



DANIELA APARECIDA OLIVEIRA

**PLANTAS CONDIMENTARES E PROBIÓTICOS
MODULANDO A ATIVIDADE DE ENZIMAS ENVOLVIDAS
NA HEMOSTASE E RESPOSTA INFLAMATÓRIA**

**LAVRAS – MG
2023**

DANIELA APARECIDA OLIVEIRA

**PLANTAS CONDIMENTARES E PROBIÓTICOS MODULANDO A ATIVIDADE DE
ENZIMAS ENVOLVIDAS NA HEMOSTASE E RESPOSTA INFLAMATÓRIA**

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

Professora Doutora Silvana Marcussi
Orientadora

Professora Doutora Larissa Fonseca Andrade Vieira
Co-Orientadora

**LAVRAS - MG
2023**

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

Oliveira, Daniela Aparecida.

Plantas condimentares e probióticos modulando a atividade de
enzimas envolvidas na hemostase e resposta inflamatória / Daniela
Aparecida Oliveira. - 2023.

125 p. : il.

Orientador(a): Silvana Marcussi.

Coorientador(a): Larissa Fonseca Andrade Vieira.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Lavras, 2023.

Bibliografia.

1. Plantas nutracêuticas. 2. Microorganismos simbióticos. 3.
Moduladores enzimáticos. I. Marcussi, Silvana. II. Vieira, Larissa
Fonseca Andrade. III. Título.

DANIELA APARECIDA OLIVEIRA

**PLANTAS CONDIMENTARES E PROBIÓTICOS MODULANDO A ATIVIDADE DE
ENZIMAS ENVOLVIDAS NA HEMOSTASE E RESPOSTA INFLAMATÓRIA**

**AROMATIC PLANTS AND PROBIOTICS MODULATING THE ACTIVITY OF
ENZYMES INVOLVED IN HEMOSTASIS AND INFLAMMATORY RESPONSE**

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

APROVADA em 16 de fevereiro de 2023.

Dr. Filippe Elias de Freitas Soares	UFLA
Dra. Juliana Mesquita Freire	UFLA
Dra. Luciana Lopes Silva Pereira	UFLA
Dra. Lidiane Orlandi	UNILAVRAS

Profa. Dra. Silvana Marcussi
Orientadora

Profa. Dra. Larissa Fonseca Andrade Vieira
Co-Orientadora

**LAVRAS - MG
2023**

*A minha mãe Tereza por ser
minha força, por estar sempre ao
meu lado em todos os momentos
me apoiando. Na qual é um
exemplo de fé, amor e dedicação.
Dedico*

AGRADECIMENTOS

Á DEUS primeiramente, por estar comigo todos os dias da minha vida, por ter atender as minhas orações, por ter me dado força nos momentos difíceis e por me confortar sempre, sem Ele não teria conseguido trilhar todo esse caminho e chegar até aqui.

Á minha família, meus maiores incentivadores, por cada palavra, cada conselho e por todo o carinho, a qual foram essenciais.

Á Universidade Federal de Lavras por ter aberto as portas para minha formação acadêmica.

Ao Departamento de Química por todo apoio e suporte.

As professoras Dra. Silvana Marcussi e Dra. Larissa Fonseca Andrade Vieira pelas colaborações nas correções, observações e sugestões feitas durante todo o trabalho.

Á Lidiany M. Zacaroni Lima, técnica no Departamento de Química por toda ajuda necessária com o HPLC na identificação e quantificação dos compostos.

Á Aline Chaves Reis, da Faculdade de Ciências da Saúde, técnica no Departamento de Medicina por toda ajuda na coleta de material biológico.

Aos colegas do Laboratório de Bioquímica e aos funcionários do Departamento de Medicina e do Departamento de Química que colaboraram como doadores voluntários nos experimentos.

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

Enfim, a todos que de forma direta ou indireta, colaboraram com esse trabalho de diversas formas, meu sincero agradecimento.

MUITO OBRIGADA!

“Elevo os meus olhos para os montes: de onde me virá o socorro? O meu socorro vem do Senhor, que fez o céu e a terra.” (Salmos 121: 1-2)

RESUMO

As plantas correspondem a uma valiosa fonte de moléculas bioativas com função na prevenção e tratamento de diversas doenças. Nesse contexto, as plantas condimentares se destacam pela produção de grandes quantidades de agentes antioxidantes, anti-inflamatórios e antimicrobianos. Espécies como *Laurus nobilis*, *Ocimum basilicum*, *Origanum vulgare*, *Petroselinum crispum*, *Rosmarinus officinalis*, *Salvia officinalis* e *Thymus vulgaris* são ricas em compostos fenólicos. E tem sido usadas na medicina popular para tratamento de distúrbios digestivos e gastrointestinais, com funções anti-inflamatória, cicatrizante e microbicida. De igual importância, os probióticos exercem efeitos benéficos sobre a microbiota intestinal e funcionalidade do trato intestinal, com função adjuvante aos tratamentos com antibióticos e anti-inflamatórios. As fosfolipases A₂ (PLA₂s) e proteases são enzimas que participam de diferentes processos fisiológicos no organismo humano. Tais como coagulação, cicatrização e regeneração tecidual, e defesa, sendo importantes alvos no estudo mecanicista de diversas patologias e para o desenvolvimento de novos fármacos. O alto grau de homologia existente entre enzimas presentes em peçonhas de serpentes e enzimas humanas, aliado a grande facilidade de obter estas enzimas para utilização em estudos científicos, fazem destas poderosas ferramentas laboratoriais para o estudo de compostos com potencial clínico-farmacêutico. Neste contexto, o presente trabalho teve como objetivo avaliar os efeitos de extratos de plantas condimentares e probióticos sobre a atividade de enzimas presentes na peçonha de *Bothrops moojeni*, visando caracterizar ações farmacológicas exercidas pelos extratos. Desta maneira, foi realizada atividade PLA₂s, hemolítica, anti-inflamatória, trombolítica e coagulante nos extratos de plantas condimentares. Todas as doses dos extratos avaliados tanto na ausência como na presença de probiótico exerceram inibições entre 15% e 56% sobre a atividade de PLA₂s induzida pela peçonha de *B. moojeni*, mesmo quando submetidos a diferentes pHs, com exceção apenas do extrato de *R. officinalis* em pH 8,0. Para a atividade hemolítica, com adição ou não do probiótico, durante as incubações, todos os extratos apresentaram inibições significativas, que ficaram entre 19% a 60% nas diferentes doses avaliadas. Na atividade anti-inflamatória, todos os extratos inibiram a hemólise na ausência e presença de probiótico, mas os melhores resultados foram para os extratos de *L. nobilis*, *O. basilicum*, *P. crispum* e *R. officinalis* na menor dose apresentando os menores valores de hemólise entre 0,82% a 15,63%. Todos os extratos apresentaram inibição das atividades trombolítica e coagulante significativas tanto na ausência como presença de probiótico, exceto a *P. crispum* que apresentou atividade coagulante na presença de probiótico. Os resultados demonstram o potencial dessas plantas em modular a atividade de enzimas que atuam na fisiologia humana, sobretudo nos processos de hemostase e resposta inflamatória. No entanto, futuros estudos devem ser realizados, ampliando assim os conhecimentos sobre seus mecanismos de ação e possibilitando futuras aplicações na área da saúde humana.

Palavras-chave: Plantas nutracêuticas. Alimentos funcionais. Microorganismos simbióticos. Moduladores enzimáticos.

ABSTRACT

Plants are a valuable source of bioactive molecules with a role in the prevention and treatment of various diseases. In this context, aromatic plants stand out for the production of large amounts of antioxidant, anti-inflammatory and antimicrobial agents. Species such as *Laurus nobilis*, *Ocimum basilicum*, *Origanum vulgare*, *Petroselinum crispum*, *Rosmarinus officinalis*, *Salvia officinalis* and *Thymus vulgaris* are rich in phenolic compounds. And it has been used in folk medicine to treat digestive and gastrointestinal disorders, with anti-inflammatory, healing and microbicidal functions. Equally important, probiotics exert beneficial effects on the intestinal microbiota and functionality of the intestinal tract, with an adjuvant function to treatments with antibiotics and anti-inflammatories. Phospholipases A₂ (PLA₂s) and proteases are enzymes that participate in different physiological processes in the human body. Such as coagulation, healing and tissue regeneration, and defense, being important targets in the mechanistic study of various pathologies and for the development of new drugs. The high degree of homology between enzymes present in snake venoms and human enzymes, together with the great ease of obtaining these enzymes for use in scientific studies, make these powerful laboratory tools for the study of compounds with clinical-pharmaceutical potential. In this context, the present work aimed to evaluate the effects of aromatic plant extracts and probiotics on the activity of enzymes present in the venom of *Bothrops moojeni*, aiming to characterize the pharmacological actions exerted by the extracts. In this way, PLA₂s, hemolytic, anti-inflammatory, thrombolytic and coagulant activity was performed in the aromatic plant extracts. All doses of extracts evaluated both in the absence and in the presence of probiotic exerted inhibitions between 15% and 56% on the activity of PLA₂s induced by the venom of *B. moojeni*, even when submitted to different pHs, with the exception of the extract of *R. officinalis* at pH 8.0. For hemolytic activity, with or without the addition of probiotic, during incubations, all extracts showed significant inhibitions, ranging from 19% to 60% at the different doses evaluated. In the anti-inflammatory activity, all extracts inhibited hemolysis in the absence and presence of probiotic, but the best results were for the extracts of *L. nobilis*, *O. basilicum*, *P. crispum* and *R. officinalis* at the lowest dose presenting the lowest values of hemolysis between 0.82% to 15.63%. All extracts showed significant inhibition of thrombolytic and coagulant activities both in the absence and presence of probiotics, except *P. crispum* which showed coagulant activity in the presence of probiotics. The results demonstrate the potential of these plants to modulate the activity of enzymes that act in human physiology, especially in the processes of hemostasis and inflammatory response. However, future studies must be carried out, thus expanding the knowledge about its mechanisms of action and enabling future applications in the area of human health.

Keywords: Nutraceutical plants. Functional foods. Symbiotic microorganisms. Enzyme modulators.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Compostos com atividade antioxidante: A) eugenol; B) ácido carnósico; C) carnosol; D) rosmanol; E) ácido cafeíco; F) luteolina; G) ácido rosmarínico.....	16
Figura 2 – <i>Laurus nobilis</i>	17
Figura 3 – <i>Ocimum basilicum</i>	19
Figura 4 – <i>Origanum vulgare</i>	20
Figura 5 – <i>Petroselinum crispum</i>	22
Figura 6 – <i>Rosmarinus officinalis</i>	23
Figura 7 – <i>Salvia officinalis</i>	25
Figura 8 – <i>Thymus vulgaris</i>	26
Figura 9 – Diagrama esquemático com os mecanismos de ação potenciais e conhecidos dos probióticos na microbiota	28
Figura 10 – Ativação e inibição endógena da cascata de proteases da coagulação e sistema de fibrinólise.....	30
Figura 11 – Ativadores e inibidores exógenos do sistema de coagulação de mamíferos e do sistema fibrinolítico	31

LISTA DE ABREVIATURAS

AA	Ácido araquidônico
APTT	Activated Partial Thromboplastin Time - Tempo de tromboplastina parcial ativado
AR	Ácido rosmarínico
Asp49	Ácido aspártico na posição 49 da cadeia polipeptídica
Ca ²⁺	Cálcio
<i>C.d.t.</i>	<i>Crotalus durissus terrificus</i>
COX	Ciclooxigenase
Cys167	Cisteína na posição 167 da cadeia polipeptídica
FIB	Fibrinogênio
Glu146	Ácido glutâmico na posição 146 da cadeia polipeptídica
Gly170	Glicina na posição 170 da cadeia polipeptídica
His147	Histidina na posição 147 da cadeia polipeptídica
IL	Interleucina
INF	Interferon
iNOS	Inducible Nitric Oxide Synthase - Óxido nítrico sintase induzido
LOX	Lipooxigenase
Lys49	Lisina na posição 49 da cadeia polipeptídica
MAPK	Mitogen Activated Protein Kinase - Proteína quinase ativada por mitógeno
NF-kB	Nuclear Factor kappa B - Fator nuclear kappa B
NO	Nitric Oxide - Óxido nítrico
PBS	Phosphate Buffered Saline - Solução salina tamponada em fosfato
PCR	Protein C Reative - Proteína C reativa
PLA _{2s}	Phospholipases A ₂ - Fosfolipases A ₂
PT	Prothrombin Time - Tempo de protrombina
SCFAs	Short-Chain Fatty Acids - Ácidos graxos de cadeia curta
sPLA _{2s}	Secreted Phospholipases A ₂ - Fosfolipases A ₂ secretadas
SVMPs	Snake Venom Metalloproteinases - Metaloproteases de peçonha de serpente
svPLA _{2s}	Snake venom Phospholipases A ₂ - Fosfolipases A ₂ de peçonha de serpente
SVSPs	Snake Venom Serineproteinases - Serinoproteases de peçonha de serpente
TF	Tissue Factor - Fator tecidual
TNF- α	Tumor Necrosis Factor- α - Fator de necrose tumoral- α
Trp31	Triptofano na posição 31 da cadeia polipeptídica
TT	Thrombin Time - Tempo de trombina
UFC	Unidades formadoras de colônia
Zn ²⁺	Zinco

SUMÁRIO

PRIMEIRA PARTE	12
1 INTRODUÇÃO	13
2 REFERÊNCIAL TEÓRICO	15
2.1 Plantas condimentares	15
2.1.1 <i>Laurus nobilis</i>	17
2.1.2 <i>Ocimum basilicum</i>	18
2.1.3 <i>Origanum vulgare</i>	20
2.1.4 <i>Petroselinum crispum</i>	21
2.1.5 <i>Rosmarinus officinalis</i>	23
2.1.6 <i>Salvia officinalis</i>	24
2.1.7 <i>Thymus vulgaris</i>	25
2.2 Probióticos	27
2.3 Hemostasia	29
2.4 Fosfolipases A₂ e seus inibidores naturais	32
2.5 Proteases e seus inibidores naturais	34
3 CONCLUSÃO	36
REFERÊNCIAS	37
SEGUNDA PARTE - ARTIGOS	54
ARTIGO 1 – Modulating action of aromatic plants and probiotics on enzyme activity	55
ARTIGO 2 – Plantas condimentares e probióticos: investigação de propriedades funcionais na prevenção de doenças	87
ANEXO	119

PRIMEIRA PARTE
Introdução geral

1 INTRODUÇÃO

Plantas condimentares produzem metabólitos secundários biologicamente ativos, que modulam positivamente a microbiota, melhoram a digestão dos nutrientes e a absorção através do aumento da atividade de enzimas digestivas, diminuem processos oxidativos e controlam a multiplicação de bactérias patogênicas no organismo humano (AROWOLO; HE, 2018).

Compostos a base de plantas podem ser utilizados com função protetiva e preventiva ao desenvolvimento de doenças – promovendo a manutenção da saúde, com função adjuvante aos tratamentos medicamentosos, uma vez que atuam restaurando parâmetros fisiológicos normais, favorecendo a multiplicação de microorganismos benéficos e fortalecendo o sistema imunológico, estando, portanto, associados à melhora na qualidade de vida dos indivíduos. Alguns estudos relatam a ação sinérgica benéfica à saúde, do consumo de produtos naturais vegetais e aumento da microbiota probiótica (GUPTA; ABU-GHANNAM, 2012; SHIPRADEEP et al., 2012; YOUSAF et al., 2016; MAHMOUDI et al., 2017), mas o conhecimento sobre as inúmeras variáveis de interação entre vegetais e probióticos é ainda muito limitado.

Tendo em vista que o consumo de alimentos contendo probióticos tem aumentado a cada ano, diversos estudos já demonstraram que o consumo de probiótico pode melhorar o sistema imunológico e prevenir doenças e distúrbios intestinais (AMER et al., 2018; FONTANÉ et al., 2018; WIEËRS et al., 2020). Bactérias probióticas são organismos vivos que habitam os intestinos após o consumo e têm efeitos positivos na saúde humana, compondo a microbiota natural dos intestinos e contribuindo assim com a digestão e absorção de nutrientes (ROSS et al., 2002).

Os probióticos são alvos de crescente interesse médico e científico, sendo reconhecidos como alimentos funcionais promissores devido aos benefícios que promovem para a saúde intestinal e prevenção de doenças. Para serem considerados probióticos, os microorganismos devem ter a capacidade de resistir ao baixo pH do estômago e sais biliares e pancreatina do intestino delgado (VIZOSO PINTO et al., 2006; JENSEN et al., 2012). A adição de probióticos aumenta o nível de ácido láctico e diminui os níveis de ácidos graxos voláteis totais em alimentos, preservando muito mais os nutrientes (JIN et al., 2019) presentes nos alimentos.

Em estudos de caracterização de produtos naturais e busca por inibidores enzimáticos, diversas classes de enzimas presentes em peçonha de serpentes têm sido utilizadas como ferramentas laboratoriais, uma vez que possuem ampla homologia estrutural e funcional à proteínas humanas com ação sobre processos fisio-patológicos, tais como os relacionados à hemostase, resposta inflamatória e regeneração de tecidos. As principais classes relatadas são fosfolipases A₂ (PLA₂s) e proteases, havendo um extenso e promissor campo para a exploração de outras classes de enzimas tais como hialuronidases, nucleotidases, colinesterases e L-aminoácido oxidases (OLIVEIRA et al., 2021a; OLIVEIRA et al., 2021b).

Nesse contexto, destaca-se a importância de prospectar cientificamente os benefícios das plantas condimentares e probióticos – de fácil acesso e consumo pela população, para a saúde humana por meio da modulação da atividade de enzimas, envolvidas em processos bioquímicos/fisiológicos humanos, tais como PLA₂s e proteases, cujas atividades, na presença de extratos obtidos de plantas condimentares e probióticos, serão exploradas no presente trabalho. No presente trabalho, objetivou-se a avaliação da ação moduladora de soluções aquosas obtidas de folhas de *Laurus nobilis*, *Ocimum basilicum*, *Origanum vulgare*, *Petroselinum crispum*, *Rosmarinus officinalis*, *Salvia officinalis* e *Thymus vulgaris*, na presença ou ausência de probióticos, sobre a atividade de PLA₂s e proteases que atuam nos processos de coagulação e fibrinólise, inflamação, regeneração de tecidos e cicatrização.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Plantas condimentares

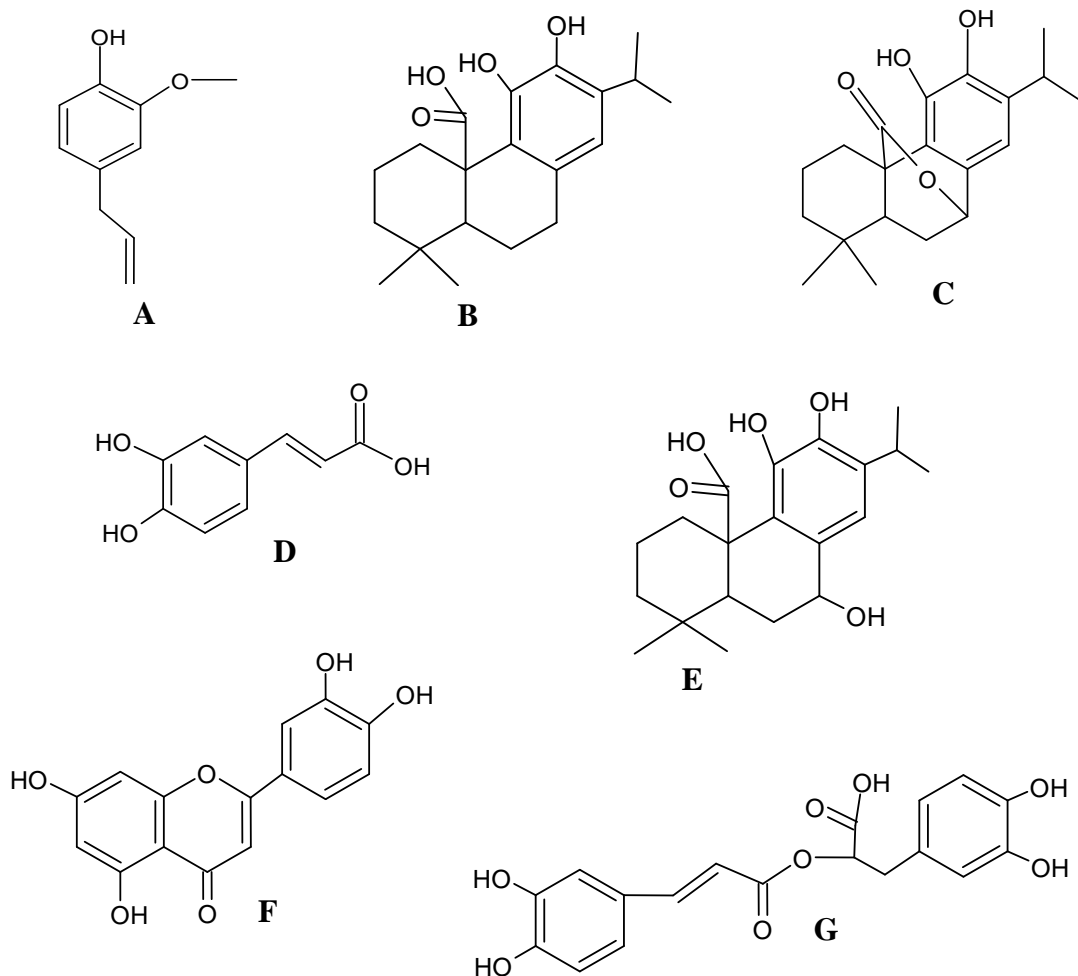
O emprego da definição "plantas condimentares" se deve ao fato do uso genérico para definir plantas empregadas com a finalidade de temperar, aromatizar e/ou conservar alimentos. O grande potencial dessas plantas em conservar alimentos está relacionado a atividade antioxidante das mesmas. Foram encontrados em extratos vegetais compostos como ácido carnósico, carnosol, ácido rosmarínico, entre outros, que contém ação contra oxidação lipídica responsável pela deterioração dos alimentos (SILVA; SANTOS; PENTEADO, 2011). As plantas condimentares são mundialmente utilizadas para aumentar e/ou acrescentar sabor ao alimento, e, secundariamente, com finalidade de conservação, devido também às suas propriedades antimicrobianas.

Os antioxidantes protegem os organismos vivos contra o dano oxidativo causado pelos radicais livres. Espécies reativas estão envolvidos em uma variedade de distúrbios que ocorrem em seres humanos, como dano tecidual, morte celular, câncer, lesão do sistema nervoso central, envelhecimento, artrite, aterosclerose, doenças cardiovasculares, doenças isquêmicas do coração, obesidade, distúrbios neurais, inflamação, gastrite e lesões de reperfusão de muitos tecidos (GULÇIN et al., 2010; KÖSE et al., 2015). Os efeitos de oxidantes podem ser inibidos por meio da doação de átomos de hidrogênio ou por quelação de metais (BURSAL, KOKSAL, 2011; GÜLÇIN, BEYDEMIR, 2013).

Devido a preocupações relacionadas à baixa eficácia antioxidante sintética, há um interesse crescente no desenvolvimento de antioxidantes naturais. As principais fontes de antioxidantes naturais, correspondem às frutas e muitas plantas, incluindo as condimentares (ELMASTAS et al., 2006; GÜLÇIN et al., 2012). Compostos fenólicos apresentam alta atividade antioxidante, agindo na proteção das células contra o dano oxidativo causado por espécies reativas de oxigênio (TOPAL et al., 2016).

As plantas condimentares, por exemplo, da família Lamiaceae têm sido extensivamente estudadas devido ao caráter antioxidante de seus compostos fenólicos (MORAES; CAVALCANTI; COSTA, 2009). Está descrito em literatura, compostos naturais pertencentes a família Lamiaceae, que são responsáveis pela atividade antioxidante (Figura 1) e suas aplicações em produtos alimentícios (MARIUTTI; BRAGANOLO, 2007).

Figura 1 - Compostos com atividade antioxidante: A) eugenol; B) ácido carnósico; C) carnosol; D) rosmanol; E) ácido cafeíco; F) luteolina; G) ácido rosmarínico.



Fonte: Lu, Foo, 2002; Petiwala, Johnson, 2015; Vrsalovic et al., 2016; Chen et al., 2017

As plantas condimentares contêm uma ampla gama de compostos fitoquímicos com efeitos antimicrobianos que podem ter um impacto benéfico ou prejudicial na vida de seres vivos, dependendo do tipo e da concentração desses compostos (KISIRIKO et al., 2021). Extratos de plantas condimentares, isolados ou combinados, podem melhorar parâmetros bioquímicos-fisiológicos do organismo humano, promovendo a manutenção da saúde (NOVAIS et al., 2021).

Extratos de plantas podem atuar como aditivo alimentar sendo uma alternativa para prevenir o uso de antibióticos, e melhorar a efetividade de probióticos (FERNANDES JÚNIOR, 2012). Para um bom desempenho na aplicação de extratos de plantas, na conservação de alimentos e para criar um preservativo antimicrobiano natural benéfico, eles devem ser avaliados isoladamente e em combinação com outros fatores de preservação, como

bactérias probióticas, para determinar se há efeitos sinérgicos e planejar formulações eficazes (HOLKEM; DA SILVA; FAVARO-TRINDADE, 2022).

2.1.1 *Laurus nobilis*

Laurus nobilis (Figura 2), conhecido como louro, pertencente a família Lauraceae, é muito utilizado em países ocidentais e asiáticos como uma especiaria culinária (SILVEIRA et al., 2014). As folhas de louro são usadas como um valioso condimento e aromatizante nas indústrias alimentícias e de cosméticos como componente de fragâncias (MERGHNI et al., 2016).

Investigações fitoquímicas revelaram que o flavonol é um dos compostos fenólicos mais encontrados nas folhas de louro. O α -pineno, β -pineno, mirceno, limoneno, linalol, neral, α -terpineol, acetato de geranil e eugenol são compostos ativos voláteis encontrados. Numerosos compostos possuem várias atividades farmacológicas entre elas estão anti-séptica, digestiva, anti-cancer (DIAZ et al., 2014), antimicrobiana (AUMEERUDDY-ELALFI; GURIB-FAKIM; MAHOMOODALLY, 2015), antifúngica (HOUICHER et al., 2016), antioxidante (BRAHMI et al., 2015) e anti-inflamatória (MAZZIO et al., 2016). O uso do louro tem se dado no tratamento de doenças como reumatismo, diarreia, infecções virais e indigestão (SHARMA; SINGH, 2012).

Figura 2 - *Laurus nobilis*



Fonte: Horto Didático de Plantas Medicinais do HU/CCS, 2023a

Estudos mostraram que o extrato e óleo essencial obtidos das folhas de louro aumentam a secreção do fluido gástrico e podem ser úteis no tratamento de distúrbios gastrointestinais (QNAIS et al., 2012; MERGHNI et al., 2016). As folhas de louro apresentam diferentes ações farmacológicas tais como inibição de espécies reativas de oxigênio, diminuindo a expressão de marcadores inflamatórios e aumenta a sensibilidade à insulina em pessoas com diabetes tipo 2 (BOUREBABA et al., 2021).

2.1.2 *Ocimum basilicum*

Ocimum basilicum popularmente conhecido como manjeriço, é uma planta condimentar utilizada em várias partes do mundo pertencente a família Lamiaceae. Originário nato da Índia e de outras regiões da Ásia, o manjeriço é muito usado nas dietas como ingrediente nas culinárias ocidentais e mediterrâneas (LU et al., 2014). Esta planta também possui aplicação em alimentos industrializados e produtos de higiene oral, sendo seu óleo essencial usado em perfumaria (BILAL et al., 2012). O óleo essencial extraído das folhas do manjeriço contém forte aroma, na culinária, são utilizadas as folhas e brotos frescos ou secos (KHALIQ; TITA; SAND, 2017; NADEEM et al., 2020). Dependendo do cultivo, as folhas podem apresentar cheiro forte, pungente, e as vezes doce. O manjeriço normalmente é usado em receitas, sendo acrescentado por último, evitando o cozimento e mantendo assim o sabor (HOZAYEN et al., 2016), apresenta forte odor de cravo-da-índia, derivado do eugenol (SHAROPOV et al., 2016). Para a fabricação de produtos farmacêuticos, biopesticidas e cosméticos, a indústria também se utiliza dos extratos de manjeriço (NADEEM et al., 2020; BRAVO et al., 2021).

O. basilicum (Figura 3), é rico em compostos fenólicos, em especial, ácidos fenólicos, como ácido cinâmico, ácido siríngico, ácido ferúlico, ácido cafeíco, ácido clorogênico, catequina e rutina (ANTONESCU et al., 2019). O óleo pode ser extraído tanto das folhas como das sementes, ambos ricos em óleo, tendo grande potencial como repelente de insetos (KADHIM; MOHAMMED; HAMEED, 2016).

Figura 3 - *Ocimum basilicum*

Fonte: Gardenia Creating Jardens, 2023

O manjericão é utilizado para tratar distúrbios relacionados ao trato respiratório, incluindo asma, bronquite, tosse, distúrbios gastrointestinais (OTHMAN et al., 2021; TOUISS et al., 2021), distúrbios neurocognitivos (HESHAMI et al., 2021) e distúrbios metabólicos (KIYOSE et al., 2021).

O. basilicum contém diversas propriedades farmacológicas já investigadas tais como anti-osteoporótica (HOZAYEN et al., 2016), sedativa, anti-hipertensiva, anti-trombótica, hepatoprotetora, hipoglicêmica, anti-plaquetária, anti-cancer, antimicrobiana, anti-inflamatória (MIRAJ; KIANI, 2016; KAYA; YIGIT; BENLI, 2008) antioxidante e antimicrobiano (ALTAMEME; HAMEED; ABU-SERAG 2015; HAMEED; HUSSEIN; KAREEM, 2015; HUSSEIN; MOHAMMED, 2016).

O extrato metanólico de *O. basilicum* foi descrito com ação protetora sobre moléculas de DNA, impedindo que células da linhagem MCF-7 fossem danificadas (AL-ALI et al., 2013). O extrato de *O. basilicum* promoveu um aumento na produção de 6-ceto-prostaglandina F1- α e redução na produção de prostaglandina E2 e tromboxano B2, indicando efeito inibidor sobre ciclooxigenase-2 (COX-2) e estimulador sobre COX-1 endotelial, quando avaliado em células endoteliais humanas e cultura de macrófagos celíacos de camundongos (UMAR et al., 2014).

Para o extrato aquoso de *O. basilicum*, também foi descrita ação protetora contra a perda óssea induzida por glicocorticoides em ratos, sugerindo seu potencial de uso na prevenção de osteoporose. O mesmo extrato mostrou-se inibidor de α -glicosidade e α -amilase, podendo ter ação benéfica no controle da diabetes (EL-BESHBISHY; BAHASHWAN, 2012).

2.1.3 *Origanum vulgare*

O gênero *Origanum* (Lamiaceae) compreende 39 espécies, entre elas está o *Origanum vulgare* (Figura 4), nome popular, orégano, planta condimentar amplamente utilizada e de grande importância na culinária do sul da Europa, sendo muito popular nos países do mediterrâneo (SOZMEN et al., 2012). Assim como outras plantas condimentares, a folha do orégano é rica fonte de diversos compostos fenólicos, tais como, ácido rosmarínico e o carvacrol, que apresentam alto potencial antioxidante (SHEIBANI et al., 2011; COCCIMIGLIO; ALIPOUR; JIANG, 2016).

O óregano possui uma variedade de atividades biológicas importantes tais como atividades antifúngica, anti-genotóxica (KURSAT et al, 2011; GULLUCE et al., 2012). Os efeitos positivos a saúde humana são atribuídos a sua atividade antioxidante, contido tanto no óleo, quanto nas frações fenólicas (DE TORRE et al., 2020; SIMIRGIOTIS et al., 2020). Foram encontrados no extrato etanólico de *O. vulgare* os compostos fenólicos, ácido rosmarínico, ácido coumárico, quercetina, apigenina e carvacrol (CHUANG et al., 2018). O ácido rosmarínico é um éster de cafeoil que apresenta atividade anti-inflamatória (COLICA et al., 2018; ALDOGHACHI; AL-MOUSAWI; SHARI, 2021).

Figura 4 - *Origanum vulgare*



Fonte: Horto Didático de Plantas Medicinais do HU/CCS, 2023b

O. vulgare é usada no alívio de distúrbios reumáticos, digestivos e respiratórios, baixa os níveis de colesterol e glicose no sangue, ameniza desconfortos menstruais e suprime o progresso de certos tumores (GOZE; CETIN; GOZE, 2010; SHEIBANI et al., 2011). Estudos recentes *in vitro* e *in vivo* mostraram que extratos de *O. vulgare* possuem propriedades antioxidantes (TARGHI; CHANGIZI; HADDAD, 2016), hepatoprotetores (HABIBI; SHOKRZADEH; CHABRA, 2015), anti-inflamatórias (CHUANG et al., 2018), antidiabéticas, antiapoptóticas (MOHAMED; NASSIER, 2013; VUJICIC et al., 2015) e antimicrobianas (MARTINS et al., 2014; BRDANIN; BOGDANOVIC; KOLUNDZIC, 2015; SARIKURKCU et al., 2015). O extrato etanólico do orégano demonstrou grande potencial de neutralizar radicais livres, quando avaliado pelo teste de DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazil) (CONFORTI; MARRELLI; MENICHINI, 2011; TEIXEIRA; MARQUES; RAMOS, 2013), além de inibir o crescimento de *Salmonella typhimurium* e *Escherichia coli* (TEIXEIRA; MARQUES; RAMOS, 2013; COCCIMIGLIO; ALIPOUR; JIANG, 2016).

2.1.4 *Petroselinum crispum*

Petroselinum crispum (Figura 5), da família Apiaceae, comumente conhecida como salsa, é uma planta condimentar medicinal (ELSHAFIE; CAMELE, 2017). É muito utilizada para dar sabor aos alimentos no Sudeste Asiático, China, Índia, América do Sul e México (WONG; KITTS, 2006). Apesar de originária da Europa é muito utilizada no Brasil e em diversos países como condimento. Essa planta geralmente é vendida *in natura*, desidratada ou em sua forma minimamente processada (MPV) (CORRÊA FILHO et al., 2018; CATUNESCU et al., 2019). MPV são comumente definidos como aqueles que foram submetidos a uma ou mais etapas de processamento, por exemplo, selecionar, descascar, cortar, lavar, desinfetar, enxaguar, secar e embalar, resultando em um produto pronto para uso (CASTRO-IBÁÑEZ; GIL; ALLENDE, 2017; SANT'ANNA; FRANCO; MAFFEI, 2020; SANTOS et al., 2020).

Figura 5 - *Petroselinum crispum*

Fonte: Horto Didático de Plantas Medicinais do HU/CCS, 2023c

A salsa é muito utilizada popularmente para tratar doenças de pele, otite, fungo, distúrbios gastrointestinais, hemorróidas, cálculos renais, hipertensão, doenças cardíacas, hepatotoxicidade, hiperlipidemia e infecção do trato urinário, e como aromatizante de alimentos e diurético. A *P. crispum* exibe ainda propriedades anticoagulante, antimicrobiana, gastrintestinal, analgésica, antidiabética, hepatoprotetora (FARZAEI et al., 2013; SHARIFI-RAD et al., 2017) e anticancer (TANG et al., 2015).

P. crispum é rica em metabólitos secundários e fonte de compostos biologicamente ativos e estruturas fitoquímicas como apigenina, cumarina, miristicina, apiol, galocatequina, epicatequina, ácido hidroxibenzoico, ácido gálico e ácido clorogênico usadas em sistemas de medicina tradicional (FARZAEI et al., 2013; EPIFANIO et al., 2020; YU et al., 2021; FOUDAH et al., 2022).

Foi verificado que folhas de *P. crispum* diminui o estresse oxidativo *in vivo* (EPIFANIO et al., 2020). O extrato de *P. crispum*, promoveu proteção contra danos no DNA induzidos por H₂O₂ em linhagem de células de cancer de mama. O consumo regular de *P. crispum* como suplemento pode favorecer os sistemas antioxidantes do organismo e diminuir os efeitos carcinogênicos induzidos por radicais livres (TANG et al., 2015).

2.1.5 *Rosmarinus officinalis*

Entre as várias plantas da família Lamiaceae está a *Rosmarinus officinalis* (Figura 6) conhecida popularmente como alecrim. É originária da região mediterrânea da Europa, mas se encontra cultivada em muitos países de clima tropical, como o Brasil (SILVA et al., 2010).

Nas folhas de *R. officinalis* foram encontrados carnosol, rosmanol, betulina, metil carnosato, apigenina, luteolina, hispidina, hispidulina, genkvanina e ácidos carnósico, rosmarínico, cafeíco, oleanólico, ursólico e betulínico. Os ácidos rosmarínico e carnósico são os principais constituintes bioativos das folhas de alecrim, que possuem propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias e anticancerígenas (KAMLI et al., 2022).

Figura 6 - *Rosmarinus officinalis*



Fonte: Horto Didático de Plantas Medicinais HU/CCS, 2023d

A infusão das folhas e flores de alecrim é utilizada na medicina popular no tratamento de desobstrução nasal, na eliminação de catarros, como diurética e digestiva, cicatrizante, antimicrobiana, ameniza problemas circulatórios e reumáticos (AFONSO; SANT'ANA; MANCINI-FILHO, 2010). As folhas de *R. officinalis* apresentam atividade antioxidante (KAMLI et al., 2022), antiparasitária (KASEM et al., 2019), anti-inflamatória (YU et al., 2013) e antitumoral (HUSSAIN et al., 2010).

Outras propriedades farmacológicas importantes foram encontradas, como ação hipoglicemiante, atividade inibidora da enzima acetilcolinesterase e da α -amilase, efeito hepatoprotetor contra agentes hepatotóxicos (YESIL-CELIK TAS et al., 2010) e anti-cancer (PETIWALA; JOHNSON, 2015).

2.1.6 *Salvia officinalis*

A *Salvia officinalis* (Figura 7), família Lamiaceae, é uma espécie originária da Europa, Ásia e América Latina, no entanto, é plantada em todo o mundo (GARCIA et al., 2016). Suas partes aéreas são utilizadas na medicina, perfumaria, indústria alimentícia (MARTINS et al., 2015; ALTINDAL; ALTINDAL, 2016), culinária e medicina tradicional devido as suas propriedades aromatizantes e terapêuticas (GARCIA et al., 2016). O extrato das folhas de *S. officinalis* é usada popularmente no tratamento de inflamações na boca e garganta, gengivites, feridas, micoses, alivia picadas de insetos, auxilia na digestão, insônia, e como descongestionante das vias respiratórias (ILKIU-VIDAL; SOUZA; VIANI, 2010), alivia dores do estomago e reumáticas (SALEM et al., 2013). Não é recomendada o seu uso em mulheres grávidas, pois pode ocorrer estímulos de contrações uterinas, no caso de mulheres amamentando, pode reduzir a secreção do leite, e também não é recomendado em casos de insuficiência renal. Deve ser evitada a sua ingestão em grande quantidade e por longo período de tempo, podendo provocar aumento da pressão arterial, bradicardia e ser tóxica para o sistema nervoso central (GARCIA; ELY; WASUM, 2012).

Figura 7 - *Salvia officinalis*

Fonte: Horto Didático de Plantas Medicinais do HU/CCS, 2023e

A *S. officinalis* é fonte rica de compostos fenólicos, os principais constituintes fitoquímicos são terpenos, ácidos fenólicos e flavonoides, tais como, apigenina, kaempferol, ácidos gálico, caféico, rosmarínico, siríngico, *p*-cumárico e ferúlico (JEDIDI et al., 2020). Foram atribuídas diversas propriedades farmacológicas a *S. officinalis*, tais como antimicrobiana, antioxidante, anti-inflamatória, citotóxica entre outros efeitos benéficos (JASSBI et al., 2016; OZKAN et al., 2016; GHORBANI; ESMAEILIZADEH, 2017; AFONSO et al., 2019; JAKOVLJEVIC et al., 2019).

2.1.7 *Thymus vulgaris*

Thymus vulgaris (Figura 8), conhecida popularmente como tomilho, da família Lamiaceae, é uma planta condimentar e medicinal, até agora, 928 espécies do gênero *Thymus* já foram identificadas na Europa, Norte da África, Ásia, América do Sul e Austrália (LI et al., 2019). As folhas do tomilho são pequenas, ovais e enroladas nas bordas, e muito perfumadas. Têm sido utilizadas desde a antiguidade no tratamento de queimaduras e intoxicações causadas por serpentes e escorpiões. O tomilho é amplamente utilizado na medicina popular por suas propriedades antiespasmódicas, anti-helmínticas, diuréticas, sedativas (HOSSEINZADEH et al., 2015), anti-inflamatórias, antálgicas (TURAL; TURHAN, 2017) e antifúngicas (BENABED et al., 2017). No tomilho, a principal parte utilizada comercialmente

são as folhas, com as finalidades que variam desde tempero até fitoterapia. A sua essência tem múltiplas aplicações, tanto na medicina quanto na perfumaria. Da essência do tomilho extraem-se substâncias balsâmicas e vermícidas para as mais diversas utilizações (NIETO, 2020).

