* L. were also evaluated by Rodrigues et al. [49] as inhibitors of thrombin, acting as natural anticoagulants or thrombolytics.

3.3. Coagulant activity

The induced coagulation of citrated plasma was performed using pre-determined minimum coagulant doses (MCD) of 5 µg and 10 µg of *Bothrops moojeni* and *Lachesis muta muta* venoms, respectively.

The aqueous extract of *A. satureioides*, promoted an increase in coagulation time, induced by *B. moojeni* venom, in all ratios analyzed; 1:0.5 (23 sec), 1:1 (54 sec.), 1:2.5 (53 sec.), 1:5 (61 sec.), and 1:10 (100 sec.). The ethanolic extract also presented anticoagulant activity on the same venom, with increases in coagulation time of 14, 28, 46, and 52 seconds in the ratios of 1:1, 1:2.5, 1:5, and 1:10 (w:w), respectively.

For the *L. muta muta* venom, the aqueous extract induced an increase in coagulation time (32 to 101 seconds higher than the control), characterizing anticoagulant activity in the ratios of 1:1; 1:2.5; 1:5, and 1:10 (w:w). The ethanolic extract, however, presented lower anticoagulant action than the aqueous extract and few variations between the analyzed ratios, observing times of 12 to 27 seconds higher than the control (Table 2).

Table 2. Effect of the aqueous and ethanolic extracts of *Achyrocline satureioides* on the coagulant activity induced by *Bothrops moojeni* and *Lachesis muta muta* venoms on human citrated plasma.

<i>Achyrocline satureioides</i> extract	Proportion venom: extract (w:w)	Clotting time (s)	
		<i>Bothrops moojeni</i>	<i>Lachesis muta muta</i>
Aqueous	1:0.5	93.33 ± 2.08 ^a	103.00 ± 5.57
	1:1	124.00 ± 5.29 ^a	128.00 ± 4.36 ^a
	1:2.5	123.00 ± 4.36 ^a	147.67 ± 7.37 ^a
	1:5	131.33 ± 5.13 ^a	173.33 ± 6.11 ^a
	1:10	170.00 ± 5.20 ^a	197.00 ± 7.37 ^a
Ethanolic	1:0.5	73.33 ± 5.77	108.67 ± 7.09 ^a
	1:1	84.00 ± 5.29 ^a	119.33 ± 8.62 ^a
	1:2.5	98.00 ± 3.00 ^a	133.00 ± 2.08 ^a
	1:5	116.00 ± 4.58 ^a	124.67 ± 4.04 ^a
	1:10	122.33 ± 5.86 ^a	123.33 ± 3.06 ^a
	1:0 (Control)	70.00 ± 3.21*	96.00 ± 7.37**

*The control was carried out with 5µg of the evaluated venom. **The control was carried out with 10µg of the evaluated venom. The results are presented as the average of triplicates ± standard deviation.

^adiffers from their respective positive controls in values equal to or greater than 10 seconds.

Blood coagulation depends, among other steps, on the conversion of fibrinogen to fibrin molecules by the action of thrombin [50] - a serine protease with an essential role in hemostasis. Several cardiovascular diseases, such as stroke, atherosclerosis, and thrombosis, are associated with disorders in the mechanisms controlling the generation and activity of thrombin [51, 52].

Mack-Wen et al. [53] demonstrated the anticoagulant action of *Brownea ariza* ethanolic extract on the activity induced by *Bothrops asper* venom, indicating its possible inhibitory action on venom metalloproteinases that are capable of activating some factors of the coagulation cascade and convert fibrinogen into fibrin. Similar results were found for the extract of *Brownea rosademonte* [54].

In the present study, in addition to the inhibitory action exerted by extracts of *A. satureioides* on coagulant enzymes, we must also consider the effect of flavonoids present in the extracts. They are associated with an increase in coagulation time (Table 2) and dissolution of thrombi (Figure 3). According to Silva et al. [55] flavonoids act on the production of nitric oxide in blood platelets, inhibiting platelet aggregation and delaying the formation of clots.

In this context, extracts of *A. satureioides* present therapeutic potential as anticoagulant agents with possible application in the treatment of cardiovascular diseases. However, further studies are necessary, allowing the evaluation of their effective and safe doses and formulations of use.

3.4. Fibrinogenolytic activity

The aqueous extract of *A. satureioides* did not present, under the conditions evaluated, an inhibitory effect on the breakage of fibrinogen induced by the *B. moojeni* venom. However, the ethanolic extract in the ratios of 1:2.5 and 1:5 (w:w) exerted 100% of inhibition on the fibrinogenolysis. Thus, it was observed the α , β , and γ chains [56] of the fibrinogen molecules intact, as seen in the negative control (image not shown).

Fibrinogen has been widely used for the evaluation of the proteolytic potential of venom toxins, besides making it possible to predict the action of proteases and their inhibitors on the blood coagulation cascade [57, 58].

Fibrinogenases present in *Bothrops* snakes venoms, exert a proteolytic action on the α chain of fibrinogen molecules, being less effective in degrading the β and without any effect on the γ chains [57].

Patiño et al. [59] reported the inhibitory action of *Renalmia alpinia* extract on the fibrinolytic activity induced by a toxin isolated from the *B. atrox* venom. According to the researchers, the flavonoids present in the extract and the metalloproteases interact through hydrogen bonds between hydroxyls. The aqueous extract of *Jatropha gossypifolia* L. also exercised 100% protection over the chains of fibrinogen against the proteolysis induced by *B. jararaca* venom [60].

One of the proposed mechanisms of action for plant molecules involves the formation of complexes with zinc ions present in binding sites in the structures of metalloproteases, resulting in inhibition of these enzymes [61]. Thus, the changes observed in this work, mainly in the thrombolytic, coagulant, and fibrinolytic activities, whose proteases play a fundamental role, can be partially attributed to the formation of ionic complexes with plant compounds.

3.5. Comet assay

The result of the fragmentation of DNA molecules by the comet assay is shown in Table 3.

The aqueous extract of *A. saturoioides*, when incubated with the *L. muta muta* venom in the ratios of 1:0.5 and 1:1 (w:w), presented values of arbitrary units (A.U.) of 71.9 and 65.6, respectively. These are approximately 3 times lower than the value obtained (232.7) for the positive control (*L. muta muta* venom). A similar result was observed in the ethanolic extract, which presented A.U. of 53.6 and 52.6 in the ratios of 1:0.5 and 1:1 (w:w), respectively (Table 3). Both extracts inhibited the genotoxic effect induced by the *Lachesis muta muta* venom, resulting in values of arbitrary units statistically equal to the value of the negative control. The scores evaluated in the different treatments are showed in Figure 4.

In the negative control, the absence of nucleoids with high damage levels (class 3) and totally damaged DNA (class 4) was observed, as well as in the treatments containing *L. muta muta* venom previously incubated with the aqueous and ethanolic extracts of *A. saturoioides* in the ratios of 1:0.5 and 1:1 (w:w) (Table 3). Controls using only the extracts ($250 \mu\text{g mL}^{-1}$ and $50 \mu\text{g mL}^{-1}$) were also performed and these at the highest concentration induced DNA fragmentation levels approximately 30% lower than those observed for the *L. muta muta* venom (data not shown).

Table 3. Effect of the aqueous and ethanolic extracts of *Achyrocline satureioides* on the genotoxic activity induced by the *Lachesis muta muta* venom evaluated by the comet assay. The average percentage of nucleoids was classified according to levels of fragmentation of DNA molecules, frequency of nucleoids with damage, and arbitrary units.

Treatments	Nucleoids (%)					Damage frequency (%)	Arbitrary Units (A.U)
	Comet classes (Damage %)						
	0 (≤ 5)	1 (5–20)	2 (20–40)	3 (40–85)	4 (≥ 85)		
C (-)	49.9±5.4a	48.0±7.1a	2.1±0.8b	0.0±0.0c	0.0±0.0b	50.1±5.4c	52.2±3.7c
C (+)*	2.1 ±0.8c	12.8±6.2c	44.3±5.4a	31.9±7.3a	8.9±4.7a	97.9±1.3a	232.7±23.2a
C (+)**	10.1±4.4c	31.0±0.7b	39.6±6.1a	12.6±2.9b	6.7±0.7a	89.9 ±4.3a	174.8±7.5b
Venom: <i>Achyrocline satureioides</i> extract (w:w)	37.6±0.9b	52.9±3.9a	9.5±3.7b	0.0±0.0c	0.0±0.0b	62.4±0.2b	71.9±3.5c
Aqueous (1:0.5)							
Aqueous (1:1)	44.1±1.8a b	46.2±2.8a	9.7±1.0b	0.0±0.0c	0.0±0.0b	55.9±1.8bc	65.6±0.8c
Ethanolic (1:0.5)	50.6±2.0a	45.2±0.8a	4.2±1.2b	0.0±0.0c	0.0±0.0b	49.4±2.0c	53.6±3.2c
Ethanolic (1:1)	51.4±1.7a	44.6±0.3a	4.0±1.3b	0.0±0.0c	0.0±0.0b	48.6±1.7c	52.6±3.0c

C (-): blood only. C (+)*: *Lachesis muta muta* ($50 \mu\text{g mL}^{-1}$). C (+)**: Doxorubicin ($100 \mu\text{g mL}^{-1}$), genotoxic antitumor drug. The values represent the average of 3 tests performed with blood from different volunteers, with 300 nucleoids per treatment/volunteer/test, counting a total of 900 nucleoids/treatment. Values followed by the same letter in the columns do not differ from each other by the Tukey test ($p < 0.05$).

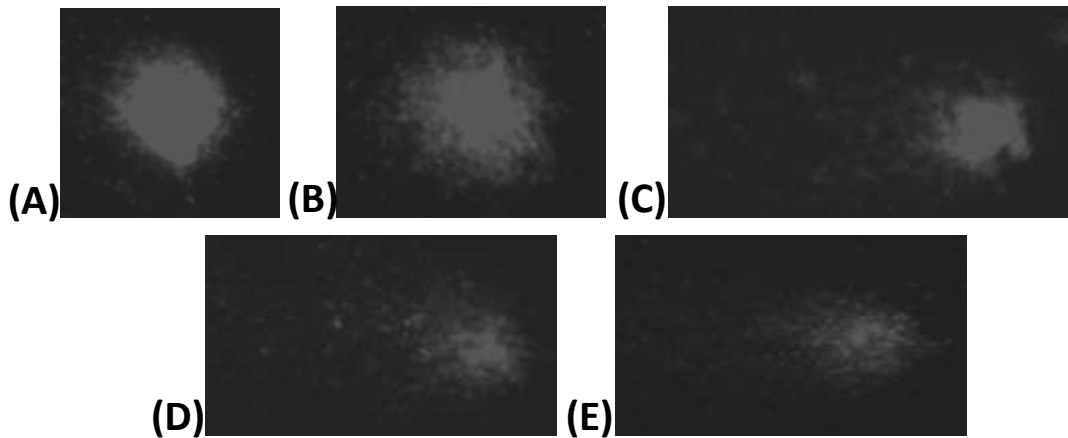


Figure 4. Examples of nucleoids evaluated. Classification of comet in different treatments performed. (A) Class 0 (damage $\leq 5\%$), example obtained in negative control. (B) Class 1 (5-20% of damage), example obtained in the treatment containing *Lachesis muta muta* venom plus the aqueous extract from *Achyrocline satureioides* at the ratio of 1:0.5 (w:w). (C) Class 2 (20-40% of damage), example obtained in the positive control containing *Lachesis muta muta* venom ($50 \mu\text{g mL}^{-1}$). (D) Class 3 (40-85% of damage), example obtained in positive control containing Doxorubicin ($100 \mu\text{g mL}^{-1}$). (E) Class 4 (damage $\geq 85\%$), example obtained in positive control containing *Lachesis muta muta* venom ($50 \mu\text{g mL}^{-1}$).

The comet assay has been widely used as a complement to the toxicological characterization of natural compounds in order to investigate the genotoxic and/or antigenotoxic effects. Simão et al. [62] found that the aqueous extract of leaves of *Pereskia grandifolia* at different doses, higher than the one recommended for consumption, did not induce genotoxic effects. Salgueiro et al. [23] investigated the aqueous extract of *Achyrocline satureioides* on human leukocytes and described in their results the predominance of low DNA damage levels at doses of 30, 60, 150, and 300 μg .

Extracts of *Mikania glomerata*, *Maytenus ilicifolia*, and *Lippia alba* showed cytotoxic and genotoxic activity, under the conditions evaluated, induced by metabolites such as coumarins, tannins, and terpenes [63].

Cesar et al. [39] demonstrated to the aqueous extracts of different cultivars from *Psidium guajava* the absence of DNA fragmentation in human leukocytes, even when evaluated at high concentration ($300 \mu\text{L mL}^{-1}$). In addition, the nucleoids treated with these extracts showed a 75% reduction in the frequency of DNA damage (induced by doxorubicin), proving the antigenotoxic potential of these. Thus, the toxicological characterization of the secondary metabolites present in

plant extracts is necessary as these can induce adverse and/or therapeutic effects, depending on factors such as dose and chronic use.

3.6. Inhibition of digestive enzymes

The results of the enzymatic inhibition exerted by the aqueous and ethanolic extracts of *A. satureioides* before and after exposure to simulated gastric fluid are presented in Table 4.

Table 4. Inhibition of digestive enzymes exerted by the aqueous and ethanolic extracts of *A. satureioides* before and after exposure to simulated gastric fluid.

<i>Achyrocline satureioides</i>								
Enzyme	Aqueous extract				Ethanolic extract			
	Inhibition before exposure		Inhibition after exposure		Inhibition before exposure		Inhibition after exposure	
	(IEU) ^a	(%)	(IEU) ^a	(%)	(IEU) ^a	(%)	(IEU) ^a	(%)
α -amylase	ns	19.35	nd	nd	75.42 \pm 4.31	43.23	62.54 \pm 3.13	34.53
α -glycosidase	3.20 \pm 0.28	57.51	1.91 \pm 0.21	40.49	1.28 \pm 0.11	41.50	0.48 \pm 0.04	17.31
Lipase	10.42 \pm 0.23	49.03	6.32 \pm 0.34	29.93	ns	32.62	nd	nd
Trypsin	3.86 \pm 0.12	67.04	3.77 \pm 0.26	48.72	2.05 \pm 0.13	55.76	1.05 \pm 0.06	27.16

Data from five repetitions, with mean \pm standard deviation.

^aThe *Achyrocline satureioides* extract measured for each of the enzymes was diluted to provide an inhibition between 40% and 80%, in order to ensure result reliability.

IEU = Inhibited Enzyme Unit in $\mu\text{mol min}^{-1}\text{g}^{-1}$ sample (extract)

nd = inhibition not determined

ns = inhibition not significant

The aqueous extract of *A. satureioides* did not inhibit the α -amylase activity, as previously described for other plant species such as *Melissa officinalis* L., *Passiflora incarnata* L., *Valeriana officinalis* L., and *Matricaria chamomilla* L. [64]. The ethanolic extract presented inhibition of 75.42 $\mu\text{mol min}^{-1}\text{g}^{-1}$, corresponding to a percentage of 43.23%, but after exposure to gastric fluid, there was a 17.1% decrease in inhibition. Marques et al. [7], when studying the methanolic extract of the *Malpighia emarginata* bagasse flour, detected inhibition of 238.96 $\mu\text{mol min}^{-1}\text{g}^{-1}$. Simão et al. [65] verified that the extracts of the cultivars Paluma, Pedro Sato, and Seculo XXI from *Psidium guajava* showed inhibition of 13,776.93; 13,130.47, and 14,410.60 $\mu\text{mol min}^{-1}\text{g}^{-1}$, respectively, which are results higher than the one found in this study. This may

be due to differences in the types and amounts of the compounds found in each evaluated extract. The inhibition of α -amylase, an enzyme involved in carbohydrate digestion, might be an additional therapy to the early treatment of type 2 diabetes since it decreases postprandial hyperglycemia and suppresses the production and/or uptake of glucose from the gastrointestinal tract [66].

The aqueous and ethanolic extracts of *A. saturoioides* showed inhibition of the α -glycosidase activity of 3.20 and 1.28 $\mu\text{mol min}^{-1}\text{g}^{-1}$, respectively, corresponding to 57.51% and 41.50%. The inhibitory potential of these extracts was superior to the one found by Simão et al. [15], who reported for the aqueous extracts of *Aloe vera* (L.) Burm and *Baccharis trimera* (Less.) DC inhibitions of 1.23 and 0.58 $\mu\text{mol min}^{-1}\text{g}^{-1}$, respectively. The use of medicinal plants as inhibitors of enzymes involved in glucose metabolism has become a promising alternative to the treatment of obesity associated with the incidence of type 2 diabetes since these inhibitors induce carbohydrate tolerance, satiety, weight loss, delay of emptying, as well as reducing the release of glucose into the blood [67].

Inhibition of lipases, which results in a delay in the hydrolysis process of triglycerides, was detected only for the aqueous extract of *A. saturoioides* whose inhibition was 10.42 $\mu\text{mol min}^{-1}\text{g}^{-1}$ (49.03%). This inhibition may be associated with the content of phenolic compounds present in the aqueous extract, that presented 3.8 times higher than the content of ethanolic extract (Table 1). According to Lunagariya et al. [68], some amino acids present at the lipase catalytic site may interact with the phenolic compounds, forming stable complexes and reducing the structural flexibility of the enzyme [18]. This makes it insoluble in the reactional environment and, therefore, inactive [69].

The aqueous extract of *A. saturoioides* induced inhibition of 3.86 $\mu\text{mol min}^{-1}\text{g}^{-1}$ in trypsin activity prior to the exposure to simulated gastric fluid, exhibiting 67.04% inhibition. However, after exposure to simulated gastric fluid, inhibition was 48.72%. The ethanol extract had inhibition of 2.05 $\mu\text{mol min}^{-1}\text{g}^{-1}$, whose inhibition percentage was 55.76%. After the exposure to simulated gastric fluid, it reduced to 27.16%.

Proteases play an important role in cell metabolism by catalyzing various processes, such as food digestion, tissue remodeling, and host defense against potential pathogens [70]. Trypsin inhibitors have already been considered as antinutritional compounds because of their inhibitory activity on humans and animals enzymes. Also, they can cause gastric problems and lead to

pancreatic hypertrophy or hyperplasia [71, 72]. Hence, an advantage is attributed to the decrease in trypsin inhibition after exposure to gastric fluid because protein digestibility is little affected.

The presence of different levels of phenolic compounds in the aqueous and ethanolic extracts of *A. satureioides* (Table 1) is probably responsible for the different inhibitory profiles observed in the digestive enzyme assays. The aqueous extract had a higher content of catechin and epigallocatechin gallate, exerting greater inhibition on α -glycosidase and lipase activity. Similarly, Koh et al. [73] observed that the inhibitory profile of different teas on α -amylase and α -glycosidase enzymes were correlated with high catechin content. In another study, carried out with rats that had their diet supplemented with epigallocatechin gallate purified from green tea, a reduction in obesity was observed due to reduced absorption and increased lipid oxidation [74].

Phenolic compounds such as caffeic acid, chlorogenic acid, catechin, epigallocatechin gallate, and quercetin have already been described as having thermogenic effect, ability to oxidize fats, control appetite, regulate obesity-related hormone levels and inhibit digestive enzymes involved in the absorption of carbohydrates and lipids [65, 75, 76]. Therefore, the synergy between the phenolic compounds present in *A. satureioides* extracts should be considered for a better understanding of the inhibitory action of the extracts on the digestive enzymes.

CONCLUSION

The aqueous and ethanolic extracts of *A. satureioides* showed modulatory effects (through inhibition or potentiation) on the biological activities induced by different snake venoms, highlighting their anti-genotoxic potential, and modulator of hemostasis-related processes. This is probably due to the presence of phenolic compounds that interact with catalytic sites of the enzymes, or with hydrophobic regions present in these molecules, and promote formation of complexes with ionic cofactors. The inhibitions exerted on digestive enzymes also highlight the potential use of these extracts in the prevention and/or treatment of various pathologies, such as thrombosis, obesity, diabetes, and several others with inflammatory origin. However, new studies are still needed to expand knowledge about the mechanisms of interactions between the bioactive compounds and enzymes, cellular components or other animal molecules.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare that they have no conflict of interest.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors are grateful for the financial support of Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, and Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais (CNPq/CAPES/FAPEMIG), Brazil.

REFERENCES

- [1] Boeira, J.M.; Fenner, R.; Betti, A.H.; Provensi, G.; Lacerda, L.A.; Barbosa, P.R.; González, F.H.; Corrêa, A.M.; Driemeier, D.; Dall'Alba, M.P.; Pedroso, A.P.; Gosmann, G.; da Silva, J.; Rates, S.M. Toxicity and genotoxicity evaluation of *Passiflora alata* Curtis (Passifloraceae). *J. Ethnopharmacol.*, **2010**, *128* (2), 526-532.
- [2] Osowski, A.; Pietrzak, M.; Wieczorek, Z.; Wieczorek, J. Natural compounds in the human diet and their ability to bind mutagens prevents DNA-mutagen intercalation. *J. Toxicol. Environ. Health A.*, **2010**, *73*(17-18), 1141-1149.
- [3] Berling, I.; Isbister, G.K. Hematologic effects and complications of snake envenoming. *Transfus. Med. Rev.*, **2015**, *29*(2), 82-89.
- [4] Kadarian, C.; Broussalis, A.M.; Miño, J.; Lopez, P.; Gorzalczany, S.; Ferraro, G.; Acevedo, C. Hepatoprotective activity of *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC. *Pharmacol. Res.*, **2002**, *45*(1), 57-61.
- [5] Simões, C.M.O.; Schenkel, E.P.; Bauer, L.; Langeloh, A. Pharmacological investigations on *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC. Compositae. *J. Ethnopharmacol.*, **1988**, *22*(3), 281-293.
- [6] Matos, F.J.A. *Introdução à fitoquímica experimental*, 2nd ed.; UFC: Fortaleza, **1997**.
- [7] Marques, T.R.; Caetano, A.A.; Simão, A.A.; Castro, F.C.O.; Ramos, V.O.; Corrêa, A.D. Metanolic extract of *Malpighia emarginata* bagasse: phenolic compounds and inhibitory potential on digestive enzymes. *Rev. Bras. Farmacogn.*, **2016**, *26*(2), 191-196.
- [8] Gutiérrez, J.M.; Avila, C.; Rojas, E.; Cerdas, L. An alternative *in vitro* method for testing the potency of the polyvalent antivenom produced in Costa Rica. *Toxicon*, **1988**, *26*(4), 411-413.

- [9] Cintra, A.C.; Toni, L.G.; Sartim, M.A.; Franco, J.J.; Caetano, R.C.; Murakami, M.T.; Sampaio, S.V. Batroxase, a new metalloproteinase from *B. atrox* snake venom with strong fibrinolytic activity. *Toxicon*, **2012**, *60*(1), 70–82.
- [10] Rodrigues, V.M.; Soares, A.M.; Guerra-Sá, R.; Rodrigues, V.; Fontes, M.R.; Giglio, J.R. Structural and functional characterization of neuwiedase, a nonhemorrhagic fibrin(ogen)olytic metalloprotease from *Bothrops neuwiedi* snake venom. *Arch. Biochem. Biophys.*, **2000**, *381*(2), 213-224.
- [11] Selistre, H.S.; Queiroz, L.S.; Cunha, O.A.B.; de Souza, G.E.P.; Giglio, J.R. Isolation and characterization of hemorrhagic, myonecrotic and edema-inducing toxins from *Bothrops insularis* (jararaca ilhoa) snake venom. *Toxicon*, **1990**, *28*(3), 261–273.
- [12] Laemmli, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **1970**, *227*, 680–685.
- [13] Nandhakumar, S.; Parasuraman, S.; Shanmugam, M.M.; Rao, K.R.; Chand, P.; Bhat, B.V. Evaluation of DNA damage using single-cell gel electrophoresis (comet assay). *J. Pharmacol. Pharmacother.*, **2011**, *2*(2), 107–111.
- [14] Collins, A.R.; Dusinská, M.; Franklin, M.; Somorovská, M.; Petrovská, H.; Duthie, S.; Fillion, L.; Panayiotidis, M.; Raslová, K.; Vaughan, N. Comet assay in human biomonitoring studies: reliability, validation, and applications. *Environ. Mol. Mutagen.*, **1997**, *30*(2), 139–146.
- [15] Simão, A.A.; Corrêa, A.D.; Chagas, P.M.B. Inhibition of digestive enzymes by medicinal plant aqueous extracts used to aid the treatment of obesity. *J. Med. Plants Res.*, **2012**, *6*(47), 5826-5830.
- [16] Noelting, G.; Bernfeld, P. Sur les enzymes amylolytiques - III. La β -amylase: dosage d'activité et contrôle de l'absence d' α -amylase. *Helv. Chimica Acta*, **1948**, *31*(1), 286-290.
- [17] Kwon, Y.I.; Apostolidis, E.; Shetty, K. Inhibitory potential of wine and tea against α -amylase and α -glucosidase for management of hyperglycemia linked to type 2 diabetes. *J. Food Biochem.*, **2008**, *32*, 15-31.
- [18] Souza, S.P.; Pereira, L.L.S.; Souza, A.A.; dos Santos, C.D. Inhibition of pancreatic lipase by extracts of *Baccharis trimera* (Less.) DC., Asteraceae: evaluation of antinutrients and effect on glycosidases. *Rev. Bras. Farmacogn.*, **2011**, *21*(3), 450-455.
- [19] Erlanger, B.F.; Kokowsky, N.; Cohen, W. The preparation and properties of two new chromogenic substrates of trypsin. *Arch. Biochem. Biophys.*, **1961**, *95*(2), 271-278.