Figura 8 – *Thymus vulgaris*



Fonte: Natural Alchemy, 2023

Uma das aplicações medicinais importantes do *T. vulgaris* é contra infecções intestinais variadas, como parasitas, bactérias gram-positivas e gram-negativas. O timol, um dos constituintes ativos do tomilho, é eficaz contra bactérias coccidas. O tomilho pode melhorar o funcionamento do fígado e é um estimulante de apetite (AMIRI, 2012). É conhecido por suas propriedades antimicrobianas (MANCINI et al., 2015), antioxidantes e não apresenta efeitos citotóxicos renais ou hepáticos, sendo encontrado ao alto teor de polifenóis como a quercetina, ácidos rosmarínico, ferúlico, siríngico, caféico, *p*-cumárico e vanílico (AIROLDI et al., 2013; QUIROGA; ASENSIO; NEPOTE, 2014; BAHRI et al., 2022).

2.2 Probióticos

A Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (FAO) e a Organização Mundial da Saúde (OMS) definem os probióticos como “microorganismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, conferem benefícios à saúde do hospedeiro”. Os probióticos são usados constantemente para melhorar a homeostase da microbiota interna a fim de manter a saúde intestinal humana (SANDERS et al., 2011). Como consequência, o número de bactérias nocivas que não conseguem sobreviver em um ambiente ácido é reduzido, e as bactérias benéficas que crescem bem em um estado ácido proliferam, equilibrando assim a microbiota intestinal (KIM et al., 2019).

Lactobacillus, *Bifidobacterium* e *Saccharomyces* são os gêneros de cepas probióticas mais utilizadas pelo homem (BUTEL, 2014). À população de bactérias que reside no trato gastrointestinal humano dá-se o nome de microbiota intestinal (BURITI; SAAD, 2007). Foi encontrado e isolado do *Enterococcus faecium*, o metabólito chamado E297 que apresentou características probióticas *in vitro* (SCHITTLER et al., 2019). A bactéria probiótica *Pediococcus pentosaceus*, é uma bactéria que tem a capacidade de absorver e degradar a aflatoxina em metabólitos menos tóxicos (MARTÍNEZ et al., 2019).

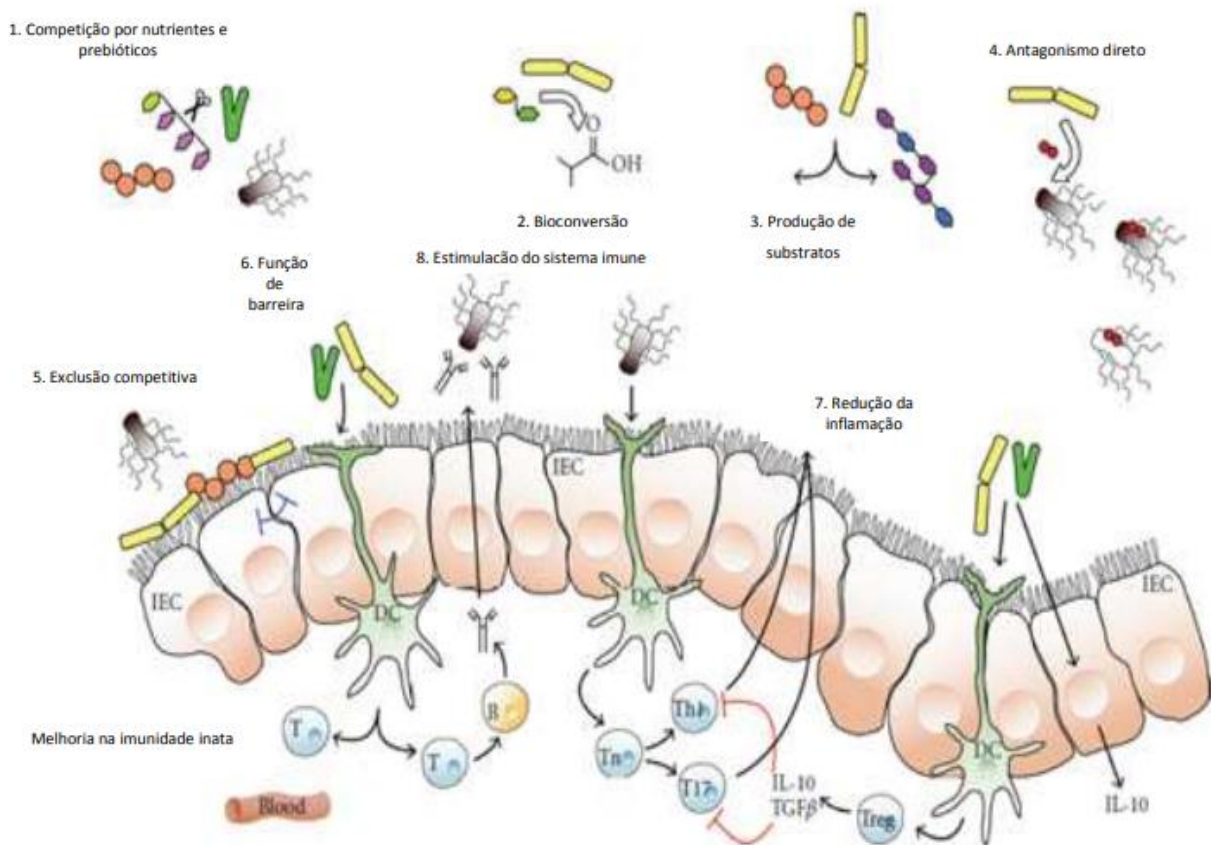
A ingestão de probióticos tem sido sugerida para melhorar a saúde geral e a imunidade. É reconhecido que a microbiota intestinal humana pode desempenhar um papel no desenvolvimento de doenças metabólicas, incluindo obesidade, diabetes e doença inflamatória intestinal (CHOI et al., 2017). A administração de probióticos demonstrou melhorar o prognóstico e o manejo dessas doenças (QIN et al., 2010). Doenças como distúrbios intestinais (ECKBURG et al 2005; BUTEL, 2014), infecções urogenitais (MARELLI; PAPALEO; FERRARI, 2004), obesidade (AGUIRRE; VENEMA, 2015), doenças cardiovasculares (IVEY et al., 2015) e doenças dentárias e hepáticas (VAJRO et al., 2014; CHÁVEZ-TAPIA et al., 2015; DALIRI; LEE, 2015) podem ser prevenidas e até melhoradas com a ingestão de *L. casei*, por exemplo. Deficiências na composição da microbiota intestinal têm sido associadas a vários distúrbios psiquiátricos, como distúrbios do espectro do autismo, depressão e distúrbios relacionados ao álcool (KELLY et al., 2016).

São múltiplas e diversificadas as influências das bactérias probióticas no hospedeiro. As bactérias probióticas têm mecanismos de ação semelhantes aos dos componentes presentes na microbiota, já que são isolados desse ecossistema. A sua função é reforçar as funções da microbiota ou compensá-las quando esta apresentar falhas. As bactérias probióticas interagem

com a superfície da mucosa intestinal permitindo uma exclusão por competição de patógenos (HAJELA et al., 2012).

A eficácia dos efeitos de um probiótico e seu mecanismo dependem geralmente da interação entre hospedeiro e microbiota específica ou com células imunocompetentes da mucosa intestinal (SAAD et al., 2013). A microbiota intestinal é modulada por ação dos microorganismos probióticos, cujo mecanismo é conhecido como exclusão competitiva (Figura 9). Ocorre através do impedimento da colonização da mucosa intestinal pelos microorganismos patogênicos, pela competição por sítios de adesão, por nutrientes e por produção de compostos antimicrobianos (GUARNER; MALAGELADA, 2003; SAAD, 2006). Um mecanismo fundamental para explicar essa constatação, que é a exclusão competitiva, que ocorre entre probióticos e bactérias patogênicas, se baseiam na ligação dos mesmos sítios receptores glicoconjugados na superfície epitelial (WOHLGEMUTH; LOH; BLAUT, 2010).

Figura 9 - Diagrama esquemático com os mecanismos de ação potenciais e conhecidos dos probióticos na microbiota



Fonte: O'Toole, Cooney, 2008

Em caso de condições ambientais desfavoráveis, a atividade antioxidante pode proteger os microorganismos, tais como os probióticos (GUNENC et al., 2016). É requerido, para sua eficácia associada a todos os benefícios a saúde humana, a ingestão de uma quantidade suficiente de unidades formadoras de colônia (UFC) (KUMARI et al., 2016). Entretanto, durante condições ambientais severas, muitas das células probióticas ingeridas não sobrevivem ao passar pelo suco gástrico (RANADHEERA; EVANS; ADAMS, 2012; DE PRISCO; MARESCA; ONGENG, 2015). O encapsulamento das células ou associação com outros compostos que possam atuar em sua proteção, configuram meios alternativos para amenizar esse problema (BELSCAK-CVITANOVIC et al., 2016; COGHETTO; BRINQUES; SIQUEIRA, 2016; FARNWORTH; CHAMPAGNE, 2016).

Probióticos, bacteriocinas, ácidos graxos de cadeia curta, óleos essenciais e extratos de plantas receberam recentemente maior atenção por apresentarem potencial como agentes naturais bioprotetores (NOOMHORM; AHMAD; ANAL, 2014; DUBEY et al. 2018). As cepas de *Lactobacillus*, por exemplo, muito utilizadas como iniciadoras na produção de alimentos lácteos, podem atuar como cultura probiótica ou como bioprotetora, uma vez que produzem compostos antimicrobianos que atuam sobre vários patógenos bacterianos transmitidos por alimentos (CAREY et al., 2008).

Assim, um importante campo de pesquisa consiste em estudar produtos capazes de fornecer um meio mais adequado para a sobrevivência e manutenção de microrganismos probióticos por mais tempo (RANADHEERA; HO; LUO, 2007; MAHMOUDI et al., 2017). Os probióticos podem ser usados como soluções potenciais para prevenir ou tratar doenças associadas ao microbioma intestinal humano, e seus efeitos sobre a saúde humana é a chave essencial no desenvolvimento de novos probióticos, bem como de fármacos (KIM et al., 2019).

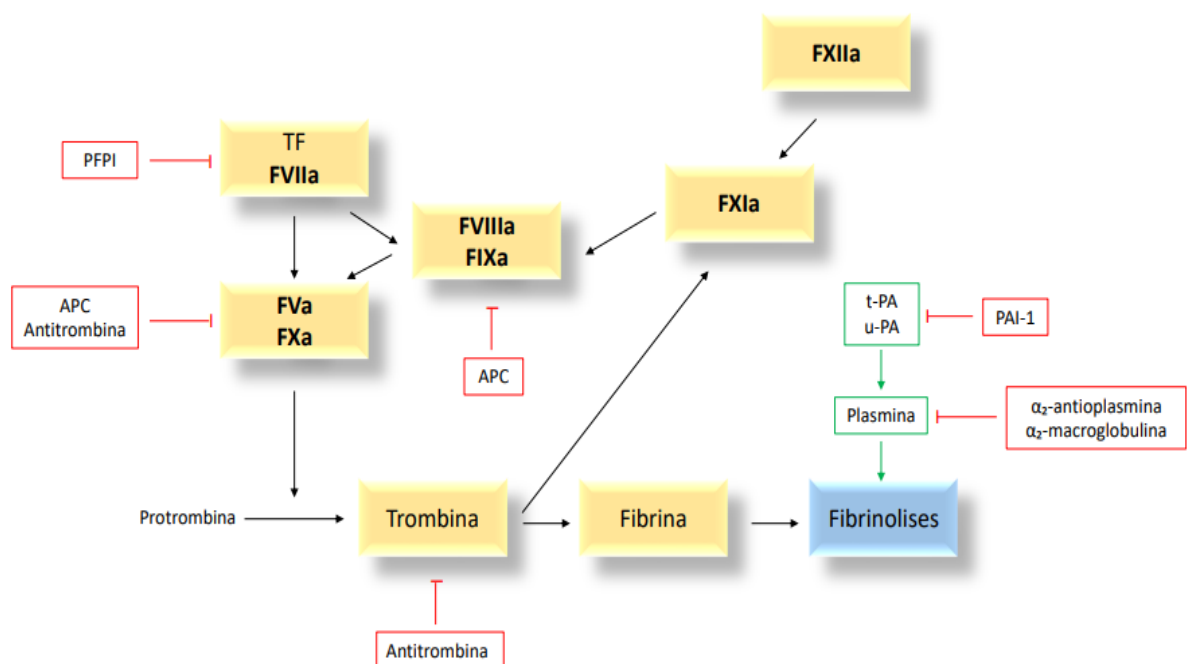
2.3 Hemostasia

A hemostasia é um sistema biológico complexo no qual o equilíbrio dos processos pró-coagulantes e anticoagulantes mantém a fluidez do sangue em vasos intactos e forma trombos quando é necessário prevenir o sangramento de vasos rompidos (HRACHOVINOVÁ, 2018). Na visão clássica da hemostasia, o principal iniciador da cascata de coagulação é o fator tecidual (TF), através do dano vascular, ocorre a exposição ao TF, o que gera quantidades pequenas de trombina que exercem efeitos sobre os fatores de coagulação e plaquetas (CIMMINO; CICCARELLI; GOLINO, 2015). As plaquetas quando

são ativadas, aderem ao local, e o tampão hemostático então, é formado. As quantidades de fibrina garantem a estabilização do agregado plaquetário (CIMMINO; GOLINO, 2013).

Atualmente, a coagulação pode ser dividida em fases separadas e indiferentes: 1) fase de iniciação, onde ocorre a geração de pequenas quantidades de fatores pró-coagulantes ativos. 2) fase de ampliação, na qual ocorre um aumento na quantidade de fatores de coagulação ativos. 3) fase de propagação, em que são gerados fatores ativos de coagulação. 4) fase de estabilização, o polímero, composto por moléculas de fibrina é covalentemente ligado, estabilizando o coágulo (RIDDEL JR. et al., 2007). As plaquetas invadem o local da lesão, se agregam e se aderem, aumentando a rigidez do coágulo. Simultaneamente, às plaquetas, o complexo do TF – fator VII ativado, ativa a formação da cascata de proteases da coagulação (GROVER; MACKMAN, 2018) (Figura 10).

Figura 10 - Ativação e inibição endógena da cascata de proteases da coagulação e sistema de fibrinólise

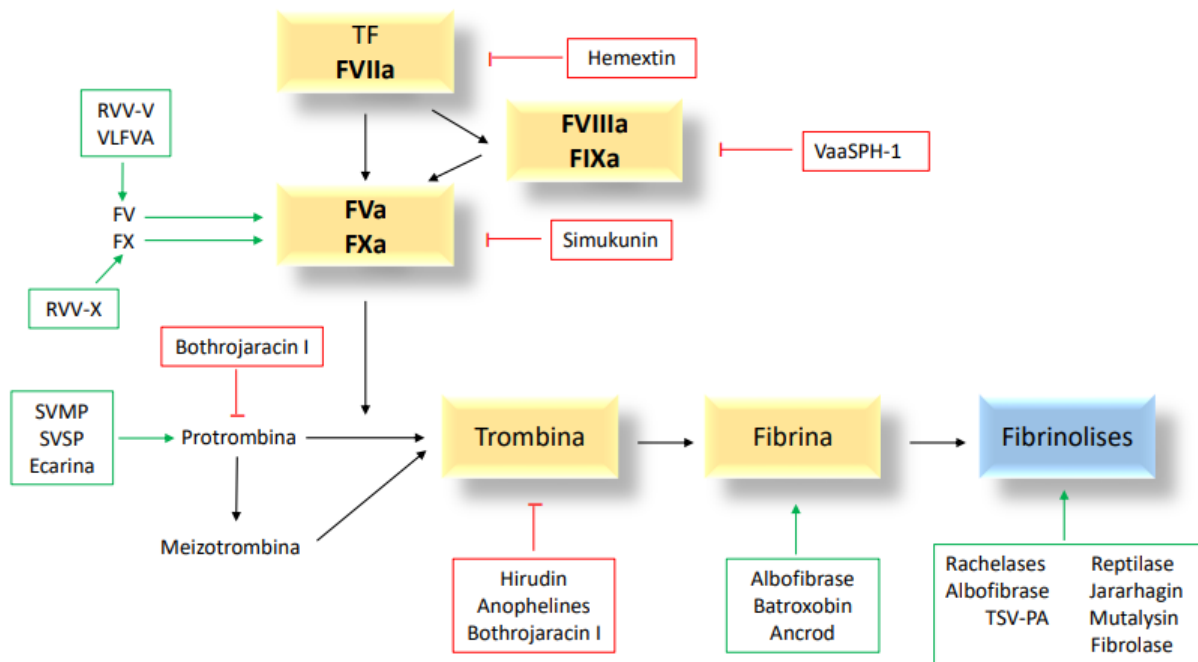


O fator tecidual (TF); fator (F) VII, FVIII, FIX, FV, FX, FXI, FXII ativado (a); inibidor da via do fator tecidual (TFPI); ativador da proteína C (APC); ativador de plasminogênio tipo tecidual (t-PA); ativador de plasminogênio uroquinase (u-PA); inibidor do ativador de plasminogênio do tipo 1 (PAI-1).

Fonte: Adaptado do Sachetto, Mackman, 2019

Uma desregulação nos sistemas de coagulação e fibrinolítico, pode resultar em hemorragia ou trombose. Diversos componentes presentes em peçonhas de serpente podem modular os sistemas de coagulação e fibrinólise de mamíferos, através de enzimas como proteases e fosfolipases A₂. Estudos com variadas classes dessas enzimas, objetivam o desenvolvimento de novas drogas terapêuticas, kits diagnósticos, e ainda a elucidação de mecanismo de ação de moléculas naturais sobre a hemostasia (SACHETTO; MACKMAN, 2019) (Figura 11).

Figura 11 - Ativadores e inibidores exógenos do sistema de coagulação de mamíferos e do sistema fibrinolítico



Metaloproteases de peçonha de serpente (SVMPs); serinoproteases de peçonha de serpente (SVSPs); fator tecidual (TF); fator (F) VII, FVIII, FIX, FV, FX ativado (a); ativador do fator V isolado da peçonha de serpente *Daboia russelli* (RVV-V); ativador do fator X isolado da peçonha de serpente *Daboia russelli* (RVV-X); ativador do fator V isolado da peçonha de serpente *Vipera lebetina* (VLFVA).

Fonte: Adaptado do Sachetto, Mackman, 2019.

As peçonhas de serpente interferem na hemostasia atuando em várias fases da coagulação, destacando-se enzimas homólogas à trombina, enzimas fibrinogenolíticas, ativadoras da protrombina, enzimas que atuam nos fatores V, VII e X, na proteína C, na agregação plaquetária e no plasminogênio (serinoproteases). Outras enzimas ativam a

protrombina e fator X, são fibrinogenolíticas, inibem a agregação plaquetária e causam hemorragia (metaloproteases) (SAJEVIC; LEONARDI; KRIZAJ, 2011; McCLEARY; KINI, 2013).

2.4 Fosfolipases A₂ e seus inibidores naturais

As fosfolipases A₂ (PLA₂s) são enzimas que hidrolisam a segunda ligação éster de um fosfolípido liberando um ácido graxo e um lisofosfolípido (LAMBEAU; GELB, 2008). Em peçonhas de serpentes, dois grupos de sPLA₂s (GI e GII) foram identificados. O Grupo I inclui PLA₂s de peçonhas de serpente (svPLA₂s) de Elapinae e Hydrophiinae, com 115-120 resíduos de aminoácidos e estas svPLA₂s são homólogas às do pâncreas de mamíferos GIB sPLA₂. O Grupo II compreende as svPLA₂s de Crotalinae e Viperidae, com 120-125 resíduos de aminoácidos, sendo estas homólogas as sPLA₂s do grupo IIA n-pancreico de mamíferos (BURKE; DENNIS, 2009). Estes grupos de svPLA₂s são conhecidos por exibir uma ampla variedade de efeitos fisiológicos e patológicos que inclui a indução de reações inflamatórias e alterações na hemostasia (DOLEY; ZHOU; KINI, 2010). Em humanos, elevados níveis de sPLA₂s estão associados a diversos processos fisiopatológicos como doenças cerebrais, distúrbios cardiovasculares, cancer, asma, síndrome da angústia respiratória e progressão da amigdalite (EZZEDDINI et al., 2012).

O íon Ca²⁺, é o principal cofator para atividade das svPLA₂s, e um resíduo de Asp na posição 49 é essencial para a ligação e catálise dos substratos (YU et al., 1998). A sua atividade catalítica sobre fosfolípidios de membranas de células de tecidos específicos sugere um papel importante destas enzimas na toxicidade das peçonhas (SAMY; GOPALAKRISHNAKONE; CHOW, 2012). As peçonhas de serpente são utilizadas como ferramentas para o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas, com uma grande variedade de efeitos farmacológicos, devido aos seus componentes ativos (EL-AZIZ; SOARES; STOCKAND, 2019; OLIVEIRA et al., 2021a; OLIVEIRA et al., 2021b). As PLA₂s têm sido descritas como de grande interesse médico-científico e aplicações biotecnológicas, devido ao seu envolvimento com diversas atividades, como miotoxicidade, hemólise e processos inflamatórios (JIA et al., 2019).

Diversos extratos de plantas e seus componentes tem sido descritos como inibidores de PLA₂s (KISHORE; YARLA; ZAMEER, 2016; FATIMA et al., 2019; OLIVEIRA et al., 2021a; OLIVEIRA et al., 2021b). O extrato de *Bredemeyera floribunda* neutralizou a atividade de PLA₂s de *B. jararacussu* (ALVES et al., 2019). Flavonoides como a quercetina e

a rotina, inibiram PLA_{2s} (LINDAHL; TAGESSON, 1997; COTRIM et al., 2011; TOYAMA et al., 2014). *Cynanchum paniculatum*, inibiu atividades PLA_{2s}, induzidas por peçonha *Deinagkistrodon acutus* (XIONG et al., 2018). Os compostos 2-hidroxi-3-metoxibenzaldeído, 2-hidroxi-4-metoxibenzaldeído, álcool de 2-hidroxi-3-metoxibenzil apresentaram inibição de 100% sobre a atividade enzimática de PLA_{2s} (ALAM et al., 2016). Foi isolado do extrato de *Clematis gouriana*, o composto ikshusterol3-o-glicosídeo, que inibiu PLA_{2s} isoladas de *Naja naja* (MUTHUSAMY et al., 2017; MUTHUSAMY et al., 2018). Os extratos de *Eryngium foetidum*, *Neurolaena lobata*, *Pimenta dioica* e *Urospatha sagittifolia*, inibiram a atividade de PLA_{2s} de peçonhas do gênero *Bothrops* (SARAIVA-OTTEN et al., 2022; VERA-PALACIOS et al., 2022). Até o momento, já foram estudados diversos compostos isolados de plantas que apresentaram inibição sobre PLA_{2s} de diferentes peçonhas de serpentes (CARVALHO et al., 2013; GUIMARÃES et al. 2014; CASTAÑEDA et al., 2020).

O ácido rosmarínico (AR) demonstrou ser eficiente contra efeitos miotóxicos induzidos por peçonhas de serpentes botrópicas e toxinas isoladas (TICLI et al., 2005; AUNG et al., 2010a; AUNG et al., 2010b; DOS SANTOS; CARDOSO; SOARES, 2011; AUNG et al., 2011). Recentemente, foi demonstrado que o AR reduz significativamente a ocorrência do bloqueio neuro-muscular causado pela miotoxina MjTX-II, isolada da peçonha de *B. moojeni* (SALVADOR et al., 2019). Para a inibição exercida pelo AR sobre a PrTX-I isolada da peçonha de *B. pirajai*, foi descrita a formação de complexos, por meio de interações do AR com os resíduos da região N-terminal de um monômero da toxina (DOS SANTOS; CARDOSO; SOARES, 2011).

O mecanismo molecular de ativação da PrTX-I, ocorre com a entrada de uma molécula de ácido graxo, desse modo, a molécula de AR bloqueia o canal hidrofóbico impedindo a ativação da PrTX-I. Analogamente, o complexo MjTX-II/AR, caracteriza mecanismo de inibição semelhante. Contudo, nesse modelo, os dois monômeros da toxina interagem com o AR simultaneamente em regiões diferentes da molécula (TEIXEIRA et al., 2011). Os polifenóis presentes nas plantas podem interagir com proteínas contidas nas peçonhas de serpente através de ligações de hidrogênio, interações hidrofóbicas ou ligações covalentes, formando complexos solúveis ou insolúveis em condições estequiométricas favoráveis (HAGERMAN, 2012), alterando assim as estruturas e funções destas enzimas.

svPLA_{2s} contém inúmeras propriedades biológicas e alto grau de homologia com enzimas presentes no organismo humano e podem atuar em diferentes processos fisiológicos e patológicos. Devido a estas características, as svPLA_{2s} podem ser utilizadas como ferramenta

laboratorial, induzindo efeitos farmacotóxicos que simulem e/ou modulem as enzimas humanas (ROMERO et al., 2010).

2.5 Proteases e seus inibidores naturais

Diferentes proteases de peçonha de serpente [metaloproteases (SVMPs) e serinoproteases (SVSPs)] atuam na hemostasia. Algumas atuam sobre as plaquetas e sistema hemostático e outras podem interagir com fatores específicos da cascata de coagulação (KINI, 2011; SAJEVIC; LEONARDI; KRIZAJ, 2011; SLAGBOOM et al., 2017). Peçonhas de serpente botrópicas, da família Viperidae, são ricas em SVMPs (TASOULIS; ISBISTER, 2017), que causam hemorragia, inflamação, mionecrose e edema local (GUTIÉRREZ; RUCAVADO, 2000; GUTIÉRREZ et al., 2016).

Na peçonha de *B. moojeni* foram encontradas quantidades significativas de SVMPs (46,63%), seguida das SVSPs (26,18%), PLA₂s (9,02%) e hialuronidases (0,51%) (AMORIM et al., 2017). Estas enzimas danificam o endotélio vascular e estão envolvidas em vários efeitos patológicos (CHOUDHURY et al., 2018). A facilidade com o que ocorre a difusão de toxinas na circulação é devido as SVMPs que degradam a membrana basal e tecidos conjuntivos que circundam os vasos sanguíneos (ANAI et al., 2002). Objetivando reduzir a difusão de toxinas sistêmicas, inibidores de proteases, principalmente naturais, tem sido amplamente estudados (CHOUDHURY; SENTHILVADIVEL; VELMURUGAN, 2018).

Várias plantas são responsáveis pela inibição de proteases de diferentes peçonha de serpente, tais como os extratos de *Hedychium coronarium* (MIRANDA et al., 2014), *Jatropha gossypifolia* (FÉLIX-SILVA et al., 2014), *Sapindus saponaria* (DA SILVA et al., 2012), *Hypericum brasiliense* (ASSAFIM et al., 2011), *Luffa egyptiaca*, *Nicotina rustica* (IBRAHIM et al., 2011), *Mangifera indica* (DHANANJAYA et al., 2011), *Nectandra angustifolia* (TORRES et al., 2011), *Fagonia cretica* (RAZI et al., 2011) e *Hibiscus aethiopicus* (HASSON et al., 2010).

Algumas classes de moléculas naturais tem se destacado na inibição de metaloproteases e seus efeitos patológicos, tais como os terpenoides, esteróides, polifenóis e flavonóides (BIRT et al., 1997; SANTHOSH et al., 2013). A galocatequina, a isoquercitrina, a pinostrobin e a quercetina-3-o-ramnosídeo são flavonoides, isolados de diferentes espécies de plantas, apresentaram inibição sobre SVMPs de diversas espécies de viperídeos e elapídeos (CASTRO et al., 1999; VALE et al., 2011; GÓMEZ-BETANCUR et al., 2014; GOPI et al., 2016). Flavonoides (apigenina, luteolina, kaempferol, quercetina, miricetina, genisteína,

hesperidina, naringenina, (+)-catequina e (-)-epicatequina) também apresentaram inibição sobre metaloproteases da matriz humana (CRASCI et al., 2017; YADAV et al., 2017). Ligações de hidrogênio, interações hidrofóbicas, quelação de metais e interações de ligações pi, entre o núcleo fenólico dos flavonoides e interações entre as proteínas foram responsáveis por essas inibições (ANDERSEN; MARKHAM, 2005).

Outras proteases que desempenham um papel crucial na atividade fisiopatológica induzida pelas peçonhas são as SVSPs. As SVSPs catalisam a clivagem das ligações peptídicas nas proteínas e desempenham papel fundamental em diversos processos biológicos que vão da digestão ao controle e regulação da coagulação sanguínea, sistema imunológico e inflamação (KANG et al., 2011). Devido as SVSPs serem proteínas moduladoras da hemostase sanguínea diversos estudos revelaram o seu potencial terapêutico no tratamento da coagulopatia do sangue (PAINE; DESMOND; THEAKSTON, 1992; FOX; SERRANO, 2008; ZELANIS et al., 2011). Os distúrbios na hemostase estão diretamente associados a eventos proteolíticos causados, em sua maior parte, pelas serinoproteases (SERRANO; MAROUN, 2005; KINI, 2005). Essas enzimas afetam a coagulação sanguínea, agregação plaquetária e fibrinólise, causando perturbação da coagulação e efeitos drásticos do envenenamento por serpentes da família Viperidae.

Diferentes plantas e compostos isolados têm capacidade de neutralizar as diversas enzimas proteolíticas presentes nas peçonhas (MARQUES et al., 2018; CESAR et al., 2019). A hesperetina, flavonoide glicosilado, encontrado em frutas cítricas, inibiu a atividade catalítica de duas SVSPs, que foram denominadas de SVSP1 e SVSP2 e foram isoladas de *Crotalus simus* (SANTOS et al., 2018). Em adição, flavonoides e compostos fenólicos contidos em extratos de plantas são conhecidos por quelar íons zinco no sítio ativo das enzimas, impedindo assim sua ação (CHAYAMITI, 2013).

3 CONCLUSÃO

As plantas medicinais são constituídas de uma diversidade de compostos com potencial bioativos e com ação na prevenção e tratamento de diferentes doenças. Em adição, os probióticos produzem metabólitos benéficos ao organismo humano que favorecem o crescimento de uma microbiota intestinal saudável prevenindo contra infecções e diversas doenças crônicas resultantes de processos inflamatórios. A possível ação sinérgica que há entre os extratos de plantas e as bactérias probióticas foi observada na modulação da atividade das enzimas avaliadas no presente trabalho. Os efeitos exercidos pelos extratos de *Laurus nobilis*, *Ocimum basilicum*, *Origanum vulgare*, *Petroselinum crispum*, *Rosmarinus officinalis*, *Salvia officinalis* e *Thymus vulgaris* em conjunto com bactérias probióticas podem desempenhar um papel fundamental e benéfico a saúde humana, atuando na prevenção de doenças provenientes de distúrbios nos sistemas hemostáticos e inflamatório. Com isso, o aprofundamento desta pesquisa poderá contribuir para futuras aplicações terapêuticas dos extratos e bactérias avaliados.

REFERÊNCIAS

- AFONSO, M. S.; SANT'ANA, L. S.; MANCINI-FILHO J. Interaction between natural antioxidants and reactive oxygen species in cardiovascular diseases: perspectives to rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) contribution. **Nutrire**, v. 35, n. 1, p. 129-148, 2010.
- AFONSO, A. F. et al. Phytochemical composition and bioactive effects of *Salvia africana*, *Salvia officinalis* 'Icterina' and *Salvia mexicana* aqueous extracts. **Molecules**, v. 24, n. 4327, p. 1-13, 2019.
- AGUIRRE, M.; VENEMA, K. The art of targeting gut microbiota for tackling human obesity. **Genes & Nutrition**, v. 10, p. 1–12, 2015.
- AIROLDI, C. et al. Natural compounds against Alzheimer's disease: molecular recognition of A β 1-42 peptide by *Salvia sclareoides* extract and its major component, rosmarinic acid, as investigated by NMR. **Chemistry – An Asian Journal**, v. 8, p. 596-602, 2013.
- AL-ALI, K. H. et al. Cytotoxic activity of methanolic extract of *Mentha longifolia* and *Ocimum basilicum* against human breast cancer. **Pakistan Journal of Biological Sciences**, v. 16, n. 23, p. 1744-1750, 2013.
- ALAM, M. I. et al. Molecular modeling and snake venom phospholipase A₂ inhibition by phenolic compounds: Structure activity relationship. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 114, p. 209-219, 2016.
- ALDOGHACHI, F. E. H; AL-MOUSAWI, U. M. N.; SHARI, F. H. Antioxidant activity of rosmarinic acid extracted and purified from *Mentha piperita*. **Archives of Razi Institute**, v. 76, n. 5, p. 1279-1287, 2021.
- ALTAMEME, H. J.; HAMEED, I. H.; ABU-SERAG, N.A. Analysis of bioactive phytochemical compounds of two medicinal plants, *Equisetum arvense* and *Alchemilla vulgaris* seeds using gas chromatographymass spectrometry and fourier-transform infrared spectroscopy. **Malaysian Applied Biology**, v. 44, n. 4, p. 47-58, 2015.
- ALTINDAL, D.; ALTINDAL, N. **Sage (*Salvia officinalis*) oils**. In: Preedy, V. R. (Eds.), essential oils in food preservation, flavor and safety., London, p. 715-721, 2016.
- ALVES, N. T. Q. et al. Anti-ophidian activity of *Bredemeyera floribunda* Willd. (Polygalaceae) root extract on the local effects induced by *Bothrops jararacussu* venom. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 52, n. 1, 2019.
- AMER, M. et al. Probiotics and their use in inflammatory bowel disease. **Alternative Therapies in Health and Medicine**, v. 24, n. 3, p. 16-23, 2018.
- AMIRI, H. Essential oils composition and antioxidant properties of three Thymus species. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, 8 p., 2012.
- AMORIM, F. G. et al. New findings from the first transcriptome of the *Bothrops moojeni* snake venom gland. **Toxicon**, v. 140, p. 105-117, 2017.
- ANAI, K. et al. Neutralization of a snake venom hemorrhagic metalloproteinase prevents coagulopathy after subcutaneous injection of *Bothrops jararaca* venom in rats. **Toxicon**, v. 40, p. 63-68, 2002.

ANDERSEN, O. M.; MARKHAM, K. R. **Flavonoids: Chemistry, Biochemistry and Applications**; CRC Press: Boca Raton, FL, USA, 2005.

ANTONESCU, A. I. et al. Comparative phytochemical and antioxidative characterization of *Trifolium pratense* L. and *Ocimum basilicum* L. **Farmacia**, v. 67, 2019.

AROWOLO, M. A.; HE, J. Use of probiotics and botanical extracts to improve ruminant production in the tropics: A review. **Animal Nutrition**, v. 4, p. 241-249, 2018.

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

AUMEERUDDY-ELALFI, Z.; GURIB-FAKIM, A.; MAHOMOODALLY, F. Antimicrobial, antibiotic potentiating activity and phytochemical profile of essential oils from exotic and endemic medicinal plants of Mauritius. **Industrial Crops and Products**, v. 71, p. 197-204, 2015.

AUNG, H. T. et al. Rosmarinic acid in *Argusia argentea* inhibits snake venom-induced hemorrhage. **Journal of Natural Medicines**, v. 64, p. 482–486, 2010a.

AUNG, H. T. et al. Biological and pathological studies of rosmarinic acid as an inhibitor of hemorrhagic *Trimeresurus flavoviridis* (habu) venom. **Toxins**, 2, n.10, p. 2478–2489, 2010b.

AUNG, H. T. et al. Contribution of cinnamic acid analogues in rosmarinic acid to inhibition of snake venom induced hemorrhage. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 19, p. 2392–2396, 2011.

BAHRI, S. et al. *Thymus vulgaris* inhibit lung fibrosis progression and oxidative stress induced by bleomycin in wistar rats. **Nutrition and Cancer**, v. 74, n. 4, 2022.

BELSCAK-CVITANOVIC, A. et al. Emulsion templated microencapsulation of dandelion (*Taraxacum officinale* L.) polyphenols and β -carotene by ionotropic gelation of alginate and pectin. **Food Hydrocolloids**, v. 57, p. 139–152, 2016.

BENABED, K. et al. Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activities of the essential oils of three Algerian Lamiaceae species. **Current Nutrition & Food Science**, v. 13, p. 97-109, 2017.

BILAL, A. et al. Phytochemical and pharmacological studies on *Ocimum basilicum* Linn – a review. **International Journal of Current Research and Review**, v. 4, p. 73-83, 2012.

BIRT, D. F. et al. Inhibition of ultraviolet light induced skin carcinogenesis in SKH-1 mice by apigenin, a plant flavonoid. **Anticancer Research**, v. 17, p. 85-91, 1997.

BOUREBABA, N. et al. *Laurus nobilis* ethanolic extract attenuates hyperglycemia and hyperinsulinemia-induced insulin resistance in HepG2 cell line through the reduction of oxidative stress and improvement of mitochondrial biogenesis – Possible implication in pharmacotherapy. **Mitochondrion**, v. 59, p. 190-213, 2021.

BRAHMI, N. et al. ¹H NMR based metabolic profiling of eleven Algerian aromatic plants and evaluation of their antioxidant and cytotoxic properties. **Food Research International**, v. 76, p. 334-341, 2015.

- BRAVO, H. C. et al. Basil seeds as a novel food, source of nutrients and functional ingredients with beneficial properties: a review. **Foods**, v. 10, n. 1467, p. 1-18, 2021.
- BRDANIN, S.; BOGDANOVIC, N.; KOLUNDZIC, M. Antimicrobial activity of oregano (*Origanum vulgare* L.) and basil (*Ocimum basilicum* L.) extracts. **Advanced Technologies**, v. 4, n. 2, p. 5-10, 2015.
- BURITI, F. C. A.; SAAD, S. M. I. Bacteria of *Lactobacillus casei* group: characterization, viability as probiotic in food products and their importance for human health. **Archivos Latinoamericanos de Nutrición**, v. 57, n. 4, 2007.
- BURKE, J. E.; DENNIS, E. A. Phospholipase A2 structure/function, mechanism, and signaling. **Journal of Lipid Research**, v. 50, p. 237–242, 2009.
- BURSAL, E.; KOKSAL, E. Evaluation of reducing power and radical scavenging activities of water and ethanol extracts from sumac (*Rhus coriaria* L.). **Food Research International**, v. 44, p. 2217–2221, 2011.
- BUTEL, M. J. Probiotics, gut microbiota and health. **Médecine et Maladies Infectieuses**, v. 44, n. 1, p. 1–8, 2014.
- CAREY, C. M. et al. The effect of probiotics and organic acids on Shiga-toxin 2 gene expression in enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157: H7. **Journal of Microbiological Methods**, v. 73, n. 2, p. 125-132, 2008.
- CARVALHO, B. M. A. et al. Snake venom PLA₂s inhibitors isolated from Brazilian plants: synthetic and natural molecules. **BioMed Research International**, 2013.
- CASTAÑEDA, I. H. et al. Sulfur compounds as inhibitors of enzymatic activity of a snake venom phospholipase A₂: benzyl 4-nitrobenzenecarbodithioate as a case of study. **Molecules**, v. 25, n. 1373, p. 1-12, 2020.
- CASTRO, O. et al. Neutralización del efecto hemorrágico inducido por veneno de *Bothrops asper* (Serpentes: Viperidae) por extractos de plantas tropicales. **Revista Biología Tropical**, v. 47, p. 605-616, 1999.
- CASTRO-IBÁÑEZ, I.; GIL, M. I.; ALLENDE, A. Ready-to-eat vegetables. Current problems and potential solutions to reduce microbial risk in the production chain. **LWT-Food Science and Technology**, v. 85, p. 284-292, 2017.
- CATUNESCU, G. M. et al. Comparative effect of gamma irradiation, drying and freezing on sensory, and hygienic quality of parsley leaves. **LWT**, v. 115, n. 108448, 2019.
- CESAR, P. H. S. et al. Molecular interactions between p-coumaric acid and snake venom toxins. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 120, n. 9, p. 14594-14603, 2019.
- CHÁVEZ-TAPIA, N. C. et al. Current evidence on the use of probiotics in liver diseases. **Journal of Functional Food**, v. 17, p. 137–151, 2015.
- CHAYAMITI, T. Spectrophotometric study of the anti-caseinolytic activity of root extracts of *Teclea nobilis* and *Vepris zambesiaca* on *Bitis arietans* venom. **African Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 7, p. 1420-1425, 2013.

CHEN, C. et al. Research of dyeing thermodynamics and supramolecular structure of luteolin on Wool Fabric. **World Journal of Engineering and Technology**, v. 5, p. 19-28, 2017.

CHOI, S. et al. Difference in the gut microbiome between ovariectomy-induced obesity and diet-induced obesity. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 27, p. 2228-2236, 2017.

CHOUDHURY, M. et al. EC-PIII, a novel non-hemorrhagic procoagulant metalloproteinase: Purification and characterization from Indian *Echis carinatus* venom. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 106, p. 193-199, 2018.

CHOUDHURY, M.; SENTHILVADIVEL, V.; VELMURUGAN, D. Inhibitory effects of ascorbic acid toward snake venom metalloproteinase (SVMP) from Indian *Echis carinatus* venom: Insights from molecular modeling and binding studies. **Journal of Biochemical and Molecular Toxicology**, v. 32, n. 12, 2018.

CHUANG, L. T. et al. Ethanolic extract of *Origanum vulgare* suppresses propionibacterium acnes-induced inflammatory responses in human monocyte and mouse ear edema models. **Molecules**, v. 23, 2018.

CIMMINO, G.; GOLINO, P. Platelet biology and receptor pathways. **Journal of Cardiovascular Translational Research**, v. 6, n. 3, p. 299-309, 2013.

CIMMINO, G.; CICCARELLI, G.; GOLINO, P. Role of tissue factor in the coagulation network. **Seminars in Thrombosis and Hemostasis**, v. 41, n. 7, p. 708-717, 2015.

COCCIMIGLIO, J.; ALIPOUR, M.; JIANG, Z. H. Antioxidant, antibacterial, and cytotoxic activities of the ethanolic *Origanum vulgare* extract and its major constituents. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, 8 p., 2016.

COLICA, C. et al. Rosmarinic acid as potential anti-inflammatory agent. **Reviews on Recent Clinical Trials**, v. 13, p. 240-242, 2018.

COGHETTO, C. C.; BRINQUES, G. B.; SIQUEIRA, N. M. Electrospaying microencapsulation of *Lactobacillus plantarum* enhances cell viability under refrigeration storage and simulated gastric and intestinal fluids. **Journal of Functional Foods**, v. 24, p. 316-326, 2016.

CONFORTI, F.; MARRELLI, M.; MENICHINI F. Chemical composition and protective effect of oregano (*Origanum heracleoticum* L.) ethanolic extract on oxidative damage and on inhibition of NO in LPS-stimulated RAW 264.7 macrophages. **Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry**, v. 26, p. 404-411, 2011.

CORRÊA FILHO, L. C. et al. Microbiological quality and essential oil of parsley (*Petroselinum crispum*) submitted to the hygienizing and drying process. **Industrial Crops and Products**, v. 114, p. 180-184, 2018.

COTRIM, C. A. et al. Quercetin as an inhibitor of snake venom secretory phospholipase A2. **Chemico-Biological Interactions**, v. 189, p. 9-16, 2011.

CRASCI, L. et al. Correlating *in vitro* target-oriented screening and docking: inhibition of matrix metalloproteinases activities by flavonoids. **Planta Medica**, v. 83, n. 11, p. 901-911, 2017.

- DA SILVA, M. L. et al. Anti-snake venom activities of extracts and fractions from callus cultures of *Sapindus saponaria*. **Pharmaceutical Biology**, v. 50, n. 3, p. 366-375, 2012.
- DALIRI, E. B. M.; LEE, B. H. New perspectives on probiotics in health and disease. **Food Science and Human Wellness**, v. 4, p. 56–65, 2015.
- DE PRISCO, A.; MARESCA, D.; ONGENG, D. Microencapsulation by vibrating technology of the probiotic strain *Lactobacillus reuteri* dsm 17938 to enhance its survival in foods and in gastrointestinal environment. **L.W.T. Food Science and Technology**, v. 61, p. 452–462, 2015.
- DE TORRE, M. P. et al. Improvement of antioxidant activity of oregano (*Origanum vulgare* L.) with an oral pharmaceutical form. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 129, n. 110424, p. 1-9, 2020.
- DIAZ, M. I. et al. Nutritional and antioxidante contributions of *Laurus nobilis* L. leaves: would be more suitable a wild or cultivated sample? **Food Chemistry**, v. 156, p. 339-346, 2014.
- DHANANJAYA, B. L. et al. Anti-venom potential of aqueous extract of stem bark of *Mangifera indica* L. against *Daboia russellii* (Russell's viper) venom. **Indian Journal of Biochemistry and Biophysics**, v. 48, p. 175-183, 2011.
- DOLEY, R.; ZHOU, X.; KINI, R. M. **Snake venom phospholipase A2 enzymes**. In: Mackessy SP, editor. Handbook of Venoms and Toxins of Reptiles. Boca Raton, FL, USA: CRC Press, p. 173–205, 2010.
- DOS SANTOS, J. I.; CARDOSO, F. F.; SOARES, A. M. Structural and functional studies of a bothropic myotoxin complexed to rosmarinic acid: new insights into Lys49-PLA2 inhibition. **PLoS One**, v. 6, 28521, 2011.
- DUBEY, M. K. et al. PR Toxin – Biosynthesis, genetic regulation, toxicological potential, prevention and control measures: overview and challenges. **Frontiers in Pharmacology**, v. 9, 2018.
- ECKBURG, P. B. et al. Diversity of the human intestinal microbial flora. **Science**, v. 308, n. 5728, p. 1635–1638, 2005.
- EL-AZIZ, T. M. A.; SOARES, A. G.; STOCKAND, J. D. Snake venoms in drug discovery: valuable therapeutic tools for life saving. **Toxins**, v. 11, n. 10, p. 564, 2019.
- EL-BESHBISHY, H. A.; BAHASHWAN, S. A. Hypoglycemic effect of basil (*Ocimum basilicum*) aqueous extract is mediated through inhibition of α -glucosidase and α -amylase activities: An *in vitro* study. **Toxicology and Industrial Health**, v. 28, n. 1, p. 42-50, 2012.
- ELMASTAS, M. et al. The antioxidant activity of two wild edible mushrooms (*Morchella vulgaris* and *Morchella esculanta*) from North Turkey. **Combinatorial Chemistry and High Throughput Screening**, v. 9, 2006.
- ELSHAFIE, H. S.; CAMELE, I. An overview of the biological effects of some Mediterranean essential oils on human health. **BioMed Research International**, v. 2017, 2017.
- EPIFANIO, N. M. M. et al. Chemical characterization and *in vivo* antioxidant activity of parsley (*Petroselinum crispum*) aqueous extract. **Food & Function**, v. 11, p. 5346-5356, 2020.

EZZEDDINI, R. et al. Circulating phospholipase A2 activity in obstructive sleep apnea and recurrent tonsillitis. **International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology**, v.76, n. 4, p.471–474, 2012.

FARNWORTH, E. R.; CHAMPAGNE, C. **Production of probiotic cultures and their incorporation into Foods**. In probiotics, prebiotics, and synbiotics: Bioactive foods in health promotion; Watson, R.R., Preedy, V., Eds.; Academic Press: San Diego, CA, USA, 2016; pp. 303–318.

FARZAEI, M. H. et al. Parsley: a review of ethnopharmacology, phytochemistry and biological activities. **Journal of Traditional Chinese Medicine**, v. 33, n. 6, p. 815-826, 2013.

FATIMA, S. et al. Evaluation of different Pakistani medicinal plants for inhibitory potential against *Echis carinatus* induced phospholipase A₂ toxicity. **Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 32, n. 5, p. 2269-2277, 2019.

FÉLIX-SILVA, J. et al. Aqueous leaf extract of *Jatropha gossypifolia* L. (Euphorbiaceae) inhibits enzymatic and biological actions of *Bothrops jaraca* snake venom. **PLOS ONE**, v. 9, n. 8, 2014.

FERNANDES JÚNIOR, A., 2012. **Produtos antimicrobianos naturais: Potencial de uso na terapêutica das doenças infecciosas e como aditivos em alimentos**. Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Instituto de Biociências, Botucatu, São Paulo.

FONTANÉ, L. et al. Influence of the microbiota and probiotics in obesity. **Clinica e Investigación en Arteriosclerosis**, v. 30, n. 6, p. 271-279, 2018.

FOUDAH, A. I. et al. Phytochemical screening, *in vitro* and *in silico* studies of volatile compounds from *Petroselinum crispum* (Mill) leaves grown in Saudi Arabia. **Molecules**, v. 27, n. 934, p. 1-18, 2022.

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**, v. 275, p. 3016-3030, 2008.

GARCIA, C. S. C.; ELY, M. R.; WASUM, R. A. Assessment of *Salvia officinalis* (L.) hydroalcoholic extract for possible use in cosmetic formulation as inhibitor of pathogens in the skin. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 33, n. 4, p. 509-514, 2012.

GARCIA, C. S. C. et al. Pharmacological perspectives from Brazilian *Salvia officinalis* (Lamiaceae): antioxidant, and antitumoral in mammalian cells. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 88, n. 1, p. 281-292, 2016.

GARDENIA CREATING JARDENS. Disponível em:
<https://www.gardenia.net/plant/ocimum-basilicum>. Acesso em: 06 mar. 2023.

GHORBANI, A.; ESMAEILIZADEH, M. Pharmacological properties of *Salvia officinalis* and its components. **Journal of Traditional and Complementary Medicine**, v. 7, p. 433-440, 2017.

GÓMEZ-BETANCUR, I. et al. Inhibition of the toxic effects of *Bothrops asper* venom by pinostrobin, a flavanone isolated from *Renealmia alpinia* (Rottb) MAAS. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 155, p. 1609–1615, 2014.

- GOPI, K. et al. Quercetin-3-O-rhamnoside from *Euphorbia hirta* protects against snake venom induced toxicity. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1860, p. 1528–1540, 2016.
- GOZE, I.; CETIN, A.; GOZE A. Investigation of effects of essential oils of *Origanum minutiflorum* O Schwarz PH Davis and *Cyclotrichium niveum* (Labiatae) plants on angiogenesis in shell-less chick embryo culture. **African Journal of Biotechnology**, v. 9, p. 2156-2160, 2010.
- GROVER, S. P.; MACKMAN, N. Tissue factor: an essential mediator of hemostasis and trigger of thrombosis. **Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology**, v. 38, n. 4, p. 709–725, 2018.
- GUARNER, F.; MALAGELADA, J. R. Gut flora in health and disease. **The Lancet**, v. 360, Issue 9356, n. 8, p. 512-519, 2003.
- GUIMARÃES, C. L. S. et al. Biodiversity as a source of bioactive compounds against snakebites. **Current Medicinal Chemistry**, v. 21, n. 25, p. 2952-2979, 2014.
- GÜLÇİN, I. et al. Polyphenol contents and antioxidant activity of lyophilized aqueous extract of popolis from Erzurum, Turkey. **Food and Chemical Toxicology**, v. 48, p. 2227–2238, 2010.
- GÜLÇİN, I. et al. Apoptotic, antioxidant and antiradical effects of majdine and isomajdine from *Vinca Herbacea* Waldst. and Kit. **Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry**, v. 27, p. 587–594, 2012.
- GÜLÇİN, I.; BEYDEMİR, S. Phenolic compounds as antioxidants: Carbonic anhydrase isoenzymes inhibitors. **Mini Review in Medicinal Chemistry**, v. 13, p. 408–430, 2013.
- GULLUCE, M. et al. Isolation of some active compounds from *Origanum vulgare* L. ssp. *vulgare* and determination of their genotoxic potentials. **Food Chemistry**, v. 130, p. 248-253, 2012.
- GUNENC, A. et al. Seabuckthorn as a novel prebiotic source improves probiotic viability in yogurt. **L.W.T. Food Science and Technology**, v. 66, p. 490–495, 2016.
- GUPTA, S.; ABU-GHANNAM, N. Probiotic fermentation of plant based products: Possibilities and opportunities. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 52, p. 183–199, 2012.
- GUTIÉRREZ, J. M.; RUCAVADO, A. Snake venom metalloproteinases: their role in the pathogenesis of local tissue damage. **Biochimie**, v. 82, p. 841–850, 2000.
- GUTIÉRREZ, J. M. et al. A comprehensive view of the structural and functional alterations of extracellular matrix by snake venom metalloproteinases (SVMPs): Novel perspectives on the pathophysiology of envenoming. **Toxins**, v. 8, 304, 21 p., 2016.
- HABIBI, E.; SHOKRZADEH, M.; CHABRA, A. Protective effects of *Origanum vulgare* ethanol extract against cyclophosphamide-induced liver toxicity in mice. **Pharmaceutical Biology**, v. 53, p. 10–15, 2015.
- HAGERMAN, A. E. **Fifty years of polyphenol-protein complexes**. In: Cheynier, V., Sarni Manchado, P., Quideau, S. (Eds.), *Recent Advances in Polyphenol Research*. Wiley, Malden, p. 71-97, 2012.

- HAJELA, N. et al. Health impact of probiotics – vision and opportunities. **Gut Pathogens**, v. 4, p. 1-6, 2012.
- HAMEED, I. H.; HUSSEIN, H. J.; KAREEM, M. A. Identification of five newly described bioactive chemical compounds in methanolic extract of *Mentha viridis* by using gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). **Journal of Pharmacognosy and Phytotherapy**, v. 7, n. 7, p. 107-125, 2015.
- HASSON, S. S. et al. Antisnake venom activity of *Hibiscus aethiopicus* L. against *Echis ocellatus* and *Naja nigricollis*. **Journal of Toxicology**, v. 2010, p.1-8, 2010.
- HESHAMI, N. et al. Favorable effects of dill tablets and *Ocimum basilicum* L. extract on learning, memory and hippocampal fatty acid composition in hypercholesterolemic rats. **Iranian Journal of Basic Medical Sciences**, v. 24, p. 300-311, 2021.
- HOLKEM, A. T.; DA SILVA, M. P.; FAVARO-TRINDADE, C. S. Probiotics and plant extract: a promising synergy and delivery systems. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, p. 1-19, 2022.
- HORTO DIDÁTICO DE PLANTAS MEDICINAIS DO HU/CCS. Disponível em: <https://www.hortodidatico.ufsc.br/louro/>. Acesso em: 06 mar. 2023a.
- HORTO DIDÁTICO DE PLANTAS MEDICINAIS DO HU/CCS. Disponível em: <https://www.hortodidatico.ufsc.br/oregano/>. Acesso em: 06 mar. 2023b.
- HORTO DIDÁTICO DE PLANTAS MEDICINAIS DO HU/CCS. Disponível em: <https://www.hortodidatico.ufsc.br/salsa/>. Acesso em: 06 mar. 2023c.
- HORTO DIDÁTICO DE PLANTAS MEDICINAIS DO HU/CCS. Disponível em: <https://www.hortodidatico.ufsc.br/alecrim/>. Acesso em: 06 mar. 2023d.
- HORTO DIDÁTICO DE PLANTAS MEDICINAIS DO HU/CCS. Disponível em: <https://www.hortodidatico.ufsc.br/salvia-real/>. Acesso em: 06 mar. 2023e.
- HOSSEINZADEH, S. et al. The application of medicinal plants in traditional and modern medicine: A review of *Thymus vulgaris*. **International Journal of Clinical Medicine**, v. 6, p. 635-642, 2015.
- HOUICHER, A. et al. *In vitro* study of the antifungal activity of essential oils obtained from *Mentha spicata*, *Thymus vulgaris* and *Laurus nobilis*. **Recent Patents Food Nutrition & Agriculture**, v. 8, p. 99-106, 2016.
- HOZAYEN, W. G. et al. Antiosteoporotic effect of *Petroselinum crispum*, *Ocimum basilicum* and *Cichorium intybus* L. in glucocorticoid-induced osteoporosis in rats. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 16, n. 165, 11 p., 2016.
- HRACHOVINOVÁ, I. Diagnostic strategies in disorders of hemostasis. **Vnitr Léč**, v. 64, n. 5, p. 537-544, 2018.
- HUSSAIN, A. J. et al. *Rosmarinus officinalis* essential oil: antiproliferative, antioxidante and antibacterial activities. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 41, p. 1070-1078, 2010.
- HUSSEIN, A. O.; MOHAMMED, G. J. Phytochemical screening of methanolic dried galls extract of *Quercus infectoria* using gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) and

fourier transform-infrared (FT-IR). **Journal of Pharmacognosy and Phytotherapy**, v. 8, n. 3, p. 49-59, 2016.

IBRAHIM, M. A. et al. Inhibition of *Naja nigricolis* (Reinhardt) venom protease activity by *Luffa egypitiaca* (Mill) and *Nicotina rustica* (Linn) extracts. **Indian Journal of Experimental Biology**, v. 49, p. 552-554, 2011.

ILKIU-VIDAL, L. H.; SOUZA, J. R. B.; VIANI, R. A. G. Action of potentials of hydrogen on growth and productivity of sage (*Salvia officinalis* L.). **Brazilian Journal of Medicinal Plants**. Botucatu, v. 12, n. 1, p. 43-47, 2010.

IVEY, K. L. et al. The effect of yoghurt and its probiotics on blood pressure and serum lipid profile; a randomised controlled trial. **Nutrition, Metabolism & Cardiovascular Diseases**, v. 25, p. 46–51, 2015.

JAKOVLJEVIC, M. et al. *Salvia officinalis* L. Preparations. **Plants**, v. 8, n. 55, 2019.

JASSBI, A. R. et al. Bioactive phytochemical from shoots and roots of *Salvia* species. **Phytochemistry Reviews**, v. 15, p. 829-867, 2016.

JEDIDI S et al. Comparative studies of phytochemical screening, HPLC-PDA-ESI-MS/MS-LC/HR-ESI-MS analysis, antioxidant capacity and in vitro fermentation of officinal sage (*Salvia officinalis* L.) cultivated in different biotopes of Northwestern Tunisia. **Chemistry & Biodiversity**, v. 17, n. e1900394, p. 1-16, 2020.

JENSEN, H. et al. *In vitro* testing of commercial and potential probiotic lactic acid bacteria. **International Journal of Food Microbiology**, v. 153, p. 216-222, 2012.

JIA, Y. et al. Rapid identification of phospholipase A₂ transcripts from snake venoms. **Toxins**, v. 11, n. 2, p. 69, 2019.

JIN, W. et al. Comprehensive understanding of the bacterial populations and metabolites profile of fermented feed by 16S rRNA gene sequencing and liquid chromatography-mass spectrometry. **Metabolites**, v. 9, n. 239, 2019.

KADHIM, M. J.; MOHAMMED, G. J.; HAMEED, I. H. *In vitro* antibacterial, antifungal and phytochemical analysis of methanolic fruit extract of *Cassia fistula*. **Oriental Journal of Chemistry**, v. 32, n. 2, p. 10-30, 2016.

KAMLI, M. R. et al. Phytochemical screening of *Rosmarinus officinalis* L. as a potential anticholinesterase and antioxidant-medicinal plant for cognitive decline disorders. **Plants**, v. 11, n. 514, p. 1-15, 2022.

KANG, T. S. et al. Enzymatic toxins from snake venom: structural characterization and mechanism of catalysis. **The FEBS Journal**, v. 278, p. 4544-4576, 2011.

KASEM, S. M. et al. Evaluating the *in vitro* efficiency of *Rosmarinus officinalis* extracts formalin and sodium hypochlorite on sporulation of *Eimeria tenella* oocysts. **Jokull Journal**, v. 69, n. 9, p. 36-54, 2019.

KAYA, I.; YIGIT, N.; BENLI, M. Antimicrobial activity of various extracts of *Ocimum basilicum* L. and observation of the inhibition effect on bacterial cells by use of scanning electron microscopy. **African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines**, v. 5, n. 4, p. 363-369, 2008.

- KELLY, J. R. et al. Brain-gut-microbiota axis: challenges for translation in psychiatry. **Annals of Epidemiology**, v. 26, p. 366-372, 2016.
- KHALIQ, R.; TITA, O.; SAND, C. A comparative study between seeds of sweet basil and psyllium on the basis of proximate analysis. **Scientific Papers Series Management, Economic Engineering in Agriculture and Rural Development**, v. 17, p. 189-194, 2017.
- KIM, S. K. et al. Role of probiotics in human gut microbiome-associated diseases. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 29, n. 9, p. 135-1340, 2019.
- KINI, R. M. Serine proteases affecting blood coagulation and fibrinolysis from snake venoms. **Pathophysiology of Haemostasis and Thrombosis**, v. 34, p. 200-204, 2005.
- KINI, R. M. Toxins in thrombosis and haemostasis: potential beyond imagination. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, v. 9, p. 195–208, 2011.
- KISHORE, V.; YARLA, N. S.; ZAMEER, F. Inhibition of group IIA secretory phospholipase A₂ and its inflammatory reactions in mice by ethanolic extract of *Andrographis paniculata*, a well-known medicinal food. **Pharmacognosy Research**, v. 8, n. 3, p. 213–216, 2016.
- KISIRIKO, M. et al. Phenolic from medicinal and aromatic plants: characterization and potential as biostimulants and bioprotectants. **Molecules**, v. 26, n. 6343, p. 1-37, 2021.
- KIYOSE, C. et al. Improvement effect on sweet basil (*Ocimum basilicum* L.) powder intake on obese mice fed a high-fat and high-sucrose diet. **Journal of Oleo Science**, v. 70, p. 1317-1323, 2021.
- KÖSE, L. P. et al. LC-MS/MS analysis, antioxidant and anticholinergic properties of galanga (*Alpinia Officinarum* Hance) rhizomes. **Industrial Crops and Products**, v. 74, p. 712–721, 2015.
- KUMARI, A. et al. Probiotic attributes of indigenous *Lactobacillus* spp. isolated from traditional fermented foods and beverages of north-western Himalayas using *in vitro* screening and principal component analysis. **Journal of Food Science Technology**, v. 53, p. 2463–2475, 2016.
- KURSAT, M. et al. Antioxidant and antimicrobial activity in the seeds of *Origanum vulgare* L. subsp. *gracile* (C. Koch) letsvaart and *Origanum acutidens* (Hand-Mazz.) letsvaart from Turkey. **Grasas Y Aceites**, v. 62, n. 4, p. 410–417, 2011.
- LAMBEAU, G.; GELB, M. H. Biochemistry and physiology of mammalian secreted phospholipases A₂. **Annual Review of Biochemistry**, v. 77, p. 495-520, 2008.
- LI, X. et al. Traditional uses, chemical constituents and biological activities of plants from the genus *Thymus*. **Chemistry & Biodiversity**, v. 16, n. e1900254, 2019.
- LINDAHL, M.; TAGESSON, C. Flavonoids as phospholipase A₂ inhibitors: importance of their structure for selective inhibition of group II phospholipase A₂. **Inflammation**, v. 21, p. 347-356, 1997.
- LU, Y.; FOO, L.Y. Polyphenolics of *Sálvia* – a review. **Phytochemistry**, v. 59, p. 117-140, 2002.

- LU, Y. et al. Characterisation of organic and conventional sweet basil leaves using chromatographic and flow-injection mass spectrometric (FIMS) fingerprints combined with principal component analysis. **Food Chemistry**, v. 154, p. 262–268, 2014.
- MAHMOUDI, R. et al. An introductory review on increasing the survival of probiotic bacteria in dairy products using essential oil. **Journal of Dental and Oral Health**, v. 3, n. 4, 4 p., 2017.
- MANCINI, E. et al. Studies on chemical composition, antimicrobial and antioxidant activities of five *Thymus vulgaris* L. essential oils. **Molecules**, v. 20, p. 12016-12028, 2015.
- MARELLI, G.; PAPALEO, E.; FERRARI, A. Lactobacilli for prevention of urogenital infections: a review. **European Review for Medical and Pharmacological Sciences**, v. 8, p. 87–95, 2004.
- MARIUTTI, L. R. B.; BRAGANOLO, N. Review: Natural antioxidants from the Lamiaceae family. Application in food products. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 10, n. 2, p. 96-103, 2007.
- MARQUES, T. R. et al. Fruit bagasse phytochemicals from *Malpighia emarginata* Rich in enzymatic inhibitor with modulatory action on hemostatic processes. **Journal of Food Science**, v. 83, n. 11, p. 2840-2849, 2018.
- MARTÍNEZ, M. P et al. Probiotic bacteria and yeasts adsorb aflatoxin M₁ in milk and degrade it to less toxic AFM₁-metabolites. **Toxicon**, v. 172, p. 1-7, 2019.
- MARTINS, N. et al. Decoction, infusion and hydroalcoholic extract of *Origanum vulgare* L.: Different performances regarding bioactivity and phenolic compounds. **Food Chemistry**, v. 158, p. 73-80, 2014.
- MARTINS, N. et al. Evaluation of bioactive properties and phenolic compounds in different extracts prepared from *Salvia officinalis* L. **Food Chemistry**, v. 170, p. 378-385, 2015.
- MAZZIO, E. A. et al. Natural product HTP screening for antibacterial (*E. coli* 0157:H7) and anti-inflammatory agents in (LPS from *E. coli* O111:B4) activated macrophages and microglial cells; focus on sepsis. **BMC Complementary Alternative Medicine**, v. 16, n. 467, p. 1-14, 2016.
- McCLEARY, R. J. R.; KINI, R. M. Snakebites and hemostasis/thrombosis. **Thrombosis Research**, v. 132, p. 642–646, 2013.
- MERGHNI, A. et al. Antibacterial and antibiofilm activities of *Laurus nobilis* L. essential oil against *Staphylococcus aureus* strains associated with oral infections. **Pathologie Biologie**, v. 64, p. 29–34, 2016.
- MIRAJ, S.; KIANI, S. Study of pharmacological effect of *Ocimum basilicum*: A review. **Der Pharmacia Lettre**, v. 8, n. 9, p. 276-280, 2016.
- MIRANDA, C. A. S. F. et al. Preliminary assessment of *Hedychium coronarium* essential oil on fibrinogenolytic and coagulant activity induced by Bothrops and Lachesis snake venoms. **Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases**, v. 20, n. 39, 2014.

- MOHAMED, N. A.; NASSIER, O. A. The antihyperglycaemic effect of the aqueous extract of *Origanium vulgare* leaves in streptozotocin-induced diabetic rats. **Jordan Journal of Biological Sciences**, v. 6, p. 31–38, 2013.
- MORAES, S. M.; CAVALCANTI, E. S. B.; COSTA, S. M. O. Antioxidant action of teas and seasonings more consumed in Brazil. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 19, p. 315-320, 2009.
- MUTHUSAMY, K. et al. Isolation and characterization of bioactive compounds of *Clematis gouriana* Roxb. ex DC against snake venom phospholipase A₂ (PLA₂s) computational and *in vitro* insights. **Journal of Biomolecular Structure and Dynamics**, v. 35, n. 9, p. 1936-1949, 2017.
- MUTHUSAMY, K. et al. Computacional and *in vitro* insights on snake venom phospholipase A₂ inhibitor of phytocompound ikshusterol3-o-glucoside of *Clematis gouriana* Roxb. ex DC. **Journal of Biomolecular Structure and Dynamics**, v. 36, n. 16, p. 4197-4208, 2018.
- NADEEM, F. et al. Chapter 4: Basil. In: Hanif M. A., Nawaz H., Khan M. M., Byrne H. J., editors. **Medicinal Plants of South Asia**. Elsevier, Amsterdam, The Netherlands: p. 47-62, 2020.
- NATURAL ALCHEMY. Disponível em: <https://www.naturalalchemy.com.au/product/thyme-thymus-vulgaris-2/>. Acesso em: 06 mar. 2023.
- NIETO, G. A review on applications and uses of Thymus in the food industry. **Plants**, v. 9, n. 961, p. 1-29, 2020.
- NOOMHORM, A.; AHMAD, I.; ANAL, A. K. **Functional Foods and Dietary Supplements**, 2014.
- NOVAIS, C. et al. Bioactive and nutritional potential of medicinal and aromatic plant (MAP) seasoning mixtures. **Molecules**, v. 26, n. 1587, p. 1-19, 2021.
- OLIVEIRA, D. A. et al. Modulation of hemostasis by inhibiting enzymes with the extract of *Averrhoa carambola* leaves. **Journal of Biotechnology and Biodiversity**, v. 9, n. 4, p. 384-396, 2021a.
- OLIVEIRA, D. A. et al. Lipases and proteases inhibition by *Averrhoa carambola* L. fruit extracts. **Phytomedicine Plus**, v. 1, n. 100119, p. 1-8, 2021b.
- OTHMAN, M. S. et al. Hepatorenal protective efficacy of flavonoids from *Ocimum basilicum* extract in diabetic albino rats: a focus on hypoglycemic, antioxidant, anti-inflammatory and anti-apoptotic activities. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 144, n. 112287, 2021.
- O'TOOLE, P. W.; COONEY, J. C. Probiotic bacteria influence the composition and function of the intestinal microbiota. **Interdisciplinary Perspectives on Infectious and Diseases**, v. 2008, p. 1-9, 2008.
- OZKAN, G. et al. Potential use of Turkish medicinal plants in the treatment of various diseases. **Molecules**, v. 21, n. 257, p. 1-32, 2016.
- PAINE, M. J. L.; DESMOND, H. P.; THEAKSTON, R. D. Purification, cloning and molecular characterization of a high molecular weight hemorrhagic metalloprotease,

jararhagin, from *Bothrops jararaca* venom, insights into the disintegrin gene Family. **Journal of Biological Chemistry**, v. 267, p. 22869-22876, 1992.

PETIWALA, S. M.; JOHNSON, J. J. Diterpenes from rosemary (*Rosmarinus officinalis*): Defining their potential for anti-cancer activity. **Cancer Letters**, v. 367, p. 93–102, 2015.

QIN, J. et al. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. **Nature**, v. 464, p. 59-65, 2010.

QNAIS, E. Y. et al. Antidiarrheal activity of *Laurus nobilis* L. leaf extract in rats. **Journal of Medicinal Food**, v. 15, n. 1, 2012.

QUIROGA, P. R.; ASENSIO, C. M.; NEPOTE, V. Antioxidant effects of the monoterpenes carvacrol, thymol and sabinene hydrate on chemical and sensory stability of roasted sun flower seeds. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 95, p. 471-479, 2014.

RANADHEERA, R.; HO, P. H.; LUO, J. Does the food substrate influence the functionality of probiotics? **Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition**, v. 16, n. 81, 2007.

RANADHEERA, C. S.; EVANS, C. A.; ADAMS, M. C. *In vitro* analysis of gastrointestinal tolerance and intestinal cell adhesion of probiotics in goat's milk ice cream and yogurt. **Food Research International**, v. 49, p. 619–625, 2012.

RAZI, M. T. et al. Antihaemorrhagic potentials of *Fagonia cretica* against *Naja naja karachiensis* (Black Pakistan cobra) venom. **Natural Product Research**, v. 25, p. 1902-1907, 2011.

RIDDEL JR., J. P. et al. Theories of blood coagulation. **Journal of Pediatric Oncology Nursing**, v. 24, n. 3, p. 123-131, 2007.

ROMERO, L. et al. Enzymatic and structural characterization of a basic phospholipase A(2) from the sea anemone *Condylactis gigantea*. **Biochimie**, v. 92, p. 1063-1071, 2010.

ROSS, R. P. et al. Cheese delivering biocultures-probiotic cheese. **Australian Journal of Dairy Technology**, v. 57, p. 71-78, 2002.

SAAD, S. M. I. Probiotics and prebiotics: the state of the art. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 42, p. 1-6, 2006.

SAAD, N. et al. An overview of the last advances in probiotic and prebiotic field. **LWT – Food Science and Technology**, v. 50, p. 1-16, 2013.

SACHETTO, A. T. A.; MACKMAN, N. Modulation of the mammalian coagulation system by venoms and other proteins from snakes, arthropods, nematodes and insects. **Thrombosis Research**, v. 178, p. 145–15, 2019.

SAJEVIC, T.; LEONARDI, A.; KRIZAJ, I. Haemostatically active proteins in snake venoms. **Toxicon**, v. 57, p. 627–645, 2011.

SALEM, I. B. et al. Effect of ionising radiation on polyphenolic content and antioxidant potential of parathion-treated sage (*Salvia officinalis*) leaves. **Food Chemistry**, v. 141, n. 2, p. 1398-1405, 2013.

- SALVADOR, G. H. M. et al. Search for efficient inhibitors of myotoxic activity induced by ophidian phospholipase A₂-like proteins using functional, structural and bioinformatics approaches. **Scientific Reports**, v. 9, n. 510, 2019.
- SAMY, R. P.; GOPALAKRISHNAKONE, P.; CHOW, V. T. K. Therapeutic application of natural inhibitors against snake venom phospholipase A₂. **Bioinformation**, v. 8, n. 1, p. 48-57, 2012.
- SANDERS, M. E. et al. Health claims substantiation for probiotic and prebiotic products. **Gut Microbes**, v. 2, p. 127-133, 2011.
- SANT'ANNA, P. B.; FRANCO, B. D. M.; MAFFEI, D. F. Microbiological safety of read-to-eat minimally processed vegetables in Brazil: an overview. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 100, p. 4664-4670, 2020.
- SANTHOSH, M. S. et al. Snake venom induced local toxicities: Plant secondary metabolites as an auxiliary therapy. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 13, p. 106-123, 2013.
- SANTOS, R. V. et al. Citrus bioflavonoid, hesperetin, as inhibitor of two thrombin-like snake venom serine proteases isolated from *Crotalus simus*. **Toxicon**, v. 143, p. 36-43, 2018.
- SANTOS, T. S. et al. Assessment of the microbiological quality and safety of minimally processed vegetables sold in Piracicaba, SP-Brazil. **Letters in Applied Microbiology**, v. 71, p. 187-194, 2020.
- SARAIVA-OTTEN, P. et al. Inhibition of enzymatic activities of *Bothrops asper* venom and docking analysis of compounds from plants used in Central America to treat snakebite envenoming. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 283, n. 114710, p. 1-12, 2022.
- SARIKURKCU, C. et al. Composition, antioxidant, antimicrobial and enzyme inhibition activities of two *Origanum vulgare* subspecies (subsp. *vulgare* and subsp. *hirtum*) essential oils. **Industrial Crops and Products**, v. 70, p. 178-184, 2015.
- SCHITTLER, L. et al. Isolation of *Enterococcus faecium*, characterization of its antimicrobial metabolites and viability in probiotic Minas frescal cheese. **Journal of Food Science Technology**, v. 56, n. 11, p. 5128-5137, 2019.
- SERRANO, S. M. T.; MAROUN, R. C. Snake venom serine proteinases: sequence homology vs. substrate specificity, a paradox to be solved. **Toxicon**, v. 45, p. 1115-1132, 2005.
- SHARIFI-RAD, J. et al. Biological activities of essential oils: from plant chemoeology to traditional healing systems. **Molecules**, v. 22, n. 70, 2017.
- SHARMA, A.; SINGH, J. K. S. **Bay leaves**. In handbook of herbs and spices, KV, P., Ed., Woodhead Publishing Ltd.: Oxford, UK, p. 73-85, 2012.
- SHAROPOV, F. S. et al. The essential oil compositions of *Ocimum basilicum* from three different regions: Nepal, Tajikistan and Yemen. **Chemistry & Biodiversity**, v. 13, p. 241-248, 2016.
- SHEIBANI, V. et al. Evaluation of *Origanum vulgare* L. ssp. *viridis* leaves extract effect on discrimination learning and LTP induction in the CA1 region of the rat hippocampus. **Iranian Journal of Basic Medical Sciences**, v. 14, p. 161-169, 2011.

- SHIPRADEEP et al. Development of probiotic candidate in combination with essential oils from medicinal plant and their effect on enteric pathogens: A review. **Gastroenterology Research and Practice**, v. 2012, p. 1-6, 2012.
- SILVA, A. B. et al. Antibacterial activity, chemical composition, and cytotoxicity of leaf's essential oil from Brazilian pepper tree (*Schinus terebinthifolius*, Raddi). **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 41, p. 158-163, 2010.
- SILVA, A. F.; SANTOS, E. P.; PENTEADO, P. T. P. S. Sensory analysis of *Salvia officinalis* L. **Visão Acadêmica**, v. 12, n. 1, p. 27-34, 2011.
- SILVEIRA, S. M. et al. Chemical composition and antibacterial activity of *Laurus nobilis* essential oil towards foodborne pathogens and its application in fresh Tuscan sausage stored at 7°C. **LWT-Food Science and Technology**, v. 59, n. 1, p. 86-93, 2014.
- SIMIRGIOTIS, M. J. et al. Antioxidant and antibacterial capacities of *Origanum vulgare* L. essential oil from the Arid Andean region of Chile and its chemical characterization by GC-MS. **Metabolites**, v. 10, n. 0414, p. 1-12, 2020.
- SLAGBOOM, J. et al. Haemotoxic snake venoms: their functional activity, impact on snakebite victims and pharmaceutical promise. **British Journal of Haematology**, v. 177, p. 947-959, 2017.
- SOZMEN, F. et al. Extraction of the essential oil from endemic *Origanum bilgeri* P.H Davis with two different methods: comparison of the oil composition and antibacterial activity. **Chemistry & Biodiversity**, v. 9, p. 1356-1363, 2012.
- TANG, E. L. H. et al. *Petroselinum crispum* has antioxidant properties, protects against DNA damage and inhibits proliferation and migration of cancer cells. **Journal of the Science of Food Agriculture**, v. 95, p. 2763-2771, 2015.
- TARGHI, R. G.; CHANGIZI, V.; HADDAD, F. *Origanum vulgare* leaf extract protects mice bone marrow cells against ionizing radiation. **Avicenna Journal of Phytomedicine**, v. 6, p. 678-685, 2016.
- TASOULIS, T.; ISBISTER, G. K. A review and database of snake venom proteomes. **Toxins**, v. 9, n. 290, 23 p., 2017.
- TEIXEIRA, S. S. et al. Molecular characterization of an acidic phospholipase A2 from *Bothrops pirajai* snake venom: synthetic C-terminal peptide identifies its antiplatelet region. **Molecular Toxicology**, v. 85, p. 1219-1233, 2011.
- TEIXEIRA, B.; MARQUES, A.; RAMOS, C. Chemical composition and bioactivity of different oregano (*Origanum vulgare*) extracts and essential oil. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 93, p. 2707-2714, 2013.
- TICLI, F. K. et al. Rosmarinic acid, a new snake venom phospholipase A2 inhibitor from *Cordia verbenacea* (Boraginaceae): antiserum action potentiation and molecular interaction. **Toxicon**, v. 46, p. 318-327, 2005.
- TOPAL, M. et al. Antioxidant, antiradical and anticholinergic properties of cynarin purified from the Illyrian Thistle (*Onopordum illyricum* L.). **Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry**, v. 31, p. 266-275, 2016.

- TORRES, A. M. et al. Neutralizing effects of *Nectandra angustifolia* extracts against *Bothrops neuwiedi* snake venom. **Natural Product Communications**, v. 6, p. 1393-1396, 2011.
- TOUISS, I. et al. Toxicological evaluation and hepatoprotective efficacy of rosmarinic acid-rich extract from *Ocimum basilicum* L. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, 6676998, 2021.
- TOYAMA, D. O. et al. An evaluation of 3-rhamnosylquercetin, a glycosylated form of quercetin, against the myotoxic and edematogenic effects of sPLA2 from *Crotalus durissus terrificus*. **BioMed Research International**, 2014, 2014.
- TURAL, S.; TURHAN, S. Antimicrobial and antioxidant properties of thyme (*Thymus vulgaris* L.), rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) and laurel (*Laurus nobilis* L.) essential oils and their mixtures. **GIDA/The Journal of Food**, v. 42, p. 588-596, 2017.
- UMAR, A. et al. Effect of *Ocimum basilicum* L. on cyclo-oxygenase isoforms and prostaglandins involved in thrombosis. **Journal of Ethnopharmacology**, p. 151-155, 2014.
- VAJRO, P. et al. Chapter 33—**Probiotics to treat visceral obesity and related liver disease**. In Nutrition in the Prevention and Treatment of Abdominal Obesity; Watson, R.R., Ed.; Academic Press: San Diego, CA, USA, p. 363–380, 2014.
- VALE, L. H. F. et al. Protective effect of *Schizolobium parahyba* flavonoids against snake venoms and isolated toxins. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 11, p. 2566–2577, 2011.
- VERA-PALACIOS, A. L. et al. A first look at the inhibitory potential of *Urospatha sagittifolia* (Araceae) ethanolic extract for *Bothrops atrox* snakebite envenomation. **Toxins**, v. 14, n. 496, p. 1-18, 2022.
- VIZOSO PINTO, M. G. et al. *Lactobacillus* spp. with *in vitro* probiotic properties from human faeces and traditional fermented products. **International Journal of Food Microbiology**, v. 109, p. 205-214, 2006.
- VRSALOVIC, L. et al. Inhibition of copper corrosion in NaCl solution by caffeic acid. **International Journal of Electrochemical Science**, v. 11, p. 459-474, 2016.
- VUJICIC, M. et al. Methanolic extract of *Origanum vulgare* ameliorates type 1 diabetes through antioxidant, anti-inflammatory and anti-apoptotic activity. **British Journal of Nutrition**, v. 113, p. 770–782, 2015.
- WIEËRS, G. et al. How probiotics affect the microbiota. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 9, n. 454, p. 1-9, 2020.
- WOHLGEMUTH, S.; LOH, G.; BLAUT, M. Recent developments and perspectives in the investigation of probiotic effects. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 300, p. 3-10, 2010.
- WONG, P. Y. Y.; KITTS, D. D. Studies on the dual antioxidant and antibacterial properties of parsley (*Petroselinum crispum*) and cilantro (*Coriandrum sativum*) extracts. **Food Chemistry**, v. 97, p. 505–515, 2006.