- [20] The United States Pharmacopeia. *The national formulary NF 18* (Pharmacopeial Convention Inc). Rockvile, **2005**.
- [21] R Core Team. *R: A Language and Environment for Statistical Computing*. Viena: Viena: R Foundation for Statistical Computing, **2012**.
- [22] Carini, J.P.; Klamt, F.; Bassani, V.L. Flavonoids from *Achyrocline satureioides*: promising biomolecules for anticancer therapy. *RSC Adv.*, **2014**, *4*, 3131–3144.
- [23] Salgueiro, A.C.F.; Folmer, V.; Rosa, H.S.; Costa, M.T.; Boligon, A.A.; Paula, F.R.; Roos, D.H.; Puntel, G.O. *In vitro* and *in silico* antioxidant and toxicological activities of *Achyrocline satureioides*. *J. Ethnopharmacol.*, **2016**, *194*, 6–14.
- [24] Teske, M.; Trentini, A.M.M. *Herbarium compêndio de fitoterapia*, 4 rd ed.; Herbarium: Curitiba, **2001**.
- [25] Santino, A.; Scarano, A.; Santis S.; Benedictis, M.; Giovinazzo, G.; Chieppa, M. Gut microbiota modulation and anti-inflammatory properties of dietary polyphenols in IBD: new and consolidated perspectives. *Curr. Pharm. Des.*, **2017**, *23(16)*, 2344-2351.
- [26] Vacca, R.A.;Valenti, D.; Caccamese, S.; Daglia, M.; Braidly, N.; Nabavi, S.M. Plant polyphenols as natural drugs forthe management of Down syndrome and related disorders. *Neurosci. Biobehav Rev.*, **2016**, *71*, 865-877.
- [27] Carvalho, B.M.; Santos, J.D.; Xavier, B.M.; Almeida, J.R.; Resende, L.M.; Martins, W.; Marcussi, S.; Marangoni, S.; Stábeli, R.G.; Calderon, L.A.; Soares, A.M.; da Silva, S.L.; Marchi-Salvador, D.P. Snake venom PLA₂s inhibitors isolated from Brazilian plants: synthetic and natural molecules. *Biomed Res. Int.*, **2013**, *2013*, 1-8.
- [28] Guimarães, C.L.; Moreira-Dill, L.S.; Fernandes, R.S.; Costa, T.R.; Hage-Melim, L.I.; Marcussi, S.; Carvalho, B.M.; da Silva, S.L.; Zuliani, J.P.; Fernandes, C.F.; Calderon, L.A.; Soares, A.M.; Stabeli, R.G. Biodiversity as a source of bioactive compounds against snakebites. *Curr. Med. Chem.*, **2014**, *21(25)*, 2952-2979.
- [29] Burkard, M.; Leischner, C.; Lauer, U.M.; Busch, C.; Venturelli, S.; Frank, J. Dietary flavonoids and modulation of natural killer cells: implications in malignant and viral diseases. *J. Nutr. Biochem.*, **2017**, *46*, 1-12.
- [30] Singh, R.; Akhtar, N.; Haqqi, T.M. Green tea polyphenol epigallocatechin-3-gallate: inflammation and arthritis. *Life Sci.*, **2010**, *86(25-26)*, 907–918.

- [31] Manach, C.; Mazur, A.; Scalbert, A. Polyphenols and prevention of cardiovascular diseases. *Curr. Opin. Lipidol.*, **2005**, *16*(1), 77–84.
- [32] Mozzicafreddo, M.; Cuccioloni, M.; Eleuteri, A.M.; Fioretti, E.; Angeletti, M. Flavonoids inhibit the amidolytic activity of human thrombin. *Biochimie*, **2006**, *88*(9), 1297–1306.
- [33] Gutiérrez, J.M.; Lomonte, B. Phospholipases A₂: unveiling the secrets of a functionally versatile group of snake venom toxins. *Toxicon*, **2013**, *62*, 27-39.
- [34] Dong, Q.; Patel, M.; Scott, K.F.; Graham, G.G.; Russell, P.J.; Sved, P. Oncogenic action of phospholipase A₂ in prostate cancer. *Cancer Lett.*, **2006**, *240*(1), 9–16.
- [35] Garg, P.K.; Norby, F.L.; Polfus, L.M.; Boerwinkle, E.; Gibbs, R.A.; Grove, M.L.; Folsom, A.R.; Garimella, P.S.; Matsushita, K.; Hoogeveen, R.C.; Ballantyne, C.M. Lipoprotein-associated phospholipase A₂ and risk of incident peripheral arterial disease: Findings from the Atherosclerosis Risk in Communities study (ARIC). *Atherosclerosis*, **2018**, *268*, 12-18.
- [36] Cho, A.S.; Jeon, S.M.; Kim, M.J.; Yeo, J.; Seo, K.I.; Choi, M.S.; Lee, M.K. Chlorogenic acid exhibits anti-obesity property and improves lipid metabolism in high-fat diet-induced-obese mice. *Food Chem. Toxicol.*, **2010**, *48*(3), 937-943.
- [37] Félix-Silva, J.; Gomes, J.A.; Xavier-Santos, J.B.; Passos, J.G.; Silva-Junior, A.A.; Tambourgi, D.V.; Fernandes-Pedrosa, M.F. Inhibition of local effects induced by *Bothrops erythromelas* snake venom: Assessment of the effectiveness of Brazilian polyvalent bothropic antivenom and aqueous leaf extract of *Jatropha gossypifolia*. *Toxicon*, **2017**, *125*, 74-83.
- [38] Moura, V.M.; Souza, L.Y.A.; Guimarães, N.C.; Santos, I.G.C.; Almeida, P.D.O.; Oliveira, R.B. The potential of aqueous extracts of *Bellucia dichotoma* Cogn. (Melastomataceae) to inhibit the biological activities of *Bothrops atrox* venom: A comparison of specimens collected in the states of Pará and Amazonas, Brazil. *J. Ethnopharmacol.*, **2017**, *196*, 168-177.
- [39] Cesar, P.H.S.; Trento, M.V.C.; Oliveira, D.A.; Simão, A.A.; Vieira, L.F.A.; Marcussi, S. Prospection of effects of guava leaves infusion: antigenotoxic action and enzymatic inhibition. *Nat. Prod. Commun.*, **2017**, *12*, 957-960.
- [40] Moura, V.M.; da Silva, W.C.; Raposo, J.D.; Freitas-de-Sousa, L.A.; Santos, M.C.; de Oliveira, R.B.; Veras Mourão, R.H. The inhibitory potential of the condensed-tannin-rich fraction of *Plathymenia reticulata* Benth. (Fabaceae) against *Bothrops atrox* envenomation. *J. Ethnopharmacol.*, **2016**, *183*, 136–142.

- [41] Batina, M.F.; Cintra, A.C.O.; Veronese, E.L.G.; Lavrador, M.A.; Giglio, J.R.; Pereira, P.S.; Dias, D.A.; França, S.C.; Sampaio, S.V. Inhibition of the lethal and myotoxic activities of *Crotalus durissus terrificus* venom by *Tabernaemontana catharinensis*: identification of one of the active components. *Planta Med.*, **2000**, *66*(5), 424- 428.
- [42] Cotrim, C.A.; Oliveira, S.C.; Diz Filho, E.B.; Fonseca, F.V.; Baldissera, L.J.; Antunes, E.; Ximenes, R.M.; Monteiro, H.S.; Rabello, M.M.; Hernandez, M.Z.; de Oliveira Toyama, D.; Toyama, M.H. Quercetin as an inhibitor of snake venom secretory phospholipase A₂. *Chem. Biol. Interact.*, **2011**, *189*(1-2), 9–16.
- [43] Mors, W.B.; Nascimento, M.C.; Pereira, B.M.; Pereira, N.A. Plant natural products active against snake bite – the molecular approach. *Phytochemistry*, **2000**, *55*(6), 627-642.
- [44] Silva, S.L.; Calgarotto, A.K.; Maso, V.; Damico, D.C.; Baldasso, P.; Veber, C.L.; Villar, J.A.; Oliveira, A.R.; Comar, M.J.; Oliveira, K.M.; Marangoni, S. Molecular modeling and inhibition of phospholipase A₂ by polyhydroxy phenolic compounds. *Eur. J. Med. Chem.*, **2009**, *44*(1), 312-321.
- [45] Bauer, K.A. Recent progress in anticoagulant therapy: oral direct inhibitors of thrombin and factor Xa. *J. Thromb. Haemost.*, **2011**, *9*, 12–19.
- [46] Escalante, T.; Rucavado, A.; Fox, J.W.; Gutiérrez, J.M. Key events in microvascular damage induced by snake venom hemorrhagic metalloproteinases. *J. Proteomics*, **2011**, *74*(9), 1781-1794.
- [47] Kini, R.M.; Koh, C.Y. Metalloproteases affecting blood coagulation, fibrinolysis and platelet aggregation from snake venoms: definition and nomenclature of interaction sites. *Toxins*, **2016**, *8*(10), 1-27.
- [48] Elumalai, A.; Eswariah, M.C.; Chowdary, C.H.V.; Kumar, R.; Anusha, M.; Naresh, K. Screening of thrombolytic activity of *Bougainvillea glabra* leaves extract by *in vitro*. *Asian J. Res. Pharm. Sci.*, **2012**, *2*(4), 134-136.
- [49] Rodrigues, C.F.; Gaeta, H.H.; Belchor, M.N.; Ferreira, M.J.; Pinho, M.V.; Toyama, D.O., Toyama, M.H. Evaluation of potential thrombin inhibitors from the white Mangrove (*Laguncularia racemosa* (L.) C.F. Gaertn.). *Mar. Drugs.*, **2015**, *13*(7), 4505-4519.
- [50] Carlos, M.M.L.; Freitas, P.D.F.S. Estudo da cascata de coagulação sanguínea e seus valores de referência. *Acta Veterinaria Brasílica*, **2007**, *1*, 49-55.

- [51] Brummel-Ziedins, K.E.; Vossen, C.Y.; Butenas, S.; Mann, K.G.; Rosendaal, F.R. Thrombin generation profiles in deep venous thrombosis. *J. Thromb. Haemost.*, **2005**, *3(11)*, 2497–2505.
- [52] Tosi, F.; Micaglio, R.; Sandri, M.; Castagna, A.; Minguzzi, D.; Stefanoni, F.; Chiariello, C.; Franzese, I.; Luciani, G.B.; Faggian, G.; Girelli, D.; Olivieri, O.; Martinelli, N. Increased plasma thrombin potential is associated with stable coronary artery disease: An angiographically-controlled study. *Thromb. Res.*, **2017**, *155*, 16–22.
- [53] Mack-Wen, G.V.L.; Rico, G.L.B.; Alarcón, P.J.C.; Pereañez, J.J.A. *In vitro* inhibition of *Bothrops asper* venom by ethanol extracts from *Brownea ariza* B. (Caesalpinaceae). *Revista de la Facultad de Química Farmacéutica*, **2011**, *18(1)*, 43-48.
- [54] Salazar, M.; Chérigo, L.; Acosta, H.; Otero, R.; Martínez-Luis, S. Evaluation of anti-*Bothrops asper* venom activity of ethanolic extract of *Brownea rosademonte* leaves. *Acta Pharm.*, **2014**, *64(4)*, 475–483.
- [55] Silva, M.C.; Sousa, E.; Duarte, B.; Marques, F.; Carvalho, F.; Ribeiro, L.M.C.; Pinto, M.M.M. Flavonoids with an oligopolysulfated moiety: a new class of anticoagulant agents. *J. Med. Chem.*, **2011**, *54(1)*, 95-106.
- [56] Monaco, S.; Gioia, M.; Rodriguez, J.; Fasciglione, G.F.; Di Pierro, D.; Lupidi, G.; Krippahl, L.; Marini, S.; Coletta, M. Modulation of the proteolytic activity of matrix metalloproteinase-2 (gelatinase A) on fibrinogen. *Biochem. J.*, **2007**, *402(3)*, 503-513.
- [57] Silva, M.L.; Marcussi, S.; Fernandes, R.S.; Pereira, P.S.; Januário, A.H.; França, S.C.; da Silva, S.L.; Soares, A.M.; Lourenço, M.V. Anti-snake venom activities of extracts and fractions from callus cultures of *Sapindus saponaria*. *Pharm. Biol.*, **2012**, *50(3)*, 366–375.
- [58] Torres, A.M.; Camargo, F.J.; Ricciardi, G.A.; Ricciardi, A.I.; Dellacassa, E. Neutralizing effects of *Nectandra angustifolia* extracts against *Bothrops neuwiedi* snake venom. *Nat. Prod. Commun.*, **2011**, *6(9)*, 1393–1396.
- [59] Patiño, A.C.; Benjumea, D.M.; Pereañez, J.A. Inhibition of venom serine proteinase and metalloproteinase activities by *Renealmia alpinia* (Zingiberaceae) extracts: Comparison of wild and in vitro propagated plants. *J. Ethnopharmacol.*, **2013**, *149(2)*, 590–596.
- [60] Félix-Silva, J.; Souza, T.; Menezes, Y.A.; Cabral, B.; Câmara, R.B.; Silva-Junior, A.A.; Rocha, H.A.; Rebecchi, I.M.; Zucolotto, S.M.; Fernandes-Pedrosa, M.F. Aqueous leaf

extract of *Jatropha gossypifolia* L. (Euphorbiaceae) inhibits enzymatic and biological actions of *Bothrops jararaca* snake venom. *Plos One*, **2014**, 9(8), 1-14.

[61] Castro, O.; Gutiérrez, J.M.; Barrios, M.; Castro, I.; Romero, M.; Umaña, E. Neutralización del efecto hemorrágico inducido por veneno de *Bothrops asper* (Serpentes: viperidae) por extratos de plantas tropicales. *Rev. Biol. Trop.*, **1999**, 47(3), 605-616.

[62] Simão, A.A.; Corrêa, A.D.; Carvalho, T.C.L.; Cesar, P.H.S.; Oliveira, C.H.M.; Marcussi, S. Pharmacotoxic characterization of the aqueous extract from *Pereskia grandifolia* leaves. *J. Med. Plants Res.*, **2015**, 9(7), 216-222.

[63] Stange, V.S.; Gomes, T.D.U.H.; Andrade, M.A.; Batitucci, M.C.P. Avaliação do efeito mutagênico do extrato hidroalcoólico bruto, por meio de bioensaios *in vivo* e prospecção fitoquímica de *Cecropia glaziovii* Sneth (embaúba), *Cecropiaceae*. *Rev. Bras. Farmacogn.*, **2009**, 19(2), 637-642.

[64] Herrera, T.; Aguilera, Y.; Rebollo-Hernanz, M.; Bravo, E.; Benítez, V.; Martínez-Sáez, N.; Arribas, S.M.; del Castillo, M.D.; Martín-Cabrejas, M.A. Teas and herbal infusions as sources of melatonin and other bioactive non-nutrient components. *Food Sci. Technol.*, **2018**, 89, 65-73.

[65] Simão, A.A.; Marques, T.R.; Marcussi, S.; Corrêa, A.D. Aqueous extract of *Psidium guajava* leaves: phenolic compounds and inhibitory potential on digestive enzymes. *An. Acad. Bras. Cienc.*, **2017**, 89(3Suppl), 2155-2165.

[66] Costamagna, M.S.; Zampini, I.C.; Alberto, M.R.; Cuello, S.; Torres, S.; Pérez, J.; Quispe, C.; Schmeda-Hirschmann, G.; Isla, M.I. Polyphenols rich fraction from *Geoffroea decorticans* fruits flour affects key enzymes involved in metabolic syndrome, oxidative stress and inflammatory process. *Food Chem.*, **2016**, 190, 392-402.

[67] Podsędek, A.; Majewska, I.; Redzyna, M.; Sosnowska, D.; Koziolkiewicz, M. *In vitro* inhibitory effect on digestive enzymes and antioxidant potential of commonly consumed fruits. *J. Agric. Food Chem.*, **2014**, 62(20), 4610-4617.

[68] Lunagariya, N.A.; Patel, N.K.; Jagtap, S.C.; Bhutani, K.K. Inhibitors of pancreatic lipase: state of the art clinical perspectives. *Excli J.*, **2014**, 13, 897-921.

[69] Shikov, A.N.; Pozharitskaya, O.N.; Makarova, M.N.; Kovaleva, M.A.; Laakso, I.; Dorman, H.J.D.; Hiltunen, R.; Makarov, V.G.; Galambosi, B. Effect of *Bergenia crassifolia* L.

extracts on weight gain and feeding behavior of rats with high-caloric diet-induced obesity. *Phytomedicine*, **2012**, *19(14)*, 1250-1255.

[70] Kostekli, M.; Karakaya, S. Protease inhibitors in various flours and breads: Effect of fermentation, baking and *in vitro* digestion on trypsin and chymotrypsin inhibitory activities. *Food Chem.*, **2017**, *224*, 62–68.

[71] McDougall, G.J.; Shpiro, F.; Dobson, P.; Smith, P.; Blake, A.; Stewart, D. Different polyphenolic components of soft fruits inhibit α -amylase and α -glucosidase. *J. Agric. Food Chem.*, **2005**, *53(7)*, 2760-2766.

[72] Horton, H.R.; Moran, L.A.; Scrimgeour, K.G.; Perry, M.D.; Rawn, J.D. *Principles of Biochemistry*, 4rd ed.; Upper Saddle River, NJ, USA: Pearson Prentice Hall, **2006**.

[73] Koh, L.W.; Wong, L.L.; Loo, Y.Y.; Kasapis, S.; Huang, D. Evaluation of different teas against starch digestibility by mammalian glycosidases. *J. Agric. Food Chem.*, **2010**, *58(1)*, 148-154.

[74] Klaus, S.; Pultz, S.; Thone-Reineke, C.; Wolfram, S. Epigallocatechin gallate attenuates diet-induced obesity in mice by decreasing energy absorption and increasing fat oxidation. *Int. J. Obes.*, **2005**, *29(6)*, 615-623.

[75] Cho, A.S.; Jeon, S.M.; Kim, M.J.; Yeo, J.; Seo, K.I.; Choi, M.S.; Lee, M.K. Chlorogenic acid exhibits anti-obesity property and improves lipid metabolism in high-fat diet-induced-obese mice. *Food Chem. Toxicol.*, **2010**, *48(3)*, 937-943.

[76] Rains, T.M.; Agarwal, S.; Maki, K.C. Antiobesity effects of green tea catechins: a mechanistic review. *J. Nutr. Biochem.*, **2011**, *22(1)*, 1-7.

ARTIGO 2**PROSPECTION OF ENZYME MODULATORS IN AQUEOUS AND ETHANOLIC
EXTRACTS OF *Lippia sidoides* LEAVES: GENOTOXICITY, DIGESTION,
INFLAMMATION, AND HEMOSTASIS**

Mariana Aparecida Braga^a, Tatiane Silva Abreu^a, Marcus Vinicius Cardoso Trento^a, Gustavo Henrique Andrade Machado^a, Luciana Lopes Silva Pereira^a, Anderson Assaid Simão^a, Silvana Marcussi^{a*}

^aDepartment of Chemistry, Biochemistry Laboratory, Universidade Federal de Lavras (UFLA), Campus Universitario, Lavras, Minas Gerais, 37200-000, Brazil.

Artigo submetido ao Conselho Editorial do periódico “Journal of Ethnopharmacology” e formatado conforme normas do referido periódico.

Abstract

In the present work, the aqueous and ethanolic extracts made using leaves of *Lippia sidoides* were chemically characterized. In addition, they were tested for their modulating action on snake venom enzymes involved in processes such as inflammation and blood coagulation, and also on digestive enzymes. The high homology that venom toxins have with human enzymes makes them excellent tools for the study of pathophysiological processes. When evaluating the composition of the aqueous and ethanolic extracts of *L. sidoides*, the phenolic compounds stood out and, among them, the ferulic acid was the majority in these extracts. Both extracts potentiated the activity of phospholipases A₂ present in the venom of *Bothrops atrox* in 12% and completely inhibited the hemolysis induced by the venoms of *B. jararacussu* and *B. moojeni* in the proportions between 1:0.5 and 1:5 (venom:extracts, w:w). They partially inhibited the thrombolytic activity induced by *B. moojeni* venom (10 to 25%), potentiated the thrombolysis (30 to 80%) induced by the *Lachesis muta muta* venom, and prolonged the coagulation time induced by the venoms of *B. moojeni* and *L. muta muta*. The extracts presented antigenotoxic activity against the venom of *L. muta muta* when evaluated by the comet assay. When evaluating their activity on digestive enzymes both extracts reduced the activity of α -glycosidases, the aqueous extract inhibited lipases, and the ethanolic extract inhibited α -amylases. The results demonstrate the modulatory action of the extracts on proteases that act in processes related to homeostasis. The inhibition of digestive enzymes suggests the action of the extracts in decreasing the caloric availability coming from the ingestion of carbohydrates and lipids. In addition, the rich phenolic composition of these extracts (e.g., gallic and ferulic acids, catechin, epigallocatechin gallate, epicatechin, and quercetin) highlights their potential for nutraceutical use.

Keywords: medicinal plants, phospholipase inhibitors, proteases inhibitors, digestive enzymes inhibitors, antigenotoxic compounds.

1. Introduction

The characterization of bioactive molecules present in plant extracts that have pharmacological potential has been growing in recent years. Much of this potential comes from secondary metabolism compounds, such as phenolic compounds. They act as natural antioxidants (inactivating the reactive species responsible for the development of chronic non-communicable diseases), interact specifically with a variety of enzymes and other proteins, and play a protective role in membranes (Kumar, 2015; Peluso and Serafini, 2017). In addition, phenolic compounds have been used as inhibitors of toxic and pharmacological effects induced by the toxins that make up different snake venoms (Carvalho et al., 2013).

Lippia sidoides Cham. (Verbenaceae family) corresponds to a plant species whose biological activities have been scientifically exploited. This species is mainly found in the Northeast region of Brazil, but its cultivation has expanded in several Brazilian states due to its use in folk medicine as antiseptic and anti-inflammatory (Almeida et al., 2010). Thus, it was included in the list of the Brazilian National List of Medicinal Plants of Interest to the Unified Health System (RENISUS) as one of the plants with the potential to generate phytotherapeutic medicines for use in public health (Garmus et al., 2015).

The essential oil of *L. sidoides* has great commercial and pharmacological value, due to its main constituents, thymol and carvacrol, and its antiseptic, antimicrobial, antioxidant, and anti-inflammatory properties (Almeida et al., 2010). Hydroalcoholic extracts have already been used for the treatment of cutaneous wounds as an oral antiseptic and in liquid soap preparations to prevent and treat fungal infections in the body (Monteiro et al., 2007).

Considering that most of the scientific work on this species shows the biological activities of its essential oil, the objective of the present work was to carry out the toxicological and pharmacological characterization of the aqueous and ethanolic extracts of *L. sidoides* leaves, in order to obtain new information that allows different applications for this species.

Aiming at increasing the knowledge about the pharmacological potential exerted by these extracts, besides evaluating its genotoxic/antigenotoxic potential, the effects on the hemostasis, on the activities performed by phospholipases A₂ and proteases (using snake venoms as tools), and on the activities of digestive enzymes were performed.

2. Material and methods

2.1. Obtaining *Lippia sidoides* and preparation of the extracts

The leaves of *Lippia sidoides* were collected at the Medicinal Herb Garden of the Federal University of Lavras, Lavras, Minas Gerais (21 ° 14'S, 45 °00 'W, and 918 m altitude) in March 2016. The leaves were identified and incorporated into the collection of the ESAL Herbarium in the Department of Biology of the Federal University of Lavras, under the registration number 30.250.