XIONG, Y. et al. Anti-*Deinagkistrodon acutus* venom properties of ethanolic root extract from *Cynanchum paniculatum* (Bunge) kitag and its GC-MS analysis. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 225, p. 189-197, 2018.

YADAV, D. K. et al. Tamarixetin 3-O- β -d-glucopyranoside from *Azadirachta indica* leaves: Gastroprotective role through inhibition of matrix metalloproteinase-9 activity in Mice. **Journal of Natural Products**, v. 80, p. 1347–1353, 2017.

YESIL-CELIKTAS, O. et al. Inhibitory effects of rosemary extracts, carnosic acid and rosmarinic acid on the growth of various human c ancer cell lines. **Plant Foods for Human Nutrition**, v. 65, n. 2, p. 158-163, 2010.

YOUSAF, S. et al. Hypoglycemic and hypolipidemic effects of *Lactobacillus fermentum*, fruit extracts of *Syzygium cumini* and *Momordica charantia* on diabetes induced mice. **Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 29, n. 5, p. 1535-1540, 2016.

YU, B. Z. et al. Catalytic significance of the specificity of divalent cations as Ks and Kcat cofactors for secreted phospholipase A2. **Biochemistry**, v. 37, p. 12576-12587, 1998.

YU, M. H. et al. Suppression of LPS-induced inflammatory activities by *Rosmarinus officinalis* L. **Food Chemistry**, v. 136, n. 2, p. 1047-1054, 2013.

YU, M. et al. Phytochemical and antioxidant analysis of medicinal and food plants towards bioactive food and pharmaceutical resources. **Scientific Reports**, v. 11, n. 10041, 2021.

ZELANIS, A. et al. *Bothrops jararaca* venom proteome rearrangement upon neonate to adult transition. **Proteomics**, v. 11, p. 4218-4228, 2011.

SEGUNDA PARTE
ARTIGOS

**ARTIGO 1 – MODULATING ACTION OF AROMATIC PLANTS AND
PROBIOTICS ON ENZYME ACTIVITY**

DANIELA APARECIDA OLIVEIRA¹, PEDRO HENRIQUE SOUZA CÉSAR¹, SILVANA
MARCUSI^{1*}

¹Department of Chemistry, Federal University of Lavras, CP: 3037, Lavras, CEP: 37200-000,
Minas Gerais, Brazil. danioliveira.ufla@hotmail.com; pedrocesar.biologia@gmail.com;
marcussi@ufla.br

**Artigo formatado segundo as normas da revista Journal of Herbs, Spice & Medicinal
Plants**

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

ABSTRACT

The present study aimed to evaluate the effects of extracts from aromatic plants and probiotics on the enzymatic activities induced by *Bothrops moojeni* venom, as well as to assess their potential as anti-inflammatory agents. The venom's phospholipase and hemolysis activities were found to be inhibited by incubation with pure plant extracts or probiotics at different pH levels. Additionally, all plant extracts with and without probiotics displayed an inhibitory effect on heat-induced hemolysis and venom-induced thrombus lysis. The greatest inhibitions were observed for extracts of *Laurus nobilis* and *Ocimum basilicum*. Furthermore, the extracts of *L. nobilis*, *O. basilicum* and *Origanum vulgare* with and without probiotics were found to exert an inhibitory action on coagulant enzymes present in the venom, prolonging the clotting time. Interestingly, the *Petroselinum crispum* extract in the presence of the probiotic appeared to potentiate the coagulant effect of the venom's enzymes, as observed by a reduction in the clotting time. The findings demonstrate the potential of these plants to modulate the action of enzymes that play a crucial role in the regulation of hemostasis and the inflammatory response, providing a valuable laboratory tool for the study of compounds with pharmaceutical potential.

Keywords: Hemostasis. Aromatic plants. Probiotic bacteria. Enzyme modulators.

INTRODUCTION

The use of medicinal plants for the treatment of various diseases, including hemostatic disorders, has a long history. Hemostatic disorders such as hemorrhages and thrombosis can lead to serious complications. Phenolic compounds found in plants are known to play a significant role in their diverse actions on human health. Aromatic plants such as *Laurus nobilis*, *Ocimum basilicum*, *Origanum vulgare* and *Petroselinum crispum* have been shown to possess anti-inflammatory, antioxidant, hypoglycemic and antimicrobial properties.^[1, 2, 3, 4, 5]

Probiotics, which are live microorganisms that confer health benefits when consumed in adequate amounts, have been shown to play a crucial role in maintaining the balance of the gut microbiota. Probiotic bacteria are commonly used to alleviate intestinal disorders, by exerting a variety of beneficial effects on the host, such as controlling the growth of pathogenic microorganisms, improving gut barrier function, and modulating the immune system. Among the most commonly used probiotic strains are those belonging to the

genera *Lactobacillus* and *Bifidobacterium*. These microorganisms commonly used in the food industry to manufacture various products such as fermented dairy, probiotic beverages, and dietary supplements.^[6]

Snake venom is a complex mixture of biologically active compounds, including enzymes such as phospholipases A₂ (PLA₂s), metalloproteases and serine proteases, which have been shown to play a critical role in the venom's toxicity by promoting coagulation or bleeding and participating in the inflammatory response. These enzymes share structural and functional similarities with their human counterparts. In this sense, the present work aimed to evaluate the modulating action of aqueous extracts obtained from leaves of *L. nobilis*, *O. basilicum*, *O. vulgare* and *P. crispum* in the presence and absence of probiotics, on activities induced by PLA₂s and proteases and suggest possible effects in human physiology.

MATERIALS AND METHODS

Obtaining and preparing samples

The aromatic plants of the species, *Laurus nobilis*, *Ocimum basilicum*, *Origanum vulgare* and *Petroselinum crispum* were commercially purchased at a market in the city of Lavras, MG, Brazil. The dried leaves were crushed, sieved, weighed 4 g and dissolved in 40 mL of PBS (phosphate buffered saline solution, pH 7.4, 2 mM NaH₂PO₄, 3 mM Na₂HPO₄, 154 mM NaCl) and remained under agitation for approximately 12 h. Then, they were taken to the ultrasound machine for 1h10min. After this step, the solution was centrifuged for 10 min. at 3.5 g and the supernatant was collected and frozen until the moment of use in the assays.

The probiotic bacteria (*Lactobacillus acidophilus*, *L. rhamnosus*, *L. paracasei* and *Bifidobacterium lactis*) in powder form, were purchased under the trade name Probiatop. Each 1 g was diluted in 10 mL of PBS and then quantified using the McFarland scale method.^[7] Subsequently, a screening was performed with different values of colony-forming units (CFU), to identify ideal amounts of probiotic bacteria to be used in the tests, so that they would not saturate the reaction environment. Then, the bacteria were diluted in PBS pH 7.4 and 8.0 for the phospholipases A₂ (PLA₂s) activity and PBS pH 7.4 for the other activities.

Snake venoms

The crystallized venom of *Bothrops moojeni* (registered in Sisgen under the number ADF95EA) was purchased commercially from the serpentarium Bioagents (Batatais-SP). At

room temperature, the crude venom was weighed 10 mg, dissolved in 1.0 mL of PBS and stored at -20 °C.

All activities [except anti-inflammatory (without the use of venom)] were performed with plants extracts and probiotics alone. Extracts and probiotic bacteria were pre-incubated with enzyme source (venom) in different proportions for 30 minutes at 37 °C.

Obtaining human blood

The blood was obtained from healthy volunteers and collected in tubes containing heparin (anti-inflammatory and hemolysis activities), citrate (coagulant activity), and without anticoagulant (thrombolytic activity). All tests using human blood or its components were carried out with the previous authorization of the Ethics Committee on Human Research (COEP) of the Federal University of Lavras, under the registration number: CAAE: 57151322.4.0000.5148.

Identification of phenolic compounds by HPLC

Phenolic compounds were identified and quantified for each extract. The phenolic standards used were obtained from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA). High performance liquid chromatography (HPLC) was performed using a Shimadzu UHPLC chromatograph (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japão). Equipped with two LC-20AT high pressure pumps, an SPD-M20A Uvvis detector, a CTO-20AC oven, a CBM- Interface 20 A, and an auto-injector with a SIL-20A autosampler. Separations were performed using a VP-ODS-C18 (250 mm x 4.6 mm) Shim-pack column, attached to a Shim-pack pre-column (10 mm x 4.6 mm) (Shimadzu, Japão). The addition of patterns to the extracts was also used as an identification parameter. Stock standard solutions were prepared in methanol (HPLC grade; Sigma-Aldrich, EUA). Extracts and standards were filtered through a 0.45 µm nylon membrane (EMD Millipore, USA) and injected directly into the chromatographic system, in three replications. The phenolic compounds in the extracts were identified by comparing the retention times of the standards. Quantification was performed by constructing analytical curves obtained through linear regression using Origin 6.1 computer software (OriginLab, Northampton, MA, USA) and considering the coefficient of determination (R²) equal to 0.99.

Anti-inflammatory activity

To carry out the anti-inflammatory activity adapted from Williams et al.^[8]; Tatiya and Saluja^[9]; Nkeh-Chungag et al.^[10], the blood of the volunteers was collected in tubes

containing heparin. The blood was then centrifuged at 1500 xg for 5 min., and the plasma removed. The packed red blood cells were used to prepare a 2 % (v/v, mL/mL) suspension in PBS, pH 7.4. The red blood cell concentrate were used to prepare a 2 % (v/v, mL/mL) suspension in PBS, pH 7.4. The extracts at doses of 1.75 and 3.5 mg and the probiotic bacteria 9.6×10^5 CFU were previously prepared in volume of 200 μ L and then 800 μ L of the red blood cell suspension was added. Controls were performed with steroidal anti-inflammatory drug prednisolone [126 μ g and 180 μ g (anti-inflammatory action as a comparison parameter)], PBS (corresponding to mechanical hemolysis), and water (corresponding to total hemolysis – 100 % hemolysis). The suspensions containing the samples were incubated at 37 °C for 30 min. After incubation, the tubes containing the incubated remained in a thermostatic bath at 54 °C for 20 min., followed by centrifugation at 1200 xg for 10 min. Then, the absorptions were read in a spectrophotometer at 540 nm. The protective capacity of the extracts against temperature-induced hemolysis was evaluated. The anti-inflammatory potential of plant extracts previously incubated with probiotic bacteria was also evaluated. The calculation of the percentage of inhibition of hemolysis was done using the following formula:

$$\% \text{ Hemolysis} = 100 - \left[1 - \left(\frac{AHS - AUS}{C+ - AUS} \right) \times 100 \right]$$

AHS - absorbance of the heated sample

AUS - absorbance of the unheated sample

C+ - positive control absorbance

To infer possible interferences, present in the extracts, capable of performing absorption at the wavelength used for the evaluation of the tests, a scan of each extract was performed before the thermal hemolysis tests.

Phospholipase and hemolysis activity

The phospholipase and hemolysis activities were evaluated in a solid medium, as described by Gutiérrez et al.^[11] The gel for the evaluation of the phospholipase activity was prepared with 0.01 mol L⁻¹ CaCl₂, egg yolk lecithin's 1:3 v/v, PBS, 1 % bacteriological agar, and 0.005 % sodium azide. The medium was poured into Petri dishes at 45-50 °C. After gel solidification, the treatments were applied in 0.5 cm diameter holes, and the dishes were maintained in a cell culture chamber for 12 hours at 37 °C. The gel for hemolysis activity was prepared by replacing egg yolk lecithin's for human erythrocyte concentrate calculated to a

hematocrit of 1 %. The newly collected blood was centrifuged at 900 xg for 5 min. to obtain the erythrocytes. The erythrocytes were suspended in 5 mmol L⁻¹ of PBS (pH 7.4) and centrifuged under the same conditions, repeating this washing step twice. The results of both tests were evaluated by measuring the diameter of the translucent halos formed in the gels around the holes where the samples were applied. Inhibition of PLA_{2s} and hemolysis activities were evaluated on *B. moojeni* venom 10 and 20 μg , respectively. The venom was previously incubated with extracts of *L. nobilis*, *O. basilicum*, *O. vulgare*, *P. crispum* at doses (0.1, 0.4, 0.7, 1.8, 2.5 mg) and with probiotic bacteria (2.6×10^5 CFU) for 30 min. at 37 °C. Dexamethasone and Prednisolone were used at doses of 2.5 μg , 5 μg and 10 μg to compare the effects of the extracts.

Coagulant activity

The evaluation of clotting time was performed according to Rodrigues et al.^[12] The pure extracts at doses of 0.1, 0.4, 0.7, 1.8, 2.5 mg, and associated with probiotic bacteria 2.6×10^5 CFU, were previously incubated with *B. moojeni* venom (10 μg) for 30 min. at 37 °C. Controls containing extracts with and without probiotics, and pure venom was also performed. Tubes containing citrated plasma were kept in a 37 °C bath. The incubated samples were added to the plasma (200 μL), and then the time until the formation of a rigid clot was measured. The minimum coagulant dose was previously defined, which was the lowest amount of venom capable of inducing plasma coagulation in a range between 50 and 180 seconds.

Thrombolytic activity

The thrombolytic activity was assessed on human blood clots formed *in vitro*, according to the methodology described by Cintra et al.^[13] The clots, 100 μL distributed in microplate wells, were incubated for 24 h at 37 °C with the samples, prepared in a volume of 30 μL , containing *B. moojeni* venom (30 μg), probiotic bacteria 2.6×10^5 CFU, PBS, and plant extracts at doses 0.4, 0.7, 1.8, 2.5 mg. Thus, the venom was previously incubated (30 min at 37 °C) with the pure extracts and with these added probiotics. The activities were calculated by measuring the volume of fluid released by each thrombus. The data were converted in percentages. The final volume applied to each well, corresponding to blood + sample, 130 μL , was considered as 100 % activity. The mean value of controls containing only PBS were subtracted from the means of incubated samples.

Statistical analysis

The results were presented as the mean of triplicates \pm standard deviation. The data were evaluated by analysis of variance, and the means were compared using the Scott Knott test ($p < 0,05$).^[14]

RESULTS

Identification of phenolic compounds by HPLC

In the present work, significant amounts of phenolic compounds were found in the extracts of *Laurus nobilis*, *Ocimum basilicum*, *Origanum vulgare*, and *Petroselinum crispum* (Table 1). Caffeic acid was found in the extracts of *L. nobilis* and *P. crispum* and, in greater concentration, in the extract of *O. vulgare*. Caffeic acid can exert anti-inflammatory effects by inhibiting cyclooxygenase 2 and one of its products, prostaglandin 2.^[15] The catechin identified in the extracts of *L. nobilis* and *O. basilicum* has microbicidal action on pathogenic bacteria favoring the multiplication of beneficial bacteria.^[16]

Table 1: Identification of phenolic compounds by HPLC in aromatic plants

Phenolic compounds (mg 100g ⁻¹)	<i>Laurus nobilis</i>	<i>Ocimum basilicum</i>	<i>Origanum vulgare</i>	<i>Petroselinum crispum</i>
Caffeic acid	8.164	-	35.859	5.172
Chlorogenic acid	-	5.037	16.110	-
Catechin	6.939	5.856	-	-
Ferulic acid	unq	-	32.222	-
Gallic acid	-	unq	11.500	40.276
<i>m</i> -coumaric acid	-	-	-	-
<i>o</i> -coumaric acid	-	-	-	-
<i>p</i> -coumaric acid	1.113	1.155	5.143	10.154
Resveratrol	-	-	unq	-
Trans-cinnamic	-	23.965	7.069	-
Vanillic acid	2.812	1.198	1.710	1.691
Σ Phenolic compounds	19.028	37.211	109.513	57.293

unq = unquantified (identified, but below the limit of quantification).

The ferulic acid found in the extract of *O. vulgare* has multiple functions such as antioxidant, anti-inflammatory, inhibiting platelet aggregation and substances similar to thromboxane with inhibitory action on the formation of thrombi.^[17] Gallic acid was found in the extracts of *O. vulgare* and *P. crispum* in expressive concentrations. This compound has anti-inflammatory, antioxidant^[18] and antimicrobial activity.^[19] Trans-cinnamic acid has great potential in the wound healing process^[20] and was found in significant amount in the extracts

of *O. vulgare* and *O. basilicum*. The *p*-coumaric acid was identified in all extracts and is used in the treatment of cardiovascular, neuroinflammatory and liver diseases.^[21] In this context, extracts of aromatic plants containing a diversity of actives compounds and their association with probiotic bacteria were analyzed for the effects on different activities induced by the main classes of enzymes present in the snake venom of the species *B. moojeni*, phospholipases A₂ (PLA₂s) and proteases. The anti-inflammatory potential of these samples was evaluated using heat-induced hemolysis assays.

Anti-inflammatory activity

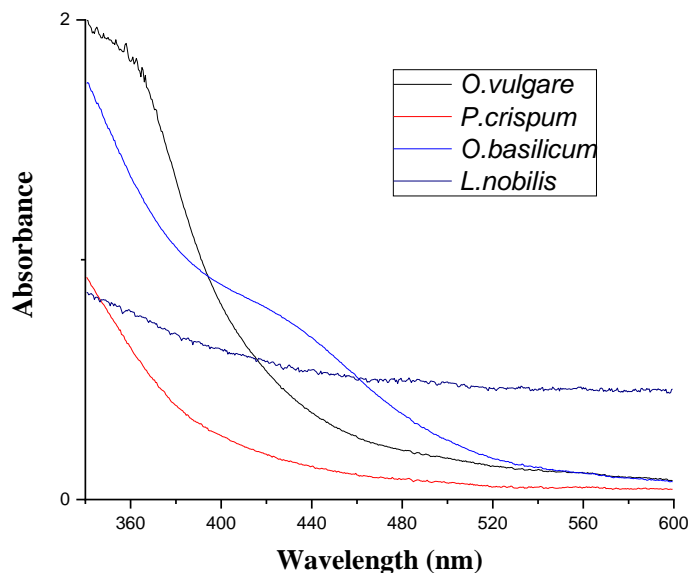


Figure 1 – Spectrophotometer scans of different aromatic plant extracts (100 µg/µL): black- *Origanum vulgare*; red- *Petroselinum crispum*; blue- *Ocimum basilicum*; purple- *Laurus nobilis*.

The wavelength of hemoglobin absorption is 540 nm, and is released and measured in the liquid hemolysis test for evaluation of anti-inflammatory potential. A scan was made in the extracts to investigate possible interferences in the evaluation of the activity. No peak was identified at 540 nm wavelength, leading to the conclusion that the extracts do not absorb in this wavelength (Figure 1).

The extracts of *L. nobilis*, *O. basilicum*, *O. vulgare*, and *P. crispum* showed significant anti-inflammatory *in vitro* potential when compared with prednisolone and mechanical (C-) hemolysis control. Samples containing the extract of *P. crispum* presented a high protective effect on membranes lysis with heat-induced hemolysis percentages of 2.26 %

and 1.53 % in absence of probiotics and, 0.98 % and 0.82 % in the presence of probiotics (1.75 and 3.5 mg doses, respectively). For the extract of *O. basilicum* evaluated in absence of probiotics, heat-induced hemolysis percentage was 7.39 % and 8.13 %, and in the presence of probiotics, the values of hemolysis (1.75 and 3.5 mg doses) were 4.75 % and 5.02 %, respectively. The incubation with the extract of *L. nobilis* in absence of probiotics resulted in 12.22 % and 13.65 % of hemolysis and in the presence of probiotics with the previous doses the values were 10.03 % and 9.28 %. The extract of *O. vulgare* had the lowest inhibition potential of heat-induced hemolysis with results of 51.71 % and 55.18 % of hemolysis in absence of probiotics and 46.66 % and 52.72 % in presence of probiotics in the same doses of the previous extracts (Table 2).

Tabela 2: Anti-inflammatory potential evaluated on heating-induced erythrocyte lysis (54 °C)

Controls	Hemolysis %	
C- (PBS)	8.15 ± 1.5147	
Probiotic (9.6x10 ⁵ CFU)	6.89 ± 0.3084	
Prednisolone (126 µg)	6.73 ± 0.4661	
Prednisolone (180 µg)	5.63 ± 0.6729	
C+ (H ₂ O)	100 ± 0.0087	

Samples	1.75 mg	3.5 mg
<i>Laurus nobilis</i>	12.22 ± 1.4255*b	13.65 ± 0.3814*a,b
<i>Laurus nobilis</i> +Probiotic	10.03 ± 0.8586b	9.28 ± 0.8743b
<i>Ocimum basilicum</i>	7.39 ± 0.3125b	8.13 ± 0.7020b
<i>Ocimum basilicum</i> +Probiotic	4.75 ± 0.8060b	5.02 ± 0.1578b
<i>Origanum vulgare</i>	51.71 ± 1.1919*a,b	55.18 ± 1.8249*a,b
<i>Origanum vulgare</i> +Probiotic	46.66 ± 2.5233*a,b	52.72 ± 2.5065*a,b
<i>Petroselinum crispum</i>	2.26 ± 0.7237a,b	1.53 ± 0.6545*a,b
<i>Petroselinum crispum</i> +Probiotic	0.98 ± 0.8460*a,b	0.82 ± 0.7150*a,b

a - It differs from the negative control (C-), p < 0.05.

b - It differs from the positive control (C+), p < 0.05.

*Statistically different from the drug, p < 0.05.

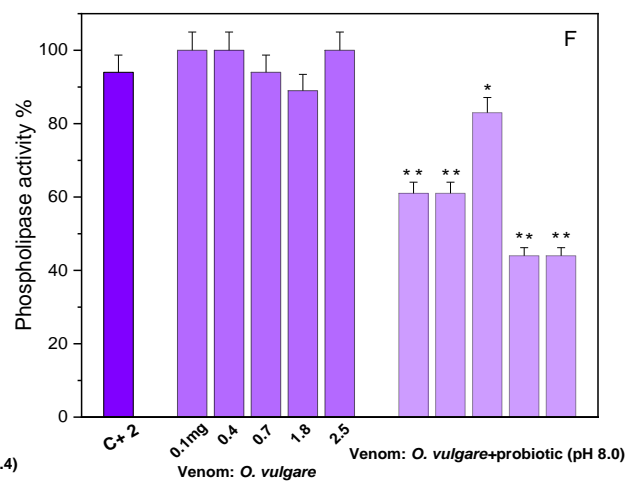
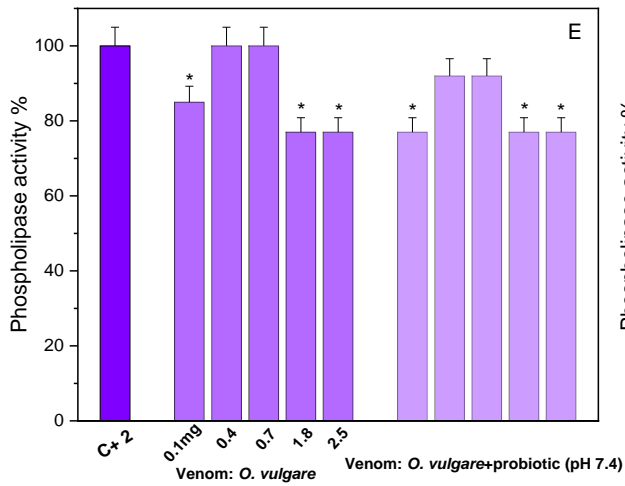
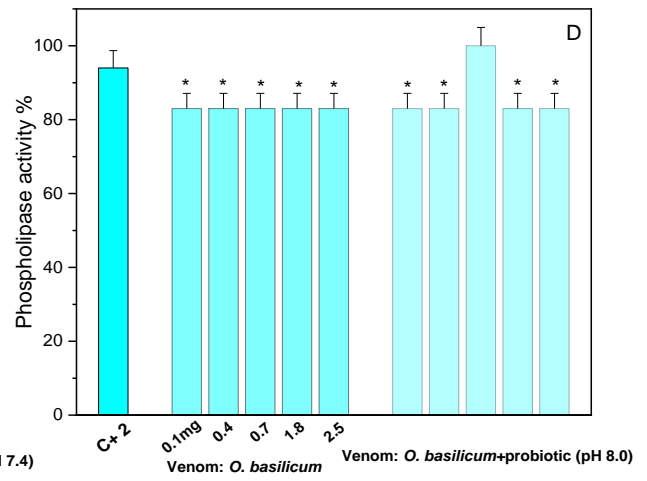
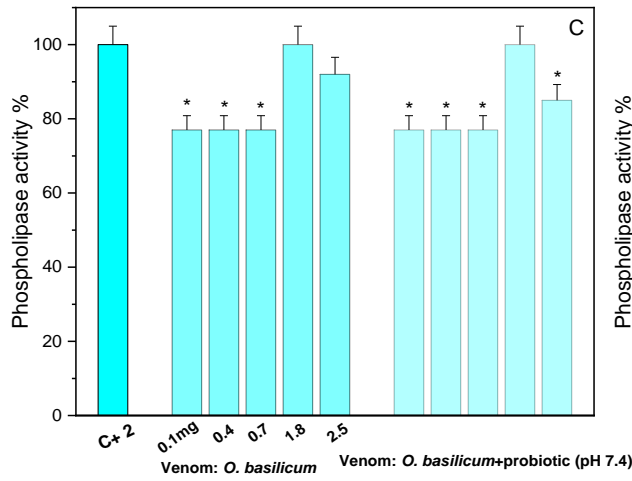
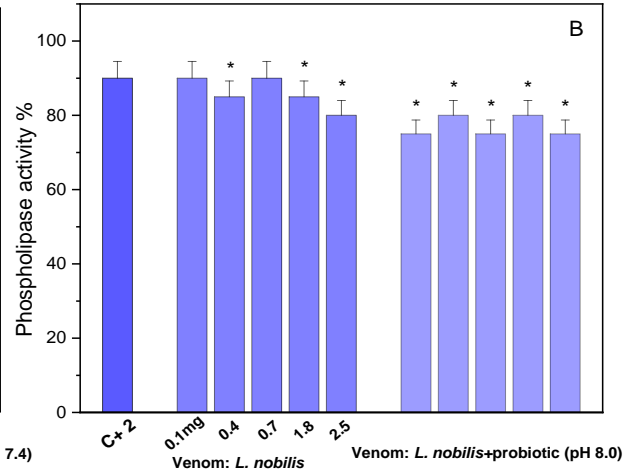
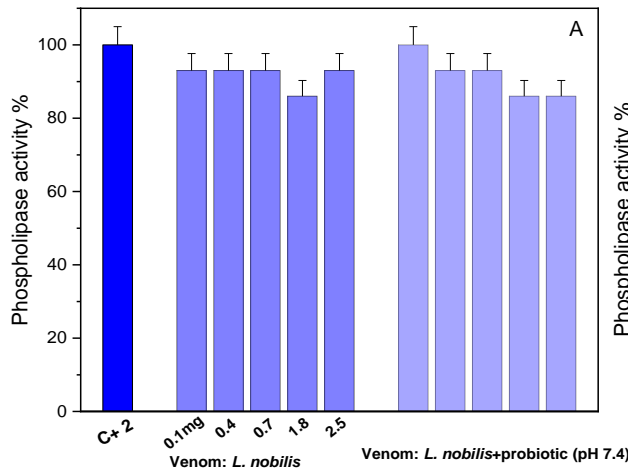
Phospholipase and hemolysis activity

In the present work, alterations in the activity of PLA₂s were observed after incubation of *B. moojeni* venom with extracts of aromatic plants and probiotic bacteria. The extract of *L. nobilis* in pH 8.0 (Figure 2B), had a better inhibition on the activity of PLA₂s than in pH 7.4 (Figure 2A) at doses of 0.4, 1.8 and 2.5 mg with and without probiotic (values from 20 % to 25 %) (Figure 2B). The extracts of *O. basilicum* had significant inhibitions at pH 7.4 and pH 8.0 in all evaluated doses, with and without probiotics, with inhibitions values from 15 % to 17 % (Figure 2C and 2D).

O. vulgare extract exerted the best inhibitions, around 23 %, when evaluated at pH 7.4 at doses of 1.8 and 2.5 mg, both in the absence and in the presence of probiotics (Figure 2E). For the evaluations at pH 8.0, in the absence of probiotics, there were no significant inhibitions and in the presence of probiotics, the greatest inhibitions were 39% at doses of 0.1 and 0.4 mg and 56 % at doses of 1.8 and 2.5 mg (Figure 2F).

The extracts of *P. crispum* at pH 7.4 in the presence and absence of probiotics, inhibited 15 % and 23 % at doses of 0.4, 0.7 mg, and 1.8, 2.5 mg, respectively (Figure 2G). At pH 8.0 the inhibitions in absence of probiotics were 17 % at doses of 0.4, 0.7 and 2.5 mg. In presence of probiotics, inhibitions were 44 % at doses of 0.1, 0.7, and 1.8 mg and 50 % at doses of 0.4 and 2.5 mg (Figure 2H).

In this research, Prednisolone and Dexamethasone at doses of 2.5, 5 and 10 µg were used for comparison to the effects caused by the extracts. The drugs did not show statistically significant inhibitions compared to the control performed only with crude venom, considered as 100 % of the activity (data not shown).



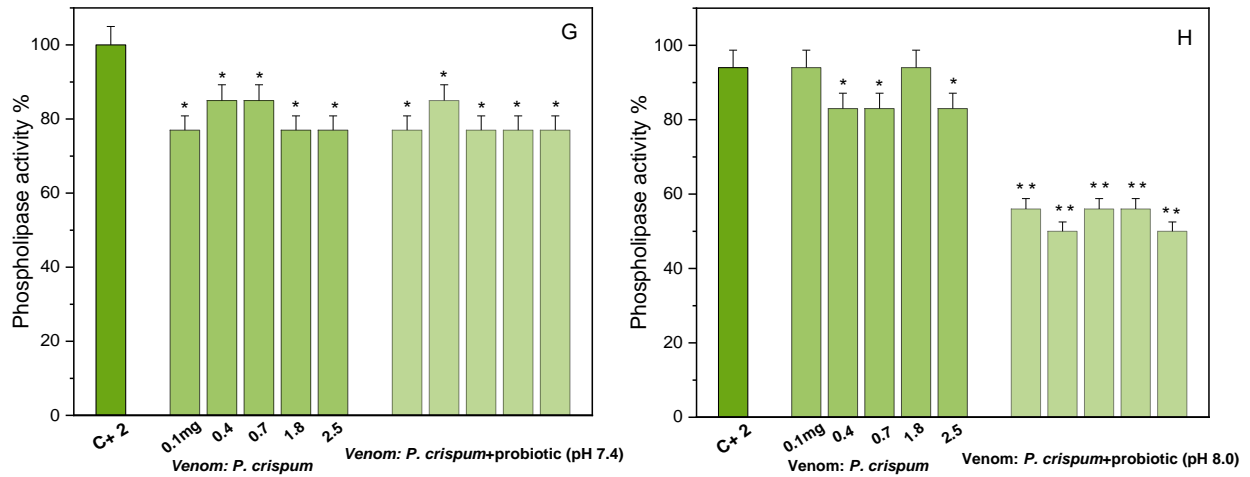


Figure 2 – Phospholipase activity (%) induced by *Bothrops moojeni* venom, previously incubated with probiotic bacteria (pH 7.4 and pH 8.0) and extracts of *Laurus nobilis* (A,B), *Ocimum basilicum* (C,D), *Origanum vulgare* (E,F) and *Petroselinum crispum* (G,H). Positive control 1 (C+ 1): containing only venom (10 μ g) was considered as 100 % activity. Positive control 2 (C+ 2): Venom + Probiotic (2.6×10^5 CFU). The results correspond to the means of triplicates obtained in each proportion (venom: extract) and (venom: extract + probiotic) and their calculated standard deviations.

*Statistically different from the positive control.

**Statistically different from the positive control and those incubated without probiotic.

In the present work, was observed the inhibition of 19 % on the hemolysis after incubation of the venom with 2.5 mg of *L. nobilis* extract in the absence of probiotics, and inhibitions between 25 % and 56 % for all doses evaluated in the presence of probiotics (Figure 3A). The extract of *O. basilicum*, showed significant inhibitions in absence of probiotics of 37.5 % and 50 % at doses of 1.8 and 2.5 mg, respectively. In the presence of probiotics, the inhibitions were 50 % at 0.1 mg, 37.5 % at 0.7 mg, and 44 % at 0.4, 1.8, and 2.5 mg (Figure 3B). The extract of *O. vulgare* presented significant inhibition only in presence of probiotics, exerting 19 % inhibition at the dose of 0.1 mg and 37.5 % to the other doses evaluated (Figure 3C). The extract of *P. crispum* in the absence of probiotics inhibited the erythrocytes lysis in 19 % at the dose of 0.7 mg and 37.5 % at the dose of 1.8 and 2.5 mg. In presence of probiotics, the inhibitions were 25 % at 0.1 mg, 37.5 % at 0.4 mg, 44 % at 0.7 mg, 50 % at 1.8 mg and 56 % at 2.5 mg (Figure 3D). In this study, the probiotic bacteria and the extracts didn't induce hemolysis in any evaluated doses, except for *O. vulgare*, which showed hemolytic potential at the highest doses, 1.8 and 2.5 mg (data not shown).

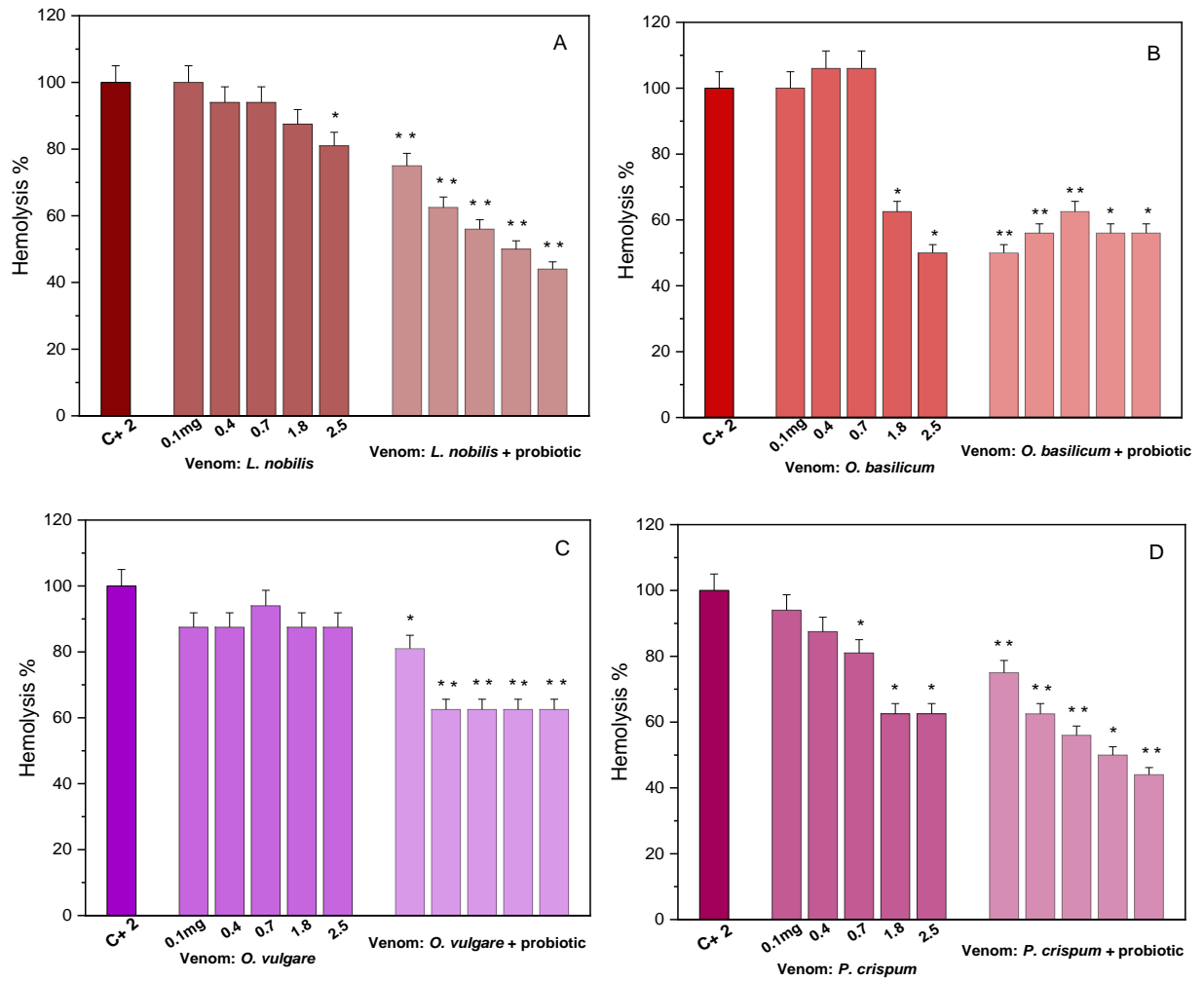


Figure 3 – Hemolysis activity (%) induced by *Bothrops moojeni* venom, previously incubated with probiotic bacteria and extracts of *Laurus nobilis* (A), *Ocimum basilicum* (B), *Origanum vulgare* (C) and *Petroselinum crispum* (D). Positive control 1 (C+ 1): containing only venom (20 µg) was considered as 100 % activity. Positive control 2 (C+ 2): Venom + Probiotic (2.6x10⁵ CFU). The results correspond to the means of triplicates obtained in each proportion (venom: extract) and (venom: extract + probiotic) and their calculated standard deviations.

*Statistically different from the positive control.

**Statistically different from the positive control and those incubated without probiotic.

Thrombolytic and coagulant activity

The extract of *L. nobilis* inhibited the thrombolytic activity in percentages that varies from 46 % to 67 % in absence and presence of probiotics, in all evaluated doses (Figure 4A). *O. basilicum* extract inhibited thrombolytic activity at all doses evaluated in the absence and presence of probiotics, with values between 25 % and 44 % observed (Figure 4B). For the *O. vulgare* extract, the inhibition was significant both in the absence and in presence of probiotics at all evaluated doses, with values ranging from 57 % to 82 % (Figure 4C). For the extract of *P. crispum*, the inhibitions of thrombolytic activity were observed at the doses of 0.4, 0.7, and 1.8 mg with and without probiotics, the values ranging between 26 to 47 % (Figure 4D). Extracts of *L. nobilis*, *O. basilicum*, *P. crispum* and isolated probiotic bacteria and extracts associated with probiotic bacteria did not show significant thrombolytic activity. Except for the extract of *O. vulgare*, that showed 39 % and 22 % of thrombolytic activity when isolated and when associated with probiotic bacteria, respectively (data not shown).

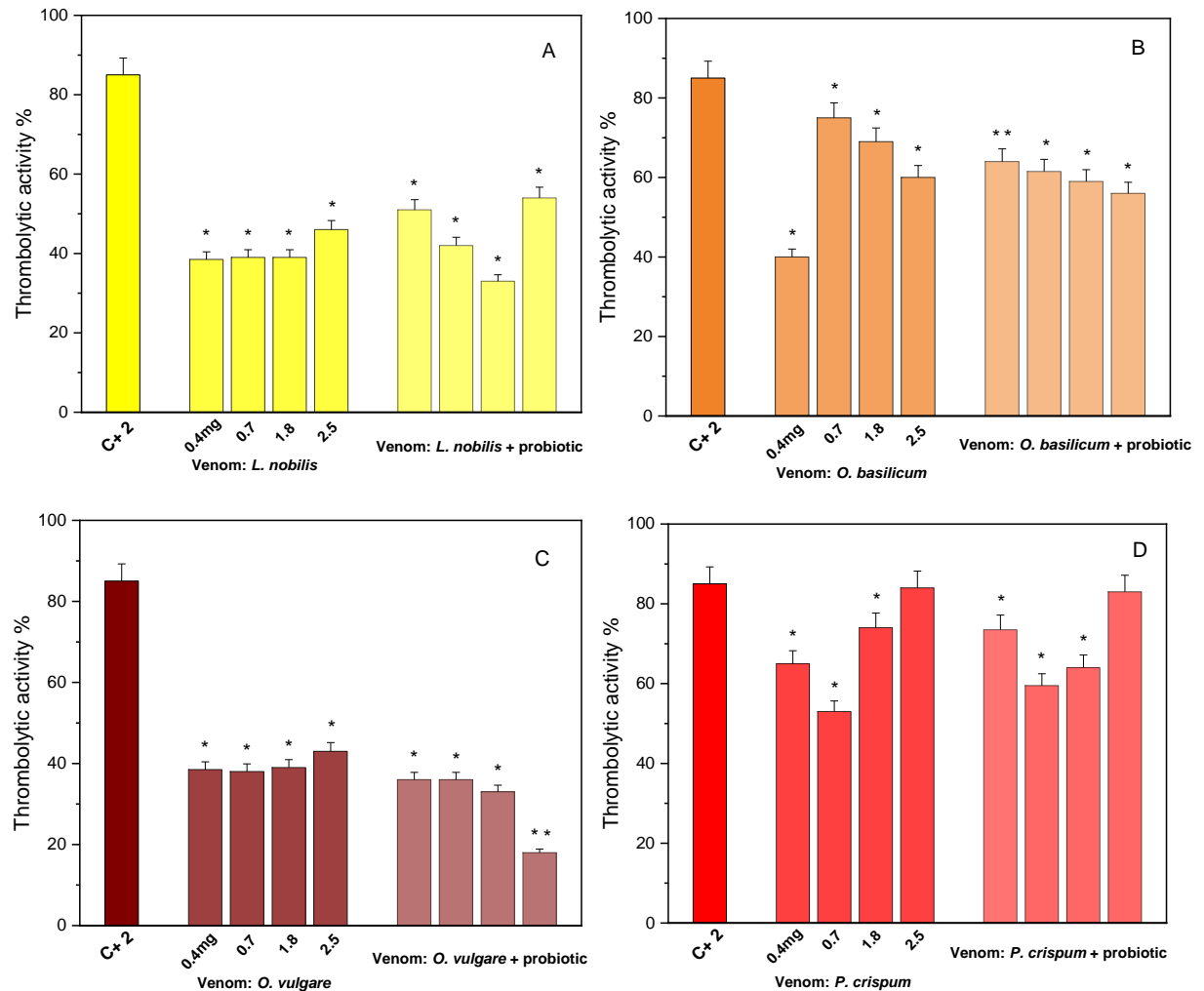


Figure 4 – Thrombolytic activity (%) induced by *Bothrops moojeni* venom, previously incubated with probiotic bacteria and extracts of *Laurus nobilis* (A), *Ocimum basilicum* (B), *Origanum vulgare* (C) and *Petroselinum crispum* (D). Positive control 1 (C+ 1): containing only blood (100 μ L) + [venom (30 μ g) in 30 μ L of sample] was considered as 100 % activity, and therefore not shown in the graphs. Positive control 2 (C+ 2): Venom (30 μ g) + Probiotic (2.6×10^5 CFU). The results correspond to the means of triplicates obtained in each proportion (venom: extract) and (venom: extract + probiotic) and their calculated standard deviations.

*Statistically different from the positive control.

**Statistically different from the positive control and those incubated without probiotic.

The extracts of *L. nobilis*, *O. basilicum* and *O. vulgare* showed coagulation inhibition in all evaluated doses (in the absence and presence of probiotics). The extract of *P. crispum* showed coagulation activity in presence of probiotics in all evaluated doses. The coagulation inhibition was observed at doses of 0.1 and 0.7 mg and, pro-coagulation activity

at doses of 0.4, 1.8 and 2.5 mg (Table 3). The extracts and probiotic bacteria isolated and both showed anticoagulant activity (data not shown).

Table 3: Effect of aromatic plants extracts with and without probiotic on the coagulant activity induced by *B. moojeni* venom

		Clotting times (s)			
		Controls			
Venom 10µg		127±0.0100			
Venom+Probiotic 2.6x10 ⁵ CFU		77±0.0153 a			
Sample	mg	<i>Laurus nobilis</i>	<i>Ocimum basilicum</i>	<i>Origanum vulgare</i>	<i>Petroselinum crispum</i>
without Probiotic	0.1	186±0.0503 b	214±0.0305 b	246±0.0153 b	135±0.020 b
	0.4	209±0.2773 b	255±0.0462 b	268±0.0265 b	111±0.2715 a
	0.7	250±0.0283 b	247±0.0436 b	310±0.0608 b	132±0.0416 b
	1.8	254±0.0265 b	231±0.3782 b	319±0.0208 b	75±0.0265 a
	2.5	256±0.0231 b	213±0.4908 b	320±0.0305 b	74±0.0351 a
with Probiotic	0.1	254±0.0305 b	206±0.0305 b	151±0.0321 b	113±0.2524 a
	0.4	258±0.0603 b	223±0.2916 b	200±0.0208 b	91±0.0305 a
	0.7	190±0.2887 b	233±0.2639 b	247±0.0321 b	91±0.0361 a
	1.8	180±0.0666 b	252±0.1332 b	262±0.010 b	91±0.0321 a
	2.5	174±0.0351 b	263±0.010 b	304±0.0361 b	90±0.0379 a

a – Differ from the positive control (p < 0.05) – reduces time.

b – Differ from the positive control (p < 0.05) – increases time.

The results are presented as the average of triplicates ± standard deviation p < 0.05.

DISCUSSION

Medicinal plants are known for their diversity of molecules with therapeutic activities with proven effectiveness against a wide variety of pathophysiological disorders. Isolated phytochemical molecules of several plant species have been described with action in reducing edema, inflammation, myotoxicity, neurotoxicity and hemorrhage.^[22,23] Several chemical compounds effect various enzymes in humans. These compounds exhibit therapeutic effects by altering the activities of enzymes drastically.^[24]

Medicinal plant extracts have been studied for their potential anti-inflammatory action^[25] and the phenolic compounds present in these extracts are the main responsible for this action.^[26] The extract of the leaves of *L. nobilis* exerted an anti-inflammatory effect by reducing the expression of pro-inflammatory cytokines *in vitro* and *in vivo*.^[1] The extract of leaves of *O. basilicum* showed anti-inflammatory properties and, inhibit nitric oxide (NO) production showing the capacity to extinguish free radicals of NO,^[27] and the expressions

interleukins (IL-6, IL-1 β) and chemosin ligant 2 decreased significantly when treated with the leaf extract.^[28]

The extract of leaves of *O. vulgare* showed anti-inflammatory and antioxidant activities by inhibiting pro-inflammatory cytokines [IL-6 and tumor necrosis factor- α (TNF- α)] and NO without affecting cell viability.^[29] In the extract of the leaves of *P. crispum* was identified anti-inflammatory activity^[30] by inhibition of inflammatory cytokines (IL-1 β and TNF- α) through modulation of the oxidative stress which also increased the antioxidant activity of the extract.^[31] For all these plant extracts described in the literature, the anti-inflammatory effect was attributed to phenolic compounds that represent a large part of their composition.^[32] Some compounds present in these plant extracts were also found in the extracts of aromatic plants evaluated in the present work such as caffeic, chlorogenic, pterulic, gallic, *p*-coumaric, vanillic acids and catechin.^[26,33,34,35,36,37]

It is known that free radicals are important mediators that act by inducing and aggravating inflammatory process. Thus, free radical scavenger compounds present in the extracts reduce inflammation.^[38,39] Phenolic compounds have several properties such as antimicrobial, anti-inflammatory, antihyperglycemic, and antioxidant.^[40,41] Phenolic compounds, found in plants, are known to possess strong antioxidant properties and can capture free radicals, which leads to metal chelation, interactions with adenosine receptor enzymes, and biomembranes.^[42] These compounds have been described as enzymatic modulators and have been shown to exert inhibitory or potentiating effects on several classes of enzymes. The literature suggests that these interactions are typically weak, and involve amino acid residues present in the active site of enzymes or residue regions that coordinate an ionic cofactor. Some phenolic compounds have also been shown to form complexes with cofactors that are unavailable to bind in enzymes. In the context of snake venom, inhibition of phospholipases A₂ (PLA₂s) and proteases by phenolic compounds plays a fundamental role in reducing the inflammatory response.^[43,44,45]

In addition, strains of probiotic bacteria can exert beneficial effects on the host through their immunomodulatory activity and regulation of the inflammatory process. Probiotics administered orally can increase the activity of Natural Killer cells, the production of interferon (INF) and INF- γ .^[46] The probiotic strain *Lactobacillus casei* acts in the elimination of free radicals (*in vitro*) and reduces oxidative damage, improving lipid metabolism and reducing lipid peroxidation.^[47] Probiotics containing *Bifidobacterium*, *L. acidophilus*, *L. plantarum*, and *L. paracasei* decreased the levels of TNF- α and IL-6^[48] and inhibit the nuclear factor kappa B (NF- κ B) pathway.^[49] The interaction between probiotic

strains *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* significantly reduced the expressions of IL-8, p-p65, NF-kB, p-p38 MAPK, vascular system adhesion molecule, and cyclooxygenase-2 (COX-2). The combination of probiotic strains showed better anti-inflammatory activity.^[50]

Steroid drugs are known as PLA₂s inhibitors. Although they are widely used in the treatment of inflammatory diseases, they have adverse effects such as accelerated protein loss, decreased protein synthesis, and bone demineralization.^[51] Prednisolone is a glucocorticoid often used to suppress the immune response and treat inflammatory diseases.^[52] The most common side effects are fatigue, increased blood pressure and blood glucose, mental disorders, headaches, and its prolonged use can cause cataracts.^[53]

The synthetic anti-inflammatory drugs used in the treatment of inflammation are becoming less acceptable due to serious adverse effects on human health^[54] mainly due to their use in high doses, continuous or chronic. Treatment with these drugs in the long term has some effectiveness, but is associated with depression, growth retardation, osteoporosis, hypertension, kidney, and liver problems.^[55] The development of new and safe strategies to prevent and treat inflammatory diseases is of extreme medical and scientific relevance. Therefore, the extracts of *L. nobilis*, *O. basilicum*, *O. vulgare* and *P. crispum* showed anti-inflammatory potential and seem to be amplified by association with probiotics bacteria, since they also act in control of the inflammatory response.^[56]

Venom is a complex mix of proteins and active peptides, including PLA₂s, metalloproteases (SVMPs), serine proteases (SVSPs), C-type lectins, L-amino acids oxidases, hyaluronidases and myotoxins^[57,58] that affect the hemostatic system, act on the inflammatory response, debridement and tissue regeneration, among other physiological effects^[59] involved in hemolysis and cytolysis.^[60] Snake venom is rich in PLA₂s enzymes. Those enzymes hydrolyze membrane phospholipids in position sn-2^[61] and release lysophospholipids and fatty acids. The arachidonic acid leads to the production of pro-inflammatory mediators by the pathways of COX and lipooxygenases.^[62]

Inflammation is triggered by a complex biological response of body tissues extending to internal and external stimuli, which involve pathogens, and damaged or irritated cells. However, when there is an excess of inflammation, characterized by dilation of blood vessels, production of pro-inflammatory molecules, the release of cytokines, and recruitment of leukocytes, there can be serious damage and losses to cells, tissues, and organs.^[63] The inhibition of PLA₂s causes the decrease of eicosanoid levels and reduced inflammatory response.^[64] Many plants with anti-inflammatory potential are rich in phenolic compounds and some of these have been described as inhibitors of PLA₂s, such as extracts of grape bark,

Averrhoa carambola and *Morinda citrifolia*.^[65,66,67] In this way, wide research of the toxins and pharmacological effects exerted by various plants species can result in valuable knowledge that will allow their use for promoting human health through the prevention and treatment of diseases.

In the present study, significant amounts of gallic acid were found in *O. vulgare* and *P. crispum* extracts. Zhang et al.^[68] showed that gallic acid acts as a possible inhibitor of thrombin activity. Gallic acid is a chelator of metals^[69] which justifies the inhibitory effect of the extracts of the present study on the activity of PLA₂s and hemolysis, partially induced by this class of enzymes, since these enzymes are dependent on Ca²⁺ ions to perform most of their functions.

In a study, the gallic acid inhibited 100 % of the hemolytic activity induced by *Bothrops jararaca* venom.^[70] The gallic acid was isolated from the aqueous extract of *Anacardium humile* and inhibited the activities of PLA₂s of the *B. jararacussu* venom and its PLA₂s isolated BthTX-II.^[71] Quercetin-3-o-rhamnosideo, a compound isolated from *Euphorbia hirta* extract, inhibited the hemolysis activity induced by snake venom of the species *Naja naja*, suggesting inhibition of inflammatory activity, proteases and PLA₂s, *in vivo*.^[72] The aqueous extract of leaves of *Aniba fragrans* neutralized the activity of PLA₂s of the *B. atrox* venom.^[73] The aqueous extract of the leaves of *Averrhoa carambola* inhibited the activity of PLA₂s from the venoms of *B. moojeni* and *B. alternatus*, and the same extract of *A. carambola* inhibited the hemolysis induced by the of *B. atrox* and *Crotalus durissus terrificus* (*C. d. t*) venom.^[74]

The extract of *Eucalyptus urophylla* showed an inhibitory effect on proteases, being this effect attribute to phenolic compounds, terpenoids, alkaloids, and steroids.^[75] The extract of *Cissampelos parreira* inhibited the activity of PLA₂s induced by *B. diporus* venom.^[76] The aqueous extract of leaves of *Schawartiza brasiliensis* inhibited the proteolysis induced by the venom of *B. jararaca* and *B. jararacussu*, besides inhibiting the hemolysis induced by the venom of *B. jararaca*.^[77] All these inhibitions described in the literature, for extracts from different plants acting on snake venoms of the *Bothrops* and *Crotalus* genera, corroborated the results of the present study, considering the rich phenolic composition attributed to plant extracts and the main classes of enzymes, potentially inhibited in the test carried out, focusing on PLA₂s and several proteases.

Antioxidants present in plant extracts have protective effects against inflammation. Probiotics can stimulate the host's antioxidant system to improve antioxidant enzyme levels.^[78] According to Zeng et al.^[79], probiotics presented antioxidant potential and did not

presented hemolytic activity. There is evidence that probiotics have valuable benefits in modulating inflammation^[80], producing specific effects in healthy individuals.^[81] The probiotic bacteria most commonly used are *Bifidobacterium* and *Lactobacillus spp.*^[82] Probiotic strains such as *Bifidobacterium*, *L. rhamnosus* and *L. acidophilus* regulate inflammation, producing anti-inflammatory effects.^[48,83] In addition to anti-inflammatory effects, immunomodulatory, antioxidant, and anti-lipidemic properties have been demonstrated for strains of *Bifidobacterium*.^[48,81]

Considering the existing scientific information and the data from the present work, we can suggest that the reduction in hemolysis activity, observed after incubation of the venom with the different extracts of aromatic plants and probiotics, is the result of the inhibitory effect of the phenolic compounds present in the extracts and the metabolites produced by probiotic bacteria such as trimethylamine and short-chain fatty acids^[84] on PLA₂s and proteases present in the venom. These polyphenols can act as complexes with metal ions, such as Ca²⁺ and Zn²⁺ for example, decreasing the activity of PLA₂s and proteases, that use metallic ions as cofactors in their catalytic activity^[85,86], can still make hydrogen bonds, hydrophobic interactions, pi bonds between the nucleon of the compound present in the extracts and the proteins presents in the *B. moojeni* venom, reducing its catalytic activity.^[87]

The *B. moojeni* venom is made up of 30 % to 60 % of SVMPs.^[88] This SVMPs affect the hemostasis, inducing defibrinogenesis, activating coagulation cascade factor X and prothrombin.^[89] The SVMPs have the potential to act as thrombolytic agents and act as anticoagulants. The SVMPs have also the capacity to decrease fibrinogen levels and inhibit thrombogenesis.^[90] Equally important, the *B. moojeni* venom is made of 10 % to 30 % of SVSPs, being kallikrein-type enzymes that generate bradykinin with vasodilator and inflammatory function.^[91,92]

The isolated action of enzymes present in bothropic venoms, such as PLA₂s, SVMP, and SVSP, as well as their joint action^[93], results in a series of disturbs in the hemostatic systems. Those toxins activate the coagulation system, consuming the coagulation factors, mainly fibrinogen. The fibrinogen is hydrolyzed in intravascular fibrin, which is also hydrolyzed, forming degradation products. This results in increased blood clotting time causing bleeding.^[94]

Corroborating the data of the present study, in which all the evaluated extracts exerted an inhibitory effect on the thrombolytic activity induced by the venom of *B. moojeni*, the extract of the leaves of *A. carambola* was described with the same action potential.^[74] The

aqueous extracts of *Aniba fragans* and *Philodendron megalophyllum* showed the potential to inhibit hemorrhages caused by *B. atrox* venom.^[73,95] Plants like *Diospyro discolor*, *Enobotrya deflez*, *Machulius japônica*, and *Pyros taiwanensis* showed high phenolic amounts in the chemical composition of their extracts also exert inhibition on the activity of the metalloproteases.^[96] The fact that plants are natural sources for inhibiting the SVMPs was noted in many research papers, such as those that describe the *Euphoria longana*,^[97] *Macrocystis pyrifera*, *Camellia sinensis*, *Eucommia ulmoides*^[98] and *Renalmia alpinia*.^[99]

Corroborating the data of the present study, the gallic acid found in significant amounts in the extracts of *O. vulgare* and *P. crispum*, presented anticoagulant activity and inhibited the proteolytic and hemorrhagic activities induced by the venoms of *B. jararaca* and *B. jararacussu*.^[70] The extracts of *Schwartzia brasiliensis*, *Andrographis paniculata* and *Stryphnodendron adstringens* inhibited anticoagulant, proteolytic and hemorrhagic activities induced by *B. jararaca*, *Naja naja* and *B. jararacussu* venom.^[77,100,101] In the present study, *P. crispum* showed pro-coagulant activity, enhancing the action of enzymes present in the venom of *B. moojeni*, as well as the aqueous extract of the leaves of *A. carambola* showed pro-coagulant activity when evaluated after incubation with the venom of *C.d.t.*^[74]

Studies suggest an improvement in the intestine condition through the administration of beneficial bacteria such as *Lactobacillus* and *Bifidobacterium*.^[102,103] Probiotic bacteria release bioactive mediators that contribute to the maintenance of intestinal homeostasis and platelet aggregation without thrombotic tendency.^[104] During thrombus formation, various coagulation factors are involved in the action of thrombin, fibrinogen (FIB) is continuously transformed into fibrin, the main component of thrombus.^[105] Zeng et al.^[106] demonstrated that *L. plantarum* can control PT, APTT, TT and FIB, indicating interfering with thrombosis formation *in vivo*. Platelet aggregation is an initial key event in thrombus formation. The *L. rhamnosus* and *Bifidobacterium lactis* are considered probiotic strains that don't participate of thrombotic disorders.^[107] Metabolites produced by probiotic strains dissolve thrombi and improve blood flow.^[108] Metabolites of *L. rhamnosus*, *L. casei*, and *L. plantarum* can modulate/regulate metalloproteases to prevent inflammatory diseases.^[109] Probiotic stains such as *L. casei* and *L. rhamnosus* are able to beneficially modulate the inflammation-coagulation interaction by reducing blood clotting activation.^[110,111]

In addition, the presence of phenolic compounds in vegetables is correlated with beneficial effects on human health, the various biological actions have been attributed especially to phenolic acids.^[112] The suggested mechanisms of action for these compounds are based on their ability to bind to metals such as Zn^{2+} and/or Ca^{2+} and macromolecules, and

interaction with amino acid residues present in protein structures, thus blocking the pharmacological activities of enzymes.^[113]

For the most part, the drugs found in the pharmaceutical market were developed from compounds extracted mainly from plants. Based on studies found in the literature and on our results, the synergetic actions between the extracts of aromatic plants and their bioactive compounds with probiotic bacteria are promising in the treatment and prevention of diseases related to homeostatic and inflammatory disorders. The extract of *L. nobilis*, *O. basilicum*, *O. vulgare* and *P. crispum* exert modulating action on the activities induced mainly by PLA₂s and proteases, presenting anti-inflammatory, anti-hemolytic and anti-thrombolytic potential, in addition to interfering with the action of coagulant enzymes present in the venom used as a laboratory tool. Considering the experimental conditions evaluated in this work, we concluded that the extracts represent cheap and safe sources of natural antioxidants, active in the prevention and adjuvant treatment of inflammatory diseases, that can have their culinary consumption reinforced by doctors and nutritionist. Therefore, understanding the action of extracts and probiotic bacteria on the modulation of hemostasis and the inflammatory response still requires further studies. However, due to the complexity of the composition of these extracts and the pathophysiological processes inherent to the human body, complementary scientific studies need to be carried out to elucidate possible mechanisms of action that are responsible for the benefits to human health.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors gratefully acknowledge the financial support by Coordenação de Aperfeiçoamento de Nivel Superior (CAPES). The authors express their gratitude to the Federal University of Lavras for the structural and logistical support.

REFERENCES

- [1] Lee, E. H.; Shin, J. H.; Kim, S. S.; Lee, H.; Yang, S. R.; Seo, S. R. *Laurus nobilis* leaf extract controls inflammation by supressing NLRP3 inflammasome activation. *J. Cell. Physiol.* **2019**, *234*, 6854-6864. DOI: [10.1002/jcp.27434](https://doi.org/10.1002/jcp.27434).
- [2] Tavallali, V.; Kiani, M.; Hojati, S. Iron nano-complexes and iron chelate improve biological activities of sweet basil (*Ocimum basilicum* L.). *Plant Phys. Biochem.* **2019**, *144*, 445-454. DOI: [10.1016/j.plaphy.2019.10.021](https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2019.10.021).
- [3] Liberal, A.; Fernandes, A.; Polyzos, N.; Petropoulos, S. A.; Dias, M. I.; Pinela, J.; Petrovic, J.; Sokovic, M.; Ferreira, I. C. F. R.; Barros, L. Bioactive properties and phenolic

compound profiles of turnip-rooted, plain-leafed and curly-leafed parsley cultivars. *Molecules*. **2020**, *25*, 5606, 1-17. DOI: [10.3390/molecules25235606](https://doi.org/10.3390/molecules25235606).

[4] Ovidi, E.; Masci, V. L.; Zambelli, M.; Tiezzi, A.; Vitalini, S.; Garzoli, S. *Laurus nobilis*, *Salvia sclarea* and *Salvia officinalis* essential oils and hydrolates: evaluation of liquid and vapor phase chemical composition and biological activities. *Plants*. **2021**, *10*, 707, 1-17. DOI: [10.3390/plants10040707](https://doi.org/10.3390/plants10040707).

[5] Yu, H.; Zhang, P.; Liu, H.; Sun, X.; Liang, J.; Sun, L.; Chen, Y. Hypoglycemic activity of *Origanum vulgare* L. and its main chemical constituents identified with HPLC-ESI-QTOF-MS. *Food Funct*. **2021**, *12*, 6, 2580-2590. DOI: [10.1039/D0FO03166F](https://doi.org/10.1039/D0FO03166F).

[6] Jezewska-Frackowiak, J.; Seroczynska, K.; Banaszczyk, J.; Jedrzejczak, G.; Zylicz-Stachula, A.; Skowron, P. M. The promises and risks of probiotic *Bacillus* species. *Acta Biochim. Pol.* **2018**, *65*, 4, 509-519. DOI: [10.18388/abp.2018_2652](https://doi.org/10.18388/abp.2018_2652).

[7] Zamora, L. L.; Pérez-Gracia, M. T. Using digital photography to implement the McFarland method. *J. R. Soc. Interface*. **2012**, *9*, 1892-1897. DOI: [10.1098/rsif.2011.0809](https://doi.org/10.1098/rsif.2011.0809).

[8] Williams, L. A. D.; Connar, A. O.; Latore, L.; Dennis, O.; Ringer, S.; Whittaker, J. A.; Conrad, J.; Vogler, B.; Rosner, H.; Kraus, W. The *in vitro* anti-denaturation effects induced by natural products and non-steroidal compounds in heat treated (immunogenic) bovine serum albumin is proposed as a screening assay for the detection of anti-inflammatory compounds, without the use of animals, in the early stages of the drug discovery process. *West Ind. Med. J.* **2008**, *57*, 4, 327-321. DOI: [10.1215/9780822388630-010](https://doi.org/10.1215/9780822388630-010).

[9] Tatiya, A. U.; Saluja, A. K. Further studies on membrane stabilizing, anti-inflammatory and FCA induced arthritic activity of various fractions of bark of *Machilus macrantha* in rats. *Braz. J. Pharmacog.* **2011**, *21*, 6, 1052-1064. DOI: [10.1590/S0102-695X2011005000152](https://doi.org/10.1590/S0102-695X2011005000152).

[10] Nkeh-Chungag, B. N.; Oyedeji, O. O.; Oyedeji, A. O.; Ndebia, E. J. Anti-inflammatory and membrane-stabilizing properties of two semisynthetic derivatives of oleanolic acid. *Inflammation*. **2015**, *38*, 1, 61-69. DOI: [10.1007/s10753-014-0007-y](https://doi.org/10.1007/s10753-014-0007-y).

[11] 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.

[12] Rodrigues, V. M.; Soares, A. M.; Guerra-Sa, 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*, 215-324. DOI: [10.1006/abbi.2000.195](https://doi.org/10.1006/abbi.2000.195).

[13] Cintra, A. C.; De Toni, L. G.; Sartim, M. A.; Franco, J. J.; Caetano, R. C.; Murakami, M. T.; Sampaio, S. V. Batroxase, a new metalloproteinase from *Bothrops atrox* snake venom with strong fibrinolytic activity. *Toxicon*, **2012**, *60*, 70-82. DOI: [10.1016/j.toxicon.2012.03.018](https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2012.03.018).

[14] R Core Team: R: A Language and Environment for Statistical Computing. Viena: Viena: R Foundation for Statistical Computing, 2012.

- [15] Zielinska, D.; Zielinski, H.; Laparra-Llopis, J. M.; Szawara-Nowak, D.; Honke, J.; Giménez-Bastida, J. A. Caffeic acid modulates processes associated with intestinal inflammation. *Nutrients*. **2021**, *13*, 554, 1-14. DOI: **10.3390/nu13020554**.
- [16] Xue, B.; Xie, J.; Huang, J.; Chen, L.; Gao, L.; Ou, S.; Wang, Y.; Peng, X. Plant polyphenols alter a pathway of energy metabolism by inhibiting fecal bacteroidetes and firmicutes *in vitro*. *Food Funct*. **2016**, *7*, 3, 1501-1507. DOI: **10.1039/c5fo01438g**.
- [17] Li, D.; Rui, Y.; Guo, S.; Luan, F.; Liu, R.; Zeng, N. Ferulic acid: a review of its pharmacology, pharmacokinetics and derivatives. *Life Sci*. **2021**, *284*, 119921, 1-13. DOI: **10.1016/j.lfs.2021.119921**.
- [18] Nouri, A.; Heibati, F.; Heidarian E. Gallic acid exerts anti-inflammatory, anti-oxidative stress, and nephroprotective effects against paraquat-induced renal injury in male rats. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol*. **2020**, *394*, 1-61. DOI: **10.1007/s00210-020-01931-0**.
- [19] Rasooly, R.; Choi, H. Y.; Do, P.; Morroni, G.; Brescini, L.; Cirioni, O.; Giacometti, A.; Apostolidis, E. whISOBAX™ inhibits bacterial pathogenesis and enhances the effect of antibiotics. *Antibiotics*. **2020**, *9*, 264, 1-14. DOI: **10.3390/antibiotics9050264**.
- [20] Viana, R. S.; De Aquino, F. L. T.; Barreto, E. Effect of trans-cinnamic acid and *p*-coumaric acid on fibroblast motility: a pilot comparative study of *in silico* lipophilicity measure. *Nat. Prod. Res*. **2020**, *35*, 1-7. DOI: **10.1080/14786419.2020.1798664**.
- [21] Abotaleb, M.; Liskova, A.; Kubatka, P.; Büsselberg, D. Therapeutic potential of plant phenolic acids in the treatment of cancer. *Biomolecules*. **2020**, *10*, 221, 1-23. DOI: **10.3390/biom10020221**.
- [22] Urs, N. A. N.; Yariswamy, M.; Joshi, V.; Nataraju, A.; Gowda, T. V.; Vishwanath, B. S. Implications of phytochemicals in snakebite management: present status and future prospective. *Toxin Rev*. **2013**, *33*, 1-24.
- [23] Santhosh, M. S.; Hemshekhar, M.; Sunitha, K.; Thushara, R. M.; Jnaneshwari, S.; Kemparaju, K.; Girish, K. S. Snake venom induced local toxicities: plant secondary metabolites as an auxiliary therapy. *Mini. Rev. Med. Chem*. **2013**, *13*, 106-123. DOI: **10.2174/1389557511307010106**.
- [24] Aslan, H. E.; Beydemir, S. Phenolic compounds: the inhibition effect on polyol pathway enzymes. *Chem.-Biol. Int*. **2017**, *266*, 47-55. DOI: **10.1016/j.cbi.2017.01.021**.
- [25] Leelaprakash, G.; Dass, S. M. *In vitro* antiinflammatory activity of methanol extract of *Enicostemma axillare*. *Int. J. Drug Dev. Res*. **2011**, *3*, 3, 189-196.
- [26] Yu, M.; Gouvinhas, I.; Rocha, J.; Barros, A. I. R. N. A. Phytochemical and antioxidant analysis of medicinal and food plants towards bioactive food and pharmaceutical resources. *Scient. Reports*. **2021**, *11*, 10041. DOI: **10.1038/s41598-021-89437-4**.
- [27] Bensaid, A.; Boudard, F.; Servent, A.; Morel, S.; Portet, K.; Guzman, C.; Vitou, M.; Bichon, F.; Poucheret, P. Differential nutrition-health properties of *Ocimum basilicum* leaf and stem extracts. *Food*. **2022**, *11*, 1699, 1-20. DOI: **10.3390/foods11121699**.
- [28] Takeuchi, H.; Takahashi-Muto, C.; Nagase, M.; Kassai, M.; Tanaka-Yachi, R.; Kiyose, C. Anti-inflammatory effects of extracts of sweet basil (*Ocimum basilicum* L.) on a co-culture

of 3T3-L1 adipocytes and RAW 264.7 macrophages. *J. Oleo Sci.* **2020**, *69*, 5, 487-493. DOI: **10.5650/jos.ess19321**.

[29] Mir, R. H.; Sawhney, G.; Verma, R.; Ahmad, B.; Kumar, P.; Ranjana, S.; Bhagat, A.; Madishetti, S.; Ahmed, Z.; Jachak, S. M.; Choi, S.; Masoodi, M. H. *Origanum vulgare* L.: *in vitro* assessment of cytotoxicity, molecular docking studies, antioxidant and anti-inflammatory activity in LPS stimulated RAW 264.7 cells. *Med. Chem.* **2021**, *17*, 9, 983-997. DOI: **10.2174/1573406416666200904110828**.

[30] Foudah, A.I.; Alqarni, M. H.; Alam, A.; Salkini, M. A.; Ross, S. A.; Yusufoglu, H. S. Phytochemical screening, *in vitro* and *in silico* studies of volatile compounds from *Petroselinum crispum* (Mill) leaves grown in Saudi Arabia. *Molecules.* **2022**, *27*, 934, 1-18. DOI: **10.3390/molecules27030934**.

[31] Soliman, M. M.; Nassan, M. A.; Aldhahrani, A.; Althobaiti, F.; Mohamed, W. A. Molecular and histopathological study on the ameliorative impacts of *Petroselinum crispum* and *Apium graveolens* against experimental hyperuricemia. *Scient. Reports.* **2020**, *10*, 9512, 1-11. DOI: **10.1038/s41598-020-66205-4**.

[32] Huang, W. C.; Tsai, T. H.; Huang, C. J.; Li, Y. Y.; Chyuan, J. H.; Chuang, L. T.; Tsai, P. J. Inhibitory effects of wild bitter melon leaf extract on *Propionibacterium acnes*-induced skin inflammation in mouse and cytokine production *in vitro*. *Food Funct.* **2015**, *8*, 2550–2560. DOI: **10.1039/c5fo00550g**.

[33] Dall'Acqua, S.; Cervellati, R.; Speron, E.; Costa, S.; Guerra, M. C.; Stella, L.; Greco, E.; Innocenti, G. Phytochemical composition and antioxidant activity of *Laurus nobilis* L. leaf infusion. *J. Med. Food.* **2009**, *12*, 4, 869-876. DOI: **10.1089/jmf.2008.0119**.

[34] Rababah, T. M.; Ereifes, K. I.; Esoh, R. B.; Al-u'datt, M. H.; Alrababah, M. A.; Yang, W. Antioxidant activities, total phenolics and HPLC analyses of the phenolic compounds of extracts from common Mediterranean plants. *Nat. Prod. Res.* **2011**, *25*, 6, 596-605. DOI: **10.1080/14786419.2010.488232**.

[35] Vlase, L.; Benedee, D.; Hanganu, D.; Damian, G.; Csillag, I.; Sevastre, B.; Mot, A. C.; Silaghi-Dumitrescu, R.; Tilea, I. Evaluation of antioxidant and antimicrobial activities and phenolic profile for *Hyssopus officinalis*, *Ocimum basilicum* and *Teucrium chamaedrys*. *Molecules.* **2014**, *19*, 5490-5507. DOI: **10.3390/molecules19055490**.

[36] Koldas, S.; Demirtas, I.; Ozen, T.; Demirci, M. A.; Behçet, L. Phytochemical screening, anticancer and antioxidant activities of *Origanum vulgare* L. ssp. *viride* (Boiss.) Hayer, a plant of traditional usage. *J. Sci. Food Agric.* **2015**, *95*, 786-798. DOI: **10.1002/jsfa.6903**.

[37] Ferreira, F. S.; De Oliveira, V. S.; Chávez, D. W. H.; Chaves, D. S.; Riger, C. J.; Sawaya, A. C. H. F.; Guizellini, G. M.; Sampaio, G. R.; Torres, E. A. F. S.; Saldanha, T. Bioactive compounds of parsley (*Petroselinum crispum*), chives (*Allium schoenoprasum* L) and their mixture (Brazilian *cheiro-verde*) as promising antioxidant and anti-cholesterol oxidation agents in a food system. *Food Res. Int.* **2022**, *151*, 110864, 1-12. DOI: **10.1016/j.foodres.2021.110864**.

[38] Delaporte, R. H.; Sánchez, G. M.; Cuellar, A. C.; Guiliani, A.; De Mello, J. C. P. Anti-inflammatory activity and lipid peroxidation inhibition of iridoid lamiide isolated from *Bouchea fluminensis* (Vell.) Mold. (Verbenaceae). *J. Ethnopharmacol.* **2002**, *82*, 127–130.

- [39] Geronikaki, A. A.; Gavalas, A. M. Antioxidants and anti-inflammatory diseases: synthetic and natural antioxidants with anti-inflammatory activity. *Combinat. Chem. High Through Put Screen.* **2006**, *9*, 425–442.
- [40] Yaltirak, T.; Aslim, B.; Ozturk, S.; Alli, H. Antimicrobial and antioxidant activities of *Russula delica* Fr. *Food Chem. Toxicol.* **2009**, *47*, 8, 2052-2056. DOI: **10.1016/j.fct.2009.05.029**.
- [41] Palanisamy, U. D.; Ling, L. T.; Manaharan, T.; Appleton, D. Rapid isolation of geraniin from *Nephelium lappaceum* rind waste and its anti-hyperglycemic activity. *Food Chem.* **2011**, *127*, 21-27. DOI: **10.1016/j.foodchem.2010.12.070**.
- [42] Saija, A.; Scalese, M.; Lanza, M.; Marzullo, D.; Bonina, F.; Castelli, F. Flavonoids as antioxidant agents: importance of their interaction with biomembranes. *Free Rad. Biol. Med.* **1995**, *19*, 4, 481-486.
- [43] Simão, A. A.; Corrêa, A. D.; De Carvalho, T. C. L.; Cesar, P. H. S.; Oliveira, C. H. M.; Marcussi, S. Pharmaco-toxic characterization of the aqueous extract from *Pereskia grandifolia* leaves. *J. Med. Plants Res.* **2015**, *9*, 7, 216-222. DOI: **10.5897/JMPR2014.5647**.
- [44] Sales, T. A.; Marcussi, S.; Da Cunha, E. F. F.; Kuca, K.; Ramalho, T. C. Can inhibitors of snake venom phospholipase A₂ lead to new insights into anti-inflammatory therapy in human? A theoretical study. *Toxins.* **2017**, *9*, 341, 1-14. DOI: **10.3390/toxins9110341**.
- [45] Cesar, P. H. S.; Trento, M. V.; Sales, T. A.; Simão, A. A.; Ramalho, T. C.; Marcussi, S. Vanillic acid as phospholipase A₂ and proteases inhibitor: *in vitro* and computational analyses. *Biotechnol. Appl. Biochem.* **2021**, *68*, 3, 486-496. DOI: **10.1002/bab.1943**.
- [46] Villena, J. et al. Immunobiotics for the prevention of bacterial and viral respiratory infections. In: Kitazawa H, Villena J, Alvarez S, editors. Probiotics: immunobiotics and immunogenics. Science Publishers, CRC Press, Taylor & Francis Group company; p. 128-168, 2013.
- [47] Wang, Y.; Li, A.; Jiang, X.; Zhang, H.; Mehmood, K.; Zhang, L.; Jiang, J.; Waqas, M.; Iqbal, M.; Li, J. Probiotic potential of *Leuconostoc pseudomesenteroides* and *Lactobacillus Strains* isolated from yaks. *Front. Microbiol.* **2018**, *9*, 2987, 1-10. DOI: **10.3389/fmicb.2018.02987**.
- [48] Hajifaraji, M.; Jhanjou, F.; Abbasalizadeh, F.; Aghamohammadzadeh, N.; Abbasi, M. M.; Dolatkhah, N. Effect of probiotic supplements in womem with gestational diabetes mellitus on inflammation and oxidative stress biomarkers: a randomized clinical trial. *Asia Pac. J. Clin. Nutr.* **2018**, *27*, 3, 581-591. DOI: **10.6133/apjcn.082017.03**.
- [49] Banan, A.; Keshavarzian, A.; Zhang, L.; Shaikh, M.; Forsyth, C. B.; Tang, Y.; Fields, J. Z. NF-kappaB activation as a key mechanism in ethanol-induced disruption of the F-actin cytoskeleton and monolayer barrier integrity in intestinal epithelium. *Alcohol* (Fayetteville, NY). **2007**, *41*, 447-460. DOI: **10.1016/j.alcohol.2007.07.003**.
- [50] Li, S. C.; Hsu, W. F.; Chang, J. S.; Shih, C. K. Combination of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium animals* subsp. *lactis* shows a stronger anti-inflammatory effect than individual strains in HT-29 cells. *Nutrients.* **2019**, *11*, 969, 1-17. DOI: **10.3390/nu11050969**.

- [51] Cohen, B. L.; Sachar, D. B. Update on anti-tumor necrosis factor agents and other new drugs for inflammatory bowel disease. *B. M. J.* **2017**, *357*, 2505. DOI: **10.1136/bmj.j2505**.
- [52] Tiso, R. L.; Cutler, T.; Catania, J. A.; Whalen, K. Adverse central nervous system sequelae after selective transforaminal block: the role of corticosteroids. *Spine J.* **2004**, *4*, 468–474. DOI: **10.1016/j.spinee.2003.10.007**.
- [53] Ganbarjeddi, S.; Azimi, A.; Heydarabad, M. Z.; Hemmatzadeh, M.; Mohammadi, S.; Ardehaie, R. M.; Zamani, M.; Baharaghdam, S.; Esmaili, S.; Ghasemi, A. Apoptosis induced by prednisolone occurs without altering the promoter methylation of *BAX* and *BCL-2* genes in acute lymphoblastic leukemia cells CCRF-CEM. *Asian Pac. J. Cancer Prev.* **2020**, *21*, 2, 523-529. DOI: **10.31557/APJCP.2020.21.2.523**.
- [54] Xiao, J.; Jiang, X.; Chen, X. Antibacterial, anti-inflammatory and diuretic effect of flavonoids from *Marchantia convoluta*. *Afr. J. Trad. Compl. Altern Med.* **2005**, *2*, 244–252. DOI: **10.4314/ajtcam.v2i3.31122**.
- [55] Talley, N. J.; Abreu, M. T.; Achkar, J. P.; Bernstein, C. N.; Dubinsky, M. C.; Hanauer, S. B.; Kane, S. V.; Sandborn, W. J.; Ullman, T. A.; Moayyedi, P. M. B. An evidence-based systematic review on medical therapies for inflammatory bowel disease. *The Amer. J. Gastroent.* **2011**, *106*, 2-25. DOI: **10.1038/ajg.2011.58**.
- [56] Martyniak, A.; Medynska-Przeczek, A.; Wedrychowicz, A.; Skoczen, S.; Tomasik, P. J. Prebiotics, probiotics, synbiotics, paraprobiotics and postbiotics compounds in IBD. *Biomolecules.* **2021**, *11*, 1903, 1-24. DOI: **10.3390/biom11121903**.
- [57] Gutiérrez, J. M.; León, G.; Burnouf, T. Antivenoms for the treatment of snakebite envenomings: the road ahead. *Biologicals.* **2011**, *39*, 129-142. DOI: **10.1016/j.biologicals.2011.02.005**.
- [58] Gutiérrez, J. M.; Calvete, J. J.; Habib, A. G.; Harrison, R. A.; Williams, D. J.; Warrel, D. A. Snakebite envenoming. *Nat. Rev. Dis. Primers.* **2017**, *3*, 1-20. DOI: **10.1038/nrdp.2017.63**.
- [59] Damel, R. A.; Van Kessel, W. S. M. G.; Zwaal, R. F. A.; Roelofsen, B.; Van Deenen, L. L. M. Relation between various phospholipase actions on human red cell membranes and the interfacial phospholipid pressure in monolayers. *Biochim. Biophys. Acta.* **1975**, *406*, 97-107.
- [60] Dufton, M. J.; Hider, R. S. Structure and pharmacology of elapid cytotoxins. *Pharmacol. Ther.* **1988**, *36*, 1-40.
- [61] Burke, J. E.; Dennis, E. A. Phospholipase A2 structure/function, mechanism, and signaling. *J. Lipid. Res.* **2009**, *50*, 237–242. DOI: **10.1194/jlr.R800033-JLR200**.
- [62] Chakraborti, S. Phospholipase A2 isoforms: a perspective. *Cell. Signal.* **2003**, *15*, 637-665. DOI: **10.1016/S0898-6568(02)00144-4**.
- [63] Shin, J. S.; Noh, Y. S.; Lee, Y. S.; Cho, Y. W.; Baek, N. I.; Choi, M. S.; Jeong, T. S.; Kang, E.; Chung, H. G.; Lee, K. T. Arvelxin from *Brassica rapa* suppresses NF- κ B-regulated pro-inflammatory gene expression by inhibiting activation of I κ B kinase. *British J. Pharm.* **2011**, *164*, 145–158. DOI: **10.1111/j.1476-5381.2011.01351.x**.