The leaves were washed in distilled water and oven dried (72 hours at 35 °C). The dried leaves were milled in a Wiley mill, and the obtained powder was submitted to extraction in two different solvents: water [30 minutes infusion at the ratio 1:25 (w:v)] and 70% ethanol at room temperature by static maceration. The extracts obtained were filtered and the supernatants collected. The supernatant from the aqueous extract was immediately frozen and then lyophilized. On the other hand, the supernatant of the hydroalcoholic extract was subjected to solvent removal on a rotary evaporator (at 45 °C), and just then frozen and lyophilized. Both lyophilized extracts were dissolved in water for the digestive enzyme tests and dissolved in phosphate buffered saline (PBS, pH 7.4) for the other assays.

2.2. Phytochemical screening

The powders obtained from the aqueous and ethanolic extracts of *L. sidoides* leaves were submitted to phytochemical screening. Specific reagents were used for each chemical group so that the reactions resulted in the development of coloration and/or precipitate that was characteristic for each class of substances (Matos, 1997).

2.3. Identification and quantification of phenolic compounds by HPLC

Chromatographic analysis was performed using a Shimadzu HPLC high-performance liquid chromatography system, equipped with two LC-20AT high-pressure pumps, a UV-visible detector model SPD-M20A, an oven model CTO-20AC, an interface model CBM-20A, and an automatic injector with auto-sampler model SIL-20A. Separations were performed using a Shim-pack VP-ODS-C18 (250 mm x 4.6 mm) column connected to a Shim-pack Column Holder (10 mm x 4.6 mm) pre-column.

The lyophilized aqueous and ethanolic extracts, dissolved in water (1:20, w:v), and the phenolic standards were filtrated in a 0.45µm membrane (Millipore®) and injected into the chromatograph. The analyzes were carried out according to Marques et al. (2016). The phenolic compounds were identified by comparison with the retention times of the standards. The quantification was performed through the construction of analytical curves obtained by linear regression, considering the coefficient of determination (R^2) of 0.99.

2.4. Obtaining of human blood and snake venoms

Protocols requiring the use of human biological material were previously approved by the Ethics Committee on Human Research (COEP) of the Federal University of Lavras, under the registration number CAAE: 56628316.0.0000.5148.

The blood used for the hemolytic, thrombolytic, and coagulation activities and the comet assay were obtained from healthy volunteers between 18 and 40 years old. Blood was collected in tubes containing heparin (to the hemolytic activity and comet assay), citrate (to the coagulant activity), or without anticoagulant (to the thrombolytic activity).

The crystalline crude venoms were commercially purchased from the serpentarium Bioagents (Batatais-SP). The venoms were weighed and dissolved in phosphate buffered saline (PBS, pH 7.4).

2.5. Phospholipase and hemolytic activity

Phospholipase A_2 (PLA₂) and hemolytic activities were assessed as described by Gutiérrez et al. (1988), with the use of egg yolk for PLA₂ activity and erythrocytes to the hemolytic activity. PLA₂ inhibition tests were carried out using venoms from *Bothrops atrox*, *B. jararacussu*, and *B. moojeni*, in which 30 µg of each venom was preincubated with the aqueous and ethanolic extracts of *L. sidoides* for 30 minutes at 37 °C in the ratios 1:0.1, 1:0.5, 1:1, 1:2.5, 1:5, 1:10, and 1:20 (venom:extract; w:w). The inhibition of the hemolytic activity was evaluated using *B. jararacussu* and *B. moojeni* venoms (50 µg) preincubated with the aqueous and ethanolic extracts of *L. sidoides* for 30 minutes at 37 °C in the ratios of 1:0.05, 1:0.1; 1:0.5; 1:1, 1:2.5, and 1:5 (w:w). Controls containing only venom or plant extract were also evaluated. Then, the incubates were poured into the gel orifices. The gels were placed in a cell culture chamber for

12 hours at 37 °C. The formation of a translucent halo around the hole in the gel was measured (millimeters) and expressed in percentage of activity.

2.6. *Thrombolytic activity*

The thrombolytic activity was assessed on human blood clots formed *in vitro* according to the methodology described by Cintra et al. (2012). The clots were incubated for 24 hours at 37 °C with samples containing *B. moojeni* or *Lachesis muta muta* (40 µg), PBS, or venom previously incubated (30 minutes at 37 °C) with aqueous and ethanolic extracts of *L. sidoides* in the proportions of 1:0.5, 1:1, 1:2.5, and 1:5 (venom:extract, w:w). The activities were estimated by measuring the volume of fluid released by each thrombus. The average of the obtained volumes in the negative control (PBS) was subtracted from other treatments. Controls containing only extracts were also evaluated.

2.7. *Coagulant activity*

The aqueous and ethanolic extracts of *L. sidoides* were preincubated with *B. moojeni* and *Lachesis muta muta* venoms for a period of 10 minutes at 37 °C in the ratios of 1:0.5, 1:1, 1:2.5, 1:5, and 1:10 (venom:extract, w:w). The incubated samples were added to the tubes containing citrated plasma (200 µL) in a 37 °C bath and then timed until clot formation. The minimum coagulant dose for each venom was previously defined as the smaller amount of venom capable of inducing coagulation in a time range between 50 and 180 seconds (Rodrigues et al., 2000).

2.8. *Fibrinogenolytic activity*

To evaluate the fibrinogenolytic activity an electrophoresis in polyacrylamide gel (15%, w:v) under denaturing conditions was used. The aqueous and ethanolic extracts of *L. sidoides* were preincubated with *B. moojeni* venom (50 µg) for 30 minutes at 37 °C in the ratios of 1:0.5, 1:1, 1:2.5, and 1:5 (venom:extract, w:w). Fibrinogen was then added to the samples and remained in the water bath, at the same temperature, for another 90 minutes. Controls containing fibrinogen and venom were used to observe the proteolysis profile of fibrinogen molecules.

2.9. Comet assay

The comet assay was used to detect damage to DNA molecules of leukocytes. The treatments containing *L. muta muta* venom (50 µg in 300 µL of PBS) with the extracts of *L. sidoides* in the ratios of 1:0.5 and 1:1 (venom:extract; w:w), previously incubated for 30 minutes at 37 °C. The treatments were then added to 300 µL of blood and kept in a cell culture chamber for 4 hours at 37 °C. From the incubated, 75 µL aliquots were transferred to tubes containing 225 µL of LMP agarose (low melting point). 3 slides per treatment, 100 µL per slide, were prepared, as described by Nandhakumar et al. (2011). The slides were submitted to osmotic lysis following with electrophoresis run at 30V and 300mA for 30 minutes. After that, the nucleoids remained in a neutralization solution (0.4 M Tris-HCl, pH 7.4) for 25 minutes and then were fixed with ethanol and visualized after staining with propidium iodide using epifluorescence microscopy. Analysis of nucleotide fragmentation levels was performed according to classes described by Collins et al. (1997), with some adaptations: class 0, damages ≤ 5%; class 1, damages between 5 and 20%; class 2, damages between 20 and 40%; class 3, damages between 40 and 85%; and class 4, damages ≥ 85%. Arbitrary units were calculated according to Collins (2004).

2.10. Kinetic tests with digestive enzymes: with or without simulated gastric fluid

The following enzymes were used in these assays: porcine pancreatic lipase (EC 3.1.1.3) type II, Sigma; porcine pancreatic α-amylase (EC 3.2.1.1) type VI B, Sigma; and porcine pancreatic trypsin (EC 3.4.21.4), Merck. The α-glycosidase (EC 3.2.1.20) was obtained from fresh porcine duodenum according to Pereira et al. (2010).

2.10.1. α-Amylase activity

The α-amylase activity was determined according to the methodology proposed by Noelting and Bernfeld (1948). 50 µL of the aqueous and ethanolic extracts of *L. sidoides* were preincubated with 50 µL of the α-amylase enzyme for 20 minutes in a water bath at 37 °C. The substrate was 1% starch, prepared in 0.05 mol L⁻¹ Tris buffer, pH 7.0, with 38 mmol L⁻¹ NaCl and 0.1 mmol L⁻¹ CaCl₂. After that, 100 µL of the substrate was added, and the mixture was incubated for four different time periods (10, 20, 30, and 40 minutes). The reaction was interrupted with the addition of 200 µL of 3,5-dinitrosalicylic acid and the product measured in a spectrophotometer at the wavelength of 540 nm.

2.10.2. α -Glycosidase activity

The α -glycosidase activity was determined according to Kwon et al. (2008), using 5 mmol L⁻¹ *p*-nitrophenyl- α -D-glucopyranoside in a 0.1 mol L⁻¹ citrate-phosphate buffer, pH 7.0, as substrate. In the assay, the aqueous and ethanolic extracts and the α -glycosidase enzyme were incubated in a water bath, at 37 °C, for four different time periods (10, 20, 30, and 40 minutes). Only then the substrate was added. The reaction was interrupted adding 1,000 μ L of 0.05 mol L⁻¹ NaOH and the product (*p*-nitrophenol) was measured in a spectrophotometer at the wavelength of 410 nm.

2.10.3. Lipase activity

The lipase activity was determined according to Souza et al. (2011), using 8 mmol L⁻¹ *p*-nitrophenyl palmitate in a 0.05 mmol L⁻¹ Tris-HCl buffer, pH 8.0, containing 0.5% Triton X-100, as substrate. In the assay, the extracts and the lipase enzyme were incubated in a water bath, at 37°C, for four different time periods (10, 20, 30, and 40 minutes). After the incubation, the substrate was added. The reaction was stopped transferring the tubes to an ice bath and adding 0.05 mmol L⁻¹ Tris-HCl buffer, pH 8.0. The *p*-nitrophenol (yellow-colored product of the lipase action on *p*-nitrophenyl palmitate) was measured in a spectrophotometer at the wavelength of 410 nm.

2.10.4. Trypsin activity

The trypsin activity was determined according to the methodology described by Erlanger et al. (1961). Thus, the aqueous and ethanolic extracts and the trypsin were incubated in a water bath at 37 °C, for different time periods (10, 20, 30, and 40 minutes). Only then, the *p*-benzoyl-D-L-arginine-*p*-nitroanilide (BAPNA) substrate, prepared in 0.05 mol L⁻¹ Tris, pH 8.2, was added. The reaction was interrupted adding 200 μ L of 30% acetic acid, and the product was measured in a spectrophotometer at a wavelength of 410 nm.

2.10.5. Preparation of simulated gastric fluid

In the presence of simulated gastric fluid, *in vitro* enzymatic activity was also carried out to simulate the digestion process in the stomach. Thus, the extracts were incubated with the simulated gastric fluid prepared according to The United States and Pharmacopeia (2005), for 1h

in a water bath at 37 °C. Subsequently, it was neutralized (pH 7.2) with sodium bicarbonate salt, and only then the activity assays were performed.

2.10.6. Data analysis

To obtain 40 to 80% of enzyme inhibition (range of inhibition considered in the literature for digestive enzyme assays), the concentrations of the aqueous and ethanolic extracts were different on each enzyme evaluated.

The enzymes inhibition was obtained from the determination of the slopes of the straight lines (absorbance x time) corresponding to values obtained for the control enzyme (without extracts) and enzymes + inhibitor (with aqueous or ethanolic extracts) in the activity assays. The slope of the straight line corresponds to the speed of product formation per minute of reaction, and the presence of the inhibitor causes a decrease of this inclination. The absorbance values were converted into micromoles of product based on data obtained from a standard curve elaborated with glucose for the amylase and with *p*-nitrophenol for glycosidase and lipase. For trypsin, the molar extinction coefficient of BAPNA was determined according to Erlanger et al. (1961).

2.11. Statistical Analysis

The results were presented as the mean of the triplicates \pm standard deviation obtained in three independent assays. The significance of the difference between the means was determined by the analysis of variance, followed by Tukey's test when the treatments were compared with the control (R Core Team, 2012). The results were considered statistically significant when $p < 0.05$.

3. Results and discussion

The chemical compounds present in plant materials were characterized by phytochemical screening, in which different groups of metabolites such as tannins, catechins, alkaloids, flavonoids, coumarins, steroids, and saponins were identified in the ethanolic extract of *Lippia sidoides* (Table 1), corroborating the results found by Pinho et al. (2012). In the aqueous extract, only catechins, depsides, and depsidones were detected.

The ethanolic extract of *L. sidoides* presented higher phenolic compounds than those obtained for the aqueous extract, as shown in Table 1.

Table 1. Phytochemical screening and phenolic compounds content in the aqueous and ethanolic extracts of *Lippia sidoides* leaves.

Phytochemical Screening		
Chemical constituents	Aqueous extract	Ethanolic extract
Organic acids	(-)	(-)
Polysaccharides	(-)	(-)
Tannins	(-)	(+)
Catechins	(+)	(+)
Flavonoids	(-)	(+)
Cardiac glycosides	(-)	(-)
Azulenes	(-)	(-)
Carotenoids	(-)	(-)
Sesquiterpene lactones and other lactones	(-)	(-)
Steroids and triterpenes	(-)	(+)
Depsidones and depsidones	(+)	(-)
Coumarin derivatives	(-)	(+)
Saponins	(-)	(+)
Alkaloids	(-)	(+)
Purine	(-)	(-)
Phenolic compounds identified in <i>Lippia sidoides</i> extracts by HPLC		
Phenolic Compounds (mg 100g⁻¹)	Aqueous extract	Ethanolic extract
Gallic Acid	3.66 ± 0.16	4.97 ± 0.02
Catechin	88.52 ± 0.97	44.19 ± 0.52
Epigallocatechin Gallate	627.34 ± 2.58	665.23 ± 10.95
Epicatechin	175.84 ± 0.80	270.88 ± 2.97
Caffeic Acid	35.24 ± 0.05	47.23 ± 0.21
Vanillic Acid	60.12 ± 0.43	70.43 ± 0.46
p-Coumaric Acid	34.92 ± 1.41	12.29 ± 0.01
Ferulic Acid	1,474.76 ± 36.70	1,651.22 ± 7.43
Salicylic Acid	38.93 ± 0.23	978.17 ± 5.39
Quercetin	0.38 ± 0.00	1.06 ± 0.01
∑ Phenolic Compounds	2,539.71	3,745.67

The results correspond to the means of triplicates and the calculated standard deviations. The signs indicate the presence (+) or the absence (-) of the metabolite.

Both extracts presented high content of ferulic acid and epigallocatechin gallate. The aqueous extract also had a considerable content of epicatechin, while the ethanolic extract presented the salicylic acid highlighted in its composition.

Due to their diverse health benefits, such as antioxidants, anticoagulants, immunomodulators, anti-inflammatory, and anticarcinogenic (Olas et al., 2018; Peluso and Serafini, 2017; Singh and Patra, 2018), the phenolic compounds have been the focus of numerous researches, especially for the treatment and prevention of cancer, and reducing the risk of cardiovascular and inflammatory diseases.

On the other hand, little is known about the bioavailability of phenolic compounds after their ingestion, since most scientific studies focus particularly on the benefits attributed to their activities. When bioactive compounds are ingested, they enter the gastrointestinal tract and are exposed to a complex physicochemical environment (Celep et al., 2018). This environment may have a variable influence on their bioavailability, since these compounds in an acidic environment are very stable, and although it depends on their structure, large losses in bioavailability are observed in an alkaline environment (Rodriguez-Mateos et al., 2014).

Thus, the regular intake of these compounds, present in plant extracts, progressively increases their plasma concentration to a level in which they are able to reach their place of action to perform activities with functional benefits to human health (Ting et al., 2015).

3.1. Phospholipase and hemolytic activity

The aqueous and ethanolic extracts of *L. sidoides* significantly potentiated the phospholipase activity induced by *Bothrops atrox* venom in 12% in the highest evaluated proportions [1:2.5 to 1:20 (w:w)] (Figure 1A).

The phospholipase activity induced by the *B. jararacussu* venom was not significantly inhibited or potentiated by both *L. sidoides* extracts under the conditions evaluated (Figure 1B).

For the *B. moojeni* venom, a single statistically significant inhibition of 12% was observed after incubation with the ethanolic extract at a ratio of 1:20 (w:w) (Figure 1C).

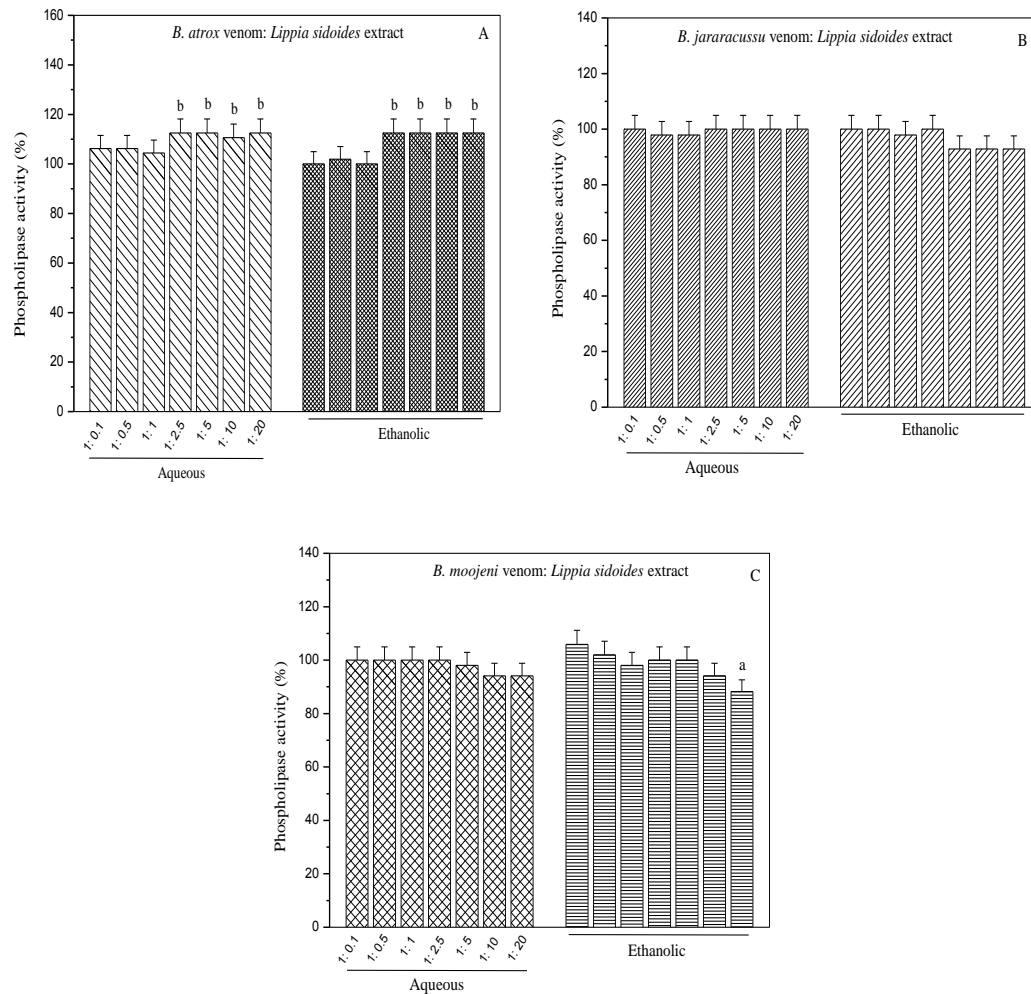


Figure 1. Phospholipase activity (%) induced by *Bothrops atrox* (A), *Bothrops jararacussu* (B), and *Bothrops moojeni* (C) snake venoms, previously incubated with the aqueous and ethanolic extracts from *Lippia sidoides* leaves. Controls (+): venoms (30 μ g) were considered as 100% activity. The results correspond to the means of the triplicates obtained for each ratio (venom: extract, w:w) and their standard deviations. a. statistically different from its respective positive control in inhibition by the Tukey test ($p < 0.05$). b. statistically different from its respective positive control in potentiation by the Tukey test ($p < 0.05$).

The potentiation of the phospholipase activity by the aqueous and ethanolic extracts of *L. sidoides* leaves, observed for the *B. atrox* venom, may be related to the fact that the components present in the extracts act as enzymatic cofactors. In addition, plant molecules with an amphipathic or hydrophobic character may have interacted with the phospholipids in order to make them more accessible to the attack promoted by phospholipases A₂, or have bound in specific regions of the phospholipases, causing structural changes favorable to coordination of the

cofactors or substrate at their binding sites. However, the evaluated venoms have various proportions of phospholipases A₂ that may be structurally different, which justify the different results obtained for the extracts evaluated.

According to Moura et al. (2016) the formation of complexes between plant compounds and calcium ions can interfere in their (Ca²⁺) binding to phospholipases A₂, and consequently affecting the performance of their function as cofactors. In the present work, however, the evaluated extracts of *L. sidoides* did not show activity as inhibitors of phospholipases.

Aiming at applications for the potentiating action exerted by the extracts on phospholipases, both the aqueous and ethanolic extracts could act amplifying the inflammatory response and, thus, their local use desirable for the treatment of tumors (Yarla et al., 2015). In addition, they can favor the formation of clots (can accelerate healing processes), act in the control of hemostasis (in cases of hemorrhages), or act in therapies of diseases such as hemophilia and diabetes in which hemorrhages and low healing rate are recurrent.

Besides regulating the arachidonic acid pathway, which is the precursor of eicosanoids, phospholipases are involved in the formation of additional inflammatory mediators, such as lysophospholipids and platelet-activating factor, which may contribute to the progression of inflammation (Dennis et al., 2011). According to Serafini et al. (2011), flavonoids influence the metabolism of arachidonic acid. In this study, flavonoids, such as quercetin, epicatechin, and epigallocatechin gallate, were identified in the aqueous and ethanolic extracts of *L. sidoides*. They may be involved in the modulation not only of phospholipases but also of proteases that act on inflammatory responses and hemostasis changes.

Thus, both the inhibition and the potentiation of phospholipases A₂ by natural compounds highlight the pharmaceutical potential of the extracts and isolated plant compounds, and their great relevance in the medical-scientific context (Carvalho et al., 2013).

On the other hand, one of the major concerns in clinical practice is the hemolysis process, since many drugs induce lysis of erythrocytes and, consequently, decrease their level in the blood. Therefore, to confirm the absence of cytotoxicity, even when evaluated in high doses (750 µg), the hemolytic activity with the aqueous and ethanolic extracts of *L. sidoides* alone was performed.

Previous incubation of the aqueous and ethanolic extracts of *L. sidoides* with *B. jararacussu* venom completely inhibited the hemolytic activity in all ratios analyzed (Figure 2A).

Both extracts also showed a significant inhibitory action on hemolysis induced by *B. moojeni* venom, with 100% inhibition being observed in the ratios of 1:0.5 to 1:5 (w:w) (Figure 2B).

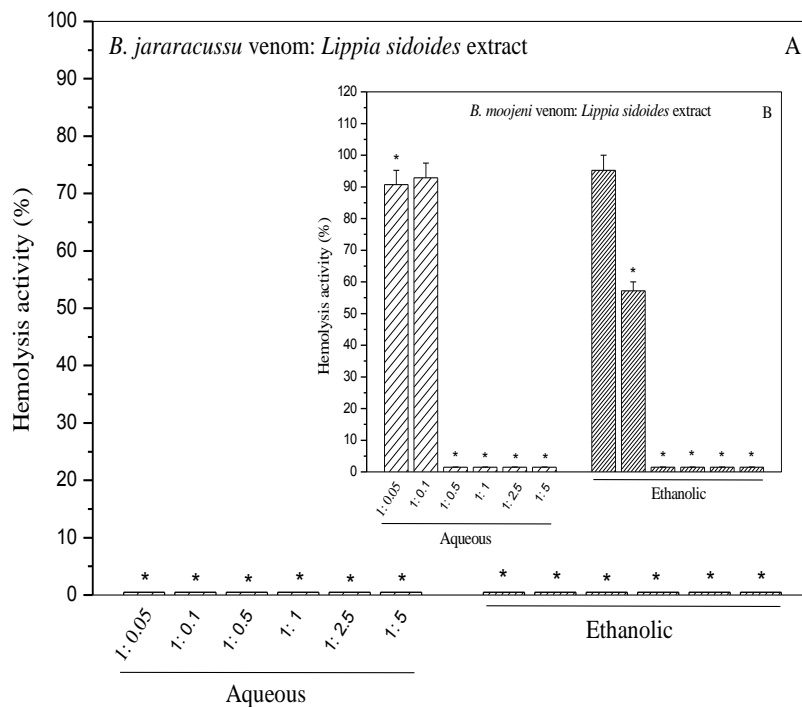


Figure 2. Hemolytic activity (%) induced by *Bothrops jararacussu* (A) and *Bothrops moojeni* (B) snake venoms, previously incubated with the aqueous and ethanolic extracts from *Lippia sidoides* leaves. Controls (+): venoms (50 μ g) were considered as 100% activity. The results correspond to the means of the triplicates obtained for each ratio (venom:extract, w:w) and their standard deviations. *statistically different from its respective positive control by the Tukey test ($p < 0.05$), and representation of the inhibitory effect on the venom activity.

The inhibition of the hemolytic activity can be explained by the presence of phenolic compounds in the *L. sidoides* extracts. Some of these compounds are likely to form complexes with metals, such as Ca^{2+} , but also their hydroxyl groups may form hydrogen bonds with amino acids at the catalytic site or at the point of attachment of divalent ions, thereby reducing the catalytic action of ion-dependent enzymes (Gómez-Betancur et al., 2014).

Snake venoms induce hemolytic activity mainly by the action of proteases such as metalloproteases and serine proteases, which degrade membrane proteins and modify the flow of ions and liquids through the membrane. In addition, phospholipases A_2 promote the breakdown of phospholipids that make up the cell membranes. Thus, the combined action of these enzymes

causes rupture of the erythrocyte membranes, which leads to the release of hemoglobin to the extracellular space (Garcia et al., 2010).

3.2. Thrombolytic activity

The ethanolic extract of *L. sidoides* exerted a significant inhibition of 26% and 20% in the proportions of 1:0.5 and 1:5 (w:w), respectively, on thrombolytic activity induced by the *B. moojeni* venom (Figure 3A). Similar inhibitions percentages were obtained after incubations of the same venom with the aqueous extract in the ratios of 1:0.5, 1:2.5, and 1:5. Considering the composition of *B. moojeni* venom, widely described in the literature (Bernardes et al., 2008; Gomes et al., 2009; de Moraes et al., 2012), it is possible to suggest the occurrence of interactions between components of the extract and hemorrhagic proteases and anticoagulants present in the venom.

However, prior incubation of both extracts with the venom of *L. muta muta*, in all ratios evaluated, increased thrombus dissolution that ranged from 35 to 75% for the aqueous extract and from 47 to 66% for the ethanolic extract (Figure 3B). This potentiation suggests the presence of enzymatic cofactors in the extracts, which are responsible for promoting an increase in the activity of one or more classes of proteases present in the *L. muta muta* venom.

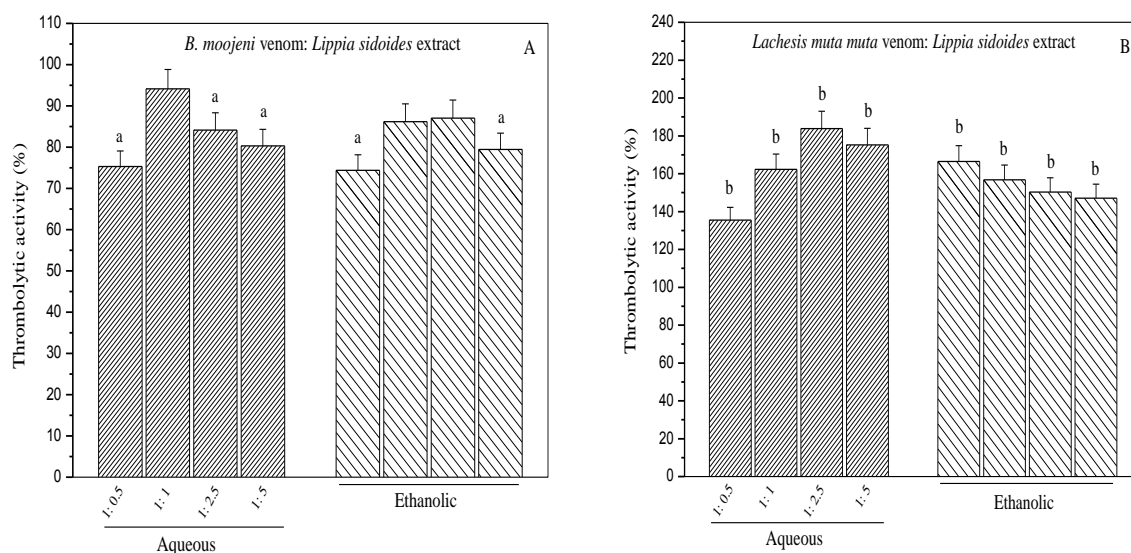


Figure 3. Thrombolytic activity (%) induced by *Bothrops moojeni* (A) and *Lachesis muta muta* (B) snake venoms, previously incubated with the aqueous and ethanolic extracts from *Lippia sidoides* leaves. Controls (+): venoms (40 μ g) were considered as 100% activity. The results correspond to the means of the triplicates obtained for each ratio (venom:extract, w:w) and their standard deviations. a. statistically different from its respective positive control in inhibition by the Tukey test ($p < 0.05$). b. statistically different from its respective positive control in potentiation by the Tukey test ($p < 0.05$).

In this context, the different compounds identified in the extracts of *L. sidoides*, as well as the possibly present but unidentified compounds (Table 1), may act on different enzymatic targets as inhibitors or potentiators, considering the different molar ratios (extracts components: toxins of the venoms) obtained in each experiment. Although they may be promising sources of compounds with pharmaceutical interest, the extracts and their fractionated compounds require further studies to elucidate their mechanisms of action and their effective and safe doses and formulations.

3.3. Coagulant/anticoagulant activity

The minimum coagulant dose (MCD) was previously determined to *B. moojeni* (5 μ g) and *L. muta muta* (10 μ g) venoms.

Previous incubation of the *B. moojeni* venom with the aqueous extract of *L. sidoides* in the ratios of 1:2.5, 1:5, and 1:10 (w:w) increased the coagulation time in 21, 25, and 29 seconds,

respectively. The ethanolic extract was also able to prolong the coagulation time in all proportions analyzed with times ranging from 12 to 39 seconds higher than the control.

Both extracts promoted an increase in the coagulation time induced by the *L. muta muta* venom, in all proportions analyzed, 28 to 85 seconds for the aqueous extract and 50 to 93 seconds for the ethanolic one, (Table 2).

Table 2. Effect of the aqueous and ethanolic extracts from *Lippia sidoides* leaves on the coagulant activity induced by *Bothrops moojeni* and *Lachesis muta muta* venoms on the human citrated plasma.

	Proportion venom: extract (w:w)	Clotting time (s)	
		<i>Bothrops moojeni</i>	<i>Lachesis muta muta</i>
Aqueous	1:0.5	68.33 ± 1.15	121.00 ± 4.58 ^a
	1:1	66.67 ± 4.04	140.33 ± 10.12 ^a
	1:2.5	82.00 ± 3.46 ^a	156.33 ± 7.02 ^a
	1:5	86.00 ± 1.73 ^a	163.33 ± 6.43 ^a
	1:10	90.00 ± 1.15 ^a	178.00 ± 5.29 ^a
Ethanolic	1:0.5	73.00 ± 4.51 ^a	143.33 ± 3.51 ^a
	1:1	85.33 ± 1.53 ^a	154.33 ± 8.50 ^a
	1:2.5	90.00 ± 1.00 ^a	163.33 ± 6.11 ^a
	1:5	96.67 ± 1.15 ^a	177.00 ± 5.29 ^a
	1:10	100.67 ± 2.08 ^a	185.67 ± 7.09 ^a
Control	-	61.33 ± 2.52*	92.67 ± 7.23**

*The control was carried out with 5µg of the evaluated venom. **The control was carried out with 10µg of the evaluated venom. The results are presented as the average of triplicates ± standard deviation. ^adiffers from their respective positive controls in values equal to or greater than 10 seconds.

The proteases present in snake venoms are responsible for some local and systemic effects observed in the envenomation. Two examples of proteases are metalloproteases, which are involved in the hemorrhagic process, edema, inflammation, and necrosis, and serine proteases, which act selectively on coagulation cascade factors, affecting platelet aggregation, fibrinolysis, and coagulation (Queiroz et al., 2017).

Blood coagulation is a physiological process that under normal conditions occurs by the activation of proteins and cellular components involved in a sequence of reactions, which

ultimately results in degradation of fibrinogen by thrombin and forms fibrin molecules (Jin and Gopinath, 2016). Therefore, any disorder that occurs in the mechanisms controlling the hemostatic system, such as excessive coagulation, may contribute to the development of cardiovascular diseases (e.g., heart attack), stroke, and pulmonary embolism (Palta et al., 2014). Thus, the inhibition of the enzymes involved in the coagulation cascade represents an alternative for the prevention of thromboses.

Thrombosis occurs when blood flow is prevented by the deposition of platelets, tissue factor, and fibrin networks in damaged regions of the surface of endothelial cells or blood vessels (Furie and Furie, 2008). Thrombin, the enzyme responsible for the conversion of fibrinogen to fibrin at the end of the coagulation cascade, has become one of the targets in studies aimed at the development of new anticoagulants and antithrombotics (Jin and Gopinath, 2016). The inhibition of the coagulant activity induced by the venoms may be related to the ability of the evaluated extracts to inhibit thrombin-like enzymes, or prothrombin activators present in snake venoms (Castro et al., 2004; Kini, 2005). Thus, it is possible to suggest the action of these inhibitors also on human thrombin, which enables future pharmaceutical applications.

The aqueous and ethanolic extracts of *L. sidoides* were efficient in inhibiting coagulating enzymes when previously incubated with the venoms of *B. moojeni* and *L. muta muta*. According to Costa et al. (2010), natural inhibitors of proteases usually act by competing with enzyme substrates, but may also bind irreversibly to the active site or act as metal chelators, sequestering ions that play an essential role in protease catalysis.

3.4. Fibrinogenolytic activity

Although the aqueous and ethanolic extracts of *L. sidoides* inhibited some classes of proteases in the different tests carried out, they had no inhibitory effect on the fibrinogen breakage induced by the *B. moojeni* venom, in any proportion evaluated (results not shown). This result allows suggesting that the inhibitions exerted by the extracts on the *B. moojeni* venom in the hemolysis, thrombolysis, and coagulation assays are related to non-fibrinogenolytic metalloproteases and serine proteases.

The envenomations caused by the *Bothrops* genus generally produce prolonged bleeding, since various toxins present in their venom act degrading factors of the coagulation cascade, or excessively converting fibrinogen molecules to fibrin, which are lysed by the action of natural

fibrinolytic systems (Gutiérrez, 2011). Therefore, fibrinogen has been widely used for the evaluation of the proteolytic potential of venoms and isolated toxins, besides making it possible to predict the action of proteases and their inhibitors on the blood coagulation cascade (Silva et al., 2012).

3.5. Comet Assay

The nucleoids treated with *L. muta muta* venom presented high levels of fragmentation. The number of nucleoids classified as class 3 and class 4 was significantly higher when compared to the treatments (containing the extracts) and the negative control (without treatment) (Table 3).

When incubated with the *L. muta muta* venom in the proportions of 1:0.5 and 1:1 (w:w), the values of the arbitrary units (A.U.) for the *L. sidoides* aqueous extract were 70.5 and 83.3, respectively, which are approximately 3 times smaller than the value obtained for the positive control (venom only) - 232.7. The values of A.U. for the ethanolic extract were 85.1 and 79.0 in the proportions of 1: 0.5 and 1:1 (w:w), respectively (Table 3).

A predominance of non-damaged cells (class 0) and cells with minimal damage (class 1) was observed in the negative control, as well as in treatments containing the *L. muta muta* venom previously incubated with the aqueous and ethanolic extracts of *L. sidoides*, in the proportions of 1:0.5 and 1:1 (w:w) (Table 3). Controls using the pure extracts at the highest concentration determined to the incubations ($250 \mu\text{g mL}^{-1}$) were also performed, and presented results similar to the negative control - no genotoxic action (data not shown).

The control containing the antitumor drug, doxorubicin, was performed as evidence of the functionality of the tests performed and for comparison with the positive control of interest. Significantly greater values of arbitrary units were observed for the *L. muta muta* venom ($50 \mu\text{g mL}^{-1}$; A.U. 232.7 ± 23.2) when evaluated at a concentration equivalent to half of the concentration of doxorubicin ($100 \mu\text{g mL}^{-1}$; A.U. 174.8 ± 7.5).

Table 3. Effect of the aqueous and ethanolic extracts of *Lippia sidoides* leaves on the genotoxic activity induced by the venom of *Lachesis muta muta*. Results expressed as the average percentage of nucleoids classified according to levels of fragmentation of DNA molecules (comet classes), damage frequency, and arbitrary units.

Treatments	Nucleoides (%)					Damage frequency (%)	Arbitrary Units (A.U.)
	Comet classes (Damage %)						
	0 (≤ 5)	1 (5–20)	2 (20–40)	3 (40–85)	4 (≥ 85)		
C (-)	49.9 \pm 5.4a	48.0 \pm 7.1a b	2.1 \pm 0.8c	0.0 \pm 0.0c	0.0 \pm 0.0b	50.1 \pm 5.4e	52.2 \pm 3.7d
C (+)*	2.1 \pm 0.8c	12.8 \pm 6.2c	44.3 \pm 5.4a	31.9 \pm 7.3a	8.9 \pm 4.7a	97.9 \pm 1.3a	232.7 \pm 23.2a
C (+)**	10.1 \pm 4.4c	31.0 \pm 0.7b	39.6 \pm 6.1a	12.6 \pm 2.9b	6.7 \pm 0.7a	89.9 \pm 4.3b	174.8 \pm 7.5b
Venom: <i>Lippia sidoides</i> extract (w:w)	38.6 \pm 3.0ab	52.3 \pm 6.0a	9.1 \pm 0.7bc	0.0 \pm 0.0c	0.0 \pm 0.0b	61.4 \pm 5.3d	70.5 \pm 4.7cd
Aqueous (1:0.5)							
Aqueous (1:1)	32.7 \pm 3.3b	51.5 \pm 4.8a	15.3 \pm 0.7b	0.4 \pm 0.0c	0.0 \pm 0.0b	67.0 \pm 3.9cd	83.3 \pm 8.0c
Ethanolic (1:0.5)	28.8 \pm 2.9b	57.3 \pm 3.7a	13.9 \pm 0.7b	0.0 \pm 0.0c	0.0 \pm 0.0b	71.2 \pm 3.8c	85.1 \pm 3.8c
Ethanolic (1:1)	30.7 \pm 4.7b	59.6 \pm 3.5a	9.7 \pm 0.3bc	0.0 \pm 0.0c	0.0 \pm 0.0b	69.3 \pm 5.9c	79.0 \pm 6.3c

C (-): blood solution only. C (+)*: *Lachesis muta muta* venom (50 $\mu\text{g mL}^{-1}$). C (+)**: Doxorubicin (100 $\mu\text{g mL}^{-1}$). The values represent the average of 3 tests performed with the blood of different volunteers, counting a total of 900 nucleoids/treatment (300 nucleoids per treatment/volunteer). Same letters in the columns do not differ from each other by the Tukey test ($p < 0.05$).

Several plant extracts have already been evaluated using the alkaline comet assay. It allows the evaluation of primary DNA lesions in individual cells that correspond to single- or double-stranded breaks of the DNA, in alkaline labile regions, by the alkylation of electronegative DNA groups and cross-links (Tice et al., 2000). One of these studies was conducted by Qari and El-Assouli (2017), who demonstrated the genotoxic effect of the aqueous extract of *Tribulus terrestris* on human lymphocytes at concentrations between 40 and 80 mgL^{-1} .

The extract of *Rubus niveus* at the doses evaluated (500, 1000, and 2000 mg Kg^{-1}) by Tolentino et al. (2015) exerted a protective effect against DNA damage, induced by doxorubicin, in peripheral blood leukocytes and bone marrow cells. Significant reductions in the frequency of DNA damage, ranging from 67.14% to 105.87%, were observed.

Different extracts of *Teucrium ramosissimum* also showed antigenotoxic activity against DNA damage of human lymphocytes (K562) induced by hydrogen peroxide (Sghaier et al., 2016). According to the researchers, the protective effect exerted by these extracts can be attributed to the presence of flavonoids, tannins, and sterols, in addition to a synergistic action of several phenolic compounds. Therefore, it is essential to evaluate the genotoxic and antigenotoxic potential of plant extracts and their secondary metabolites. Thus, they may have application in the prevention or in therapies for various human diseases, especially those related to the chronic accumulation of genomic alterations.

3.6. Inhibition of digestive enzymes

Table 4 shows the results of the enzymatic inhibition exerted by the aqueous and ethanolic extracts of *L. sidoides* leaves before and after exposure to simulated gastric fluid.

Table 4. Inhibition of digestive enzymes by the aqueous and ethanolic extracts of *Lippia sidoides* leaves before and after exposure to simulated gastric fluid.

Enzyme	<i>Lippia sidoides</i>							
	Aqueous extract				Ethanolic extract			
	Inhibition before exposure		Inhibition after exposure		Inhibition before exposure		Inhibition after exposure	
	(IEU) ^a	(%)	(IEU) ^a	(%)	(IEU) ^a	(%)	(IEU) ^a	(%)
α -Amylase	ns	33.24	nd	nd	60.52± 3.61	68.12	58.45± 2.53	66.91
α -Glycosidase	6.82 ± 0.53	62.11	6.95 ± 0.33	71.16	7.18±0.29	66.52	6.43 ± 0.19	64.86
Lipase	7.09 ± 0.28	66.74	4.04 ± 0.35	39.19	ns	36.70	nd	nd
Trypsin	ns	9.13	nd	nd	ns	4.42	nd	nd

Data from five repetitions, with the calculated means \pm standard deviation.

^aThe *Lippia sidoides* extract measured for each of the enzymes was diluted to provide an inhibition between 40% and 80%, in order to ensure result reliability.

IEU = Inhibited Enzyme Unit in $\mu\text{mol min}^{-1}\text{g}^{-1}$ sample (extract)

nd = inhibition not determined

ns = inhibition not significant (% inhibition values below 40% are not considered).

The aqueous extract of *L. sidoides* did not inhibit the α -amylase activity, but the ethanolic extract showed inhibition of 60.52 $\mu\text{mol min}^{-1}\text{g}^{-1}$ (68.12%). The inhibition of the α -amylase enzyme was maintained after gastric fluid simulation, suggesting that there were no chemical changes in the inhibitory molecules during the process.

For the α -glycosidase activity, the aqueous and ethanolic extracts of *L. sidoides* presented inhibition of 6.82 and 7.18 $\mu\text{mol min g}^{-1}$ (62.11 and 66.52%), respectively. In the presence of simulated gastric fluid, the aqueous extract increased the inhibitory potential to 71.16%, and the ethanolic extract remained at 64.86%. Simulation of gastric fluid could lead to structural changes in the inhibitors due to extremely acidic pH. However, the inhibition of α -amylase and α -glycosidase were not altered, suggesting that the inhibitors would remain stable upon the passage through the stomach during digestion.

The regulation of glucose uptake from the intestinal lumen may be related to the antihyperglycemic action by inhibiting α -amylase and α -glycosidase enzymes, which are responsible for carbohydrate digestion. The inhibition of these enzymes results in decreased absorption and consequent reduction of postprandial glucose levels and caloric availability (Güvenalp et al., 2017). Acarbose and miglitol are allopathic oral hypoglycemic agents with the mechanism of action related to the inhibition of α -glycosidase. However, they cause side effects such as diarrhea, abdominal cramps, and flatulence (Choi et al., 2015). Therefore, the use of plant extracts may be a more acceptable source of inhibitors of these enzymes, due to their low cost and lower incidence of side effects.

The inhibition of lipase was detected only for the aqueous extract of *L. sidoides* (7.09 $\mu\text{mol min g}^{-1}$, which corresponds to 66.74%). Besides helping to reduce the absorption of fatty acids in the intestine, inhibiting this enzyme results in a decrease in caloric availability.

Both extracts showed no significant inhibitory action in the trypsin activity. Since the presence of trypsin inhibitors in the diet may result in an excessive increase in the plasma concentration of cholecystokinin and causing pancreatic hypertrophy, this result was positive and desired. These inhibitors are also associated with reduced growth rate in animals due to a decrease in protein digestibility that leads to weight loss and catabolism of endogenous proteins (Horton et al., 2006).

The results of the present work demonstrate that the compounds present in the evaluated extracts act selectively on enzymes, and probably by interactions with specific regions of each molecule since they modulate the enzymatic activity of proteases present in the venoms evaluated. However, they have shown no effect on ophidian fibrinogenases and the human protease trypsin.

The inhibition of digestive enzymes is probably related to the presence of phenolic compounds in the aqueous and ethanolic extracts of *L. sidoides* (Table 1) since these compounds generally bind to enzymes and alter their activities. However, some compounds appear in greater amounts in both extracts such as epigallocatechin gallate, epicatechin, and ferulic acid. Others are found in smaller amounts but in similar concentrations in both extracts (e.g., caffeic acid and vanillic acid). The gallic acid and quercetin were found in low concentrations in both extracts. On the other hand, the catechin and *p*-coumaric acid were found in a higher concentration in the aqueous extract, and the salicylic acid was found in a concentration significantly higher in the ethanolic extract. These variations in the phenolic composition are certainly responsible for the different inhibitions exerted by the extracts on the digestive enzymes, and if this information is better explored, it may bring relevant results for the development of new therapeutic formulations.

Tannins, one of the major classes of phenolic compounds, have been described as non-specific inhibitors of various hydrolytic enzymes such as α -amylases, α -glycosidases, and lipases. This inhibition is possibly associated with their ability to strongly bind to proteins and carbohydrates (Silva et al., 2014). According to Barrett et al. (2018), the interaction between tannins and proteins is the result of multiple hydrogen bonds and hydrophobic associations that can be reinforced by the conformational similarity of their molecules. As a consequence of this interaction, the blocking of catalytic sites of the enzymes occurs and their activities are inhibited. However, in the present study, the presence of tannins was only detected in the ethanolic extract of *L. sidoides* (Table 1). Its presence could justify the greater inhibitory effect observed for the ethanolic extract on the α -amylase and α -glycosidase enzymes (Table 4).

The inhibitory activity exerted by the ethanolic extract of *L. sidoides* on α -amylase (60.52 ± 3.61 IEU/g) was higher than those for α -glycosidase (7.18 ± 0.29 IEU/g). According to Tan et al. (2017), the salicylic acid significantly inhibited α -amylase but did not inhibit α -glycosidase, suggesting different mechanisms of the inhibitory reaction exerted by this compound. Thus, the results found in the present study corroborates the previous affirmation, since the ethanolic extract of *L. sidoides* presented a high content of salicylic acid (Table 1).

On the other hand, Martinez-Gonzalez et al. (2017) reported that flavonoids, when compared to phenolic acids, exert a higher inhibitory activity on digestive enzymes, probably due to the greater complexity of flavonoid structures and their interaction with enzymes. You et al.

(2012) observed a higher inhibitory effect of quercetin on α -glucosidase and lipase than ellagic acid. Tan et al. (2017) reported higher inhibition of the flavonoid myricetin on the enzymes α -amylase, α -glycosidase, and lipase when compared to the phenolic acids (caffeic acid, gallic acid, and syringic acid). In the present study, flavonoids (quercetin, catechin, and epigallocatechin gallate) were also detected in the aqueous and ethanolic extracts of *L. sidoides*. Therefore, the synergism between the phenolic compounds present in these extracts should be considered for a better understanding of their inhibitory action on the digestive enzymes.

4. Conclusion

The aqueous and ethanolic extracts of *Lippia sidoides* present phenolic compounds with modulatory effects (inhibition or potentiation) on the activity of different enzymes, such as phospholipases A₂, proteases, and digestive enzymes. The antigenotoxic potential of these extracts and their potential use in the prevention and treatment of several pathologies (e.g., thrombosis, obesity, diabetes, and inflammatory diseases) are also highlighted. However, complementary studies should be conducted to detect the active compounds related to each enzyme and their safety, bioavailability, efficacy, and doses for use.

Conflict of interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

Acknowledgements

The authors are grateful for the financial support of Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, and Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais (CNPq/CAPES/FAPEMIG), Brazil.