- [64] Lättig, J.; Böhl, M.; Fischer, P.; Tischer, S.; Tietböhl, C.; Menschikowski, M.; Gutzeit, H. O.; Metz, P.; Pisabarro, M. T. Mechanism of inhibition of human secretory phospholipase A₂ by flavonoids: rationale for lead design. *J. Comput. Aided Mol. Des.* **2007**, *21*, 473-483. DOI: **10.1007/s10822-007-9129-8**.
- [65] Freire, J. M.; Barroso, A. R.; De Assis, A. A.; Teixeira, B. H.; Braga, J. H. S.; Oliveira, D. A.; Braga, M. A.; Marcussi, S. Enzymes modulation by dried grape pomace from the manufacture of wines and juice. *Braz. J. Pharm. Sci.* **2020**, *56*, e18467, 1-13. DOI: **10.1590/s217597902020000118467**.
- [66] Oliveira, D. A.; Trento, M. V. C.; Cesar, P. H. S.; Braga, M. A.; Marcussi, S. Lipases and proteases inhibition by *Averrhoa carambola* L. fruit extracts. *Phytomed. Plus.* **2021**, *1*, 100119, 1-8. DOI: **10.1016/j.phyplu.2021.100119**.
- [67] Marques, T. R.; Braga, M. A.; Cesar, P. H. S.; De Souza, N. P.; Fráguas, R. M.; Oliveira, D. A.; Trento, M. V. C.; Marcussi, S. Evaluation of the Brazilian functional fruit *Morinda citrifolia* as phospholipases A₂ and proteases modulator *Morinda citrifolia*: enzymatic modulation. *Phytomed. Plus.* **2021**, *100071*, 1-5. DOI: **10.1016/j.phyplu.2021.100071**.
- [68] Zhang, Y.; Wang, X.; Lu, B.; Gao, Y.; Zhang, Y.; Li, Y.; Niu, H.; Fan, L.; Pang, Z.; Qiao, Y. Functional and binding studies of gallic acid showing platelet aggregation inhibitory effect as a thrombin inhibitor. *Chin. Herbal Medic.* **2022**, *14*, 303-309. DOI: **10.1016/j.chmed.2021.09.001**.
- [69] Badhani, B.; Sharma, N.; Kakkar, R. Gallic acid: a versatile antioxidant with promising therapeutic and industrial applications. *RSC Adv.* **2015**, *5*, 27540-27557. DOI: **10.1039/c5ra01911g**.
- [70] Pereira Júnior, L. C. S.; Souza, J. F.; Da Silva, A. C. R.; De Oliveira, E. C.; Sanchez, E. F.; Fuly, A. L. Utilization of gallic acid to inhibit some toxic activities caused by *Bothrops jararaca* or *B. jararacussu* snake venoms. *Toxicon.* **2022**, *217*, 5-12. DOI: **10.1016/j.toxicon.2022.07.009**.
- [71] Costa, T. R.; Francisco, A. F.; Cardoso, F. F.; Moreira-Dill, L. S.; Fernandes, C. A. H.; Gomes, A. A. S.; Guimarães, C. L. S.; Marcussi, S.; Pereira, P. S.; Oliveira, H. C. et al. Gallic acid anti-myotoxic activity and mechanism of action, a snake venom phospholipase A₂ toxin inhibitor, isolated from the medicinal plant *Anacardium humile*. *Int. J. Biol. Macromol.* **2021**, *185*, 494-512. DOI: **10.1016/j.ijbiomac.2021.06.163**.
- [72] Gopi, K.; Anbarasu, K.; Renu, K.; Jayanthi, S.; Vishwanath, B.; Jayaraman, G. Quercetin-3-O-rhamnoside from *Euphorbia hirta* protects against snake venom induced toxicity. *Biochim. Biophys. Acta.* **2016**, *1860*, 1528-1540. DOI: **10.1016/j.bbagen.2016.03.031**.
- [73] De Moura, V. M.; Guimarães, N. C.; Batista, L. T.; Freitas-De-Sousa, L. A.; Martins, J. S.; De Souza, M. C. S.; De Almeida, P. D. O.; Monteiro, W. M.; De Oliveira, R. B.; Dos-Santos, M. C. et al. Assessment of the anti-snake properties of extracts of *Aniba fragans* Ducke (Lauraceae) used in folk medicine as complementary treatment in cases of envenomation by *Bothrops atrox*. *J. Ethnopharmacol.* **2018**, *213*, 350-358. DOI: **10.1016/j.jep.2017.11.027**.

- [74] Oliveira, D. A.; Cesar, P. H. S.; Trento, M. V. C.; Braga, M. A.; Marcussi, S. Modulation of hemostasis by inhibiting enzymes with the extract of *Averrhoa carambola* leaves. *J. Biotechn. Biodiv.* **2021**, *9*, 4, 384-396. DOI: **10.20873/jbb.uft.cemaf.v9n4.oliveira**.
- [75] Tremacoldi, C. R.; Pascholati, S. F. Detection of trypsin inhibitor in seeds of *Eucalyptus urophylla* and its influence on the *in vitro* growth of the fungi *Pisolithus tinctorius* and *Rhizoctonia solani*. *Braz. J. Microbiol.* **2002**, *33*, 281-286. DOI: **10.1590/S1517-83822002000400001**.
- [76] Verrastro, B. R.; Torres, A. M.; Ricciardi, G.; Teibler, P.; Marunak, S.; Barnaba, C.; Larcher, R.; Nicolini, G.; Dellacassa, E. The effects of *Cissampelos pareira* extract on envenomation induced by *Bothrops diporus* snake venom. *J. Ethnopharm.* **2018**, *212*, 36-42. DOI: **10.1016/j.jep.2017.09.015**.
- [77] De Souza, J. F.; De Oliveira, E. C.; Da Silva, A. C. R.; Da Silva, V. P.; Kaplan, M. A. C.; Figueiredo, M. R.; Sanchez, E. F.; Fuly, A. L. Potential use of extract of the plant *Schwartzia brasiliensis* (choisy) bedell ex gir.-Cañas against the toxic effects of the venom of *Bothrops jararaca* ou *B. jararacussu*. *Biomed. Pharmacoth.* **2020**, *125*, 109951, 1-7. DOI: **10.1016/j.biopha.2020.109951**.
- [78] Sanders, M. E.; Merenstein, D. J.; Reid, G.; Gibson, G. R.; Rastall, R. A. Probiotics and prebiotics in intestinal health and disease: from biology to the clinic. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* **2019**, *16*, 605-616. DOI: **10.1038/s41575-019-0173-3**.
- [79] Zeng, Z.; He, X.; Li, F.; Zhang, Y.; Huang, Z.; Wang, Y.; Li, K.; Bao, Y.; Iqbal, M.; Fakhar-e-Alam, M.; et al.. Probiotic properties of *Bacillus proteolyticus* isolated from Tibetan Yaks, China. *Front. Microbiol.* **2021**, *12*, 1-12. DOI: **10.3389/fmicb.2021.649207**.
- [80] Yan, F.; Cao, H.; Cover, T. L.; Whitehead, R.; Washington, M. K.; Polk, D. B. Soluble proteins produced by probiotic bacteria regulate intestinal epithelial cell survival and growth. *Gastroenterology.* **2007**, *132*, 562-575. DOI: **10.1053/j.gastro.2006.11.022**.
- [81] Men, H.; Ba, Z.; Lee, Y.; Peng, J.; Lin, J.; Fleming, J. A.; Furumoto, E. J.; Roberts, R. F.; Kris-Etherton, P. M.; Rogers, C. J. Consumption of *Bifidobacterium animalis* subsp. lactis BB-12 in yogurt reduced expression of TLR-2 on peripheral blood-derived monocytes and pro-inflammatory cytokine secretion in young adults. *Eur. J. Nutr.* **2017**, *56*, 649-661. DOI: **10.1007/s00394-015-1109-5**.
- [82] Zhang, W.; Gu, Y.; Chen, Y.; Deng, H.; Chen, L.; Chen, S.; Zhang, G.; Gao, Z. Intestinal flora imbalance results in altered bacterial translocation and liver function in rats with experimental cirrhosis. *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.* **2010**, *22*, 1481-1486. DOI: **10.1097/MEG.0b013e32833eb8b0**.
- [83] Borthakur, A.; Bhattacharyya, S.; Kumar, A.; Anbazhagan, A. N.; Tobacman, J. K.; Dudeja, P. K. *Lactobacillus acidophilus* alleviates platelet-activating factor-induced inflammatory responses in human intestinal epithelial cells. *PLoS One.* **2013**, *8*, 1-8. DOI: **10.1371/journal.pone.0075664**.
- [84] Lässinger-Herfurth, A.; Pontarollo, G.; Grill, A.; Reinhardt, C. The gut microbiota in cardiovascular disease and arterial thrombosis. *Microorganisms.* **2019**, *7*, 691, 1-13. DOI: **10.3390/microorganisms7120691**.

- [85] Carvalho, B. M. A.; Santos, J. D. L.; Xavier, B. M.; Almeida, J. R.; Resende, L. M.; Martins, W.; Marcussi, S.; Marangoni, S.; Stábeli, R. G.; Calderon, L. A. et al. Snake venom PLA₂s inhibitors isolated from Brazilian plants: synthetic and natural molecules. *BioMed Res. Int.* **2013**, *2013*, 1-8. DOI: [10.1155/2013/153045](https://doi.org/10.1155/2013/153045).
- [86] Gopi, K.; Renu, K.; Vishwanath, B. S.; Jayaraman, G. Protective effect of *Euphorbia hirta* and its components against snake venom induced lethality. *J. Ethnopharmacol.* **2015**, *165*, 180-190. DOI: [10.1016/j.jep.2015.02.044](https://doi.org/10.1016/j.jep.2015.02.044).
- [87] Andersen, O.M.; Markham, K. R. Flavonoids: Chemistry, Biochemistry and Applications; CRC Press: Boca Raton, FL, USA, 2005.
- [88] Calvete, J. J.; Sanz, L.; Angulo, Y.; Lomonte, B.; Gutiérrez, J. M. Venoms, venomics, antivenomics. *FEBS Let.* **2009**, *583*, 1736-1743. DOI: [10.1016/j.febslet.2009.03.029](https://doi.org/10.1016/j.febslet.2009.03.029).
- [89] De Lima, M. E.; Pimenta, A. M. C.; Martin-Eauclaire, M. F.; Zingali, R. B.; Rochat, H. Animal toxins: state of the art – perspective in health and biotechnology. *J. Venom Anim. Toxins Incl. Tro. Dis.* **2009**, *15*, 450-455. DOI: [10.1590/S1678-91992009000300021](https://doi.org/10.1590/S1678-91992009000300021).
- [90] Wang, D. S.; Hanamoto, M.; Fang, F.; Ohba, M.; Ishii, M.; Kimura, F.; Higaki, E.; Senga, H. Defibrinogenating effect of batroxobin (Defibrase®) in rats and inhibition of migration of human vascular smooth muscle cells by the plasma of batroxobin-treated rats *in vitro*. *Atherosclerosis.* **2001**, *156*, 73-80. DOI: [10.1016/s0021-9150\(00\)00628-6](https://doi.org/10.1016/s0021-9150(00)00628-6).
- [91] Braud, S.; Bon, C.; Wisner, A. Snake venom proteins acting on hemostasis. *Biochimie.* **2000**, *82*, 851-859.
- [92] Komori, Y.; Nikai, T.; Sugihara, H. Biochemical and physiological studies on a kallikrein-like enzyme from the venom of *Crotalus viridis viridis* (Prairie rattlesnake). *Biochim. Biophys. Acta.* **1988**, *967*, 92-102.
- [93] Sousa, L. F.; Portes-Junior, J. A.; Nicolau, C. A.; Bernardoni, J. L.; Nishiyama-Jr, M. Y.; Amazonas, D. R.; Freitas-de-Sousa, L. A.; Mourão, R. H. V.; Chalkidis, H. M.; Valente, R. H. et al. Functional proteomic analyses of *Bothrops atrox* venom reveals phenotypes associated with habitat variation in the Amazon. *J. Proteomics.* **2017**, *159*, 32-46. DOI: [10.1016/j.prot.2017.03.003](https://doi.org/10.1016/j.prot.2017.03.003).
- [94] Sgrignolli, L. R.; Mendes, G. E. F.; Carlos, C. P.; Burdmann, E. A. Acute kidney injury caused by *Bothrops* snake venom. *Nephron Clin. Pract.* **2011**, *119*, 131-137. DOI: [10.1159/000324228](https://doi.org/10.1159/000324228).
- [95] Guimarães, N. C.; Freitas-De-Souza, L. A.; De Souza, M. C. S.; De Almeida, P. D. O.; Dos Santos, M. C.; Nunez, C. V.; De Oliveira, R. B.; Mourão, R. H. V.; De Moura, V. M. Evaluation of the anti-snakebite, antimicrobial and antioxidant potential of *Philodendron megalophyllum* Schott (Araceae), traditionally used in accidents caused by snakes in the western region of Pará, Brazil. *Toxicon.* **2020**, *184*, 99-108. DOI: [10.1016/j.toxicon.2020.05.024](https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2020.05.024).
- [96] Lee, Y. L.; Lee, M. H.; Chang, H. J.; Huang, P. Y.; Huang, I. J.; Cheng, K. T.; Leu, S. J. Taiwanese native plants inhibit matrix metalloproteinase-9 activity after ultraviolet B irradiation. *Molecules.* **2009**, *14*, 1062–1071. DOI: [10.3390/molecules14031062](https://doi.org/10.3390/molecules14031062).

- [97] Panyathep, A.; Chewonarin, T.; Taneyhill, K.; Vinitketkumnuen, U. Antioxidant and anti-matrix metalloproteinases activities of dried longan (*Euphoria longana*) seed extract. *Sci. Asia*. **2013**, *39*, 12–18. DOI: **10.2306/scienceasia1513-1874.2013.39.012**.
- [98] Zaluski, D.; Smolarz, H. D. Plant inhibitors of metalloproteinases and the possibility of their application in the prevention of photoaging. *Annales Universitatis Mariae Curie-Sklodowska, Sectio DDD. Pharmacia*. **2009**, *22*, 89–96. DOI: **10.2478/v10080-008-0184-9**.
- [99] Patiño, A. C.; López, J.; Aristizábal, M.; Quintana, J. C.; Benjumea, D. Efecto inhibitorio de extractos de *Renalmia alpinia* Rottb. Maas (Zingiberaceae) sobre el veneno de *Bothrops asper* (mapaná). *Biomédica*. **2012**, *32*, 365-374. DOI: **10.7705/biomedica.v32i3.591**.
- [100] Nayak, A. G.; Ahammad, J.; Kumar, N.; Shenoy, S.; Roche, M. Can the methanolic extract of *Andrographis paniculata* be used as a supplement to anti-snake venom to normalize hemostatic parameters: a thromboelastographic study. *J. Ethnopharm.* **2020**, *252*, 112480, 1-12. DOI: **10.1016/j.jep.2019.112480**.
- [101] Pereira Júnior, L. C. S.; De Oliveira, E. C.; Rorig, T. D. V.; De Araújo, P. I. P.; Sanchez, E. F.; Garrett, R.; De Mello, J. C. P.; Fuly, A. L. The plant *Stryphnodendro adstringens* (Mart.) Coville as a neutralizing source against some toxic activities of *Bothrops jararacussu* snake venom. *Toxicon*. **2020**, *186*, 182-190. DOI: **10.1016/j.toxicon.2020.08.011**.
- [102] Pace, F.; Pace, E.; Quartarone, G. Probiotics in digestive disease: focus on *Lactobacillus* GG. *Min. Gastroent. Dietol.* **2015**, *61*, 4, 273-292.
- [103] Matsuoka, K.; Uemura, Y.; Kanai, T.; Kunisaki, R.; Suzuki, Y.; Yokoyama, K.; Yoshimura, N.; Hibi, T. Efficacy of *Bifidobacterium breve* fermented milk in main taining remission of ulcerative colitis. *Dig. Dis. Sci.* **2018**, *63*, 7, 1910-1919. DOI: **10.1007/s10620-018-4946-2**.
- [104] Isozaki, S.; Konishi, H.; Fujiya, M.; Tanaka, H.; Murakami, Y.; Kashima, S.; Ando, K.; Ueno, N.; Moriichi, K.; Okumura, T. Probiotic-derived polyphosphate accelerates intestinal epithelia wound healing through inducing platelet-derived mediators. *Mediat. Inflamm.* **2021**, 1-14. DOI: **10.1155/2021/5582943**.
- [105] Wang, X. H.; Kong, D.; Li, W. Z. Effects of aqueous extracts from *Cyclocarya paliurus* leaves on blood lipids, hemagglutination, and lipid peroxidation in rats with diabetic nephropathy. *Mod. Food Sci. Technol.* **2016**, *32*, 1-6. DOI: **10.13982/j.mfst.1673-9078.2016.6.001**.
- [106] Zeng, S.; Yi, R.; Tan, F.; Sun, P.; Cheng, Q.; Zhao, X. *Lactobacillus plantarum* HFY05 attenuates carrageenan-induced thrombosis in mice by regulating NF-κB pathway-associated inflammatory responses. *Front. Nutr.* **2022**, *9*, 813899, 1-13 DOI: **10.3389/fnut.2022.813899**.
- [107] Zhou, J. S.; Rutherford, K. J.; Gill, H. S. Inability of probiotic bacterial strains *Lactobacillus rhamnosus* HN001 and *Bifidobacterium lactis* HN019 to induce human platelet aggregation *in vitro*. *J. Food Protect.* **2005**, *68*, 11, 2459-2464. DOI: **10.4315/0362-028x-68.11.2459**.

- [108] Sumi, H.; Hamada, H.; Tsushima, H.; Mihara, H.; Muraki, H. A novel fibrinolytic enzyme (nattokinase) in the vegetable cheese Natto; a typical and popular soybean food in the Japanese diet. *Experientia*. **1987**, *43*, 1110-1111. DOI: **10.1007/BF01956052**.
- [109] Yue, Y. C.; Yang, B. Y.; Lu, Y.; Zhang, S. W.; Liu, L.; Nassar, K.; Xu, X. X.; Pang, X. Y.; Lu, J. P. Metabolite secretions of *Lactobacillus plantarum* YYC-3 may inhibit colon cancer cell metastasis by suppressing the VEGF-MMP2/9 signaling pathway. *Microb. Cell Fact.* **2020**, *19*, 213, 1-12. DOI: **10.1186/s12934-020-01466-2**.
- [110] Zelaya, H.; Laino, J.; Haro, C.; Alvarez, S.; Agüero, G. Modulation of the immuno-coagulative response in a pneumococcal infection in malnourished mice nasally treated with *Lactobacillus casei*. *J. Med. Microbiol.* **2013**, *62*, 145-154. DOI: **10.1099/jmm.0.045526-0**.
- [111] Zelaya, H.; Tsukida, K.; Chiba, E.; Marranzino, G.; Alvarez, S.; Kitazawa, H.; Agüero, G.; Villena, J. Immunobiotic lactobacilli reduce viral-associated pulmonary damage through the modulation of inflammation-coagulation interactions. *Int. Immunopharm.* **2014**, *19*, 161-173. DOI: **10.1016/j.intimp.2013.12.020**.
- [112] Olas, B. Anti-aggregatory potential of selected vegetables – promising dietary components for the prevention and treatment of cardiovascular disease. *Adv. Nutr.* **2019**, *10*, 280-290. DOI: **10.1093/advances/nmy085**.
- [113] Caro, D.; Ocampo, Y.; Castro, J.; Barrios, L.; Salas, R.; Franco, L. A. Protective effects of *Dracontium dubium* against *Bothrops asper* venom. *Biom. Pharmac.* **2017**, *89*, 1105-1114. DOI: **10.1016/j.biopha.2017.02.080**.

ARTIGO 2 – Plantas condimentares e probióticos: investigação de propriedades funcionais na prevenção de doenças

RESUMO

As plantas condimentares produzem uma grande quantidade de compostos com diferentes efeitos farmacológicos, podendo atuar como agentes moduladores sobre enzimas que atuam na manutenção da homeostasia e nas respostas imunológicas/inflamatórias/alergênicas. Em adição, as bactérias probióticas contribuem com o equilíbrio da microbiota intestinal, bem como na inflamação, imunidade e prevenção de infecções. As peçonhas de serpentes são ricas fontes de enzimas fosfolipases A₂ (PLA_{2s}), metaloproteases e serinoproteases. Essas enzimas participam dos processos de distúrbios hemostáticos e são homólogas as enzimas humanas, podendo ser utilizadas para modular atividades enzimáticas como coagulação, agregação plaquetária, hemorragia, inflamação e cicatrização. No presente estudo foram incubados extratos de folhas de *R. officinalis*, *S. officinalis* e *T. vulgaris* e bactérias probióticas com peçonha de *B. moojeni*, para avaliar os efeitos sobre as atividades de hemólise, trombolíticas, coagulantes e de PLA_{2s}, além de avaliar o potencial anti-inflamatório dos extratos por meio de sua ação protetora sobre a lise de eritrócitos induzida por alta temperatura. Os extratos em associação com probiótico demonstraram um significativo potencial anti-inflamatório, e efeitos inibidores sobre a coagulação, atividade de PLA_{2s}, hemólise e trombolítica induzidas pela peçonha. Os extratos de *R. officinalis*, *S. officinalis*, *T. vulgaris* e as bactérias probióticas demonstraram ação moduladora sobre as atividades enzimáticas, reforçando a relevância de seu consumo alimentar e suplementação, para fins de prevenção de doenças relacionadas a distúrbios hemostáticos e processos inflamatórios.

Palavras chave: alimentos funcionais, bactérias probióticas, moduladores enzimáticos.

INTRODUÇÃO

As plantas são consideradas como agentes preventivos de baixo custo para diferentes problemas de saúde, apresentando baixa e/ou praticamente inexistente toxicidade com possibilidade de serem administradas via oral e com boa aceitação por grande parte da população. As plantas são ricas fontes de compostos bioativos cujos diversos mecanismos de ação já foram descritos, outros resultam de ação sinérgica entre vários compostos e outros ainda são desconhecidos. As plantas condimentares conferem aroma, sabor e cor aos

alimentos, sendo possível substituir o uso de sal e gordura por elas, resultando em benefícios à saúde humana, e destacando a importância destas na culinária em todo o mundo (CUNHA et al., 2016). Diferentes grupos de compostos fenólicos são conhecidos por estarem presentes nas plantas condimentares e dão a elas propriedades farmacológicas como antioxidantes, anti-inflamatórias, antidiabéticas, anticarcinogênicas, com ações cardiopreventivas, hepatoprotetoras e neuroprotetoras (FERREIRA, MARTINS, BARROS, 2017; SYTAR et al., 2018; TUNGMUNNITHUM et al., 2018; NOVAIS et al., 2021).

Estudos sugerem uma melhor condição intestinal pela administração de bactérias probióticas benéficas como as diversas espécies dos gêneros *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*, no qual ajudam a evitar o desenvolvimento de inflamações crônicas, tumores gastrointestinais, disfunção hepática, doenças cerebrais e neurológicas (PACE, PACE, QUARTARONE, 2015; MATSUOKA et al., 2018; WANG et al., 2008; NISHIDA et al., 2018).

As PLAs, metaloproteases e serinoproteases são enzimas presentes nas peçonhas de serpente, essas enzimas são responsáveis por alterações na hemostasia causando inflamação, atividade fibrinolítica excessiva, agregação plaquetária que podem levar uma série de distúrbios hemorrágicos e trombóticos. Essas enzimas são homólogas as enzimas humanas, podendo ser utilizadas como ferramentas de estudo para prospectar os efeitos moduladores exercidos por compostos vegetais, assim como pelos extratos de plantas condimentares avaliados no presente trabalho.

Diante deste contexto, o presente estudo teve por objetivo investigar a ação das plantas condimentares *Rosmarinus officinalis*, *Salvia officinalis* e *Thymus vulgaris* incubados com e sem bactérias probióticas sobre a atividade de enzimas que atuam na inflamação e processos hemostáticos, presentes na peçonha de *Bothrops moojeni*, assim como avaliar o potencial anti-inflamatório destes extratos em teste de hemólise induzida por calor.

MATERIAIS E MÉTODOS

Obtenção e preparo das amostras

As plantas condimentares das espécies, *Rosmarinus officinalis*, *Salvia officinalis* e *Thymus vulgaris* foram adquiridas comercialmente em um mercado na cidade de Lavras, M.G., Brasil. As folhas secas foram trituradas, peneiradas, pesados 4g e dissolvidos em 40mL de PBS (solução salina tamponada em fosfato, pH 7,4, NaH_2PO_4 2mM, Na_2HPO_4 3mM, NaCl 154mM), e durante aproximadamente 12 horas ficaram sob agitação. Em seguida, os extratos foram mantidos em banho de ultrassom por 1h10min. Após essa etapa os extratos foram

centrifugados por 10min. a 3,5g e os sobrenadantes foram coletados e congelados até o momento de serem usados nos ensaios.

As bactérias probióticas (*Lactobacillus acidophilus*, *L. rhamnosus*, *L. paracasei* e *Bifidobacterium lactis*), em pó, foram adquiridas com o nome comercial Probiatop. Cada 1g foi diluído em 10mL de PBS e em seguida, foram quantificadas usando o método de escala de McFarland (ZAMORA; PÉREZ-GRACIA, 2012). Posteriormente foi feito um screening com diferentes valores de unidades formadoras de colônias (UFC), para identificar quantidades ideais de bactérias probióticas a serem utilizada nos testes, de forma que estas não saturassem o ambiente reacional. E então, as bactérias foram diluídas em PBS pH 7,4 e 8,0 para a atividade de PLA₂s e PBS pH 7,4 para as demais atividades.

Peçonha de serpente

A peçonha cristalizada de *Bothrops moojeni* (registrada no Sisgen sob o número ADF95EA) foi adquirida comercialmente do serpentário Bioagents (Batatais-SP). Em temperatura ambiente, a peçonha bruta, foi pesada 10mg, dissolvida em 1,0mL de PBS e acondicionada à -20°C.

Todas as atividades [exceto a anti-inflamatória (sem uso de peçonha)] foram realizadas com os extratos vegetais e probióticos isoladamente e em seguida extratos e bactérias probióticas pré-incubados com fonte enzimática (peçonha) em diferentes proporções por período de 30 minutos a 37°C.

Obtenção do sangue humano

O sangue obtido de voluntários saudáveis foram coletados em tubos contendo heparina (atividade anti-inflamatória e hemólise), citrato (atividade coagulante) e sem anticoagulante (atividade trombolítica). Todos os testes usando sangue humano ou seus componentes foram realizados com a prévia autorização do Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos (COEP) da Universidade Federal de Lavras, registrada sob o número: CAAE: 57151322.4.0000.5148.

Identificação de compostos fenólicos por HPLC

Os compostos fenólicos foram identificados e quantificados para cada extrato. Os padrões fenólicos usados foram obtidos da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA). A cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) foi realizada usando um cromatógrafo Shimadzu UHPLC (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japão) equipado com duas bombas de

alta pressão LC-20AT, um detector SPD-M20A UVvis, um forno CTO-20AC, um CBM-Interface 20A, e um injetor automático com um amostrador automático SIL-20A. As separações foram realizadas utilizando uma coluna VP-ODS-C18 (250mm x 4,6mm) Shim-pack, ligada a uma pré-coluna Shim-pack (10mm x 4,6mm) (Shimadzu, Japão). A adição de padrões aos extratos também foi utilizada como parâmetro de identificação. As soluções padrão estoque foram preparadas em metanol (grau HPLC; Sigma-Aldrich, EUA). Os extratos e os padrões foram filtrados através de uma membrana de nylon de 0,45µm (EMD Millipore, EUA) e injetados diretamente no sistema cromatográfico, em três repetições. Os compostos fenólicos nos extratos foram identificados por comparação com os tempos de retenção dos padrões. A quantificação foi realizada pela construção de curvas analíticas obtidas por meio de regressão linear utilizando software de computador Origin 6.1 (OriginLab, Northampton, MA, EUA) e considerando o coeficiente de determinação (R²) igual a 0,99.

Atividade anti-inflamatória

Para a realização da atividade anti-inflamatória adaptada de Williams et al. (2008); Tatiya e Saluja (2011); Nkeh-Chungag et al. (2015), o sangue dos voluntários foi coletado em tubos contendo heparina. O sangue foi então centrifugado à 1500g por 5min, e o plasma removido. O concentrado de hemácias foi utilizado para o preparo de uma suspensão à 2% (v:v, mL:mL) em PBS, pH 7,4. Os extratos nas doses 1,75 e 3,5mg e as bactérias probióticas $9,6 \times 10^5$ UFC foram previamente preparadas em um volume de 200µL e em seguida adicionou-se 800µL da suspensão de hemácias. Os controles foram realizados com medicamento anti-inflamatório esteroideal – prednisolona 126µg e 180µg (ação anti-inflamatória como parâmetro de comparação), PBS (correspondente a hemólise mecânica), e água (correspondente a hemólise total - 100% de hemólise). As suspensões contendo as amostras foram incubadas a 37°C durante 30min. Após a incubação, os tubos contendo os incubados permaneceram em banho termostático a 54°C por 20min., seguindo com centrifugação à 1200g por 10min. Em seguida realizou-se a leitura das absorções em espectrofotômetro a 540nm. Foi avaliada a capacidade protetora dos extratos sobre a hemólise induzida por temperatura. O potencial anti-inflamatório dos extratos vegetais previamente incubados com as bactérias probióticas também foi avaliado. O cálculo da porcentagem de inibição de hemólise foi feito com o uso da seguinte fórmula:

$$\% \text{ Hemólise} = 100 - \left[1 - \left(\frac{AA - ANA}{C+ - ANA} \right) \times 100 \right]$$

AA - absorvância da amostra aquecida
 ANA - absorvância da amostra não aquecida
 C+ - absorvância do controle positivo

Para inferir possíveis interferentes presentes nos extratos, passíveis de realizar absorção no comprimento de onda utilizado para a avaliação dos ensaios, uma varredura de cada extrato foi realizada previamente aos testes de hemólise térmica.

Atividade de fosfolipase e hemólise

As atividades de fosfolipase (PLA_{2s}) e hemólise foram avaliadas em meio sólido, conforme descrito por Gutiérrez et al. (1988). O gel para a avaliação da atividade de PLA_{2s} foi preparado com 0,01 molL⁻¹ CaCl₂, lecitinas de gema de ovo 1:3 v:v, PBS (pH 7,4), 1% de ágar bacteriológico e 0,005% de azida de sódio. O meio foi vertido em placas de petri entre 45 e 50°C. Depois da solidificação do gel, os tratamentos foram aplicados em orifícios de 0,5cm de diâmetro e as placas foram mantidas em uma câmara de cultura de células por 12 horas a 37°C. O gel para a atividade de hemólise foi feito substituindo as lecitinas de gema de ovo por um concentrado de eritrócitos humanos calculado para obter um hematócrito de 1%. Para a obtenção dos eritrócitos, o sangue recém-coletado foi centrifugado a 900g por 5 minutos. Os eritrócitos foram suspensos em 5 mmolL⁻¹ de PBS (pH 7,4) e centrifugados nas mesmas condições, repetindo esta lavagem por duas vezes. As placas com meio acrescido de eritrócitos, contendo as amostras permaneceram em câmara de cultura celular por 24 horas a 37°C. Os resultados de ambos ensaios foram avaliados pela medida do diâmetro dos halos translúcidos formados nos géis ao redor dos orifícios onde as amostras foram aplicadas. A inibição das atividades de PLA_{2s} e hemólise foram avaliadas sobre a peçonha de *B. moojeni* 10 e 20µg, respectivamente. A peçonha foi previamente incubada com os extratos de *R. officinalis*, *S. officinalis*, *T. vulgaris* nas doses (0,1; 0,4; 0,7; 1,8; 2,5mg) e com bactérias probióticas (2,6x10⁵UFC) por 30 minutos a 37°C. Foram utilizados os medicamentos Dexametasona e Prednisolona nas doses 2,5; 5 e 10µg a fim de comparar com os efeitos dos extratos.

Atividade coagulante

A avaliação do tempo de coagulação foi realizada segundo Rodrigues et al. (2000). Os extratos puros e associados às bactérias probióticas, foram previamente incubados com a peçonha de *B. moojeni* por 30 minutos a 37°C. Controles contendo apenas os extratos, extratos associados aos probióticos e peçonha pura foram também realizados. Tubos contendo plasma citratado (200µL) foram mantidos em banho a 37°C. Os extratos nas doses de 0,1; 0,4; 0,7; 1,8; 2,5mg, as bactérias probióticas ($2,6 \times 10^5$ UFC) e a peçonha (15µg), foram adicionadas ao plasma, e então o tempo foi cronometrado até a formação de um coágulo rígido. A dose mínima coagulante foi previamente definida, correspondendo ao menor valor de peçonha capaz de induzir a coagulação do plasma num intervalo entre 50 e 180 segundos.

Atividade trombolítica

A atividade trombolítica foi avaliada em coágulos de sangue humano formados *in vitro*, de acordo com a metodologia descrita por Cintra et al. (2012). Os coágulos, 100µL distribuídos em poços de microplacas, foram incubados, em câmara de cultura celular, por 24 horas a 37°C com as amostras, preparadas em um volume de 30µL, contendo peçonha de *B. moojeni* (30µg), bactérias probióticas $2,6 \times 10^5$ UFC, PBS e extratos das plantas nas doses de 0,1; 0,4; 0,7; 1,8; 2,5mg. Assim, a peçonha foi previamente incubada (30 minutos a 37°C) com os extratos puros e com estes acrescidos dos probióticos. As atividades foram calculadas medindo o volume de fluido liberado por cada trombo. Os dados foram convertidos em porcentagem. O volume final aplicado em cada poço, correspondente ao sangue + amostra, 130µL, foi considerado como 100% de atividade. O valor médio dos controles contendo apenas PBS foram subtraídos das médias dos incubados.

Análise estatística dos resultados

Os resultados foram apresentados como a média da triplicata \pm desvio padrão. Os dados foram avaliados por análise de variância, e as médias foram comparadas usando o teste de Scott Knott ($p < 0,05$) (Equipe R Core, 2012).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As plantas condimentares apresentam propriedades nutricionais, funcionais e medicinais. No presente estudo foi feita análise de identificação e quantificação dos compostos fenólicos presentes nos extratos aquosos das folhas de *Rosmarinus officinalis*, *Salvia officinalis* e *Thymus vulgaris*. O ácido caféico encontrado em quantidades

significativas nos extratos de *R. officinalis*, *S. officinalis* e *T. vulgaris* apresenta atividade antioxidante, anti-inflamatória e outras múltiplas atividades (ESPÍNDOLA et al., 2019; KASSA et al., 2021). O ácido ferúlico encontrado nos extratos de *S. officinalis* e *T. vulgaris* apresenta atividades antimicrobiana e anti-inflamatório (CAVALCANTI et al., 2021). O ácido *p*-cumárico encontrado nos extratos de *R. officinalis* e *S. officinalis* apresenta atividades antioxidante, anti-inflamatória e antimicrobiana (BOO, 2019). O trans-cinâmico quantificado somente no extrato de *S. officinalis* apresenta atividades antioxidantes, antifúngica, antitumoral e anti-inflamatória (YILMAZ, ERGÜN, 2018). O ácido vanílico encontrado em todos os extratos apresenta atividade anti-inflamatória (ZIADLOU et al., 2020). O resveratrol identificado no extrato de *T. vulgaris* reduz a incidência de inflamação intestinal (BERESWILL et al., 2010) (Tabela 1). Os compostos fenólicos presentes nas plantas são componentes essenciais da nutrição humana, que proporcionam vários benefícios a saúde.

Tabela 1: Identificação de compostos fenólicos por HPLC em plantas condimentares

Compostos fenólicos (mg 100g ⁻¹)	<i>Rosmarinus officinalis</i>	<i>Salvia officinalis</i>	<i>Thymus vulgaris</i>
Ácido caféico	28,116	120,102	36,112
Ácido clorogênico	-	-	nq
Catequina	-	nq	nq
Ácido ferúlico	-	6,167	2,950
Ácido gálico	-	nq	nq
Ácido <i>m</i> -cumárico	nq	nq	nq
Ácido <i>o</i> -cumárico	-	-	nq
Ácido <i>p</i> -cumárico	6,786	8,005	nq
Resveratrol	-	-	nq
Trans-cinâmico	-	5,159	nq
Ácido vanílico	2,359	5,153	1,831
∑ Compostos fenólicos	37,261	144,586	40,893

nq = não quantificado (identificado, porém fora do limite de quantificação).

Atividade anti-inflamatória

A inflamação é um processo altamente dinâmico, que pode ser caracterizado como a primeira resposta protetora do sistema imunológico do organismo com o objetivo imediato de proteger contra qualquer lesão ou dano a células e tecidos. Qualquer imperfeição da resposta inflamatória leva a inflamação crônica e dano tecidual excessivo (MEDZHITOV et al., 2010). O processo inflamatório envolve diferentes tipos de células e mediadores, que podem regular a quimiotaxia, migração e proliferação celular de maneira altamente coordenada (WIART,

2006). A biossíntese de eicosanoides é iniciada pela ativação de fosfolipases A₂ (PLA_{2s}) que atuam na hidrólise de fosfolipídios, resultando na liberação de ácidos graxos com variadas estruturas, sendo muitos deles a estrutura do ácido araquidônico (AA). Este ácido graxo é metabolizado pela ação de enzimas ciclooxigenases (COX), lipooxigenases (LOX) e citocromos p450, originando prostaglandinas, leucotrienos, tromboxanos, prostaciclina e lipoxinas (ELLISON, 2002).

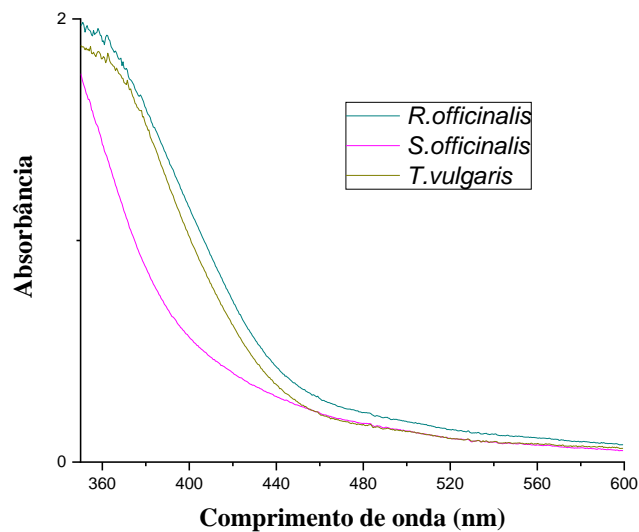


Figura 1 - Varredura em espectrofotômetro dos diferentes extratos de plantas condimentares (100µg/µL): verde- *Rosmarinus officinalis*, rosa- *Salvia officinalis*, beje- *Thymus vulgaris*.

Considerando que o comprimento de onda de absorção da hemoglobina é 540nm, e esta é liberada e aferida no teste de hemólise líquida para avaliação de potencial anti-inflamatório, foi feita uma varredura nos extratos para averiguar possíveis interferentes na avaliação da atividade. Como resultado, não foi identificado nenhum pico no comprimento de onda 540nm, concluindo que os extratos não absorvem nesse comprimento de onda (Figura 1).