References

- Almeida, M.C.S., Alves, L.A., Souza, L.G.S., Machado, L.L., Matos, M.C., Oliveira, M.C.F., Lemos, T.L.G., 2010. Flavonoides e outras substâncias de *Lippia sidoides* e suas atividades antioxidantes. *Quím. Nova.* 33(9), 1877-1881.
- Barrett, A.H., Farhadi, N.F., Smith, T.J., 2018. Slowing starch digestion and inhibiting digestive enzyme activity using plant flavanols/tannins - A review of efficacy and mechanisms. *LWT - Food Sci. Technol.* 87, 394-399.
- Bernardes, C.P., Santos-Filho, N.A., Costa, T.R., Gomes, M.S.R., Torres, F.S., Costa, J., Borges, M.H., Richardson, M., Dos Santos, D.M., Pimenta, A.M.C., Homsí-Brandeburgo, M.I., Soares, A.M., Oliveira, F., 2008. Isolation and structural characterization of a new fibrin(ogen)olytic metalloproteinase from *Bothrops moojeni* snake venom. *Toxicon.* 51(4), 574-584.
- Carvalho, B.M., Santos, J.D., Xavier, B.M., Almeida, J.R., Resende, L.M., Martins, W., Marcussi, S., Marangoni, S., Stábeli, R.G., Calderon, L.A., Soares, A.M., da Silva, S.L., Marchi-Salvador, D.P., 2013. Snake venom PLA₂s inhibitors isolated from Brazilian plants: synthetic and natural molecules. *Biomed. Res. Int.* 2013, 1-8.
- Castro, H.C., Zingali, R.B., Albuquerque, M.G., Pujol-Luz, M., Rodrigues, C.R., 2004. Snake venom thrombin-like enzymes: from reptilase to now. *Cell. Mol. Life Sci.* 61(7-8), 843-856.
- Celep, E., Akyüz, S., İnan, Y., Yesilada, E., 2018. Assessment of potential bioavailability of major phenolic compounds in *Lavandula stoechas* L. ssp. *stoechas*. *Ind. Crops and Products.* 118, 111-117.
- Choi, C.I., Lee, S.R., Kim, K.H., 2015. Antioxidant and α -glucosidase inhibitory activities of constituents from *Euonymus alatus* twigs. *Ind. Crops and Prod.* 76, 1055-1060.
- Cintra, A.C., Toni, L.G., Sartim, M.A., Franco, J.J., Caetano, R.C., Murakami, M.T., Sampaio, S.V., 2012. Batroxase, a new metalloproteinase from *B. atrox* snake venom with strong fibrinolytic activity. *Toxicon.* 60(1), 70-82.
- Collins, A.R., Dusinská, M., Franklin, M., Somorovská, M., Petrovská, H., Duthie, S., Fillion, L., Panayiotidis, M., Raslová, K., Vaughan, N., 1997. Comet assay in human biomonitoring studies: reliability, validation, and applications. *Environ. Mol. Mutagen.* 30(2), 139-146.
- Collins, A.R., 2004. The comet assay for DNA damage and repair. *Mol. Biotechnol.* 26(3), 249-261.
- Costa, J.O., Fonseca, K.C., Garrote-Filho, M.S., Cunha, C.C., de Freitas, M.V., Silva, H.S., Araújo, R.B., Penha-Silva, N., de Oliveira, F., 2010. Structural and functional comparison of proteolytic enzymes from plant latex and snake venoms. *Biochimie.* 92(12), 1760-1765.

- de Morais, N.C., Mamede, C.C.N, Fonseca, K.C., de Queiroz, M.R., Gomes-Filho, S.A., Santos-Filho, N.A., Bordon, K. de C., Beletti, M.E., Sampaio, S.V., Arantes, E.C., de Oliveira, F., 2012. Isolation and characterization of moojenin, an acid-active, anticoagulant metalloproteinase from *Bothrops moojeni* venom. *Toxicon*. 60(7), 1251-1258.
- Dennis, E.A., Cao, J., Hsu, Y.H., Magrioti, V., Kokotos, G., 2011. Phospholipase A₂ enzymes: physical structure, biological function, disease implication, chemical inhibition, and therapeutic intervention. *Chem. Rev.* 111(10), 6130-6185.
- Erlanger, B.F., Kokowsky, N., Cohen, W., 1961. The preparation and properties of two new chromogenic substrates of trypsin. *Arch. Biochem. Biophys.* 95(2), 271-278.
- Furie, B., Furie, B.C., 2008. Mechanisms of thrombus formation. *N. Engl. J. Med.* 359(9), 938-949.
- Garcia, D.M.E., Acosta, O.C., Huancahuire-Veja, S., Martins-de-Souza, D., Marangoni, S., Maruñak, S.L., Teibler, G.P., Leiva, L.C., Ponce-Soto, L.A., 2010. Isolation and functional characterization of a new acidic PLA₂ Ba SpII RP4 of the *Bothrops alternatus* snake venom from Argentina. *Toxicon*. 56(1), 64-74.
- Garmus, T.T., Paviani, L.C., Queiroga, C.L., Cabral, F.A., 2015. Extraction of phenolic compounds from pepper-rosmarin (*Lippia sidoides* Cham.) leaves by sequential extraction in fixed bed extractor using supercritical CO₂, ethanol and water as solvents. *J. Supercritical Fluids*. 99, 68–75.
- Gomes, M.S.R., Mendes, M.M., Oliveira, F., Andrade, R.M., Bernardes, C.P., Hamaguchi, A., Alcântara, T.M., Soares, A.M., Rodrigues, V.M., Homsí-Brandeburgo, M.I., 2009. BthMP: a new weakly hemorrhagic metalloproteinase from *Bothrops moojeni* snake venom. *Toxicon*. 53(1), 24-32.
- Gómez-Betancur, I., Benjumea, D., Patiño, A., Jiménez, N., Osorio, E., 2014. Inhibition of the toxic effects of *Bothrops asper* venom by pinostrobin, a flavanone isolated from *Renealmia alpinia* (Rottb.) MAAS. *J. Ethnopharmacol.* 155(3), 1609-1615.
- Gutiérrez, J.M., Avila, C., Rojas, E., Cerdas, L., 1988. An alternative *in vitro* method for testing the potency of the polyvalent antivenom produced in Costa Rica. *Toxicon*. 26(4), 411-413.
- Gutiérrez, J.M., 2011. Envenenamientos por mordeduras de serpientes en América Latina y el Caribe: Una visión integral de carácter regional. *Bol. Malar. Salud. Amb.* 51, 1–16.
- Güvenalp, Z., Özbek, H., Dursunoğlu, B., Yuca, H., Gözcü, S., Çil, Y.M., Kazaz, C., Kara, K., Demirezer, O.L., 2017. α -Amylase and α -glucosidase inhibitory activities of the herbs of *Artemisia dracuncululus* L. and its active constituents. *Med. Chem. Res.* 26(12), 3209–3215.
- Horton, H.R., Moran, L.A., Scrimgeour, K.G., Perry, M.D., Rawn, J.D., 2006. Principles of Biochemistry, 4th ed. Upper Saddle River, NJ, USA: Pearson Prentice Hall.

- Jin, N.Z., Gopinath, S.C.B., 2016. Potential blood clotting factors and anticoagulants. *Biomed. Pharmacother.* 84, 356-365.
- Kini, R.M., 2005. The intriguing world of prothrombin activators from snake venom. *Toxicon.* 45(8), 1133-1145.
- Kumar, K., 2015. Role of edible mushrooms as functional foods - a review. *South Asian J. Food Technol. Environ.* 1(3-4), 211-218.
- Kwon, Y.I., Apostolidis, E., Shetty, K., 2008. Inhibitory potential of wine and tea against α -amylase and α -glucosidase for management of hyperglycemia linked to type 2 diabetes. *J. Food Biochem.* 32, 15-31.
- Marques, T.R., Caetano, A.A., Simão, A.A., Castro, F.C.O., Ramos, V.O., Corrêa, A.D., 2016. Metanolic extract of *Malpighia emarginata* bagasse: phenolic compounds and inhibitory potential on digestive enzymes. *Rev. Bras. Farmacogn.* 26(2), 191-196.
- Martinez-Gonzalez, A.I., Díaz-Sánchez, Á.G., Rosa, L.A., Vargas-Requena, C.L., Bustos-Jaimes, I., Alvarez-Parrilla, A.E., 2017. Polyphenolic compounds and digestive enzymes: in vitro non-covalent interactions. *Molecules.* 22(4), doi: 10.3390/molecules22040669.
- Matos, F.J.A., 1997. *Introdução à fitoquímica experimental*, 2 ed. UFC, Fortaleza.
- Monteiro, M.V.B., Leite, A.K.R.M., Bertini, L.M., Morais, S.M.M., Nunes-Pinheiro, D.C.S., 2007. Topical anti-inflammatory, gastroprotective and antioxidant effects of the essential oil of *Lippia sidoides* Cham. leaves. *J. Ethnopharmacol.* 111(2), 378–382.
- Moura, V.M., da Silva, W.C., Raposo, J.D., Freitas-de-Sousa, L.A., Santos, M.C., de Oliveira, R.B., Veras Mourão, R.H., 2016. The inhibitory potential of the condensed-tannin-rich fraction of *Plathymenia reticulata* Benth. (Fabaceae) against *Bothrops atrox* envenomation. *J. Ethnopharmacol.* 183, 136–142.
- Nandhakumar, S., Parasuraman, S., Shanmugam, M.M., Rao, K.R., Chand, P., Bhat, B.V., 2011. Evaluation of DNA damage using single-cell gel electrophoresis (Comet Assay). *J. Pharmacol. Pharmacother.* 2(2), 107–111.
- Noelting, G., Bernfeld, P., 1948. Sur les enzymes amylolytiques - III. La β -amylase: dosage d'activité et contrôle de l'absence d' α -amylase. *Helv. Chimica Acta.* 31(1), 286-290.
- Olas, B., Żuchowski, J., Lis, B., Skalski, B., Kontek, B., Grabarczyk, L., Stochmal, A., 2018. Comparative chemical composition, antioxidant and anticoagulant properties of phenolic fraction (a rich in non-acylated and acylated flavonoids and non-polar compounds) and non-polar fraction from *Elaeagnus rhamnoides* (L.) A. Nelson fruits. *Food Chemistry.* 247, 39–45.

- Palta, S., Saroa, R., Palta, A., 2014. Overview of the coagulation system. *Indian J. Anaesth.* 58(5), 515–523.
- Peluso, I., Serafini, M., 2017. Antioxidants from black and green tea: from dietary modulation of oxidative stress to pharmacological mechanisms. *Br. J. Pharmacol.* 174(11), 1195-1208.
- Pereira, L.L.S., Souza, S.P., Silva, M.C., Carvalho, G.A., Santos, C.D., Correa, A.D., Abreu, C.M.P., 2010. Atividade das glicosidases na presença de chá verde e de chá preto. *Rev. Bras. Plant. Medicinai*s (Impresso). 12(4), 516-518.
- Pinho, L., Souza, P. N. S., Sobrinho, E. M., Almeida, A.C. E., Martins, E. R., 2012. Atividade antimicrobiana de extratos hidroalcoólico das folhas de alecrim-pimenta, aroeira, barbatimão, erva baleeira e do farelo da casca de pequi. *Ciência Rural.* 42(2), 326-331.
- Qari, S.H., El-Assouli, S.M., 2017. Evaluation of cytological and genetic effects of *Tribulus terrestris* fruit aqueous extract on cultured human lymphocytes. *Saudi J. Biol. Sciences.* doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.sjbs.2017.01.012>.
- Queiroz, M.R., de Sousa, B.B., Pereira, D.F.C., Mamede, C.C.N., Matias, M.S., de Morais, N.C.G., Costa, J.O., de Oliveira, F., 2017. The role of platelets in hemostasis and the effects of snake venom toxins on platelet function. *Toxicon.* 133, 33-47.
- R Core Team, 2012. *R: A Language and Environment for Statistical Computing.* Viena: Viena: R Foundation for Statistical Computing.
- Rodrigues, V.M., Soares, A.M., Guerra-Sá, R., Rodrigues, V., Fontes, M.R., Giglio, J.R., 2000. Structural and functional characterization of neuwiedase, a nonhemorrhagic fibrin(ogen)olytic metalloprotease from *Bothrops neuwiedi* snake venom. *Arch. Biochem. Biophys.* 381(2), 213-224.
- Rodriguez-Mateos, A., Vauzour, D., Krueger, C.G., Shanmuganayagam, D., Reed, J., Calani, L., Mena, P., Del Rio, D., Crozier A., 2014. Bioavailability, bioactivity and impact on health of dietary flavonoids and related compounds: an update. *Arch. Toxicol.* 88(10), 1803-1853.
- Serafini, M., Del Rio, D., Yao, D.N.D., Bettuzzi, S., Peluso, I., 2011. Health benefits of tea. In: Benzie, I.F.F., Wachtel-Galor, S., editors. *Herbal Medicine: biomolecular and clinical aspects.* 2 ed. Boca raton (FL): CRC Press/Taylor & Francis.
- Sghaier, M.B., Ismail, M.B., Bouhlel, I., Ghedira, K., Chekir-Ghedira, L., 2016. Leaf extracts from *Teucrium ramosissimum* protect against DNA damage in human lymphoblast cell K562 and enhance antioxidant, antigenotoxic and antiproliferative activity. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 44, 44-52.
- Silva, M.L., Marcussi, S., Fernandes, R.S., Pereira, P.S., Januário, A.H., França, S.C., da Silva, S.L., Soares, A.M., Lourenço, M.V., 2012. Anti-snake venom activities of extracts and fractions from callus cultures of *Sapindus saponaria*. *Pharm. Biol.* 50(3), 366–375.

Silva, S. M., Koehnlein, E.A., Bracht, A., Castoldi, R., de Morais, G.R., Baesso, M.L., Peralta, R.A., de Souza, C.G.M., de Sá-Nakanishi, A.B., Peralta, R.M., 2014. Inhibition of salivary and pancreatic α -amylases by a pinhão coat (*Araucaria angustifolia*) extract rich in condensed tannin. *Food Res. International*. 56, 1–8.

Singh, S. K., Patra, A., 2018. Evaluation of phenolic composition, antioxidant, anti-inflammatory and anticancer activities of *Polygonatum verticillatum* (L.). *J. Integ. Medicine*. 16(4), 273-282.

Souza, S.P., Pereira, L.L.S., Souza, A.A., dos Santos, C.D., 2011. Inhibition of pancreatic lipase by extracts of *Baccharis trimera* (Less.) DC., Asteraceae: evaluation of antinutrients and effect on glycosidases. *Rev. Bras. Farmacogn*. 21(3), 450-455.

Tan, Y., Chang, S.K.C., Zhang, Y., 2017. Comparison of α -amylase, α -glucosidase and lipase inhibitory activity of the phenolic substances in two black legumes of different genera. *Food Chemistry*. 214, 259–268.

The United States Pharmacopeia, 2005. The national formulary NF 18 (Pharmacopeia Convention Ing). Rockvile.

Tice, R.R., Agurell, E., Anderson, D., Burlinson, B., Hartmann, A., Kobayashi, H., Iyamae, Y., Rojas, E., Ryu, J.C., Sasaki, Y.F., 2000. Single cell gel/comet assay: guidelines for *in vitro* and *in vivo* genetic toxicology testing. *Environ. Mol. Mutagen*. 35(3), 206-221.

Ting, Y., Zhao, Q., Xia, C., Huang, Q., 2015. Using *in vitro* and *in vivo* models to evaluate the oral bioavailability of nutraceuticals. *J. Agric. Food. Chem*. 63(5), 1332–1338.

Tolentino, F., Araújo, P.A., Marques, E.S., Petreanu, M., Andrade, S.F., Niero, R., Perazzo, F.F., Rosa, P.C., Maistro, E.L., 2015. *In vivo* evaluation of the genetic toxicity of *Rubus niveus* Thunb. (Rosaceae) extract and initial screening of its potential chemoprevention against doxorubicin-induced DNA damage. *J. Ethnopharmacol*. 164, 89-95.

Yarla, N. S., Satyakumar, K., Srinivasu, D., Kaladhar, D.S.V.G.K., Gjumrakch, A., Dharmapuri, G., Putta, G.R.S.P.S., Jagarlapoodi, S., Bheeram, V., Sadu, S.P., Duddukuri, G.R., 2015. Phospholipase A₂: A potential therapeutic target in inflammation and cancer (*in silico*, *in vitro*, *in vivo* and clinical approach). *J. Cancer Sci. Therapy*. 7(7), 249-252.

You, Q., Chen, F., Wang, X., Jiang, Y., Lin, S., 2012. Anti-diabetic activities of phenolic compounds in muscadine against alpha-glucosidase and pancreatic lipase. *LWT- Food Sci. Technol*. 46(1), 164–168.

ARTIGO 3**TÓXICO OU MEDICINAL? NOVA ABORDAGEM DAS PROPRIEDADES
FARMACOLÓGICAS E TOXICOLÓGICAS DE FOLHAS DE *Echinodorus macrophyllus***

Mariana Aparecida Braga^a, Mateus William de Faria Eleutério^b, Pedro Henrique Souza Cesar^a,
Marcus Vinicius Cardoso Trento^a, Tamara Rezende Marques^a, Silvana Marcussi^{a*}

^aLaboratório de Bioquímica, Departamento de Química, Universidade Federal de Lavras - UFLA,
Lavras, Minas Gerais, Brasil.

^bLaboratório de Citogenética, Departamento de Biologia, Universidade Federal de Lavras -
UFLA, Lavras, Minas Gerais, Brasil.

Artigo a ser submetido à revista “Toxicology Letters” e formatado conforme normas do referido
periódico.

Resumo

Echinodorus macrophyllus contém alguns fitoquímicos como flavonoides, alcaloides, taninos e esteroides, que podem induzir toxicidade, mas também são promissores para o desenvolvimento de produtos com aplicação na promoção e manutenção da saúde, melhoria do sistema imunológico e prevenção de doenças. Neste estudo, os extratos aquoso e etanólico de folhas dessa espécie, foram caracterizados por HPLC, investigados *in vitro* quanto a ação moduladora sobre enzimas de peçonhas de serpentes, usadas como ferramentas laboratoriais, bem como avaliados em ensaios de inibição de enzimas digestivas. Os extratos inibiram (7%) a atividade fosfolipásica induzida pelas peçonhas de *Bothrops jararacussu* e *B. moojeni*. A atividade hemolítica induzida pela peçonha *Crotalus durissus terrificus* foi potencializada pelo extrato etanólico entre 30 a 73% nas proporções analisadas. A atividade trombolítica, induzida pela peçonha de *B. moojeni*, foi inibida em 51% e 34% pelos extratos aquoso e etanólico na proporção de 1:5 (m:m), respectivamente. O tempo de coagulação induzido pelas peçonhas de *B. moojeni* e *Lachesis muta muta* foi prolongado após incubação com ambos extratos. Os extratos também exerceram ação antígeno-tóxica sobre a fragmentação de DNA induzida pela peçonha de *L. muta muta*. Ambos extratos promoveram redução da atividade enzimática de α -glicosidases e o extrato etanólico também se mostrou inibidor de α -amilases. A inibição de enzimas digestivas sugere a ação dos extratos na diminuição da disponibilidade calórica proveniente da ingestão de carboidratos. Os resultados confirmam o potencial de uso terapêutico de *E. macrophyllus* na prevenção e tratamento de alterações hemostáticas, uma vez que, as proteínas de peçonhas por ele inibidas apresentam alta homologia com proteínas humanas que atuam em diversos processos fisiopatológicos, tais como, resposta inflamatória e coagulação sanguínea.

Palavras-chave: Inibidores de fosfolipases A₂. Inibidores de proteases. Inibidores de enzimas digestivas. Efeitos hemostáticos. Efeitos antígeno-tóxicos.

1. Introdução

Indícios do uso de plantas para fins medicinais são encontrados desde os primórdios das civilizações, sendo considerado uma das práticas mais antigas empregadas pelo homem para cura, prevenção e tratamento de doenças. Em muitos casos, as plantas medicinais têm sido utilizadas como o único recurso na atenção básica de saúde, devido ao fácil acesso, não exigência de prescrição médica, alto custo dos medicamentos industrializados e crença de ausência de efeitos tóxicos.

Na medicina popular, as folhas da espécie *Echinodorus macrophyllus* (Kunth) Micheli, da família Alismataceae, são amplamente utilizadas na forma de chá, preparado por infusão ou decocção, para o tratamento de infecções, doenças inflamatórias, respiratórias e disfunções renais (Tanus-Rangel et al., 2010). Essa espécie é encontrada na região sudeste do Brasil, principalmente em áreas alagadas dos estados de Minas Gerais e São Paulo, e é conhecida popularmente como chapéu de couro (Flor et al., 2011).

Estudos têm demonstrado a presença de alguns compostos fenólicos, tais como, flavonoides, triterpenos, alcaloides e taninos na espécie *E. macrophyllus* (Kobayashi et al., 2000; Tanus-Rangel et al., 2010). Embora essa planta já esteja listada na Farmacopeia Brasileira (tanto em 1926 quanto em 1959), estudos ainda são necessários para seu uso posterior como fitoterápico, já que esta apresenta grande importância farmacológica (Flor et al., 2011).

Os compostos bioativos têm sido investigados como moduladores enzimáticos com vistas a aplicações terapêuticas na prevenção e tratamento de diversas doenças. Neste sentido, as peçonhas de serpentes, constituem ferramentas valiosas para a caracterização de moduladores enzimáticos, já que são ricas fontes de fosfolipases A₂ (PLA₂) e proteases (metaloproteases e serinoproteases), envolvidas na manutenção da homeostasia, resposta inflamatória e imunológica. Além disso, essas enzimas podem exibir até 96% de homologia funcional e estrutural com enzimas presentes no corpo humano (Pozzi et al. 2016; Sales et al., 2017), possibilitando prospectar o efeito dos inibidores enzimáticos sobre enzimas humanas.

Assim, neste estudo, os extratos, aquoso e etanólico das folhas de *E. macrophyllus* foram caracterizados em ensaios farmacológicos e de toxicidade, avaliando seus efeitos sobre a atividade de PLA₂s e proteases (utilizando peçonhas de serpentes como ferramentas laboratoriais), bem como sobre atividades de enzimas digestivas, além de verificar seu potencial antígeno-tóxico/genotóxico pelo teste do cometa, visando ampliar o conhecimento sobre o

potencial nutracêutico exercido por estes extratos.

2. Material e Métodos

2.1. Material vegetal: Folhas de Echinodorus macrophyllus

As folhas de *E. macrophyllus* foram coletadas em março de 2016, na Universidade Federal de Lavras - UFLA, em Lavras, Minas Gerais (21° 14'Sul, longitude 45° 00' Oeste e 918 m de altitude). A espécie foi identificada no Herbário do Departamento de Biologia da UFLA e uma exsicata foi incorporada ao acervo do Herbário ESAL, sob o número de registro 30.251.

As folhas foram lavadas em água destilada e submetidas à secagem em estufa, por período de 72 horas, à temperatura de 35°C. As folhas secas foram moídas em moinho tipo Willey e a farinha obtida submetida à extração. O extrato aquoso foi obtido por infusão de 30 minutos na proporção 1:25 (m:v), sendo em seguida filtrado, congelado e liofilizado. O extrato etanólico (etanol 70%) foi obtido à temperatura ambiente por maceração estática, sendo em seguida filtrado, submetido a retirada do solvente em um evaporador rotativo (a 45°C), congelado e liofilizado.

2.2. Triagem fitoquímica

Os extratos, aquoso e etanólico das folhas de *E. macrophyllus*, foram submetidos a triagem fitoquímica, dos quais ácidos orgânicos, alcaloides, azulenos, carotenoides, catequinas, depsídeos e depsidonas, derivados de cumarinas, esteroides e triterpenoides, flavonoides, glicosídeos cardiotônicos, lactonas sesquiterpênicas e outras lactonas, saponinas, purinas e taninos, foram investigados. Reagentes específicos foram usados para cada grupo químico, de modo que as reações resultassem no desenvolvimento de coloração e/ou precipitado, característico para cada classe de substâncias (Matos, 1997).

2.3. Composição fenólica dos extratos determinada por HPLC

A análise cromatográfica foi realizada utilizando-se cromatógrafo líquido de alta eficiência HPLC Shimadzu, equipado com duas bombas de alta pressão LC-20AT, um detector UV-visível modelo SPD-M20A, forno CTO-20AC, uma interface CBM-20A e um injetor automático com amostrador SIL-20A. As separações foram realizadas utilizando-se uma coluna Shim-pack VP-ODS-C18 (250 mm x 4,6 mm) conectada a uma pré-coluna Shim-pack Column

Holder (10 mm x 4,6 mm).

Os extratos liofilizados, dissolvidos em água (1:20, m:v), e os padrões fenólicos foram filtrados em membrana de 0,45 μ m (Millipore®) e injetados no cromatógrafo.

Os compostos fenólicos foram identificados por comparação com os tempos de retenção dos padrões. Os padrões utilizados foram: ácido ferúlico, ácido salicílico, ácido siríngico, ácido gálico, ácido cafeico, ácido p-cumárico, ácido vanílico, ácido clorogênico, epicatequina, catequina, galato de epigallocatequina, resveratrol e quercetina. A quantificação foi realizada através da construção de curvas analíticas obtidas por regressão linear, considerando o coeficiente de determinação (R^2) de 0,99 (Marques et al., 2016).

2.4. *Peçonhas de serpentes*

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

2.5. *Obtenção de sangue humano*

Os protocolos que requerem o uso de material biológico humano foram previamente aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos (COEP) da Universidade Federal de Lavras, sob o número de registro CAAE: 56628316.0.0000.5148.

O sangue utilizado foi coletado por punção venosa em tubos contendo heparina (para atividade hemolítica e ensaio cometa), citrato (para atividade coagulante) ou sem anticoagulante (para atividade trombolítica).

2.6. *Atividade de fosfolipases A₂ e lise de eritrócitos*

As atividades fosfolipásica e hemolítica foram avaliadas em meio sólido conforme descrito por Gutiérrez et al. (1988). O gel para avaliação da atividade fosfolipásica foi preparado com CaCl₂ 0,01 mol L⁻¹; lecitinas de gema de ovo (fosfatidilcolina, fosfatidilserina e fosfatidiletanolamina) 1:3 v:v; PBS (pH 7,4); ágar bacteriológico 1% e azida de sódio 0,005%, sendo o meio vertido à 45-50°C em placas de petri. Para a atividade hemolítica o gel foi elaborado substituindo os fosfolipídeos de gema de ovo por um concentrado de eritrócitos humanos (hematócrito a 1%). Após a solidificação dos géis, os tratamentos foram aplicados em

orifícios, e as placas mantidas em câmara de cultivo celular por 12 horas a 37°C.

A inibição de fosfolipases A₂ foi avaliada realizando incubação prévia dos extratos aquoso e etanólico de folhas de *E. macrophyllus*, por 30 minutos a 37°C, com as peçonhas de *Bothrops atrox*, *B. jararacussu* e *B. moojeni* (30 µg), em diferentes proporções (peçonha:extrato, m:m), e a inibição da atividade hemolítica foi avaliada utilizando as peçonhas de *B. jararacussu*, *B. moojeni* e *Crotalus durissus terrificus* (50 µg). Controles contendo apenas peçonha ou extrato vegetal também foram avaliados.

Os halos translúcidos formados ao redor dos orifícios no gel foram medidos (milímetros) e as atividades expressas em porcentagem considerando os controles contendo apenas peçonhas como 100% de atividade.

2.7. Efeitos sobre a dissolução de trombos, coagulação de plasma citratado e fibrinogênólise

A atividade trombolítica foi avaliada em coágulos sanguíneos humanos formados *in vitro*, de acordo com a metodologia descrita por Cintra et al. (2012). Os coágulos foram incubados por 24 horas a 37°C com amostras contendo *B. moojeni* e *Lachesis muta muta* (40 µg), PBS, ou peçonha previamente incubada (30 minutos a 37°C) com os extratos de *E. macrophyllus*. As atividades foram quantificadas pela medida do volume de líquido liberado por cada trombo. Controles contendo apenas peçonhas foram considerados como 100% de atividade e a média dos volumes obtidos no controle negativo (PBS) foi subtraída dos demais tratamentos.

Os efeitos exercidos pelos extratos de *E. macrophyllus* sobre a coagulação do plasma foram avaliados utilizando a metodologia descrita por Rodrigues et al. (2000). Os extratos foram previamente incubados com as peçonhas de *B. moojeni* e *Lachesis muta muta*, as misturas foram então adicionadas a tubos contendo plasma citratado (200 µL), e o tempo cronometrado até a formação do coágulo. A dose coagulante mínima foi definida como a menor quantidade de peçonha capaz de induzir coagulação entre 50 e 180 segundos (Selistre et al., 1990).

Para a avaliação da atividade fibrinogênolítica foi utilizada a eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) a 15% (m:v). Os extratos de *E. macrophyllus* foram previamente incubados com a peçonha de *B. moojeni* (50 µg) por um período de 30 minutos a 37°C, seguindo com adição do fibrinogênio e mais 90 minutos de incubação. As amostras foram submetidas à eletroforese permitindo a observação das cadeias α , β e γ do fibrinogênio, utilizado como controle. Controles contendo fibrinogênio; fibrinogênio e extratos; fibrinogênio e peçonha, foram

realizados.

2.8. Avaliação de genotoxicidade/antigenotoxicidade

O ensaio do cometa foi usado para detectar danos nas moléculas de DNA de leucócitos humanos. Os tratamentos contendo a peçonha de *Lachesis muta muta* (50 µg em 300 µL de PBS) com os extratos de *E. macrophyllus* foram incubados por 30 minutos a 37°C. Em seguida, foram adicionados 300 µL de sangue a cada tratamento e estes permaneceram em câmara de cultura celular por 4 horas a 37°C. Alíquotas de 75 µL dos incubados foram transferidas para tubos contendo 225 µL de agarose de baixo ponto de fusão, sendo preparadas 3 lâminas para cada tratamento (Nandhakumar et al., 2011). As células incluídas nas lâminas foram submetidas à lise osmótica e em seguida à eletroforese (30V, 30 mA durante 30 minutos). Em seguida, os nucleoides permaneceram em solução de neutralização (0,4 M Tris-HCl, pH 7,4) por 30 minutos, e então, foram fixados com etanol, corados com iodeto de propídio e observados em microscópio de epifluorescência. Os níveis de fragmentação dos nucleotídeos foram determinados, conforme descrito por Collins et al. (1997) com adaptações (Reis et al., 2017).

2.9. Ensaaios cinéticos com enzimas digestivas: com e sem simulação de fluido gástrico

As enzimas utilizadas nestes ensaios foram: lipase pancreática suína (EC 3.1.1.3) tipo II, Sigma; α -amilase pancreática suína (EC 3.2.1.1) tipo VI B, Sigma; e tripsina pancreática suína (EC 3.4.21.4), Merck. A α -glicosidase (EC 3.2.1.20) foi obtida a partir do duodeno suíno fresco, de acordo com Pereira et al. (2010).

α -amilases: A atividade de α -amilases foi determinada segundo a metodologia proposta por Noelting e Bernfeld (1948). Assim, 50 µL da amostra e 50 µL de enzima α -amilase foram pré-incubados por 20 minutos em banho-maria a 37°C. Como substrato foi utilizado amido 1% (Tris 0,05 mol L⁻¹, NaCl 38 mmol L⁻¹ e CaCl₂ 0,1 mmol L⁻¹, pH 7,0). Amostras e substrato (100 µL) foram incubados por 10, 20, 30 e 40 minutos. As reações foram interrompidas com adição de ácido 3,5-dinitrosalicílico (200 µL) e o produto quantificado em espectrofotômetro à 540 nm.

α -glicosidases: A atividade de α -glicosidases foi determinada de acordo com Kwon et al. (2008), utilizando 5 mmol L⁻¹ de p-nitrofenil- α -D-glicopiranosídeo como substrato, preparado em tampão citrato-fosfato 0,1 mol L⁻¹, pH 7,0. No ensaio, 50 µL dos extratos de *E. macrophyllus* e 100 µL de enzima foram incubados em banho a 37 °C, após adição de 50 µL do substrato, por 10,

20, 30 e 40 minutos. As reações foram interrompidas com adição de 1.000 μL de NaOH 0,05 mol L^{-1} e o produto quantificado em espectrofotômetro à 410 nm.

Lipases: A atividade de lipases foi determinada de acordo com Souza et al. (2011), utilizando 8 mmol L^{-1} de p-nitrofenilpalmitato como substrato, preparado em tampão Tris-HCl 0,05 mmol L^{-1} e 0,5% Triton X-100, pH 8,0. No ensaio, 50 μL dos extratos e 100 μL da enzima foram incubados em banho a 37°C, após adição de 50 μL do substrato, por 10, 20, 30 e 40 minutos. As reações foram interrompidas com banho de gelo e adição de 1.000 μL de tampão Tris-HCl 0,05 mmol L^{-1} , pH 8,0 e o produto foi quantificado em espectrofotômetro à 410 nm.

Tripsinas: A atividade de tripsinas foi determinada segundo a metodologia descrita por Erlanger et al. (1961). Assim, 200 μL dos extratos e 200 μL de enzima foram incubados em banho a 37°C, por 10, 20, 30 e 40 minutos, após adição de 800 μL do substrato p-benzoil-D-L arginina p-nitroanilida (BApNA), preparado em tampão 0,05 mmol L^{-1} Tris, pH 8,2. As reações foram interrompidas com adição de 200 μL de ácido acético 30% e o produto quantificado em espectrofotômetro à 410 nm.

2.9.1. Simulação do fluido gástrico

As atividades enzimáticas foram também avaliadas após incubação dos extratos com o fluido gástrico simulado (preparado de acordo com The United States Pharmacopeia, 2005), por 1 h em banho a 37°C. Antes dos ensaios de atividades os incubados foram neutralizados com bicarbonato de sódio até pH 7,2.

2.9.2. Análise dos dados

Para atender a faixa de segurança de 40 a 80% de inibição enzimática, foram avaliadas diferentes concentrações dos extratos, aquoso e etanólico.

As inibições das enzimas foram obtidas a partir da determinação das inclinações das retas (absorbância x tempo) correspondentes aos valores obtidos para a enzima controle (sem extratos) e enzimas + amostra (extratos aquoso ou etanólico) nos ensaios de atividade. A inclinação da reta corresponde à velocidade de formação do produto por minuto de reação. A presença de agentes inibidores resulta em diminuição dessa inclinação. Os valores de absorbância foram convertidos em micromols de produto com base em dados obtidos a partir de curvas padrão elaboradas com glicose (para a α -amilase) e com p-nitrofenol (para glicosidase e lipase). Para tripsina, o cálculo

de unidades de inibição foi realizado pelo coeficiente de extinção molar do BApNA, determinado por Erlanger et al. (1961).

2.10. Análise estatística

Os resultados foram apresentados como a média de triplicatas \pm desvio padrão obtidos em três ensaios independentes. Os dados foram avaliados estatisticamente por análise de variância, e as médias comparadas usando o teste Tukey com auxílio do programa estatístico ($p < 0,05$) (R Core Team, 2012).

3. Resultados e Discussão

Os resultados da triagem fitoquímica indicaram a presença de catequinas, flavonoides, esteroides e triterpenos, cumarinas, saponinas e alcaloides, no extrato etanólico de *Echinodorus macrophyllus*. Enquanto que, no extrato aquoso foram detectados apenas flavonoides, depsídeos e depsídonas.

Os teores de compostos fenólicos em ambos os extratos de *E. macrophyllus* são apresentados na Tabela 1 e Figura 1. O extrato aquoso apresentou 2,4 vezes mais teores de compostos fenólicos do que o extrato etanólico, além dos extratos apresentarem diferentes composições, considerando a detecção de epicatequina e ácido ferúlico apenas no extrato aquoso.

Tabela 1. Teor de compostos fenólicos nos extratos aquoso e etanólico de folhas de *Echinodorus macrophyllus*.

Compostos fenólicos (mg 100g ⁻¹)	Extrato aquoso	Extrato etanólico
Ácido gálico	22,40 \pm 0,40	15,13 \pm 0,67
Catequina	125,29 \pm 2,77	145,93 \pm 1,00
Ácido clorogênico	30,34 \pm 0,49	18,00 \pm 0,46
Epicatequina	155,46 \pm 0,89	ni
Ácido <i>p</i> -cumárico	290,71 \pm 4,71	89,44 \pm 1,17
Ácido ferúlico	31,43 \pm 0,34	ni
Resveratrol	21,13 \pm 0,30	18,00 \pm 0,48
Σ Compostos fenólicos	676,76	286,5

Os resultados correspondem às médias de triplicatas e os desvios padrão calculados. ni = não identificado.

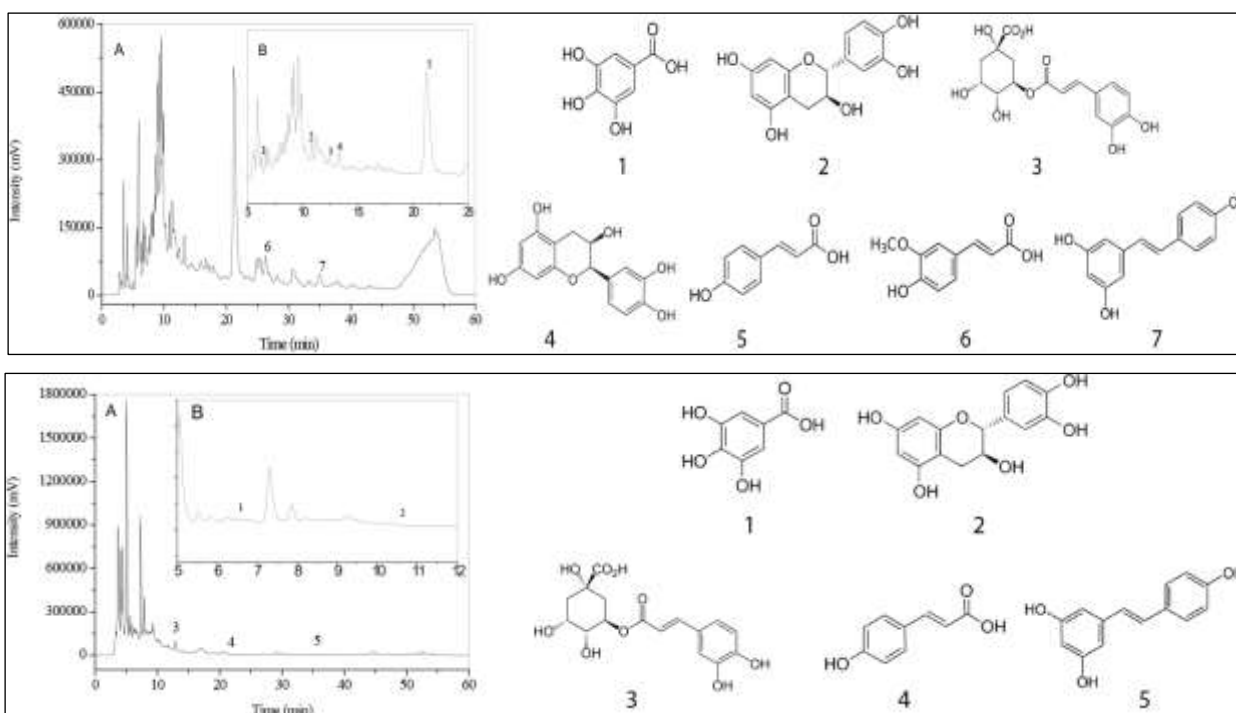


Figura 1. Imagem superior: (A) Cromatograma do extrato aquoso de folhas de *Echinodoros macrophyllus*, com identificação dos picos: 1. ácido gálico (tempo = 6,301 min); 2. catequina (tempo = 10,864 min); 3. ácido clorogênico (tempo = 12,429 min); 4. epicatequina (tempo = 13,272 min); 5. ácido p-cumárico (tempo = 21,225 min); 6. ácido ferúlico (tempo = 26,222 min) e 7. resveratrol (tempo = 35,000). **(B)** Expansão do cromatograma de 5 a 25 min. **Imagem inferior: (A)** Cromatograma do extrato etanólico de folhas de *Echinodoros macrophyllus*, com identificação dos picos: 1. ácido gálico (tempo = 6,560 min); 2. catequina (tempo = 10,867 min); 3. ácido clorogênico (tempo = 12,592 min); 4. ácido p-cumárico (tempo = 21,468 min); e 5. resveratrol (tempo = 35,017 min). **(B)** Expansão do cromatograma de 5 a 12 min.

Os compostos fenólicos têm despertado grande interesse para a área médica, por apresentarem propriedades farmacológicas, tais como as atividades citotóxicas e quimioprotetoras (Dai; Mumper 2010). A ingestão desses compostos a longo prazo, pode reduzir a incidência de inúmeras doenças que afetam a população mundial, como diferentes tipos de câncer, diabetes tipo II, cardiovasculares e do sistema nervoso (Squillaro et al., 2018).

Alguns compostos bioativos, como saponinas, flavonoides, alcaloides, triterpenos e esteroides, já foram identificados na espécie *E. macrophyllus* (Tanus-Rangel et al., 2010), o que corrobora com o presente estudo. Entretanto, são os flavonoides que têm sido relacionados ao efeito anti-inflamatório dessa espécie (Tanus-Rangel et al., 2010; Silva et al., 2016). A fração enriquecida por flavonoides do extrato aquoso de *E. macrophyllus* foi capaz de inibir a

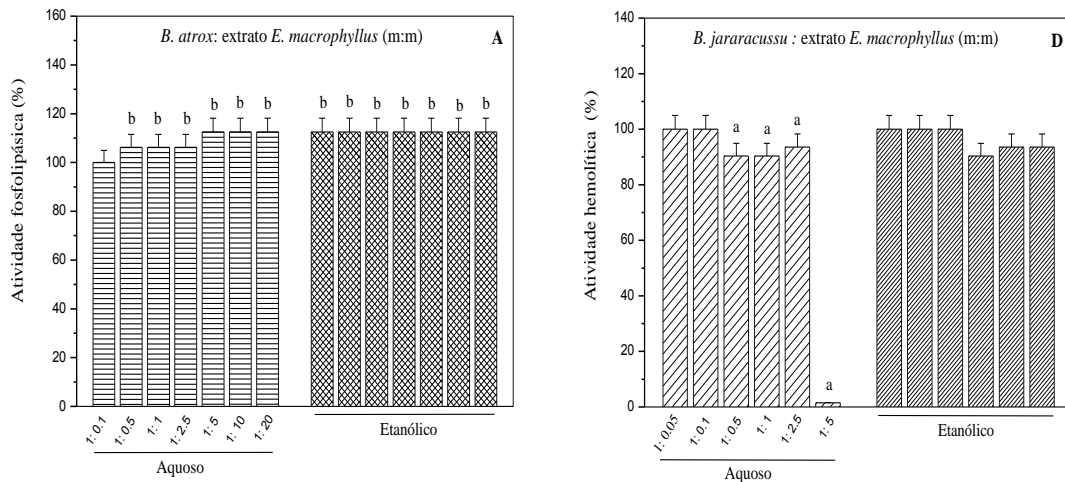
inflamação induzida por carragenina em camundongos, além de reduzir os níveis de óxido nítrico, leucotrieno B4 e a migração de neutrófilos (Silva et al., 2016).

Os flavonoides também podem atuar na proteção de plaquetas contra o estresse peroxidativo, modulando a atividade de enzimas envolvidas no metabolismo do ácido araquidônico, reduzindo a liberação de intermediários reativos de oxigênio, além de inibir a ativação plaquetária e a formação de coágulos (Vitseva et al., 2005; Faggio et al., 2017).

Desta forma, os compostos fenólicos presentes nos vegetais representam moléculas promissoras para serem utilizadas como agentes terapêuticos, contudo a eficácia desses compostos depende de sua metabolização e biodisponibilidade (Squillaro et al., 2018).

Atividade de fosfolipases A₂ e lise de eritrócitos

Os extratos, aquoso e etanólico de *E. macrophyllus*, potencializaram significativamente a atividade fosfolipásica induzida pela peçonha de *Bothrops atrox* em 6,2% e 12,5% nas proporções avaliadas (Figura 2A). Para a peçonha de *B. jararacussu*, foram observadas inibições de 7,1% após incubação com o extrato aquoso nas proporções de 1:0,1 a 1:2,5 (m:m) e com o extrato etanólico em todas as proporções (Figura 2B). Apenas o extrato aquoso, nas maiores proporções, inibiu (7%) a atividade fosfolipásica induzida pela peçonha de *B. moojeni* (Figura 2C).



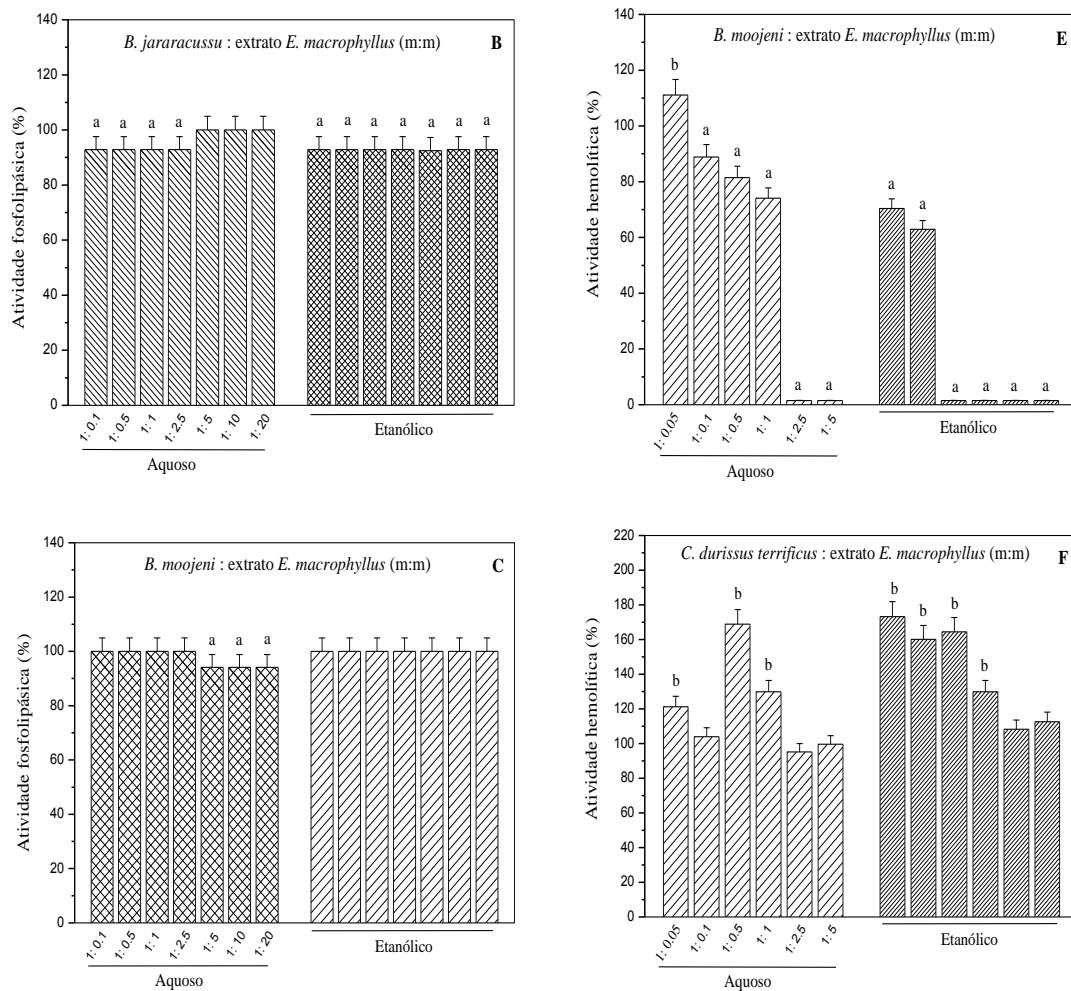


Figura 2. Atividade fosfolipásica (%) induzida por peçonhas de *Bothrops atrox* (A), *Bothrops jararacussu* (B) e *Bothrops moojeni* (C), previamente incubadas com os extratos aquoso e etanólico de folhas de *Echinodorus macrophyllus*. **Atividade hemolítica (%)** induzida por peçonhas de *Bothrops jararacussu* (D), *Bothrops moojeni* (E) e *Crotalus durissus terrificus* (F), previamente incubadas com os extratos aquoso e etanólico de folhas de *Echinodorus macrophyllus*. Controles (+) contendo apenas peçonhas (30 µg para fosfolipases e 50 µg para hemólise) foram considerados como 100% de atividade. Os resultados correspondem às médias de triplicatas de dados obtidos em cada proporção (peçonha: extrato, m:m) e os desvios padrão calculados. a. difere estatisticamente do respectivo controle positivo pelo teste Tukey ($p < 0,05$), em inibição. b. difere em potencialização.

As fosfolipases A₂ de peçonhas de serpentes, catalisam a hidrólise de fosfolipídeos na ligação éster do carbono 2, causando danos nas membranas celulares e liberando lisofosfolipídeos e ácidos graxos. A hidrólise dos fosfolipídeos resulta em ativação da resposta inflamatória e cascata de coagulação devido à produção de eicosanoides, pela ação de cicloxigenases e

lipoxigenases sobre a estrutura do ácido araquidônico (Leanpolchareanchai et al., 2009).

Diversos grupos de pesquisa investigam compostos naturais com ação inibidora sobre fosfolipases de peçonhas de serpentes, uma vez que estas apresentam alta homologia estrutural e funcional com fosfolipases humanas, atuantes em diversos processos fisiológicos, permitindo simular os efeitos desses compostos em organismos animais (Sales et al., 2017).

A atividade inibitória sobre as fosfolipases A_2 associada à presença de compostos fenólicos, como ácido gálico, ácido cafeico e galato de epigallocatequina, tem sido descrita para diferentes extratos vegetais com ação inibitória e/ou preventiva sobre processos inflamatórios (Pereañez et al., 2013; Thibane et al., 2018 *in press*).