No presente estudo, os extratos de *R. officinalis*, *S. officinalis* e *T. vulgaris* apresentaram ação protetora sobre a lise dos eritrócitos e possível potencial anti-inflamatório quando submetidos a temperaturas elevadas. Os extratos de *R. officinalis* e *T. vulgaris* obtiveram os melhores resultados que variaram de 12,38 a 32,16% de hemólise para o extrato de *R. officinalis* tanto na presença quanto ausência de probióticos. Para o extrato de *T. vulgaris* as porcentagens de hemólise ficaram entre 18,36 e 32,52% na ausência e presença de probióticos. Já a *S. officinalis* obteve de 36,77 a 53,7% de hemólise com e sem probióticos

(Tabela 2). Observou-se uma melhor ação quando os extratos foram incubados com bactérias probióticas, a ação conjunta favoreceu a atividade protetora exercida pelos extratos. As plantas medicinais e seus compostos fenólicos contribuem para a melhora da saúde humana quando utilizadas em tratamentos e prevenção de doenças, em adição, bactérias benéficas atuam como adjuvantes no fortalecimento do sistema imunológico e ampliação da digestibilidade e biodisponibilidade de moléculas com ação funcional presentes nas plantas (WIART, 2006; CHEN et al., 2016).

Tabela 2: Potencial anti-inflamatório avaliado sobre a lise de eritrócitos induzido por aquecimento (54°C)

Controles	Hemólise %	
C- (PBS)	8,15 ± 1,5147	
Probióticos (9,6x10 ⁵ UFC)	6,89 ± 0,3084	
Prednisolona (126µg)	6,73 ± 0,4661	
Prednisolona (180µg)	5,63 ± 0,6729	
C+ (H ₂ O)	100 ± 0,0087	

Amostras	1,75mg	3,5mg
<i>Rosmarinus officinalis</i>	15,63 ± 0,4962*a,b	32,16 ± 1,2664*a,b
<i>Rosmarinus officinalis</i> +Probiotico	12,38 ± 1,9062*b	24,77 ± 1,3823*a,b
<i>Salvia officinalis</i>	41,23 ± 0,9410*a,b	53,70 ± 1,7776*a,b
<i>Salvia officinalis</i> +Probiotico	36,77 ± 1,6348*a,b	48,11 ± 1,3728*a,b
<i>Thymus vulgaris</i>	21,98 ± 0,7082*a,b	30,52 ± 0,6629*a,b
<i>Thymus vulgaris</i> +Probiotico	18,36 ± 0,4165*a,b	26,13 ± 1,3032*a,b

a – Difere do controle negativo (C-), p < 0,05

b – Difere do controle positivo (C+), p < 0,05

*Estatisticamente diferente do medicamento, p < 0,05

Tasneem et al. (2019) descreveram vários mecanismos que justificam esses efeitos anti-inflamatórios encontrados nos extratos, como a regulação negativa da expressão de proteína mRNA de COX-2, reduzindo a produção de prostaglandinas inflamatórias durante a via do AA, redução da expressão da proteína óxido nítrico sintase induzível (iNOS) inibindo a geração de espécies reativa de nitrogênio inflamatório, inibição da expressão de fator nuclear kappa B, proteína p65, supressão da expressão de interleucinas IL-1β, IL-6 e fator de necrose tumoral alfa (TNF-α) (JANG et al., 2014).

O óxido nítrico (NO) é um dos principais mediadores inflamatórios. Os fitoquímicos que reduzem a produção de NO pela iNOS podem ser considerados agentes anti-inflamatórios

(KIM et al., 2004). Espécies ricas em antioxidantes apresentam efeitos protetores contra inflamação (MUELLER, HOBIGER, JUNGBAUER, 2010) e os extratos de *R. officinalis*, *S. officinalis* e *T. vulgaris* exerceram potenciais antioxidantes (CHOUKAIRI et al., 2020; SOLIMAN, ALDHAHRANI, METWALLY, 2021). Apoiando nossos resultados, o potencial anti-inflamatório do extrato de *R. officinalis* foi demonstrado quando esse extrato inibiu a síntese natural de pró-citocinas inflamatórias como as IL-1 β e TNF- α (DE OLIVEIRA et al., 2017) e promoveu diminuição da citocina IL-6 (GRISSA et al., 2017). Afonso et al. (2019) e Russo et al. (2021) descreveram o extrato de *S. officinalis* como tendo grande potencial na modulação da inflamação em humanos. O tratamento de células humanas com o extrato de *S. officinalis* causou uma redução em vários marcadores de inflamação, incluindo proteína C reativa (PCR), TNF- α , amilóide A sérica, molécula de adesão do sistema vascular, molécula de adesão intercelular, proteína quimiotática de monócitos-1, IL-17, IL-6 e IL-8 (MARGETTS et al., 2022). O extrato de *T. vulgaris* mostrou propriedades inibidoras sugerindo um potencial anti-inflamatório que poderia inibir o metabolismo do AA reduzindo a síntese de leucotrienos. Essa inibição deve-se principalmente a interações pi entre compostos presentes no extrato e a LOX, bem como as ligações de hidrogênio que também foram relatadas (OLAOYE, OSO, ABERUAGBA, 2021).

O rompimento da membrana celular gera mediadores inflamatórios (FAHMI et al., 2012). A atividade anti-inflamatória está relacionada a regulação desses mediadores inflamatórios e várias citocinas *in vitro* (TURNER et al., 2014). Corroborando com nossos estudos, Novais et al. (2021), identificaram na mistura dos extratos de plantas condimentares, *Allium schoenoprasum*, *Petroselinum crispum*, *S. officinalis*, *Satureja montana*, *T. vulgaris*, *T. mastichina*, *T. citriodorus*, *R. officinalis*, *Origanum vulgare* e *Artemisia dracuncululus* potencial anti-inflamatório. Foram identificados e quantificados diferentes compostos fenólicos nos extratos, e estes possivelmente participaram sinergicamente para exercer as ações farmacológicas descritas.

Em adição, probióticos podem produzir ácidos graxos de cadeia curta (SCFAs), como butirato, propionato e acetato, com propriedades protetoras contra patógenos intestinais (MARKOWIAK-KOPEC, SLIZEWSKA, 2020), tendo ação anti-inflamatória e promovendo positivamente a cicatrização de feridas (TSIOURIS, TSIOURI, 2017; YAN et al., 2020). As bactérias probióticas exercem efeitos protetores por múltiplos mecanismos imunes e não imunes (LEBEER, VANDERLEYDEN, DE KEERSMAECKER, 2008). Cepas probióticas são conhecidas por modular as células imunes para suprimir a inflamação (KRUMBECK et al., 2018). Probióticos têm sido associados à diminuição da secreção de citocinas

inflamatórias e aumento de citocinas anti-inflamatórias, como interferon- α e IL-10 (ASHAOLU, 2020; CORTES-PEREZ et al., 2021; VINCENZI, GOETTERT, DE SOUZA, 2021). A administração de probióticos é capaz de regular eficazmente a inflamação e as alterações hemostáticas, inibindo a produção de TNF- α , interferon gamma e IL-10, diminuindo a expressão de fator tecidual (TF) (ZELAYA et al., 2014).

Cepas como os *Lactobacillus rhamnosus* e *Bifidobacterium lactis* apresentaram propriedades anti-inflamatórias, conforme observado pelas reduções nos níveis de PCR e citocinas pró-inflamatórias em indivíduos saudáveis (KEKKONEN et al., 2008). *B. infantis* diminuiu as concentrações de lipopolissacarídeo, o que pode reduzir a produção de citocinas inflamatórias e células T (RODES et al., 2013). As cepas *L. paracasei* e *L. plantarum* juntas exerceram redução na produção de citocinas pró-inflamatórias, quando avaliadas *in vivo* (LAVASANI et al., 2010). A combinação de cepas probióticas tais como *L. acidophilus*, *L. casei* e *B. bifidum* induziram redução nos biomarcadores de estresse metabólico inflamatório e oxidativo (HUTCHINSON, TINGÖ, BRUMMER, 2020). Vale lembrar que as atividades biológicas resultam em sua maioria, da ação de seus diversos constituintes trabalhando por mecanismos diversos e/ou agindo em sinergismo para a obtenção de cada efeito observado (DA CUNHA et al., 2012; NOVAIS et al., 2021), e para o presente trabalho os efeitos somatórios e complementares observados advém dos extratos das plantas condimentares junto às bactérias probióticas.

Diante das atividades farmacológicas descritas em literatura para os compostos fenólicos identificados nos extratos de plantas das espécies *R. officinalis*, *S. officinalis* e *T. vulgaris*, observamos no presente trabalho um efeito adjuvante das bactérias probióticas, quando estas são previamente incubadas com os extratos, ampliando os efeitos protetores exercidos pelos compostos vegetais sobre as membranas dos eritrócitos desafiados por alta temperatura.

Atividade de fosfolipase e hemólise

A peçonha de serpente é composta principalmente por enzimas PLA₂s, metaloproteases hemorrágicas, L-aminoácidos oxidases e hialuronidasas (KRISHNAN et al., 2014). As PLA₂s catalisam a hidrólise de fosfolipídios, sobretudo os presentes nas membranas celulares (MÖLLER et al., 2019). As PLA₂s são as principais responsáveis pela atividade de hemólise juntamente com as proteases.

Extratos vegetais que possuem múltiplos constituintes são uma fonte extremamente rica de compostos farmacologicamente ativos. Interações de compostos ativos com enzimas podem levar a redução ou até mesmo a neutralização de suas atividades tóxico-farmacológicas, sejam elas dependentes da atividade enzimática ou não (AMBIKABOTHY et al., 2011).

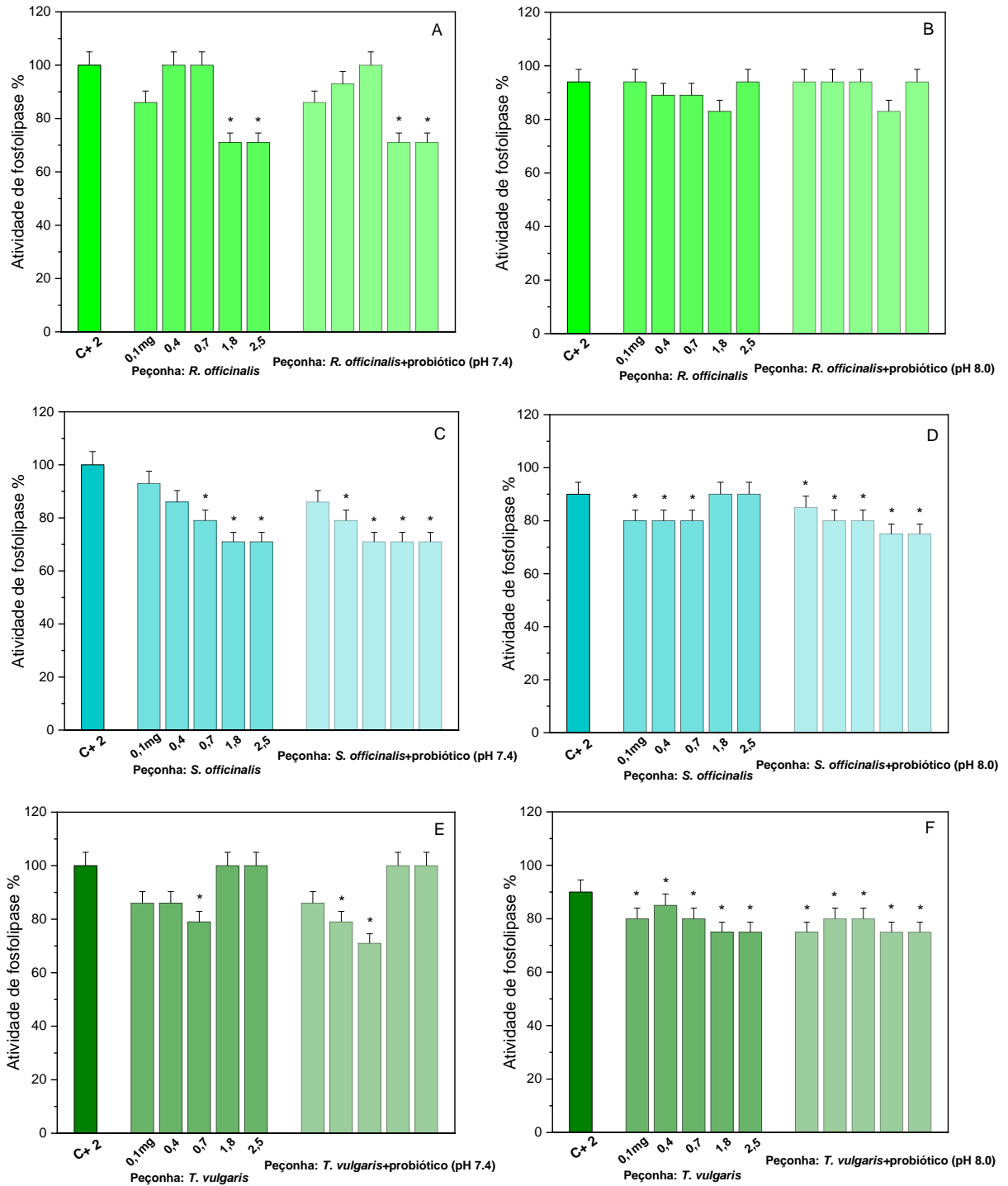


Figura 2 – Atividade de fosfolipase (%) induzida por peçonha de *Bothrops moojeni*, previamente incubada com bactérias probióticas (pH 7,4 e pH 8,0) e com os extratos de *Rosmarinus officinalis* (A,B), *Salvia officinalis* (C,D) e *Thymus vulgaris* (E,F). Controle positivo 1 (C+ 1): contendo apenas peçonha (10 μ g) foi considerado como 100% de atividade e portanto, não apresentado nos gráficos. Controle positivo 2 (C+ 2): Peçonha + Probiotic (2,6x10⁵UFC). Os resultados correspondem às médias de triplicatas obtidas em cada proporção (peçonha: extrato) e (peçonha: extrato + bactérias probióticas) e seus desvios padrão calculados.

*Estatisticamente diferente do controle positivo.

O extrato de *R. officinalis* em pH 7,4 inibiu a atividade de PLA_{2s} em 29% somente nas maiores doses, que foram 0,7; 1,8 e 2,5mg, tanto na ausência como na presença de probióticos (Figura 2A). Em pH 8,0 não houve inibições estatisticamente significativas (Figura 2B). O extrato de *S. officinalis* em pH 7,4 inibiu a atividade de PLA_{2s} em 21% e 29% nas doses de 0,4mg e 0,7; 1,8; 2,5mg, respectivamente, na presença de probióticos. Na ausência de probióticos as inibições foram de 21% e 29% nas doses de 0,7mg e 1,8; 2,5mg, respectivamente (Figura 2C). Em pH 8,0 na ausência de probióticos as inibições foram de 20% nas doses de 0,1; 0,4 e 0,7mg, na presença de probióticos as inibições foram de 15% na dose de 0,1mg, 20% em 0,4 e 0,7mg e 25% nas doses de 1,8 e 2,5mg (Figura 2D). Já o *T. vulgaris* inibiu a atividade de PLA_{2s} em pH 7,4 na ausência de probióticos somente na dose de 0,7mg em 21%, e na presença de probióticos as inibições foram de 21% e 29% nas doses de 0,4 e 0,7mg, respectivamente (Figura 2E). Em pH 8,0 as inibições foram de 15% na dose 0,4mg; 20% em 0,1 e 0,7mg e 25% nas doses maiores, de 1,8 e 2,5mg (Figura 2F).

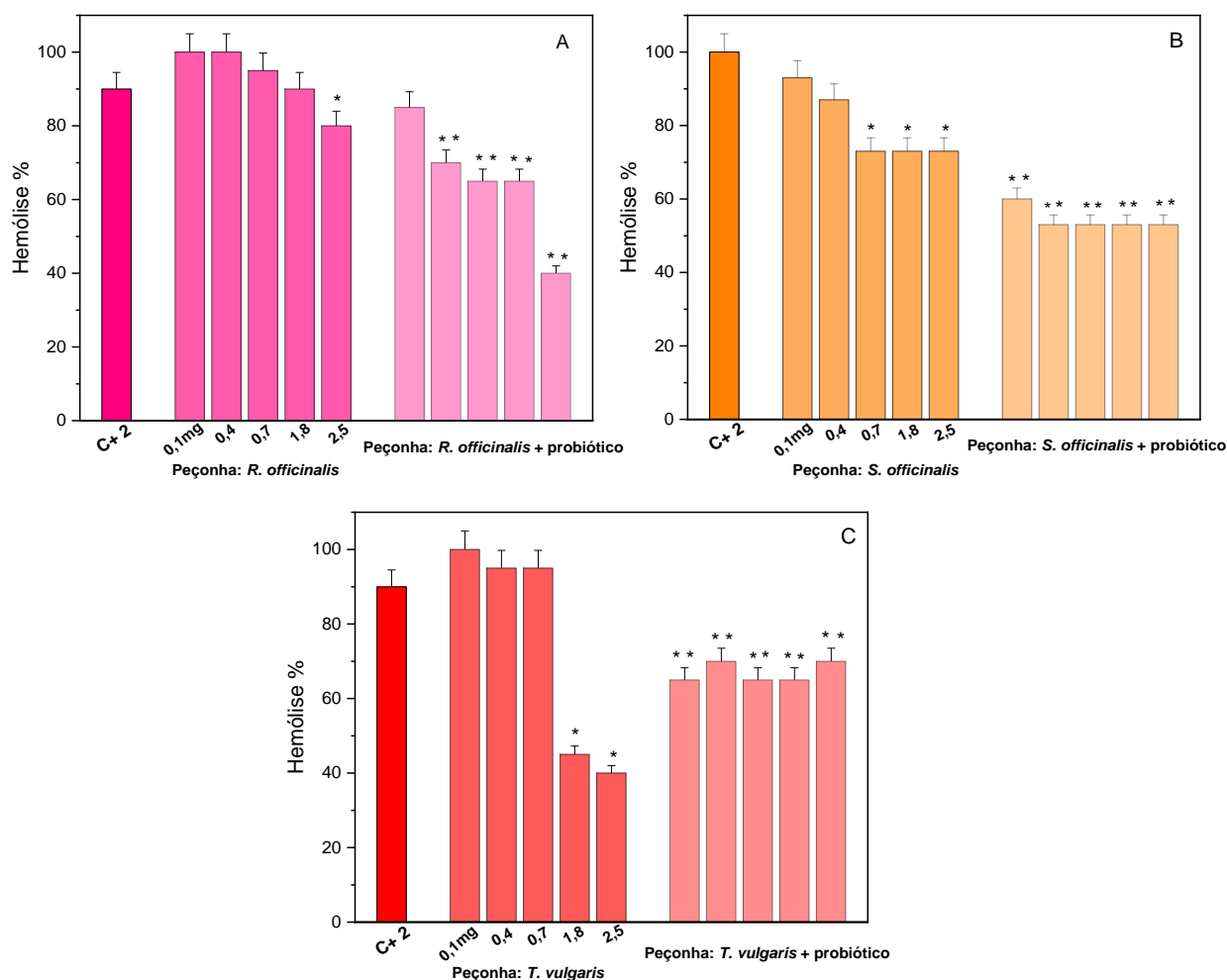


Figura 3 – Atividade de hemólise (%) induzida por peçonha de *Bothrops moojeni*, previamente incubada com bactérias probióticas e com os extratos de *Rosmarinus officinalis* (A), *Salvia officinalis* (B) e *Thymus vulgaris* (C). Controle positivo 1 (C+ 1): contendo apenas peçonha (20 μ g) foi considerado como 100% de atividade, e portanto não foi apresentado nos gráficos. Controle positivo 2 (C+ 2): Peçonha + Probiotic ($2,6 \times 10^5$ UFC). Os resultados correspondem às médias de triplicatas obtidas em cada proporção (peçonha: extrato) e (peçonha: extrato + bactérias probióticas) e seus desvios padrão calculados.

*Estatisticamente diferente do controle positivo.

**Estatisticamente diferente do controle positivo e dos incubados sem probiótico.

O extrato de *R. officinalis* inibiu a hemólise induzida por *Bothrops moojeni* na ausência de probióticos em 20% na maior dose, de 2,5mg. Na presença de probióticos as inibições foram de 30% na dose de 0,4mg, 35% nas doses de 0,7 e 1,8mg e 60% na maior dose, de 2,5mg (Figura 3A). O extrato de *S. officinalis* apresentou inibições de 27% na ausência de probióticos nas maiores doses, de 0,7; 1,8 e 2,5mg. Na presença de probióticos as inibições foram de 40% e 47% nas doses de 0,1 e 0,4; 0,7; 1,8; 2,5mg, respectivamente (Figura 3B). Já o extrato de *T. vulgaris* inibiu a hemólise na ausência de probióticos somente

nas maiores doses que foram de 55% em 1,8mg e 60% em 2,5mg. Na presença de probióticos as inibições foram de 35% e 30% nas doses de 0,1; 0,7; 1,8 e 2,5mg, respectivamente (Figura 3C).

Foram utilizados como controle para a atividade de fosfolipase os medicamentos Dexametasona e Prednisolona nas doses 2,5; 5 e 10 μ g, e ambos não apresentaram inibições estatisticamente significativas em comparação com o controle positivo. Os extratos de *R. officinalis*, *S. officinalis*, *T. vulgaris* e as bactérias probióticas isoladas não induziram hemólise nas condições avaliadas (dados não mostrados). A ausência de atividade hemolítica é uma das formas de avaliar ausência de toxicidade, embora os extratos e probióticos estudados no presente trabalho já tenham sua ausência de toxicidade e normatização para o consumo alimentício validados cientificamente (PARK et al., 2022).

Apoiando os resultados do presente trabalho, o extrato aquoso das folhas de *R. officinalis* foi previamente descrito como inibidor sobre as atividades de PLA_{2s} e hemólise (SALAMA, ABDEL-ATY, FAHMY, 2018). O extrato aquoso das folhas de *Clusia fluminensis*, reduziu a hemólise sobre a *B. jararaca* em 50% na maior dose (DA SILVA et al., 2019). O extrato de *Dracontium dubium* inibiu hemólise induzida por *B. asper* (CARO et al., 2017). O extrato das folhas de *Aegiphila integrifolia* inibiram a atividade de PLA_{2s} da *B. atrox* (NASCIMENTO et al., 2021). O extrato de *Bredemeyera floribunda* inibiu significativamente a atividade de PLA_{2s} induzida por *B. jararacussu* (ALVES et al., 2019). Os extratos das folhas de *Eryngium foetidum*, *Neurolaena lobata* e *Pimenta dioica* inibiram a atividade de PLA_{2s} e proteolítica induzida por *B. asper* (SARAVIA-OTTEN et al., 2022).

No presente estudo foi identificado quantidades significativas de ácido cafeico e ácido vanílico nos extratos de *R. officinalis*, *S. officinalis* e *T. vulgaris*. O ácido cafeico impede a ligação do íon cálcio, um cofator essencial para a catálise das PLA_{2s}, o que resulta na incapacidade das Lys49-PLA_{2s} de promoverem hidrólise dos fosfolipídios (SHIMABUKU et al., 2011). O ácido vanílico realizou ligações de hidrogênio, se ligando aos resíduos Cys167, Gly170 e Glu146 da enzima que foram as responsáveis por essas interações com a enzima (PITHAYANUKUL, LEANPOLCHAREANCHAI, BAVOVADA, 2010). Em adição, o ácido vanílico é capaz de interagir com His147 por uma interação de empilhamento pi-pi, apresentando significativo grau de interação com PLA_{2s} bothrópicas (CESAR et al., 2020). Quantidades significativas de ácido *p*-cumárico foram encontradas nos extratos *R. officinalis* e *S. officinalis* e identificado no extrato de *T. vulgaris*. O ácido *p*-cumárico inibiu atividades PLA_{2s} induzida por *B. alternatus* e hemólise induzida por *B. moojeni*. O ácido *p*-cumárico promove alterações conformacionais nas enzimas por meio da ligação ao sítio ativo levando a

inibição da atividade das enzimas PLA_{2s} (CESAR et al., 2019). Identificado somente no extrato de *T. vulgaris*, o ácido clorogênico inibiu atividades de PLA_{2s} e proteolíticas induzidas por *B. leucurus* (DA SILVA et al., 2022), interagindo com os aminoácidos Asp49, Lys49 e Trp31 do sítio ativo da PLA_{2s} (NIRMAL, PRABA, VELMURUGAN, 2008).

Todos os extratos citados, incluindo os do presente estudo, contém quantidades de compostos fenólicos que podem estar se ligando aos sítios catalíticos que impediram e/ou dificultaram a ligação da enzima ao substrato (DA SILVA et al., 2009). As ligações e interações de aminoácidos são importantes mecanismos de inibição, especialmente se as interações impedirem a coordenação do cálcio com o sítio catalítico da enzima (NIRMAL, PRABA, VELMURUGAN, 2008). Foi proposto que a entrada de um ácido graxo no canal hidrofóbico induz mudanças estruturais que ativam enzimas do tipo Lys49-PLA_{2s} para exercer sua atividade. Assim, um composto que impeça essa interação é considerado um inibidor dessas enzimas (SARAVIA-OTTEN et al., 2022), podendo estes serem mecanismos de inibição exercidos por compostos presentes nos extratos das plantas condimentares avaliadas no presente trabalho.

A inflamação aguda é uma parte normal da resposta imune, uma coordenação essencial dos mensageiros químicos, anticorpos e células imunes em locais de lesão ou infecção (IMMUNITY IN BRIEF, 2022). Entre as várias reações induzidas pela peçonha está a inflamação. No entanto, probióticos podem ser uma opção de tratamento para diferentes doenças devido à sua capacidade de modificar o equilíbrio da microbiota e devido aos seus efeitos imunomoduladores (OJETTI et al., 2018; TICINESI et al., 2019; LANGENFELD, 2021; PICCIONI et al., 2021). Os probióticos tem efeito na supressão da inflamação incluindo a influência de metabólitos derivados de bactérias (LIANG et al., 2018). A introdução de bactérias benéficas através do consumo de suplementos probióticos têm-se mostrado especialmente promissora (COSTANTINI et al., 2017).

Algumas cepas probióticas secretam lipopeptídeos que inibem PLA_{2s} *in vivo* (SELVAM et al., 2009). As bactérias probióticas *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* foram amplamente estudadas e demonstraram efeitos anti-inflamatórios (BRON et al., 2017). Foram isolados das cepas *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*, o ácido γ -amino butírico e de *Lactobacillus*, a acetilcolina (LYTE, 2011; ESTRADA, CONTRERAS, 2019), que obtiveram efeitos inibidores em processos inflamatórios (HUTCHINSON, TINGÖ, BRUMMER, 2020). Kekkonen et al. (2008) relataram que cepas de *L. rhamnosus* exerceram ação redutora sobre a produção pró-inflamatória de TNF- α em células do sangue de indivíduos saudáveis. A cepa *B. lactis* combinada com *L. acidophilus* promoveu melhorias na saúde digestiva ao se ligar às

proteínas derivadas de humanos - por exemplo, a plasmina – e interagir com o hospedeiro (RASINKANGAS, OUWEHAND, 2017). As várias cepas de *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* juntas, podem reduzir a inflamação, diminuindo as concentrações de homocisteína e aumentar os níveis de vitamina B12 (VALENTINI et al., 2015).

Em adição, os extratos de *R. officinalis*, *S. officinalis* e *T. vulgaris* contém uma mistura complexa de compostos que podem atuar sinergicamente para proporcionar inibição das atividades de PLA_{2s} e hemólise. Os compostos têm a capacidade de formar uma ligação de hidrogênio com o aminoácido Asp49 presente na enzima, e se ligar ao cálcio da enzima, formando um complexo estável. Como consequência, a coordenação do cálcio é desestabilizada e a atividade catalítica das PLA_{2s} é bloqueada (DA SILVA et al., 2009).

Atividade trombolítica e coagulante

A peçonha é uma mistura complexa de proteínas e peptídeos farmacologicamente ativos, que correspondem a aproximadamente 95%, bem como de uma fração não protéica, podendo induzir uma ampla gama de manifestações clínicas (McCLEARY, KINI, 2013), estando inclusos os distúrbios na hemostasia com contextos de inflamação, hemorragia e coagulação (MÁLAQUE, FRANÇA, 2003). As principais enzimas atuantes nessas disfunções são as metaloproteases (SVMPs), serinoproteases (SVSPs) e PLA_{2s} (KAMIGUTI, SANO-MARTINS, 1995; SANTORO et al., 2008). As SVMPs e SVSPs são responsáveis pelo surgimento de distúrbios patológicos, e estão fortemente envolvidas na coagulação, proteólise e hemorragia (MALAQUE, GUTIÉRREZ, 2016). As SVMPs são endoproteolíticas dependentes de zinco (KINI, KOH, 2016; TASOULIS, ISBISTER, 2017), que atuam na degradação endotelial, na ação inflamatória e pró-coagulantes (PREZOTO et al., 2019). Essa interferência nos processos de coagulação pelas SVMPs permite que elas atuem simultaneamente em várias etapas da cascata de coagulação sanguínea (FERRAZ et al., 2019), podendo promover uma coagulação eficaz, uma coagulação frágil e ainda atuar na fibrinólise e degradação do coágulo (SOUZA et al., 2020).

As SVMPs podem ativar o fator X e a protrombina (KINI, KOH, 2016). Tal atividade faz com que essas enzimas proteolíticas interfiram diretamente na coagulação sanguínea e na atividade plaquetária, levando a ocorrência de manifestações clínicas (SANCHEZ et al., 2017) como por exemplo, trombose microvascular (REZENDE, 2010). A patogênese do sangramento envolve danos diretos aos microvasos, o que está relacionado a atividade proteolítica exercida pelas SVMPs (GUTIÉRREZ et al., 2016). Em adição, as SVMPs também podem inibir a agregação plaquetária e desencadear a liberação de citocinas

(GÓMEZ-BETANCUR, BENJUMEA, 2014). Vários compostos do metabolismo das plantas como os compostos fenólicos estão associados à capacidade de inibir os principais grupos de enzimas ativas presentes na peçonha, sendo os efeitos atribuídos sobretudo aos compostos fenólicos (MORS et al., 2000; DE OLIVEIRA et al., 2016).

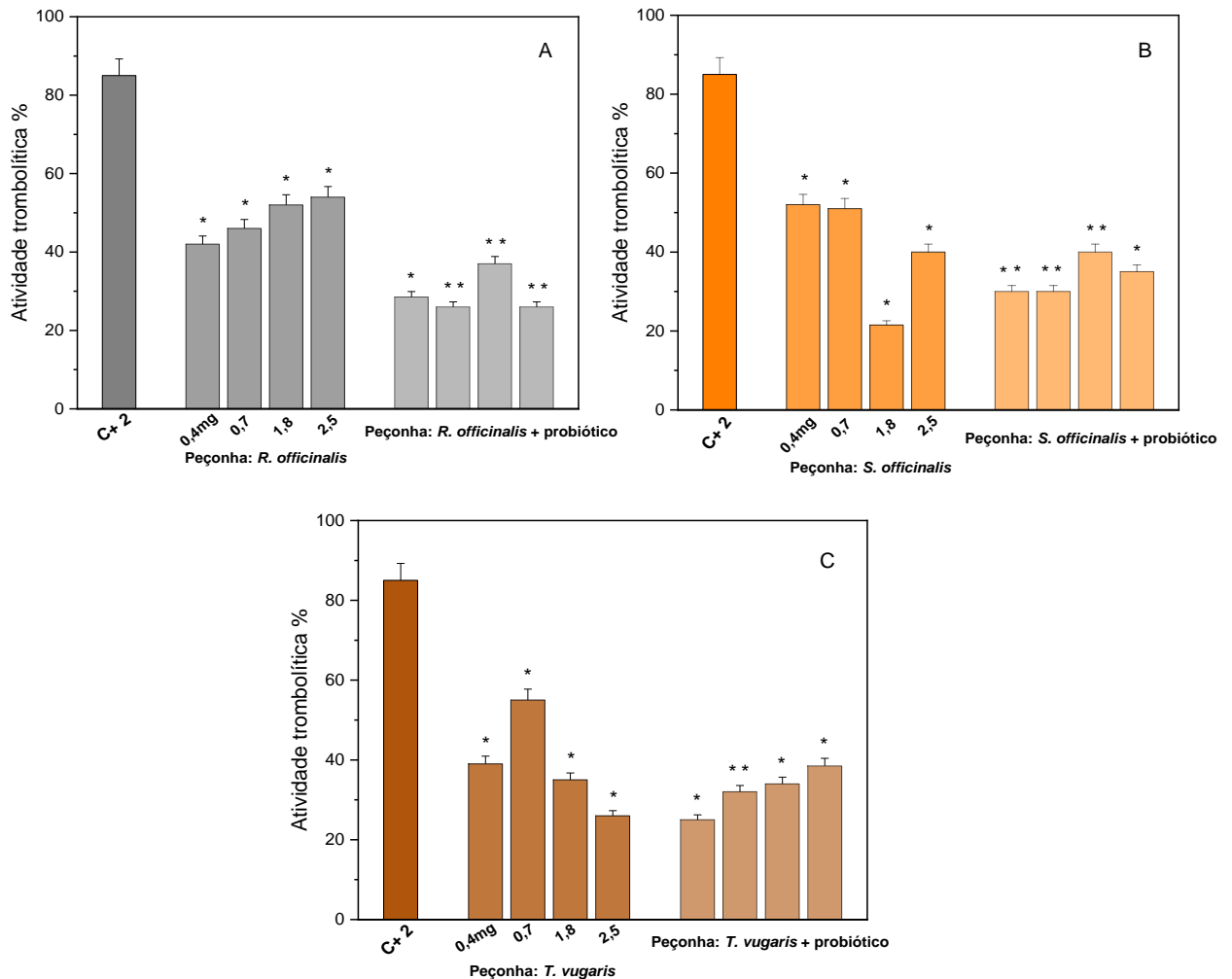


Figura 4 – Atividade trombolítica (%) induzida por peçonha de *Bothrops moojeni*, previamente incubada com bactérias probióticas e com os extratos de *Rosmarinus officinalis* (A), *Salvia officinalis* (B) e *Thymus vulgaris* (C). Controle positivo 1 (C+ 1): contendo apenas o sangue (100 μ L) + [peçonha (30 μ g) em 30 μ L de amostra] foi considerado como 100% de atividade, e portanto não foi apresentado nos gráficos. Controle positivo 2 (C+ 2): Peçonha (30 μ g) + Probióticos (2,6x10⁵UFC). Os resultados correspondem às médias de triplicatas obtidas em cada proporção (peçonha: extrato) e (peçonha: extrato + bactérias probióticas) e seus desvios padrão calculados.

*Estatisticamente diferente do controle positivo.

**Estatisticamente diferente do controle positivo e dos incubados sem probiótico.

O extrato de *R. officinalis* exerceu inibição sobre atividades trombolíticas na ausência de probióticos de 58, 54, 48 e 46% nas doses de 0,4; 0,7; 1,8 e 2,5mg, respectivamente. Na presença de probióticos as inibições foram de 71,5% na dose de 0,4mg, 63% em 1,8mg e 74% nas doses de 0,7 e 2,5mg (Figura 4A). Para o extrato de *S. officinalis* essas inibições na ausência de probióticos foram de 48, 49, 60 e 78,5% nas doses de 0,4; 0,7; 2,5 e 1,8mg, respectivamente. Na presença de probióticos as inibições foram de 70% nas doses 0,4 e 0,7mg, 65% na maior dose de 2,5mg e 60% na dose de 1,8mg (Figura 4B). Já o extrato de *T. vulgaris* inibiu a atividade trombolítica na ausência de probióticos em 45, 61, 65 e 74% nas doses de 0,7; 0,4; 1,8 e 2,5mg, respectivamente. Na presença de probióticos essas inibições foram de 75% na dose de 0,4mg, 68% em 0,7mg, 66% em 1,8mg e 61,5% em 2,5mg (Figura 4C). Os extratos *R. officinalis*, *S. officinalis*, *T. vulgaris* e as bactérias probióticas isoladas não apresentaram atividade trombolítica significativas (dados não mostrados).

A atividade trombolítica de cepas probióticas foi demonstrada por Zhang et al. (2021). Cepas probióticas são utilizadas para produzir alimentos com função trombolítica (SUMI et al., 1987), que podem degradar a fibrina diretamente, mas também podem promover a liberação de ativador de plasminogênio tecidual para degradar a fibrina *in vivo* (PAN et al., 2019). A cepa probiótica *L. rhamnosus* foi capaz de reduzir significativamente a ativação da coagulação do sangue. Esses efeitos foram associados a capacidade do probiótico em reduzir a expressão de TF. A IL-10 demonstrou diminuir a expressão de TF e inibir a atividade pró-coagulante em monócitos humanos (BEN-HADJ-KHALIFA et al., 2012). A cepa *L. rhamnosus* aumentou significativamente os níveis de IL-10 que contribuem para a proteção contra danos inflamatórios (ZELAYA et al., 2014). Vários parâmetros clínicos entre eles, a hemorragia, são significativamente melhorados quando tratados com *L. reuteri*. Os *Lactobacillus* demonstraram ser eficazes no tratamento de doenças crônicas (TEUGHELIS et al., 2013; GALOFRÉ et al., 2018). Os probióticos desempenham um papel crucial no controle da inflamação e na manutenção da hemostasia, portanto podem ser considerados como uma ferramenta preventiva e/ou terapêutica contra doenças provenientes do desequilíbrio hemostático (ATABATI et al., 2021).

No presente estudo, os extratos de *R. officinalis*, *S. officinalis* e *T. vulgaris* exerceram inibições estatisticamente significativas sobre a atividade coagulante, quando avaliados tanto na ausência como na presença de probióticos em todas as doses avaliadas (Tabela 3). Os incubados, contendo extratos de *R. officinalis*, *S. officinalis* e *T. vulgaris* com bactérias probióticas apresentaram forte potencial inibidor sobre a ação coagulante exercida por proteases presentes na peçonha avaliada. Plantas da família Lamiaceae, tem sido

consideradas fontes de anticoagulantes, inibidores da agregação plaquetária ou agentes trombolíticos (GUZMAN, MOLINA, 2018). Esses efeitos foram atribuídos aos metabólitos secundários presentes nos extratos (RENGIFO-RIOS et al., 2019) e aos metabólitos produzidos pelas bactérias probióticas, no qual desempenham papel essencial no controle do sistema homeostático do hospedeiro (STORR, VOGEL, SCHICHO, 2014). O mecanismo de ação da atividade anticoagulante pode ser explicado pela interação desses metabólitos secundários com as enzimas serinoproteases do tipo trombina (MAIORANO et al., 2005). Esses metabólitos secundários podem atuar como inibidores enzimáticos, imunomoduladores e inativadores químicos (DE MOURA et al., 2014). Outra teoria plausível para os resultados obtidos no presente trabalho seria a capacidade de interação dos compostos vegetais com proteínas presentes no plasma humano, podendo resultar na proteção destas frente à catálise exercida pelas enzimas da peçonha.

Tabela 3: Efeito dos diferentes extratos de plantas incubados com e sem probióticos sobre a atividade coagulante induzida por *B. moojeni*

Tempo de coagulação (s)				
Controles				
<i>B. moojeni</i> (15µg)		62±0,0351		
<i>B. moojeni</i> +Probióticos (2,6x10 ⁵ UFC)		54±0,3412		
Amostras	mg	<i>Rosmarinus officinalis</i>	<i>Salvia officinalis</i>	<i>Thymus vulgaris</i>
sem Probióticos	0,1	92±0,0360*	140±0,1559*	134±0,0361*
	0,4	118±0,3988*	130±0,0436*	131±0,0656*
	0,7	135±0,1447*	129±0,0643*	127±0,0586*
	1,8	179±0,4058*	104±0,2804*	123±0,0404*
	2,5	190±0,0513*	95±0,2771*	121±0,0289*
com Probióticos	0,1	88±0,0346*	102±0,2600*	87±0,0503*
	0,4	113±0,2971*	124±0,2944*	127±0,0416*
	0,7	137±0,2000*	128±0,0458*	130±0,0551*
	1,8	152±0,4061*	129±0,0611*	134±0,1277*
	2,5	191±0,1082*	139±0,0755*	137±0,0458*

Os resultados são apresentados como a média das triplicadas ± desvio padrão, $p < 0.05$.

*Diferente do controle positivo por aumentar o tempo de coagulação. Devido ao tempo de ativação de alguns fatores da cascata de coagulação (por exemplo, o tempo de ativação da protrombina está entre 10 e 14s), valores iguais ou superiores a 10s em relação ao controle foram considerados estatisticamente significativos.

O extrato de *R. officinalis*, em estudo prévio, neutralizou a ação de proteases, fibrinogenases e ação hemorrágica, além de apresentar atividade anticoagulante. Os efeitos do extrato se deve, à compostos fenólicos tais como o ácido caféico, catequina, ácido clorogênico, ácido vanílico, ácido ferúlico, ácido *p*-cumárico, ácido cinâmico entre outros

identificados no extrato (SALAMA, ABDEL-ATY, FAHMY, 2018). Outra hipótese descrita em literatura sugere que os efeitos anticoagulantes observados resultam de interações entre compostos presentes nos extratos e os fatores VIII, IX, XI e XII da cascata de coagulação (RENGIFO-RIOS et al., 2019). Apoiando nossos estudos estão o extrato aquoso das folhas de *Clusia fluminensis*, que inibiu a atividade coagulante induzida pela peçonha de *B. jararacussu*, e a atividade hemorrágica induzida por *B. jararaca* e *B. jararacussu* (DA SILVA et al., 2019). O extrato de *Dracontium dubium* neutralizou o efeito hemorrágico e prolongou o tempo de coagulação induzidos por *B. asper* (CARO et al., 2017). O extrato das folhas de *Aegiphila integrifolia* inibiu as atividades proteolíticas e hemorrágicas da peçonha de *B. atrox* (NASCIMENTO et al., 2021). O extrato das folhas de *Piper auritum* inibiu a atividade coagulante de *B. rhombeatus* (RENGIFO-RIOS et al., 2019). O extrato de *Bredemeyera floribunda* inibiu as atividades proteolíticas e hemorrágicas induzidas por *B. jararacussu* (ALVES et al., 2019). O extrato das folhas de *Pimenta dioica* inibiu a atividade coagulante induzida por *B. asper* (SARAVIA-OTTEN et al., 2022). Todos estes estudos reforçam a presença de inibidores enzimáticos sobretudo na composição fenólica dos extratos e sugerem a possibilidade de atuarem na proteção de proteínas presentes no sangue humano, destacando as que participam no controle da hemostasia.

Diferentes compostos fenólicos inibem a atividade de SVMPS, SVSPs e PLA₂s por quelatação de átomos de metais como zinco ou cálcio, que são cofatores essenciais para a atividade enzimática dessas enzimas, podendo conseqüentemente, reduzir de forma significativa algumas atividades farmacológicas dependentes da ação enzimática, tais como hemorragia e hemólise (PATINO et al., 2012; GÓMEZ-BETANCUR et al., 2014; CLAUDINO et al., 2014; DE OLIVEIRA et al., 2014). É provável que os extratos de *R. officinalis*, *S. officinalis* e *T. vulgaris* tenham também agido nas inibições por mecanismos diversos, conforme citados em literatura para alguns compostos fenólicos presentes nestes extratos.

As cepas de bactérias probióticas podem exercer um efeito benéfico no hospedeiro por meio de sua atividade imunomoduladora (CROSS, 2002), tendo, portanto, efeito na redução de processos inflamatórios. Os *L. casei* é eficaz na regulação da ativação da coagulação e inibição da fibrinólise, e a administração dessa cepa leva a diminuição de depósitos de fibrina (HARO et al., 2009). *L. casei* favorece a rápida recuperação do equilíbrio hemostático, regulando a resposta imuno-coagulativa (HARO, MÓNACO, MEDINA, 2018). Adicionalmente, entre as atividades descritas pelos compostos fenólicos, está sua capacidade de se ligar as enzimas presentes na peçonha neutralizando suas atividades que afetam a ação

hemostática, contribuem para os efeitos anti-trombolítico, anti-hemorrágico e anticoagulante demonstrados pelos extratos do presente estudo. Estudos indicaram que a eficácia dos extratos brutos é maior do que a dos constituintes individuais, provavelmente devido ao sinergismo entre as moléculas presentes nos extratos (ALVES et al., 2019), considerando ainda a ação aditiva dos efeitos exercidos pelos principais metabólitos produzidos pelas bactérias probióticas, a trimetilamina e os SCFAs, podemos chegar a uma formulação mais eficaz para a prevenção e tratamento adjuvante em diversas doenças.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

No presente estudo, os extratos das plantas *Rosmarinus officinalis*, *Salvia officinalis* e *Thymus vulgaris* incubados com e sem bactérias probióticas apresentaram efeitos inibitórios promissores sobre as atividades tóxico-farmacológicas induzidas por fosfolipases A₂ e proteases, destacando as atividades de hemólise, trombolítica e coagulante, envolvidas na manutenção da hemostasia. Em adição, os extratos e cepas bacterianas avaliados promoveram redução na hemólise induzida por calor, demonstrando potencial anti-inflamatório. Os resultados do presente estudo demonstraram que os extratos possuem componentes ativos com capacidade para modular enzimas assim como são passíveis de interagir com proteínas humanas protegendo-as contra a catálise enzimática. Assim sendo, mais estudos serão necessários para elucidar todos os mecanismos de ação envolvidos e as formas de sinergismo entre os constituintes dos extratos e as bactérias probióticas, possibilitando inferir futuras formulações de suplementos para uso como adjuvantes na prevenção e/ou tratamento de doenças oriundas de distúrbios hemostáticos, imunológicos/inflamatórios/alergênicos.

REFERÊNCIAS

- AFONSO, A. F. et al. Phytochemical composition and bioactive effects of *Salvia africana*, *Salvia officinalis* 'Icterina' and *Salvia mexicana* aqueous extracts. **Molecules**, v. 24, n. 4327, p. 1-13, 2019.
- ALVES, N. T. Q. et al. Anti-ophidian activity of *Bredemeyera floribunda* Willd. (Polygalaceae) root extract on the local effects induced by *Bothrops jararacussu* venom. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 52, n. 1, p. 1-8, 2019.
- AMBIKABOTHY, J. et al. Efficacy evaluations of *Mimosa pudica* tannin isolate (MPT) for its anti-ophidian properties. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 137, p. 257-262, 2011.
- ASHAOLU, T. J. Immune boosting functional foods and their mechanisms: a critical evaluation of probiotics and prebiotics. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 130, n. 110625, 2020.

- ATABATI, H. et al. Immunoregulatory effects of tolerogenic probiotics in multiple sclerosis. **Reviews on New Drug Targets in Age-Related Disorders**, v. 1286, p. 87-105, 2021.
- BEN-HADJ-KHALIFA, S. et al. Anticoagulant properties of the anti-inflammatory cytokine IL-10 in a factor Xa-activated human monocyte model. **European Cytokine Network**, v. 23, n. 3, p. 87-92, 2012.
- BERESWILL, S. et al. Anti-inflammatory effects of resveratrol, curcumin and simvastatin in acute small intestinal inflammation. **PLoS One**, v. 5, n. 12, 2010.
- BOO, Y. C. *p*-Coumaric acid as an active ingredient in cosmetic: a review focusing on its antimelanogenic effects. **Antioxidants**, v. 8, n. 275, p. 1-16, 2019.
- BRON, P. A. et al. Can probiotics modulation human disease by impacting intestinal barrier function? **British Journal of Nutrition**, v. 117, p. 93-107, 2017.
- CARO, D. et al. Protective effect of *Dracontium dubium* against *Bothrops asper* venom. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 89, p. 1105-1114, 2017.
- CAVALCANTI, G. R. et al. Ferulic acid activity in topical formulations: technological and scientific prospecting. **Current Pharmaceutical Design**, v. 27, p. 2289-2298, 2021.
- CESAR, P. H. S. et al. Molecular interactions between *p*-coumaric acid and snake venom toxins. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 120, p. 14594-14603, 2019.
- CESAR, P. H. S. et al. Vanillic acid as phospholipases A₂ and proteases inhibitor: *in vitro* and computational analyses. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, p. 486-496, 2020.
- CHEN, L. et al. Triterpenoid herbal saponins enhance beneficial bacteria, decrease sulfate-reducing bacteria modulate inflammatory intestinal microenvironment and exert cancer preventive effects in Apc^{Min/+} mice. **Oncotarget**, v. 7, n. 21, p. 31226-31242, 2016.
- CHOUKAIRI, Z. et al. The cytotoxic activity of *Salvia officinalis* L. and *Rosmarinus officinalis* L. leaves extracts on human glioblastoma cell line and their antioxidant effect. **Journal of Complementary and Integrative Medicine**, 2020.
- CINTRA, A. C. O. et al. Batroxase, a new metalloproteinase from *Bothrops atrox* snake venom with strong fibrinolytic activity. **Toxicon**, v. 60, p. 70-82, 2012.
- CLAUDINO, M. M. et al. Inhibitory effect of the red seaweed *Plocamium brasiliense* against the toxic effects of *Lachesis muta* snake venom. **Journal of Applied Phycology**, v. 26, p. 2047-2054, 2014.
- CORTES-PEREZ, N. G. et al. Probiotics and trained immunity. **Biomolecules**, v. 11, n. 1402, p. 1-21, 2021.
- COSTANTINI, L. et al. Impact of omega-3 fatty acids on the gut microbiota. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 2645, p. 1-18, 2017.
- CROSS, M. L. Microbes versus microbes: immune signals generated by probiotic lactobacilli and their role in protection against microbial pathogens. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 34, p. 245-253, 2002.
- CUNHA, M. et al. Salt consumption, sugar, herbs and spices. **Revista Servir**, v. 59, n. 4, p. 36-41, 2016.

DA CUNHA, A. P. et al. **Plantas aromáticas e óleos essenciais: composição e aplicações**. Fundação Calouste Gulbenkian: Lisboa, Portugal, 2012.

DA SILVA, S. L. et al. Molecular modeling and inhibition of phospholipase A₂ by polyhydroxy phenolic compounds. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 44, n. 1, p. 312-321, 2009.

DA SILVA, A. R. et al. Utilization of the plant *Clusia fluminensis* Planch & Triana against some toxic activities of the venom of *Bothrops jararaca* and *Bothrops jararacussu* snake venom toxic activities. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 19, n. 22, p. 1990-2002, 2019.

DA SILVA, D. P. et al. Antiophidic potential of chlorogenic acid and rosmarinic acid against *Bothrops leucurus* snake venom. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 148, n. 112766, p. 1-14, 2022.

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

DE OLIVEIRA, E. C. et al. Inhibitory effect of plant *Manikara subericea* against biological activities of *Lachesis muta* snake venom. **BioMed Research International**, v. 2014, p. 1-7, 2014.

DE OLIVEIRA, E. C. et al. Protective effect of the plant extracts of *Erythroxylum* sp. against toxic effects induced by the venom of *Lachesis muta* snake. **Molecules**, v. 21, n. 1350, p. 1-14, 2016.

DE OLIVEIRA, J. R. et al. Biological activities of *Rosmarinus officinalis* L. (rosemary) extract as analyzed in microorganisms and cells. **Experimental Biology and Medicine**, v. 242, p. 625-634, 2017.

ELLISON, N. Goodman & Gilman's the pharmacological basis of therapeutics. **Anesthesia & Analgesia**, 10ª edição, v. 94, n. 5, p. 1377, 2002.

ESPÍNDOLA, K. M. M. et al. Chemical and pharmacology aspects of caffeic acid and its activity in hepatocarcinoma. **Frontiers in Oncology**, v. 9, n. 541, 2019.

ESTRADA, J. A.; CONTRERAS, I. Nutritional modulation of immune and central nervous system homeostasis: the role of diet in development of neuroinflammation and neurological disease. **Nutrients**, v. 11, n. 1076, p. 1-36, 2019.

FAHMI, L. et al. Venomics and antivenomics profiles of North African *Cerastes cerastes* and *Cerastes vipera* populations reveals a potentially important therapeutic weakness. **Journal of Proteomics**, v. 75, p. 2442-2453, 2012.

FERRAZ, C. R. et al. Multifunctional toxins in snake venoms and therapeutic implications: from pain to hemorrhage and necrosis. **Frontiers in Ecology and Evolution**, v. 7, n. 218, p. 1-19, 2019.

FERREIRA, I. C. F. R.; MARTINS, N.; BARROS, L. Phenolic compounds and its bioavailability: *in vitro* bioactive compounds or health promoters? **Advances in Food and Nutrition Research**, v. 82, p. 1-44, 2017.

GALOFRÉ, M. et al. Clinical and microbiological evaluation of the effect of *Lactobacillus reuteri* in the treatment of mucositis and peri-implantitis: a triple-blind randomized clinical trial. **Journal of Periodontal Research**, v. 53, p. 378-390, 2018.

GÓMEZ-BETANCUR, I.; BENJUMEA, D. Traditional use of the genus *Renealmia* and *Renealmia alpinia* (Rottb.) Maas (Zingiberaceae) – a review in the treatment of snakebites. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v. 7, p. 574-578, 2014.

GÓMEZ-BETANCUR, I. et al. Inhibition of the toxic effects of *Bothrops asper* venom by pinostrobin, a flavanone isolated from *Renealmia alpinia* (Rottb.) MAAS. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 155, n. 3, p. 1609-1615, 2014.

GRISSA, I. et al. *Rosmarinus officinalis* L. ameliorates titanium dioxide nanoparticles and induced some toxic effects in rats' blood. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 24, p. 12474-12483, 2017.

GUTIÉRREZ, J. M. et al. An alternative *in vitro* method for testing the potency of the polyvalent antivenom produced in Costa Rica. **Toxicon**, v. 26, n. 4, p. 411-413, 1988.

GUTIÉRREZ, J. M. et al. Hemorrhage caused by snake venom metalloproteinases: a journey of discovery and understanding. **Toxins (Basel)**, v. 8, n. 93, p. 1-19, 2016.

GUZMAN, E.; MOLINA, J. The predictive utility of the plant phylogeny in identifying sources of cardiovascular drugs. **Pharmaceutical Biology**, v. 56, n. 1, p. 154-164, 2018.

HARO, C. et al. *Lactobacillus casei* modulates the inflammation-coagulation interaction in a pneumococcal pneumonia experimental model. **Journal of Inflammation**, v. 6, n. 28, p. 1-10, 2009.

HARO, C.; MÓNACO, M. E.; MEDINA, M. *Lactobacillus casei* beneficially modulates immuno-coagulative response in an endotoxemia model. **Blood Coagulation and Fibrinolysis**, v. 29, n. 1, p. 104-110, 2018.

HUTCHINSON, A. N.; TINGÖ, L.; BRUMMER, R. J. The potential effects of probiotics and ω -3 fatty acids on chronic low-grade inflammation. **Nutrients**, v. 12, n. 2402, p. 1-15, 2020.

IMMUNITY IN BRIEF. Available online: <http://lpi.oregonstate.edu/mic/health-disease/immunity-in-brief> (accessed on 28 September 2022).

JANG, S. E. et al. Ursolic acid isolated from the seed of *Cornus officinalis* ameliorates colitis in mice by inhibiting the binding of lipopolysaccharide to Toll-like receptor 4 on macrophages. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 62, p. 9711-9721, 2014.

KAMIGUTI, A. S.; SANO-MARTINS, I. S. South American snake venom affecting haemostasis. **Journal of Toxicology: Toxin Reviews**, v. 14, n. 3, p. 359-374, 1995.

KASSA, T. et al. Caffeic acid: an antioxidant with novel antisickling properties. **FEBS PRESS**, v. 11, n. 12, p. 3293-3303, 2021.

KEKKONEN, R. A. et al. Probiotic intervention has strain-specific anti-inflammatory effects in healthy adults. **World Journal of Gastroenterology**, v. 14, n. 3, p. 2029-2036, 2008.

KIM, H. P. et al. Anti-inflammatory plant flavonoids and cellular action mechanisms. **Journal of Pharmacological Sciences**, v. 96, n. 3, p. 229-245, 2004.

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

KRISHNAN, S. A. et al. Studies on neutralizing effect *Ophiorrhiza mungos* Root extract against *Daboia russelii* venom. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 151, p. 543-547, 2014.

KRUMBECK, J. A. et al. Probiotic *Bifidobacterium* strains and galactooligosaccharides improve intestinal barrier function in obese adults but show no synergism when used together as synbiotics. **Microbiome**, v. 6, n. 121, p. 1-16, 2018.

LANGENFELD, S. J. Evaluation and medical management of uncomplicated diverticulitis. **Clinics in Colon and Rectal Surgery**, v. 34, n. 2, p. 86-90, 2021.

LAVASANI, S. et al. A novel probiotic mixture exerts a therapeutic effect on experimental autoimmune encephalomyelitis mediated by IL-10 producing regulatory T cells. **PLoS ONE**, v. 5, p. 1-11, 2010.

LEBEER, S.; VANDERLEYDEN, J.; DE KEERSMAECKER, S. C. J. Genes and molecules of lactobacilli supporting probiotic action. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 72, n. 4, p. 728-764, 2008.

LIANG, S. et al. Recognizing depression from the microbiota-gut-brain axis. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 1592, p. 1-16, 2018.

LYTE, M. Probiotics function mechanistically as delivery vehicles for neuroactive compounds: microbial endocrinology in the design and use of probiotics. **Bioessays**, v. 33, p. 574-581, 2011.

MAIORANO, V. A. et al. Antiophidian properties of the aqueous extract of *Mikania glomerata*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 102, p. 364-370, 2005.

MÁLAQUE, C. M. S.; FRANÇA, F. O. S. Laquetic accident, p. 87-90, 2003. In: Cardoso, J. C. L.; França, F. O. S.; Wen, F. H.; Málaque, C. M. S.; Haddad Jr., V. (Orgs). **Venomous animals in Brazil: biology, clinical and therapeutic of accidents**. Sarvier, São Paulo (in Portuguese).

MÁLAQUE, C. M. S.; GUTIÉRREZ, J. M. Snakebite envenomation in central and South American. **Critical Care Toxicology**, p. 1-22, 2016.

- MARGETTS, G. et al. Evidence for anti-inflammatory effects and modulation of neurotransmitter metabolism by *Salvia officinalis* L. **BMC Complementary Medicine and Therapies**, v. 22, n. 131, p. 1-16, 2022.
- MARKOWIAK-KOPEC, P.; SLIZEWSKA, K. The effect of probiotics on the production of short-chain fatty acids by human intestinal microbiome. **Nutrients**, v. 12, n. 1107, p. 1-23, 2020.
- McCLEARY, R. J. R.; KINI, R. M. Snake bites and hemostasis/thrombosis. **Thrombosis Research**, v. 132, p. 642-646, 2013.
- MEDZHITOV, R. et al. Inflammation 2010: new adventures of an old flame. **Cell**, v. 140, n. 6, p. 771-776, 2010.
- MÖLLER, C. et al. Conodipine-P1-3, the first phospholipase A₂ characterized from injected cone snail venom. **Molecular & Cellular Proteomics**, v. 18, n. 5, p. 876-891, 2019.
- MORS, W. B. et al. Plant natural products active against snake bite the molecular approach. **Phytochemistry**, v. 55, p. 627-642, 2000.
- MUELLER, M.; HOBIGER, S.; JUNGBAUER, A. Anti-inflammatory of extracts from fruits, herbs and spices. **Food Chemistry**, v. 122, p. 987-996, 2010.
- NASCIMENTO, L. S. et al. Phytochemical composition, antisnake venom and antibacterial activities of ethanolic extract of *Aegiphila integrifolia* (Jacq) Moldenke leaves. **Toxicon**, v. 198, p. 121-131, 2021.
- NIRMAL, N.; PRABA, G.O.; VELMURUGAN, D. Modeling studies on phospholipases A₂-inhibitor complexes. **Indian Journal of Biochemistry and Biophysics**, v. 45, n. 4, p. 256-262, 2008.
- NISHIDA, A. et al. Gut microbiota in the pathogenesis of inflammatory bowel disease. **Clinical Journal of Gastroenterology**, v. 11, p. 1-10, 2018.
- NKEH-CHUNGAG, B. N. et al. Anti-inflammatory and membrane-stabilizing properties of two semisynthetic derivatives of oleanolic acid. **Inflammation**, v. 38, n. 1, p. 61-69, 2015.
- NOVAIS, C. et al. Bioactive and nutritional potential of medicinal and aromatic plant (MAP) seasoning mixtures. **Molecules**, v. 26, n. 1587, p. 1-19, 2021.
- OJETTI, V. et al. The use of probiotics in different phases of diverticular disease. **Reviews on Recent Clinical Trials**, v. 13, p. 89-96, 2018.
- OLAOYE, I. F.; OSO, B. J.; ABERUAGBA, A. Molecular mechanisms of anti-inflammatory activities of the extracts of *Ocimum gratissimum* and *Thymus vulgaris*. **Avicenna Journal of Medical Biotechnology**, v. 13, n. 4, p. 207-216, 2021.
- PACE, F.; PACE, M.; QUARTARONE, G. Probiotics in digestive disease: focus on *Lactobacillus* GG. **Minerva Gastroenterologica e Dietologica**, v. 61, n. 4, p. 273-292, 2015.

- PAN, X. et al. Study on molecular mechanisms of nattokinase in pharmacological action based on label-free liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Food Science Nutrition**, v. 7, p. 3185-3193, 2019.
- PARK, S. et al. Evaluation of the safety and ochratoxin A degradation capacity of *Pediococcus pentosaceus* as a dietary probiotic with molecular docking approach and pharmacokinetic toxicity assessment. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 9062, p. 1-17, 2022.
- PATINO, A. C. et al. Evaluation of the inhibitory effect of extracts from leaves of *Renealmia alpinia* Rottb MAAS (Zingiberaceae) on the venom of *Bothrops asper* (mapana). **Biomedica**, v. 32, n. 3, p. 365-374, 2012.
- PICCIONI, A. et al. Gut microbiota and acute diverticulitis: role of probiotics in management of this delicate pathophysiological balance. **Journal of Personalized Medicine**, v. 11, n. 298, p. 1-10, 2021.
- PITHAYANUKUL, P.; LEANPOLCHAREANCHAI, J.; BAVOVADA, R. Inhibitory effect of tea polyphenols on local tissue damage induced by snake venoms. **Phytotherapy Research**, v. 24, p. 56-62, 2010.
- PREZOTO, B. C. et al. Elevated plasma levels of hepatocyte growth factor in rats experimentally envenomated with *Bothrops jararaca* venom: role of snake venom metalloproteases. **Toxicon**, v. 162, p. 9-14, 2019.
- R Core Team: R: A Language and Environment for Statistical Computing. Viena: Viena: R Foundation for Statistical Computing, 2012.
- RASINKANGAS, P.; OUWEHAND, A. C. Digestive health benefits of HOWARU restore probiotic combination and its individual strains. **AgroFood Industry Hi-tech**, v. 28, n. 5, p. 20-23, 2017.
- RENGIFO-RIOS, A. M. et al. Edematous and coagulant effects caused by the venom of *Bothrops rhombeatus* neutralized by the ethanolic extract of *Piper auritum*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 242, n. 112046, p. 1-7, 2019.
- REZENDE, S. M. Disorders of homeostasis: bleeding disorders. **Revista Médica de Minas Gerais**, v. 20, n. 4, p. 534-553, 2010.
- RODES, L. et al. Effect of probiotics *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* on gut-derived lipopolysaccharides and inflammatory cytokines: an in vitro study using a human colonic microbiota model. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 23, n. 4, p. 518-526, 2013.
- RODRIGUES, V. M. et al. Structural and functional characterization of neuwiedase, a nonhemorrhagic fibrin(ogen)olytic metalloprotease from *Bothrops neuwiedi* snake venom. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 381, n. 2, p. 213-224, 2000.
- RUSSO, C. et al. Effects of *Salvia officinalis* L. and *Chamaemelum nobile* (L.) extracts on inflammatory responses in two models of human cells: primary subcutaneous adipocytes and neuroblastoma cell line (SK-N-SH). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 268, n. 113614, p. 1-15, 2021.

SALAMA, W. H.; ABDEL-ATY, A. M.; FAHMY, A. S. Rosemary leaves extract: anti-snake action against *Egyptian cerastes cerastes* venom. **Journal of Traditional and Complementary**, v. 8, n. 4, p. 465-475, 2018.

SANCHEZ, E. F. et al. Direct fibrinolytic snake venom metalloproteinases affecting hemostasis: structural, biochemical features and therapeutic potential. **Toxins**, v. 9, n. 392, p. 1-18, 2017.

SANTORO, M. L. et al. Haematological evaluation of patients bitten by the jararaca, *Bothrops jararaca*, in Brazil. **Toxicon**, v. 51, p. 1440-1448, 2008.

SARAVIA-OTTEN, P. et al. Inhibition of enzymatic activities of *Bothrops asper* snake venom and docking analysis of compounds from plants used in Central America to treat snakebite envenoming. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 283, n. 114710, p. 1-12, 2022.

SELVAM, R. et al. Effect of *Bacillus subtilis* PB6, a natural probiotic on colon mucosal inflammation and plasma cytokines levels in inflammatory bowel disease. **Indian Journal of Biochemistry and Biophysics**, v. 46, n. 1, p. 79-85, 2009.

SHIMABUKU, P. S. et al. Crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of a Lys49-phospholipase A₂ complexed with caffeic acid, a molecule with inhibitory properties against snake venoms. **Structural Biology and Crystallization Communications**, p. 249-252, 2011.

SOLIMAN, M. M.; ALDHAHRANI, A.; METWALLY, M. M. M. Hepatoprotective effect of *Thymus vulgaris* extract on sodium nitrite-induced changes in oxidative stress, antioxidant and inflammatory marker expression. **Scientific Reports**, v. 11, n. 5747, 2021.

SOUZA, J. B. et al. Generation and *In-planta* expression of a recombinant single chain antibody with broad neutralization activity on *Bothrops pauloensis* snake venom. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 149, p. 1241-1251, 2020.

STORR, M.; VOGEL, H. J.; SCHICHO, R. Metabolomics: is it useful for IBD. **Current Opinion in Gastroenterology**, v. 29, n. 4, p. 1-10, 2014.

SUMI, H. et al. A novel fibrinolytic enzyme (nattokinase) in the vegetable cheese Natto; a typical and popular soybean food in the Japanese diet. **Experientia**, v. 43, n. 10, p. 1110-1111, 1987.

SYTAR, O. et al. Comparative analysis of bioactive phenolic compounds composition from 26 medicinal plants. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 25, p. 631-641, 2018.

TASNEEM, S. et al. Molecular pharmacology of inflammation: medicinal plants as anti-inflammatory agents. **Pharmacological Research**, v. 139, p. 126-140, 2019.

TASOULIS, T.; ISBISTER, G. K. A review and database of snake venom proteomes. **Toxins**, v. 9, n. 290, p. 1-23, 2017.

TATIYA, A. U.; SALUJA, A. K. Further studies on membrane stabilizing, anti-inflammatory and FCA induced arthritic activity of various fractions of bark of *Machilus macrantha* in rats. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 21, n. 6, p. 1052-1064, 2011.

TEUGHEL, W. et al. Clinical and microbiological effects of *Lactobacillus reuteri* probiotics in the treatment of chronic periodontitis: a randomized placebo-controlled study. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 40, p. 1025-1035, 2013.

TICINESI, A. et al. Diverticular disease: a gut microbiota perspective. **Journal of Gastrointestinal and Liver Diseases**, v. 28, n. 3, p. 327-337, 2019.

TSIOURIS, C. G.; TSIOURI, M. G. Human microflora, probiotics and wound healing. **Wound Medicine**, v. 19, p. 33-38, 2017.

TUNGMUNNITHUM, D. et al. Flavonoids and other phenolic compounds from medicinal plants for pharmaceutical and medical aspects: an overview. **Medicines**, v. 5, n. 93, p. 1-16, 2018.

TURNER, M. D. et al. Cytokines and chemokines: at the crossroads of cell signalling and inflammatory disease. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1843, p. 2563-2582, 2014.

VALENTINI, L. et al. Impact of personalized diet and probiotic supplementation on inflammation, nutritional parameters and intestinal microbiota – the “RISTOMED project”: randomized controlled trial in healthy older people. **Clinical Nutrition**, v. 34, p. 593-602, 2015.

VINCENZI, A.; GOETTERT, M. I.; DE SOUZA, C. F. V. An evaluation of the effects of probiotics on tumoral necrosis factor (TNF- α) signaling and gene expression. **Cytokine and Growth Factor Reviews**, v. 57, p. 27-38, 2021.

WANG, M. et al. Reduced diversity in the early fecal microbiota of infants with atopic eczema. **The Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 121, n. 1, p. 129-134, 2008.

WIART, C. **Medicinal plants of the Asia-Pacific**. Drug for the future? CRC Press, p. 756, 2006.

WILLIAMS, L. A. D. et al. The *in vitro* anti-denaturation effects induced by natural products and non-steroidal compounds in heat treated (immunogenic) bovine serum albumin is proposed as a screening assay for the detection of anti-inflammatory compounds, without the use of animals, in the early stages of the drug discovery process. **West Indian Medical Journal**, v. 57, n. 4, 2008.

YAN, L. et al. Novel biomedical function of surfactin A from *Bacillus subtilis* in wound healing promotion and scar inhibition. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 68, p. 6987-6997, 2020.

YILMAZ, S.; ERGÜN, S. Trans-cinnamic acid application for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): I. Effects on haematological, serum biochemical, non-specific immune and head kidney gene expression responses. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 78, p. 140-157, 2018.

ZAMORA, L. L.; PÉREZ-GRACIA, M. T. Using digital photography to implement the McFarland method. **Journal of the Royal Society Interface**, v. 9, p. 1892-1897, 2012.

ZELAYA, H. et al. Immunobiotic lactobacilli reduce viral-associated pulmonary damage through the modulation of inflammation-coagulation interactions. **International Immunopharmacology**, v. 19, p. 161-173, 2014.

ZHANG, X. et al. Screening of a *Bacillus subtilis* strain producing both nattokinase and mick-clotting enzyme and its application in fermented milk with thrombolytic activity. **Journal of Dairy Science**, v. 104, n. 9, p. 9437-9449, 2021.

ZIADLOU, R. et al. Anti-inflammatory and chondroprotective effects of vanillic acid and epimedin C in human osteoarthritic chondrocytes. **Biomolecules**, v. 10, n. 932, p. 1-26, 2020.

ANEXO

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
LAVRAS



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: PLANTAS CONDIMENTARES E PROBIÓTICOS: AÇÃO MODULADORA SOBRE FOSFOLIPASES A₂, PROTEASES E HIALURONIDASES

Pesquisador: Silvana Marcussi

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 57151322.4.0000.5148

Instituição Proponente: Universidade Federal de Lavras

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 5.379.496

Apresentação do Projeto:

Resumo:

As plantas correspondem a uma valiosa fonte de moléculas bioativas com função na prevenção e tratamento de diversas doenças. Nesse contexto, as plantas condimentares têm se destacam pela produção de grandes quantidades de agentes antioxidantes, antiinflamatórios e antimicrobianos. Espécies como Rosmarinus officinalis, Ocimum basilicum, Origanum vulgare, Petroselinum crispum, Thymus vulgaris, Salvia officinalis e Laurus nobilis são ricas em compostos fenólicos e têm sido usadas na medicina popular para tratamento de distúrbios digestivos e gastrointestinais, com funções anti-inflamatória, cicatrizante e microbicida. De igual importância, os probióticos exercem efeitos benéficos sobre a microflora intestinal e funcionalidade do trato intestinal, com função adjuvante aos tratamentos com antibióticos e antiinflamatórios. As fosfolipases A₂, proteases e hialuronidases são enzimas que participam de diferentes processos fisiológicos no organismo humano, tais como coagulação, cicatrização e regeneração tecidual, e defesa, sendo importantes alvos no estudo mecanístico de diversas patologias e para o desenvolvimento de novos fármacos. O alto grau de homologia existente entre enzimas presentes em peçonhas de serpentes e enzimas humanas, aliado a grande facilidade de obter estas enzimas para utilização em estudos científicos, fazem destas poderosas ferramentas laboratoriais na indução de atividades que simulam a ação de enzimas humanas sobre diferentes moléculas, células e processos fisiológicos.

Endereço: Campus Universitário Cx Postal 3037

Bairro: PRP/COEP

CEP: 37.200-900

UF: MG

Município: LAVRAS

Telefone: (35)3829-5182

E-mail: coep.nintec@ufla.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
LAVRAS



Continuação do Parecer: 5.379.496

Hipótese:

A ação dos probióticos sobre metabólitos presentes na plantas condimentares poderá potencializar a modulação de enzimas que atuam na resposta inflamatória e na manutenção da hemostasia.

Metodologia Proposta:

MATERIAIS E MÉTODOS
Atividade anti-inflamatória Para a realização da atividade anti-inflamatória coleta-se o sangue de um doador voluntário em tubos contendo heparina. O sangue coletado é centrifugado à 3600 RPM por 5 min, remove-se o plasma. Prepara-se uma suspensão de hemácias à 2% (v:v, mL:mL) em PBS, pH 7,4. Preparar as amostras em um volume máximo de 200 L ou até 100 mg de material sólido e adicionar a 1,2 mL da solução de hemácias. Os controles serão realizados com agente anti-inflamatório não esteroidal. As amostras serão incubadas previamente a 37°C durante 30 min. Após incubação, levar os tubos contendo as amostras ao banho termostático a 54°C por 20 min. Centrifugar os tubos à 3600 RPM por 5 min. e realizar a leitura em um espectrofotômetro a 540 nm. Calcular a porcentagem de inibição de hemólise: %Inibição da Hemólise= 1 - Amostra aquecida – Amostra NÃO aquecida X 100
Controle com água 100% hemólise – Amostra NÃO aquecida
Atividade coagulante As diferentes amostras a serem testadas serão adicionadas em 200L de plasma humano citrado incubado à 37°C e o tempo de coagulação será cronometrado em segundos. O controle será realizado utilizando-se apenas o plasma e 20L de solução de cloreto de cálcio a 0,1M ou 10g de solução de peçonha bruta de serpentes. Caso as amostras não apresentem atividade coagulante poderão ser avaliadas como possíveis anti-coagulantes sendo adicionadas ao plasma citrado e incubadas por 10 minutos a 37°C com posterior adição dos indutores de coagulação e medida do tempo. Este teste de anti-coagulação permite avaliar a ocorrência ou não de interações entre as amostras e constituintes do plasma.
Atividade trombolítica: A atividade trombolítica será avaliada sobre coágulos sanguíneos humanos formados in vitro de acordo com a metodologia descrita por Cintra et al. (2012). Serão distribuídas alíquotas de 100 L de sangue total em poços de uma microplaca de 96 poços e deixados para coagular durante 15 a 20 minutos. Sobre os trombos, serão adicionados os tratamentos (volume final de 30 L por amostra/por poço) correspondentes a apenas PBS (controle negativo), extratos das plantas condimentares, peçonha de B. moojeni (30g/L, controle indutor de trombólise e fonte de enzimas hemorrágicas), probióticos e extratos das plantas + probióticos, previamente incubados com a peçonha por 30 minutos a 37°C, em diferentes proporções. A quantificação da

Endereço: Campus Universitário Cx Postal 3037

Bairro: PRP/COEP

CEP: 37.200-900

UF: MG

Município: LAVRAS

Telefone: (35)3829-5182

E-mail: coep.nintec@ufla.br

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE
LAVRAS**

Continuação do Parecer: 5.379.496

trombólise será realizada pela medida do volume líquido liberado por cada trombo, utilizando uma pipetadora automática, após a permanência das placas contendo os trombos tratados, por período de 32 horas, à 30 °C em câmara de cultura celular, dentro de sacos plásticos para manter a umidade. O valor médio das repetições será subtraído do volume inicial (considerando 100 L de sangue + 30 L de amostra = 130 L) e calculada a porcentagem de trombólise. Para quantificar a perda de fluido por evaporação, serão utilizados três poços de controle negativo (PBS) e seu volume de líquido será quantificado e subtraído a perda de todas as amostras. Se a quantidade de líquido for menor que o volume inicial, as amostras serão consideradas trombóticas.

Critério de Inclusão:

Estudantes de pós-graduação da universidade com idade entre 18 e 35 anos (homens e mulheres), que não façam uso contínuo de medicamentos (ex: pessoas com hipertensão ou diabetes), não sejam fumantes, não trabalhem em condições de risco químico ou biológico e possuam um histórico de boas condições de saúde para os últimos 3 meses. Os potenciais voluntários (três para cada teste) também não poderão ter sido submetidos a qualquer procedimento cirúrgico e/ou administração de medicamentos cuja prescrição médica seja obrigatória (ex: quimioterápicos e antibióticos) ou outras drogas.

Critério de Exclusão:

Menores de 18 anos, Gestantes e portadores de doenças crônicas que façam uso contínuo de medicamentos.

Objetivo da Pesquisa:**Objetivo Primário:**

Avaliar a ação moduladora de soluções aquosas obtidas de folhas de *Rosmarinus officinalis*, *Thymus vulgaris*, *Ocimum basilicum*, *Origanum vulgare*, *Petroselinum crispum*, *Salvia officinalis* e *Laurus nobilis*, na presença ou ausência de probióticos, sobre a atividade de fosfolipases A, proteases e hialuronidases que atuam nos processos de coagulação e fibrinólise, inflamação, regeneração de tecidos e cicatrização.

Objetivo Secundário:

a) Avaliar a composição fenólica das soluções aquosas das folhas de *Rosmarinus officinalis*, *Thymus vulgaris*, *Ocimum basilicum*, *Origanum vulgare*, *Petroselinum crispum*, *Salvia officinalis* e *Laurus nobilis*; b) Avaliar os efeitos de soluções aquosas das plantas condimentares, na ausência e

Endereço: Campus Universitário Cx Postal 3037**Bairro:** PRP/COEP**CEP:** 37.200-900**UF:** MG**Município:** LAVRAS**Telefone:** (35)3829-5182**E-mail:** coep.nintec@ufla.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
LAVRAS



Continuação do Parecer: 5.379.496

presença de probióticos, sobre a atividade catalítica de fosfolipases A2; c) Avaliar os efeitos de soluções aquosas das plantas condimentares, na ausência e presença de probióticos, sobre a atividade coagulante induzida por proteases;d) Avaliar os efeitos de soluções aquosas das plantas condimentares, na ausência e presença de probióticos, sobre a atividade fibrinogenolítica induzida por proteases;e) Avaliar o potencial antiinflamatório de soluções aquosas das plantas condimentares, na ausência e presença de probióticos, utilizando teste de hemolise realizado a 54°C;f) Avaliar os efeitos de soluções aquosas das plantas condimentares, na ausência e presença de probióticos, sobre a dissolução de trombos sanguíneos induzida por proteases;g) Avaliar os efeitos de soluções aquosas das plantas condimentares, na ausência e presença de probióticos, sobre a atividade de hialuronidases humanas.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

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

Benefícios:

Não haverá qualquer benefício direto ao voluntário nesta pesquisa. No entanto, ele estará contribuindo com a conclusão dos estudos referentes ao projeto do pesquisadora colaboradora , Daniela Aparecida Oliveira no qual se pretende obter informações sobre os efeitos in vitro de amostras comerciais de plantas condimentares; tomilho (*Thymus vulgaris*), manjerição (*Ocimum basilicum*),alecrim (*Rosmarinus officinalis*), orégano (*Origanum vulgare*), salsa (*Petroselinum crispum*), sálvia (*Salvia officinalis*)e louro (*Laurus nobilis*); como moduladores enzimáticos na hemostasia, considerando parâmetros fisiológicos e toxicológicos, visando a comprovação de indicações de uso popular dessas plantas, assim como a obtenção de conhecimentos que permitam sugerir novas aplicações com eficácia e segurança.

Endereço: Campus Universitário Cx Postal 3037

Bairro: PRP/COEP

CEP: 37.200-900

UF: MG

Município: LAVRAS

Telefone: (35)3829-5182

E-mail: coep.nintec@ufla.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
LAVRAS



Continuação do Parecer: 5.379.496

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Trata-se de uma pesquisa de caráter acadêmico, para obtenção do título de doutorado em , envolvendo a participação de 15 pessoas que serão doadores de sangue para ensaios da pesquisa.

Período de coleta de dados com seres humanos: 06 a 20 de junho de 2022.

Vide campo "Conclusões ou pendências e Lista de Inadequações".

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Vide campo "Conclusões ou pendências e Lista de Inadequações".

Recomendações:

Vide campo "Conclusões ou pendências e Lista de Inadequações".

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Não há pendência. O Comitê considera o protocolo aprovado.

Considerações Finais a critério do CEP:

Ressalta-se que cabe ao pesquisador responsável encaminhar os relatórios parciais e final da pesquisa, por meio da Plataforma Brasil, via notificação do tipo "relatório" para que sejam devidamente apreciadas no CEP, conforme norma operacional CNS n°001/13, item XI.2.d.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1919096.pdf	24/03/2022 16:59:26		Aceito
Folha de Rosto	folhaderostoDaniela.pdf	24/03/2022 16:58:56	Silvana Marcussi	Aceito
Outros	DANIELAComentarioseticos.docx	24/03/2022 14:37:25	Silvana Marcussi	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	AutorizacaoPRPGDaniela.pdf	24/03/2022 14:36:31	Silvana Marcussi	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	DANIELATermodeconsentimento.docx	24/03/2022 14:35:53	Silvana Marcussi	Aceito

Endereço: Campus Universitário Cx Postal 3037

Bairro: PRP/COEP

CEP: 37.200-900

UF: MG

Município: LAVRAS

Telefone: (35)3829-5182

E-mail: coep.nintec@ufla.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
LAVRAS



Continuação do Parecer: 5.379.496

Declaração de Pesquisadores	DANIELADeclaraçaoPesquisador.docx	24/03/2022 14:35:25	Silvana Marcussi	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	projetodoutoradoDanielacoep.docx	24/03/2022 14:34:55	Silvana Marcussi	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

LAVRAS, 30 de Abril de 2022

Assinado por:

ALCINÉIA DE LEMOS SOUZA RAMOS
(Coordenador(a))

Endereço: Campus Universitário Cx Postal 3037

Bairro: PRP/COEP

CEP: 37.200-900

UF: MG

Município: LAVRAS

Telefone: (35)3829-5182

E-mail: coep.nintec@uffa.br