Assim, a inibição de fosfolipases observada no presente trabalho pode ser parcialmente atribuída a presença de ácidos fenólicos e flavonoides nos extratos de *E. macrophyllus*, uma vez que estes estão associados a uma menor produção de mediadores inflamatórios com ação sobre fosfolipases e cicloxigenases (Nworu; Akah, 2015).

A atividade hemolítica está apresentada na Figura 2. O ensaio de lise de eritrócitos tem sido utilizado como modelo experimental *in vitro* para investigar efeitos tóxicos e anti-citotóxicos de uma grande variedade de compostos naturais, químicos e sintéticos. No presente estudo, verificou-se que os extratos vegetais, não induziram hemólise nas condições, de concentração e tempo de incubação, avaliadas. Entretanto, os extratos alteraram a atividade hemolítica exercida pelas peçonhas.

O extrato aquoso de *E. macrophyllus* na proporção de 1:5 (peçonha:extrato, m:m) inibiu 100% a atividade hemolítica induzida pela peçonha de *B. jararacussu* (Figura 2D). Sobre a hemólise induzida pela peçonha de *B. moojeni*, os extratos aquoso e etanólico exerceram inibições estatisticamente significativas, variando de 11 a 100% e 30 a 100%, respectivamente (Figura 2E). Ambos extratos aquoso e etanólico potencializaram a hemólise induzida pela peçonha de *C. durissus terrificus*, com maior ação nas proporções 1:0,5 (68%) e 1:0,05 (73%), respectivamente (Figura 2F).

Estudos realizados por Assafim et al. (2011) demonstraram que o extrato etanólico de *Hypericum brasiliense* inibiu 100% a atividade hemolítica induzida pela peçonha de *B. jararaca* na proporção de 1:50 (m:m). Diferentemente, Simão et al. (2015), relataram a indução de hemólise por extrato aquoso de *Pereskia grandifolia*, possivelmente resultante de interações dos constituintes do extrato com estruturas que compõem as membranas eritrocitárias. Estes

pesquisadores atribuíram em parte, a ação hemolítica, à presença de saponinas no extrato de *P. grandifolia*.

As saponinas possuem a capacidade de interagir com os esteróis, presentes na membrana plasmática dos eritrócitos, aumentando a permeabilidade da membrana e permitindo a entrada excessiva de íons e água nas células, resultando em sua ruptura (Karabaliev; Kochev, 2003). Considerando os resultados obtidos no presente estudo, as saponinas presentes nos extratos de *E. macrophyllus*, podem representar uma das hipóteses para explicar a potencialização da ação hemolítica exercida pelas peçonhas em algumas proporções analisadas.

Dessa forma, os efeitos sinérgicos e aditivos dos compostos fenólicos (Lidija, 2015), presentes nos extratos de *E. macrophyllus*, podem ser observados nas inibições e/ou potencializações das atividades exercidas por fosfolipases A₂ e proteases (metaloproteases e serinoproteases), sendo estes efeitos oscilantes em relação às diferentes concentrações avaliadas.

Os compostos fenólicos também podem se ligar ao sítio ativo ou a um sítio de coordenação de cofatores iônicos, promovendo mudanças conformacionais nas enzimas, e conseqüentemente alterando sua atividade catalítica (Sales et al., 2017).

Efeitos sobre a dissolução de trombos, coagulação de plasma citratado e fibrinogênolise

A atividade trombolítica induzida por peçonhas de *B. moojeni* e *Lachesis muta muta*, previamente incubadas com os extratos aquoso e etanólico de *E. macrophyllus*, está apresentada na Figura 3. O extrato aquoso potencializou a lise dos trombos induzida pela peçonha de *B. moojeni* nas proporções 1:0,5 e 1:1 (m:m) em 35 e 25% respectivamente, e na proporção 1:5 foi observada inibição de 51%. O extrato etanólico inibiu a atividade trombolítica nas proporções 1:1, 1:2,5 e 1:5 (m:m), sendo que na maior proporção a inibição foi de 34% (Figura 3A).

Para a peçonha de *L. muta muta*, a atividade trombolítica foi potencializada pelo extrato aquoso em 43% (1:0,5, m:m), e pelo extrato etanólico em 47% (1:2,5 e 1:5, m:m) (Figura 3B).

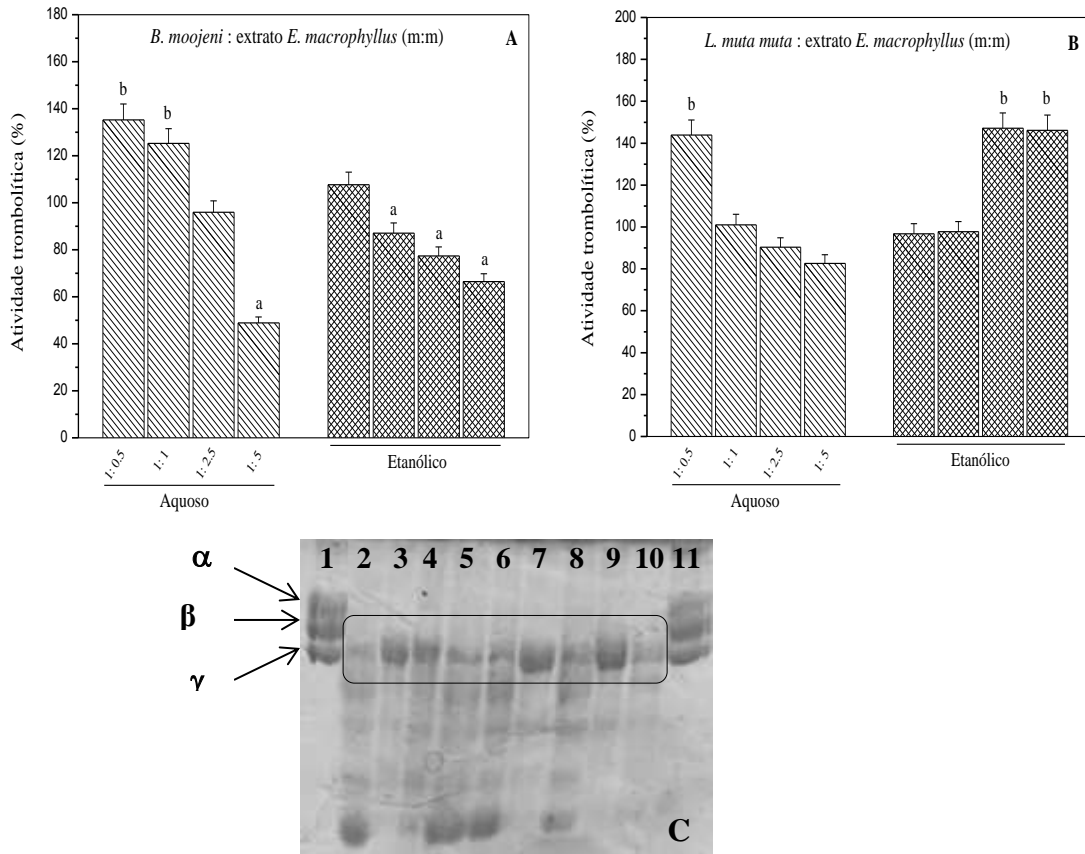


Figura 3. Atividade trombolítica (%) induzida por peçonhas de serpentes das espécies *Bothrops moojeni* (A), *Lachesis muta muta* (B), previamente incubadas com os extratos aquoso e etanólico de folhas de *Echinodorus macrophyllus*. Controles (+) contendo apenas peçonhas (40 µg) foram considerados como 100% de atividade. Os resultados correspondem às médias de triplicatas e os desvios padrão calculados. a. difere estatisticamente do respectivo controle positivo pelo teste Tukey ($p < 0,05$), em inibição. b. difere em potencialização. **Atividade fibrinogenolítica:** (C) Perfil eletroforético (SDS-PAGE) para avaliar o efeito dos extratos de *Echinodorus macrophyllus* sobre a fibrinogenólise induzida pela peçonha de *Bothrops moojeni*. 1- fibrinogênio (60 µg); 2- *B. moojeni* (60 µg) + fibrinogênio; 3- *B. moojeni* + fibrinogênio + extrato aquoso de *E. macrophyllus* - EAEM (1:0,5; m:m); 4- *B. moojeni* + fibrinogênio + EAEM (1:1; m:m); 5- *B. moojeni* + fibrinogênio + EAEM (1:2,5; m:m); 6- *B. moojeni* + fibrinogênio + EAEM (1:5; m:m); 7- *B. moojeni* + fibrinogênio + extrato etanólico de *E. macrophyllus*- EEEM (1:0,5; m:m); 8- *B. moojeni* + fibrinogênio + EEEM (1:1; m:m); 9- *B. moojeni* + fibrinogênio + EEEM (1:2,5; m:m); 10- *B. moojeni* + fibrinogênio + EEEM (1:5; m:m); 11- fibrinogênio (60 µg).

A trombina é uma serinoprotease que apresenta papel fundamental nos processos de coagulação sanguínea e cicatrização de feridas, sendo responsável por catalisar a conversão do fibrinogênio em fibrina (Zhang et al., 2017). Entretanto, o acúmulo de fibrina, no interior dos

vasos sanguíneos, induzido, por exemplo, por ativação excessiva de trombina e fator X, resulta em trombose, que corresponde a doença cardiovascular mais frequente e a principal causa de mortalidade no mundo (Bora et al., 2018).

Portanto, uma das estratégias para o tratamento de doenças trombóticas, é a redução da atividade de enzimas da cascata de coagulação sanguínea, como, por exemplo, a trombina, com o uso de compostos vegetais, considerando que os inibidores sintéticos para estas enzimas estão associados a sérios efeitos colaterais como, por exemplo, hemorragias (Bora et al., 2018).

Choi et al. (2015) relataram a atividade inibidora do flavonoide, kaempferol (30 µg), sobre a trombina e o fator Xa, sendo descrita uma redução de 71% na formação de polímeros de fibrina. No mesmo contexto, o extrato etanólico das folhas de *Brownea rosademonte* foi descrito com ação inibitória sobre as proteases trombina-símile presentes na peçonha de *B. asper* (Salazar et al., 2014), e o extrato metanólico de *Leucas lavandulifolia* atuando na lise de coágulos, teve sua ação associada a presença de taninos e alcaloides em sua composição (Islam et al., 2017).

No presente estudo, diferentes proporções dos extratos incubados com as peçonhas de *B. moojeni* e *L. muta muta*, aumentaram a dissolução de trombos sanguíneos (Figura 3), sugerindo que os diferentes compostos presentes nos extratos, principalmente flavonoides e alcaloides, poderiam atuar como inibidores de trombina, com potencial de aplicação no tratamento de doenças trombóticas (Choi et al., 2015; Chang et al., 2018), ou como potencializadores de proteases hemorrágicas.

O fibrinogênio é uma glicoproteína plasmática que desempenha importante função na coagulação e agregação plaquetária, sendo constituído de três pares de cadeias polipeptídicas (cadeia alfa, beta e gama), ligadas entre si por interações dissulfeto (Chapin; Hajjar, 2015). A quebra de suas cadeias pode levar a alterações no processo de coagulação com consequente indução de hemorragias e/ou formação de coágulos sanguíneos.

Dessa forma, o potencial fibrinogenolítico de toxinas de peçonhas têm sido avaliado, uma vez que, o fibrinogênio, utilizado como substrato permite determinar a ação de proteases e seus inibidores sobre a cascata de coagulação sanguínea e demais processos dependentes desta, além de permitir a caracterização de compostos naturais com propriedades antiofídicas.

O extrato aquoso de *E. macrophyllus* inibiu parcialmente a fragmentação de moléculas de fibrinogênio, induzida por proteases presentes na peçonha de *B. moojeni*, nas proporções de 1:0,5 e 1:1 (m:m) (Figura 3, Linhas 3 e 4). Para o extrato etanólico, atividade similar foi observada nas

proporções 1:0,5 e 1:2,5 (Figura 3, Linhas 7 e 9). As fibrinogenases induzem a formação de coágulos sanguíneos por meio da formação de redes de fibrina resultantes da quebra das cadeias de fibrinogênio, assim, os extratos podem ser considerados inibidores de proteases e ainda atuarem na redução da formação de coágulos.

Os resultados da atividade coagulante corroboram com a inibição exercida pelos extratos, observada sobre a fibrinogenólise, uma vez que a incubação prévia de peçonhas de serpentes com os extratos resultou em aumento no tempo de coagulação do plasma citratado (Tabela 2).

Em estudos realizados por Vale et al. (2011), flavonoides isolados (galocatequina e miricetina-3-O-glicosídeo) da espécie *Schizolobium parahyba* apresentaram ação inibidora sobre a atividade fibrinogenolítica induzida por metaloproteases de *B. jararacussu*. A degradação das cadeias α , β e γ das moléculas de fibrinogênio, induzida pelas peçonhas de *B. atrox*, *B. jararaca* e *B. jararacussu*, também foi inibida provavelmente por compostos fenólicos presentes no extrato de *Humirianthera ampla*, conforme descrito por Strauch et al. (2013).

Para os testes de indução de coagulação em plasma citratado foram utilizadas doses coagulantes mínimas, pré-determinadas, sendo estas 5 μg e 10 μg de peçonhas de *B. moojeni* e *Lachesis muta muta*, respectivamente. Na análise dos resultados foram considerados valores padrões obtidos em coagulogramas realizados nas rotinas de laboratórios de análises clínicas. Dessa forma, valores de tempos obtidos nos tratamentos iguais ou superiores em 10 segundos, aos tempos obtidos no controle positivo, foram considerados significativamente diferentes deste, uma vez que alguns processos da cascata de coagulação, como a ativação da protrombina (normalmente entre 10 e 14 segundos) e ativação parcial de tromboplastina (normalmente entre 24 e 40 segundos) podem ocorrer entre 10 e 24 segundos.

Os extratos, aquoso e etanólico de *E. macrophyllus*, previamente incubados com a peçonha de *B. moojeni* nas proporções analisadas, promoveram aumentos no tempo de coagulação do plasma citratado, em relação ao controle de 24 a 67 segundos e 21 a 51 segundos, respectivamente (Tabela 2).

O extrato aquoso quando previamente incubado com a peçonha de *L. muta muta*, promoveu aumento no tempo de coagulação, nas proporções analisadas 1:1 (m:m) (28 seg.), 1:2,5 (50 seg.), 1:5 (66 seg.) e 1:10 (67 seg.). O extrato etanólico, agindo sobre a mesma peçonha, em todas as proporções analisadas, também induziu aumentos no tempo de coagulação do plasma, sendo observados tempos de coagulação de 22 a 85 segundos, superiores ao controle (Tabela 2).

Tabela 2. Efeito dos extratos aquoso e etanólico de folhas de *Echinodorus macrophyllus* sobre a atividade coagulante induzida por peçonhas de serpentes das espécies *Bothrops moojeni* e *Lachesis muta muta*, sobre plasma humano citratado.

	Proporção peçonha: extrato (m:m)	Tempo de coagulação (s)	
		<i>Bothrops moojeni</i>	<i>Lachesis muta muta</i>
Extrato aquoso	1:0,5	75,33 ± 3,79	90,00 ± 6,08
	1:1	94,00 ± 4,36 ^a	123,67 ± 8,74 ^a
	1:2,5	98,00 ± 10,56 ^a	146,33 ± 7,23 ^a
	1:5	122,67 ± 5,13 ^a	162,00 ± 4,36 ^a
	1:10	136,67 ± 1,15 ^a	163,33 ± 9,45 ^a
Extrato etanólico	1:0,5	90,33 ± 6,66 ^a	118,33 ± 9,07 ^a
	1:1	96,00 ± 4,51 ^a	133,33 ± 2,52 ^a
	1:2,5	110,67 ± 7,51 ^a	140,00 ± 6,24 ^a
	1:5	115,67 ± 3,79 ^a	157,00 ± 5,13 ^a
	1:10	120,67 ± 2,08 ^a	181,67 ± 8,33 ^a
	Controle	69,67 ± 3,21*	96,00 ± 7,37**

*O controle foi realizado com 5µg da peçonha avaliada. **O controle foi realizado com 10 µg da peçonha avaliada. Os resultados são apresentados como a média de triplicatas ± desvio padrão. ^adifere dos respectivos controles positivos em valores iguais ou superiores a 10 segundos, pelo teste Tukey (p < 0,05).

Para prevenir a perda de sangue, o sistema hemostático, necessita do equilíbrio entre a formação de fibrina (coagulação) e a dissolução da mesma (fibrinólise) e, portanto, qualquer alteração nesse sistema pode ocasionar sérios problemas como trombose ou hemorragia (Pereira; Brazón, 2015). Dessa forma, o desenvolvimento de coagulopatias relacionam-se a ativação excessiva local ou sistêmica da coagulação, ou à atividade fibrinolítica local ou sistêmica excessiva (Rasche, 2001).

Neste contexto, destacam-se enzimas envolvidas na cascata de coagulação, dentre elas, metaloproteases hemorrágicas que atuam como anticoagulantes; metaloproteases pró-coagulantes que induzem a formação de redes de fibrina, como as fibrinogenolíticas; serinoproteases que também podem atuar como anticoagulantes, porém com menor eficiência, já que são responsáveis pela formação de coágulos friáveis; e por último, algumas fosfolipases A₂ que também podem agir como pró-coagulantes (Cate et al., 2017).

Desta maneira, a busca por inibidores de fosfolipases e proteases, em extratos vegetais é de grande importância no âmbito da manutenção fisiopatológica e/ou no controle dos distúrbios da hemostasia, visto que, a ação de compostos vegetais na formação de complexos com íons cálcio pode resultar não apenas na inibição de fosfolipases A₂, mas também em ação anticoagulante, uma vez que o cálcio é cofator essencial para a atividade de proteases humanas que atuam na cascata de coagulação (Moura et al., 2016).

Ambos os extratos de *E. macrophyllus*, quando previamente incubados com diferentes peçonhas, aumentaram o tempo de coagulação, provavelmente por agirem como inibidores sobre algumas enzimas coagulantes e, podendo ser futuramente explorados com potencial de aplicação no tratamento de doenças cardiovasculares. Porém, para compreender tais ações, no intuito de avaliar suas doses e formulações de uso eficazes e seguras, novos estudos ainda são necessários, permitindo a exploração do potencial farmacológico dos extratos.

Teste do cometa

Nos resultados da fragmentação de moléculas de DNA, não houve diferença estatística entre os nucleoides tratados com os extratos de *E. macrophyllus*, quando incubados com a peçonha de *L. muta muta*, e os sem tratamento (controle negativo) nas classes de danos de 1 à 4 (Tabela 3), destacando o potencial antígenotóxico dos extratos.

Tabela 3. Média do número de nucleoides por classe de cometa após tratamento com os extratos aquoso e etanólico de folhas de *Echinodorus macrophyllus* previamente incubados com a peçonha de *Lachesis muta muta*.

Tratamentos		Classes cometa (Danos %)					
		0 (≤ 5)	1 (5–20)	2 (20–40)	3 (40–85)	4 (≥ 85)	
C (-)		49,9 \pm 5,4a	48,0 \pm 7,1a	2,1 \pm 0,8b	0,0 \pm 0,0c	0,0 \pm 0,0b	
C (+)*		2,1 \pm 0,8d	12,8 \pm 6,2c	44,3 \pm 5,4a	31,9 \pm 7,3a	8,9 \pm 4,7a	
C (+)**		10,1 \pm 4,4c	31,1 \pm 0,7b	39,6 \pm 6,1a	9,7 \pm 3,2b	6,4 \pm 0,7a	
Peçonha: extrato <i>E.</i> <i>macrophyllus</i> (m:m)	Aquoso	(1:0,5)	35,7 \pm 7,0b	57,2 \pm 4,5a	10,3 \pm 1,7b	0,0 \pm 0,0c	0,0 \pm 0,0b
		(1:1)	36,2 \pm 4,8b	56,0 \pm 8,3a	7,7 \pm 3,0b	0,0 \pm 0,0c	0,0 \pm 0,0b
	Etanólico	(1:0,5)	33,8 \pm 2,8b	59,2 \pm 2,5a	6,0 \pm 0,3b	0,0 \pm 0,0c	0,0 \pm 0,0b
		(1:1)	34,5 \pm 3,8b	55,2 \pm 0,8a	11,5 \pm 2,2b	0,0 \pm 0,0c	0,0 \pm 0,0b

C (-): apenas a solução sanguínea. C (+)*: *Lachesis muta muta* (50 $\mu\text{g mL}^{-1}$). C (+)**: Doxorubicina (100 $\mu\text{g mL}^{-1}$), droga antitumoral genotóxica. Os valores representam a média de 3 testes realizados com sangue de voluntários diferentes, sendo observados 300 nucleoides por tratamento/voluntário, contabilizando um total de 900 nucleoides/tratamento. Mesmas letras nas colunas não diferem entre si pelo teste Tukey ($p < 0,05$).

A frequência média de danos (Figura 4A) e os valores de unidades arbitrárias (U.A.) (Figura 4B) demonstraram que ambos os extratos de *E. macrophyllus* reduziram a fragmentação das moléculas de DNA induzida pela peçonha de *L. muta muta*, tendo portanto, ação anti-genotóxica. As U.A. foram de 74,3 e 78,2 para os extratos aquoso e etanólico, respectivamente, sendo aproximadamente 3 vezes menores que o valor obtido para o controle positivo (peçonha) de 232,7.

Os controles dos extratos puros nas concentrações de 250 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ também foram realizados, sendo que os extratos aquoso e etanólico, na maior concentração, induziram fragmentação do DNA, possivelmente, devido a brusca alteração no ambiente de incubação celular, ressaltando ainda que os níveis de danos foram 24% e 13% menores, respectivamente, que os observados para a peçonha de *L. muta muta* (resultados não apresentados).

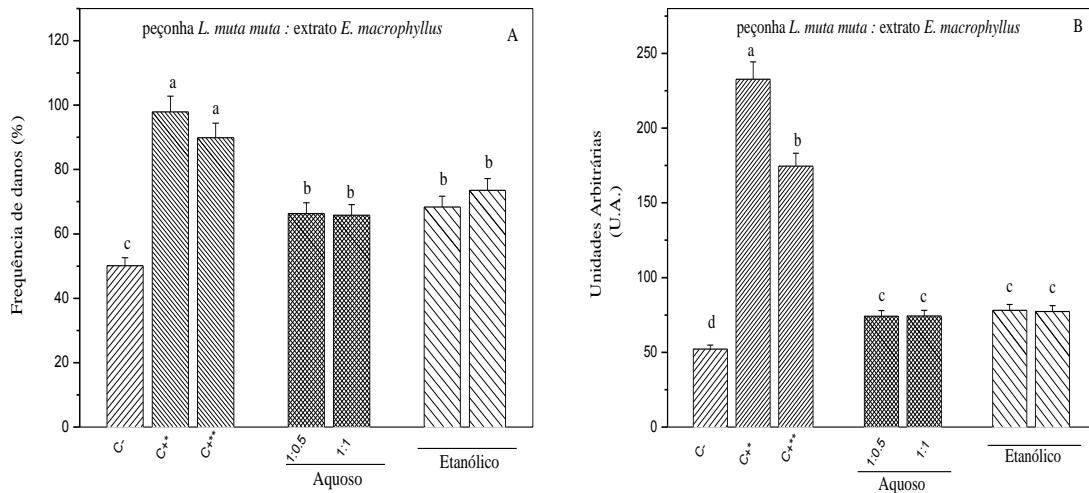


Figura 4. Ensaio cometa. (A) Frequência de danos (%). **(B)** Unidades arbitrárias, calculadas de acordo com Collins (2004). Mesmas letras não diferem entre si pelo teste Tukey ($p < 0,05$).

Danos ao DNA avaliados pelo teste do cometa são amplamente utilizados em ensaios de genotoxicidade e estudos sobre mecanismos de dano e reparo do DNA, uma vez que, o teste cometa representa uma técnica de alta sensibilidade, segura e confiável, visto que permite avaliar danos em células individuais (Vaz et al., 2016).

O extrato aquoso de *E. macrophyllus* foi previamente avaliado por Lopes et al. (2000) e estes autores verificaram a ausência de citotoxicidade *in vitro* sobre células de epitélio renal e fígado de camundongos. Vaz et al. (2016) descreveram para o extrato etanólico da mesma espécie vegetal, a ausência de ação genotóxica nas doses avaliadas.

O efeito de extratos brutos da espécie *Echinodorus grandiflorus* sobre moléculas de DNA de leucócitos de camundongos Swiss foram também analisados (Silva et al., 2010), sendo observados scores de danos não genotóxicos, similares aos obtidos no controle negativo. Segundo os mesmos pesquisadores a ausência de genotoxicidade foi atribuída à presença de compostos presentes nos extratos, como saponinas, esteroides e flavonoides, considerados protetores junto a estabilidade de moléculas proteicas e de DNA. No presente estudo, também foram identificados flavonoides, esteroides e saponinas nos extratos de *E. macrophyllus*, sugerindo a participação destes compostos na proteção das moléculas de DNA, exercendo assim ação antigenotóxica contra as toxinas presentes na peçonhas de *L. muta muta*.

Inibição de enzimas digestivas

O resultado dos efeitos moduladores dos extratos aquoso e etanólico de *E. macrophyllus* sobre as enzimas α -amilase, α -glicosidase, lipase e tripsina, avaliados antes e após exposição ao fluido gástrico simulado, estão apresentados na Tabela 4.

Tabela 4. Efeito dos extratos, aquoso e etanólico de folhas de *Echinodorus macrophyllus* sobre a atividade de enzimas digestivas, avaliado antes e após a simulação do fluido gástrico.

Enzima	<i>Echinodorus macrophyllus</i>							
	Extrato aquoso				Extrato etanólico			
	Inibição antes da exposição		Inibição após a exposição		Inibição antes da exposição		Inibição após a exposição	
	(UEI) ^a	(%)	(UEI) ^a	(%)	(UEI) ^a	(%)	(UEI) ^a	(%)
α -amilase	ns	26,29	nd	nd	7,85±1,21	53,62	11,59±0,39	68,36
α -glicosidase	1,00±0,09	60,0	1,03±0,04	70,46	0,70±0,05	42,84	0,72±0,04	49,54
Lipase	ns	37,1	nd	nd	ns	27,24	nd	nd
Tripsina	ns	11,95	nd	nd	ns	26,73	nd	nd

Dados de cinco repetições, com média \pm desvio padrão.

^aO extrato de *Echinodorus macrophyllus* medido para cada uma das enzimas foi diluído para fornecer uma inibição entre 40% e 80%, a fim de garantir a confiabilidade dos resultados.

UEI = Unidade de Enzima Inibida em $\mu\text{mol min}^{-1}\text{g}^{-1}$ amostra (extrato)

nd = inibição não determinada

ns = inibição não significativa

O extrato etanólico apresentou inibição de 53,62% sobre a enzima α -amilase, e após exposição ao fluido gástrico simulado houve um aumento de 27,5% na inibição observada.

Para a atividade da α -glicosidase, os extratos aquoso e etanólico de *E. macrophyllus*, apresentaram inibição de 1,00 e 0,70 $\mu\text{mol min}^{-1}\text{g}^{-1}$, respectivamente, que equivalem em ordem à 60,0% e 42,84%. Porém, os extratos aquoso e etanólico, após passagem pela simulação de fluido gástrico, apresentaram ações inibitórias de 70,46% e 49,54%, respectivamente. O aumento da inibição enzimática, exercida pelos extratos, após a exposição ao fluido gástrico simulado, pode ser explicada pela ionização de grupos ativos resultante da alteração no pH.

A inibição de α -amilase e α -glicosidase pode ser usada como estratégia para controlar a hiperglicemia pós-prandial, que caracteriza um fator de risco para o desenvolvimento de complicações micro e macrovasculares decorrentes do diabetes *mellitus* (Justino et al., 2018).

Alguns compostos fenólicos, devido à sua capacidade de se ligarem a proteínas, já foram relatados como inibidores de hidrolases glicosídicas. Segundo Justino et al. (2018) a presença de

compostos como ácido clorogênico, ácido cafeico, catequina, quercetina e rutina em extratos de *Annona muricata* está relacionada a ação inibitória sobre α -amilase e α -glicosidase, observada pelos autores. Estes pesquisadores sugerem um mecanismo de inibição enzimática pela ação de muitos grupos hidroxilas presentes nos compostos fenólicos.

A inibição da atividade da α -glicosidase também foi relatada para o extrato hidroalcoólico de *Moringa stenopetala*, rico em compostos fenólicos e flavonoides (Toma et al., 2014). A presença de flavonoides, detectados nos extratos de *E. macrophyllus*, também pode ter contribuído para a ação inibidora sobre as enzimas α -amilase e α -glicosidase, uma vez que estes compostos têm sido descritos como responsáveis por efeitos antiaterogênicos, anti-hiperglicêmicos, oxidação de lipoproteínas, agregação plaquetária e reatividade vascular (Mukherjee et al., 2006).

Franco et al. (2018) relataram para o extrato etanólico da espécie *Echinodorus grandiflorus* valores de inibição sobre a atividade da α -glicosidase menores que 40%, embora tenham observado alta atividade inibitória sobre lipase.

Contudo, no presente trabalho, ambos os extratos de *E. macrophyllus*, apresentaram baixa porcentagem de inibição sobre a atividade de lipase e tripsina. A inibição da lipase somaria aos efeitos benéficos dos extratos, uma vez que, representa uma alternativa promissora ao tratamento da obesidade e diabetes *mellitus*, considerando que além da hiperglicemia, essas doenças metabólicas estão associadas com níveis elevados de triglicérides no sangue, decorrentes de dietas ricas em gordura e sedentarismo (Toma et al., 2014). Assim, inibindo a lipase, a absorção de ácidos graxos livres seria reduzida e conseqüentemente diminuiria a hiperlipidemia associada a essas doenças (Birari; Bhutani, 2007).

As baixas taxas de inibição exercidas pelos extratos de *E. macrophyllus* sobre a atividade de tripsina, são favoráveis ao uso terapêutico desta planta, uma vez que, inibidores de tripsina presentes na dieta podem interferir no metabolismo normal e sistêmico de alguns órgãos como pâncreas, fígado e músculo, alterando assim a taxa de crescimento de animais jovens (Lima et al., 2004).

4. Conclusão

Os extratos de *E. macrophyllus* apresentam substâncias bioativas que conferem potencial de uso terapêutico para o tratamento de várias doenças com origem ou progressão inflamatórias,

relacionadas ao desequilíbrio do sistema hemostático. Estes extratos foram capazes de modular a atividade enzimática de fosfolipases A₂ (envolvidas na geração de eicosanoides com ação principalmente na resposta inflamatória e coagulação sanguínea) e proteases (fibrinogenolíticas e trombina-símile), principalmente pela ação de compostos fenólicos que interagem com sítios catalíticos das enzimas, sítios ligantes de cofatores ou ainda com regiões hidrofóbicas presentes nestas moléculas. Os extratos destacaram-se também pela atividade antígenotóxica, com possível efeito protetor sobre componentes celulares. Estudos complementares poderão definir formulações, dosagens e formas de administração seguras e eficazes que possibilitem a utilização terapêutica desta espécie vegetal.

Conflito de interesse

Os autores declaram não ter conflito de interesse.

Agradecimentos

Os autores agradecem o apoio financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior e a Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais (CNPq/CAPES/FAPEMIG), Brasil.

Referências

- Assafim, M., Coriolano, E.C., Benedito, S.E., Fernandes, C.P., Lobo, J.F.R., Sanchez, E.F., Rocha, L.M., Fuly, A.L., 2011. *Hypericum brasiliense* plant extract neutralizes some biological effects of *Bothrops jararaca* snake venom. J. Venom Research. 2, 11–16.
- Birari, R., Bhutani, K., 2007. Pancreatic lipase inhibitors from natural sources: unexplored potential. Drug Discov. Today. 12, 879-89.
- Bora, B., Gogoi, D., Tripathy, D., Kurkalang, S., Ramani, S., Chatterjee, A., Mukherjee, A.S., 2018. The N-terminal-truncated recombinant fibrin(ogen)olytic serine protease improves its functional property, demonstrates *in vivo* anticoagulant and plasma defibrinogenation activity as well as pre-clinical safety in rodent model. Int. J. Biol. Macromol. 111, 462-474.
- Cate, H.T., Hackeng, T.M., Frutos, P.G., 2017. Coagulation factor and protease pathways in thrombosis and cardiovascular disease. J. Thromb. Haemost. 117, 1265-1271.

- Chang, S., Yang, Z., Han, N., Liu, Z., Yin, J., 2018. The antithrombotic, anticoagulant activity and toxicity research of ambinine, an alkaloid from the tuber of *Corydalis ambigua* var. *amurensis*. Regul. Toxicol. Pharmacol. 95, 175-181.
- Chapin, J.C., Hajjar, K.A., 2015. Fibrinolysis and the control of blood coagulation. Blood Rev. 29, 17-24.
- Choi, J.H., Park, S.E., Kim, S.J., Kim, S., 2015. Kaempferol inhibits thrombosis and platelet activation. Biochimie. 115, 177-86.
- Cintra, A.C., Toni, L.G., Sartim, M.A., Franco, J.J., Caetano, R.C., Murakami, M.T., Sampaio, S.V., 2012. Batroxase, a new metalloproteinase from *B. atrox* snake venom with strong fibrinolytic activity. Toxicon. 60, 70-82.
- Collins, A.R., Dusinská, M., Franklin, M., Somorovská, M., Petrovská, H., Duthie, S., Fillion, L., Panayiotidis, M., Raslová, K., Vaughan, N., 1997. Comet assay in human biomonitoring studies: reliability, validation, and applications. Environ. Mol. Mutagen. 30, 139-146.
- Collins, A.R., 2004. The comet assay for DNA damage and repair: principles, applications, and limitations. Mol. Biotechnol. 26, 249-261.
- Dai, J., Mumper, R., 2010. Plant phenolics: extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. Molecules. 15, 7313-7352.
- Erlanger, B.F., Kokowsky, N., Cohen, W., 1961. The preparation and properties of two new chromogenic substrates of trypsin. Arch. Biochem. Biophys. 95, 271-278.
- Faggio, C., Sureda, A., Morabito, S., Sanches-Silva, A., Mocan, A., Nabavi, S.F., Nabavi, S.M., 2017. Flavonoids and platelet aggregation: A brief review. Eur. J. Pharmacol. 807, 91-101.
- Flor, R.V., Campos, M.A.A., Solano, A.G.R., Jokl, L., Dantas-Barros, A.M., 2011. Drying of *Echinodorus macrophyllus* and autoclaving and lyophilization of the fluid-extract: effects on the pharmacochemical composition. Braz. J. Pharmacogn. 21, 518-524.
- Franco, R.R., Carvalho D.S., de Moura, F.B.R., Justino, A.B., Silva, H.C.G., Peixoto, L.G., Espindola, F.S., 2018. Antioxidant and anti-glycation capacities of some medicinal plants and their potential inhibitory against digestive enzymes related to type 2 diabetes *mellitus*. J. Ethnopharmacol. 215, 140-146.
- Gutiérrez, J.M., Avila, C., Rojas, E., Cerdas, L., 1988. An alternative *in vitro* method for testing the potency of the polyvalent antivenom produced in Costa Rica. Toxicon. 26, 411-413.
- Islam, A., Hussain, M.S., Sen, N., Abedin, F., Millat, M.S., Islam, M.S., Das, A., Kar, A., Hossain, M.M., 2017. Investigation of *in vitro* thrombolytic and anti-helminthic activity and *in vivo* anxiolytic and antidepressant potentiality with phytochemical nature of methanolic extract of *Leucas lavandulifolia*. Sust. Chem. Pharmacy. 6, 61-66.

- Justino, A.B., Miranda, N.C., Franco, R.R., Martins, M.M., Silva, N.M.D., Espindola, F.S., 2018. *Annona muricata* Linn. leaf as a source of antioxidant compounds with *in vitro* antidiabetic and inhibitory potential against α -amylase, α -glucosidase, lipase, non-enzymatic glycation and lipid peroxidation. *Biomed. Pharmacother.* 100, 83-92.
- Karabaliev, M., Kochev, V., 2003. Interaction of solid supported thin lipid films with saponin. *Sens. Actuators B: Chemical.* 88, 101-105.
- Kobayashi, J., Sekiguchi, M., Shimamoto, S., Shigemori, H., Ohsaki, A., 2000. Echinophyllins C-F, new nitrogen-containing clerodane diterpenoids from *Echinodorus macrophyllus*. *J. Nat. Prod.* 63, 1576-1579.
- Kwon, Y.I., Apostolidis, E., Shetty, K., 2008. Inhibitory potential of wine and tea against α -amylase and α -glucosidase for management of hyperglycemia linked to type 2 diabetes. *J. Food Biochem.* 32, 15-31.
- Leanpolchareanchai, J., Pithayanukul, P., Bavovada, R., Saparpakorn, P., 2009. Molecular docking studies and anti-enzymatic activities of Thai Mango seed kernel extract against snake venoms. *Molecules.* 14, 1404-1422.
- Lidija, J., 2015. Interactions of polyphenols with carbohydrates, lipids and proteins. *Food Chem.* 15, 556-567.
- Lima, L.M., Araújo, A.H., Oliveira, A.S., Pereira, R.A., Miranda, M.R.A., Sales, M.P., 2004. Comparative digestibility and the inhibition of mammalian digestive enzymes from mature and immature cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) seeds. *Food Control.* 15, 107-110.
- Lopes, C.L., Albano, F., Laranja, G.A.T., Alves, L.M., Martins e Silva, L.F., de Souza G.P., Araújo I.M., Nogueira-Neto J.F., Felzenszwalb, I., Kovary, K., 2000. Toxicological evaluation by *in vitro* and *in vivo* assays of an aqueous extract prepared from *Echinodorus macrophyllus* leaves. *Toxicol Lett.* 116, 189-198.
- Marques, T.R., Caetano, A.A., Simão, A.A., Castro, F.C.O., Ramos, V.O., Corrêa, A.D., 2016. Metanolic extract of *Malpighia emarginata* bagasse: phenolic compounds and inhibitory potential on digestive enzymes. *Rev. Bras. Farmacogn.* 26, 191-196.
- Matos, F.J.A., 1997. Introdução à fitoquímica experimental, 2 ed. UFC, Fortaleza.
- Moura, V.M., da Silva, W.C., Raposo, J.D., Freitas-de-Sousa, L.A., Santos, M.C., de Oliveira, R.B., Veras Mourão, R.H., 2016. The inhibitory potential of the condensed-tannin-rich fraction of *Plathymenia reticulata* Benth. (Fabaceae) against *Bothrops atrox* envenomation. *J. Ethnopharmacol.* 183, 136-142.
- Mukherjee, P., Maiti, K., Mukherjee, K., Houghton, P., 2006. Leads from Indian medicinal plants with hypoglycemic potentials. *J. Ethnopharmacol.* 106, 1-28.

- Nandhakumar, S., Parasuraman, S., Shanmugam, M.M., Rao, K.R., Chand, P., Bhat, B.V., 2011. Evaluation of DNA damage using single-cell gel electrophoresis (Comet Assay). *J. Pharmacol. Pharmacother.* 2, 107–111.
- Noelting, G., Bernfeld, P., 1948. Sur les enzymes amylolytiques - III. La β -amylase: dosage d'activité et contrôle de l'absence d' α -amylase. *Helv. Chimica Acta.* 31, 286-290.
- Nworu, C.S., Akah, P.A., 2015. Anti-inflammatory medicinal plants and the molecular mechanisms underlying their activities. *Afr. J. Tradit. Complement. Altern. Med.* 12, 52-61.
- Pereañez, J.A., Núñez, V., Rojano, B., Lobo-Echeverri, T., 2013. Inhibitory effects of *Swietenia macrophylla* on myotoxic phospholipases A₂. *Rev. Bras. Farmacogn.* 23, 885-894.
- Pereira, L.L.S., Souza, S.P., Silva, M.C., Carvalho, G.A., Santos, C.D., Correa, A.D., Abreu, C.M.P., 2010. Atividade das glicosidases na presença de chá verde e de chá preto. *Rev. Bras. Plant. Medicinai*s (Impresso). 12, 516-518.
- Pereira, B., Brazón, J., 2015. Aqueous extract from *Brownea grandiceps* flowers with effect on coagulation and fibrinolytic system. *J. Ethnopharmacol.* 160, 6–13.
- Pozzi, N., Chen, Z., Di Cera, E., 2016. How the linker connecting the two kringles influences activation and conformational plasticity of prothrombin. *J. Biol. Chem.* 291, 6071- 6082.
- Rasche, H., 2001. Haemostasis and thrombosis: an overview. *Europ. Heart J. Supplemen.* 3, 3–72.
- Reis, G.B. dos., Andrade-Vieira, L.F., Moraes, I.C., CÉSAR, P.H.S., Marcussi, S., Davide, L.C., 2017. Reliability of plant root comet assay in comparison with human leukocyte comet assay for assessment environmental genotoxic agents. *Ecotoxicol. Environmen. Safety.* 142, 110-116.
- R Core Team, 2012. R: A Language and Environment for Statistical Computing. Viena: Viena: R Foundation for Statistical Computing.
- Rodrigues, V.M., Soares, A.M., Guerra-Sá, R., Rodrigues, V., Fontes, M.R., Giglio, J.R., 2000. Structural and functional characterization of neuwiedase, a nonhemorrhagic fibrin(ogen)olytic metalloprotease from *Bothrops neuwiedi* snake venom. *Arch. Biochem. Biophys.* 381, 213-224.
- Salazar, M., Chérigo, L., Acosta, H., Otero, R., Martínez-Luis, S., 2014. Evaluation of anti-*Bothrops asper* venom activity of ethanolic extract of *Brownea rosademonte* leaves. *Acta Pharm.* 64, 475–483.
- Sales, T., Marcussi, S., da Cunha, E., Kuca, K., Ramalho, T., 2017. Can inhibitors of snake venom phospholipases A₂ lead to new insights into anti-inflammatory therapy in humans? A theoretical study. *Toxins.* 9, 341.

Selistre, H.S., Queiroz, L.S., Cunha, O.A.B., de Souza, G.E.P., Giglio, J.R., 1990. Isolation and characterization of hemorrhagic, myonecrotic and edema-inducing toxins from *Bothrops insularis* (jararaca ilhoa) snake venom. *Toxicon*. 28, 261–273.

Silva, C.J., Bastos, J.K., Takahashi, C.S., 2010. Evaluation of the genotoxic and cytotoxic effects of crude extracts of *Cordia ecalyculata* and *Echinodorus grandiflorus*. *J. Ethnopharmacol.* 127, 445–450.

Silva, G.P., Fernandes, D.C., Vigliano, M.V., da Fonseca, E.N., Santos, S.V., Marques, P.R., Justo, M.D., Sabino, K.C., Coelho, M.G., 2016. Flavonoid-enriched fraction from *Echinodorus macrophyllus* aqueous extract exhibits high in-vitro and in-vivo anti-inflammatory activity. *J. Pharm. Pharmacol.* 68, 1584-1596.

Simão, A.A., Corrêa, A.D., Carvalho, T.C.L., Cesar, P.H.S., Oliveira, C.H.M., Marcussi, S., 2015. Pharmacotoxic characterization of the aqueous extract from *Pereskia grandifolia* leaves. *J. Med. Plants Research*. 9, 216-222.

Souza, S.P., Pereira, L.L.S., Souza, A.A., dos Santos, C.D., 2011. Inhibition of pancreatic lipase by extracts of *Baccharis trimera* (Less.) DC., Asteraceae: evaluation of antinutrients and effect on glycosidases. *Rev. Bras. Farmacogn.* 21, 450-455.

Squillaro, T., Cimini, A., Peluso, G., Giordano, A., Melone, M.A.B., 2018. Nano-delivery systems for encapsulation of dietary polyphenols: An experimental approach for neurodegenerative diseases and brain tumors. *Biochem. Pharmacol.* 154, 303-317.

Strauch, M.A., Tomaz, M.A., Monteiro-Machado, M., Ricardo, H.D., Cons B.L., Fernandes, F.F.A., El-Kik, C.Z., Azevedo, M.S., Melo, P.A., 2013. Antiophidic activity of the extract of the Amazon plant *Humirianthera ampla* and constituents. *J. Ethnopharmacol.* 145, 50-58.

Tanus-Rangel, E., Santos, S.R., Lima, J.C., Lopes, L., Noldin, V., Monache, F.D., Cechinel-Filho, V., Martins, D.T., 2010. Topical and systemic anti-inflammatory effects of *Echinodorus macrophyllus* (Kunth) Micheli (Alismataceae). *J. Med. Food*. 13, 1161-1166.

The United States Pharmacopeia, 2005. The national formulary NF 18 (Pharmacopeial Convention Inc). Rockvile.

Thibane, V.S., Ndhlala, A.R., Finnie, J.F., Van Staden, J., 2018 ‘in press’. Modulation of the enzyme activity of secretory phospholipase A₂, lipoxygenase and cyclooxygenase involved in inflammation and disease by extracts from some medicinal plants used for skincare and beauty. *S. African J. Botany*.

Toma, A., Makonnen, E., Mekonnen, Y., Debella, A., Addisakwattana, S., 2014. Intestinal α -glucosidase and some pancreatic enzymes inhibitory effect of hydroalcoholic extract of *Moringa stenopetala* leaves. *BMC Complement. Altern. Med.* 14, 1-5.

Vale, L.H.F., Mendes, M.M., Fernandes, R.S., Costa, T.R., Hage-Melim L.I.S., Sousa M.A., Hamaguchi, A., Homsí-Brandeburgo, M.I., Franca, S.C., Silva, C.H., Pereira, P.S., Soares, A.M., Rodrigues, V.M., 2011. Protective effect of *Schizolobium parahyba* flavonoids against snake venoms and isolated toxins. *Curr. Top. Med. Chem.* 11, 2566–2577.

Vaz, M.S., Vaz da Silva, M.S., Oliveira, R.J., da Silva Mota, J., Brait, D.R., de Carvalho, L.N., Vani, J.M., Berno, C.R., Araújo, F.H., de Barros, M.E., 2016. Evaluation of the toxicokinetics and apoptotic potential of ethanol extract from *Echinodorus macrophyllus* leaves *in vivo*. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 82, 32-38.

Vitseva, O., Varghese, S., Chakrabarti, S., Folts, J.D., Freedman, J.E., 2005. Grape seed and skin extracts inhibit platelet function and release of reactive oxygen intermediates. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 46, 445-451.

Zhang, Q., Yang, Y.X., Li, S.Y., Wang, Y.L., Yang, F.Q., Chen, H., Xia, Z.N. 2017. An ultrafiltration and high performance liquid chromatography coupled with diode array detector and mass spectrometry approach for screening and characterizing thrombin inhibitors from Rhizoma Chuanxiong. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 1061-1062, 421-429.

APÊNDICE – ARTIGOS 1, 2 E 3

Tabela 1A - Gradiente de eluição para análise dos compostos fenólicos.....	151
Tabela 2A- Tempo de retenção (t_R) médio para os compostos fenólicos.....	151
Tabela 3A - Parâmetros e coeficientes de determinação (R^2) das curvas analíticas	152

Tabela 1A - Gradiente de eluição para análise dos compostos fenólicos.

Tempo (min)	Fase móvel*	
	Solvente A (% v:v)	Solvente B (% v:v)
0,01	100	0
5	70	30
25	60	40
43	55	45
50	0	100
65	0	100

Fase móvel: Solvente A – solução de ácido acético 2% em água;
Solvente B – metanol: água: ácido acético (70: 28: 2% v:v)

Tabela 2A - Tempo de retenção (t_R) médio para os compostos fenólicos.

Composto	Tempo de retenção (T_R) minutos*
Ácido gálico	6,58 ± 0,01
Catequina	10,37 ± 0,06
Galato de epigallocatequina	12,11 ± 0,02
Ácido clorogênico	12,56 ± 0,03
Epicatequina	13,96 ± 0,03
Ácido cafeico	14,89 ± 0,02
Ácido siríngico	15,66 ± 0,20
Ácido vanílico	17,40 ± 0,08
Ácido <i>p</i> -cumárico	21,47 ± 0,05
Ácido ferúlico	24,48 ± 0,02
Ácido salicílico	32,11 ± 0,02
Resveratrol	35,37 ± 0,03
Quercetina	51,39 ± 0,01

*Média de três repetições ± desvio padrão.

Tabela 3A - Parâmetros e coeficientes de determinação (R^2) das curvas analíticas*.

Composto	a	b	R^2
Ácido gálico	-2555,5523	32956,77159	0,9995
Catequina	-2844,07672	13117,20972	0,9929
Galato de epigalocatequina	-5646,6605	13319,04931	0,9932
Ácido clorogênico	-1417,35438	28815,67184	0,9996
Epicatequina	-3482,14097	10519,19966	0,9934
Ácido cafeico	-1729,29891	40887,21155	0,9997
Ácido vanílico	-256,21829	58014,05631	0,9995
Ácido <i>p</i> -cumárico	-815,31045	101901,42971	0,9997
Ácido ferúlico	-9093,05166	48737,69349	0,9950
Ácido salicílico	-1045,64447	8830,09805	0,9985
Resveratrol	-4284,57642	61793,53306	0,9985
Quercetina	-657,4062	6112980,0	0,9982

*Regressão linear: $y = a + bx$