



DANIELA APARECIDA OLIVEIRA

**CARACTERIZAÇÃO FARMACOLÓGICA DE
EXTRATOS DE *Averrhoa carambola*: EFEITOS
SOBRE ENZIMAS**

**PHARMACOLOGICAL CHARACTERIZATION
OF EXTRACTS FROM *Averrhoa carambola*:
EFFECTS ON ENZYMES**

**LAVRAS – MG
2017**

DANIELA APARECIDA OLIVEIRA

**CARACTERIZAÇÃO FARMACOLÓGICA DE EXTRATOS DE *Averrhoa*
carambola: EFEITOS SOBRE ENZIMAS**

**PHARMACOLOGICAL CHARACTERIZATION OF EXTRACTS FROM
Averrhoa carambola: EFFECTS ON ENZYMES**

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Lavras,
como parte das exigências do
Programa de Pós-Graduação em
Agroquímica, área de
concentração em Química e
Bioquímica de Produtos
Naturais e Sintéticos, para a
obtenção do título de Mestre.

Profª. Dra. Silvana Marcussi
Orientadora

Dr. Anderson Assaid Simão
Coorientador

**LAVRAS – MG
2017**

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.

Caracterização farmacológica de extratos de *Averrhoa*
carambola : efeitos sobre enzimas / Daniela Aparecida Oliveira. -
2017.

159 p. : il.

Orientador(a): Silvana Marcussi.

Coorientador(a): Anderson Assaid Simão.

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de
Lavras, 2017.

Bibliografia.

1. Compostos fenólicos. 2. Plantas medicinais. 3. Peçonhas de
serpente. I. Marcussi, Silvana . II. Simão, Anderson Assaid. III.
Título.

DANIELA APARECIDA OLIVEIRA

CARACTERIZAÇÃO FARMACOLÓGICA DE EXTRATOS DE *Averrhoa carambola*: EFEITOS SOBRE ENZIMAS

PHARMACOLOGICAL CHARACTERIZATION OF EXTRACTS FROM *Averrhoa carambola*: EFFECTS ON ENZIMES

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Agroquímica, área de concentração em Química e Bioquímica de Produtos Naturais e Sintéticos, para obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 24 de abril de 2017

Dr. Bruno Del Bianco Borges	UFLA
Dra. Juliana Mesquita Freire	UFLA
Dr. Luiz Gustavo de Lima Guimarães	UFSJ
Dra. Lidiane Orlandi	UNILAVRAS

Profª. Dra. Silvana Marcussi
Orientadora

Dr. Anderson Assaid Simão
Coorientador

**LAVRAS – MG
2017**

*À minha família pelo amor, carinho e por
suportarem as ausências.
À minha mãe Tereza, por contribuir para
que eu alcançasse esse objetivo, que
sempre me ajudou e esteve comigo em
todos os momentos, me aconselhando. A
qual é exemplo de força e dedicação.
Dedico*

AGRADECIMENTOS

À DEUS, primeiramente, pelo folego de vida e pela força divina, sem ELE seria impossível chegar até aqui.

À Profa. Dra. Silvana Marcussi, minha orientadora, pela oportunidade, pelo apoio, pela paciência, pela dedicação, pela contribuição na minha formação profissional.

Ao Dr. Anderson Assaid Simão, meu co-orientador, pela atenção e incentivo e por todo comprometimento e ensinamentos transmitidos.

À Lucilene Fernandes Silva, técnica do laboratório, por toda ajuda necessária e auxílio no manuseio dos equipamentos.

À Universidade Federal de Lavras, por abrir suas portas para minha formação acadêmica e de pesquisa.

Ao Departamento de Química por ajudar na condução de todo o curso.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ), por ter concedido a bolsa.

Aos colegas do Laboratório de Bioquímica que colaboraram como doadores voluntários nos experimentos.

Enfim, a todos os docentes, discentes e funcionários do Departamento de Química que de distintas formas contribuíram e auxiliaram neste trabalho.

MUITO OBRIGADA!

RESUMO

A hemostasia é um complexo mecanismo fisiológico de defesa do organismo que visa manter o equilíbrio do sistema circulatório sanguíneo. Na busca por compostos naturais que atuam sobre processos hemostáticos, várias espécies de plantas têm demonstrado conter compostos bioativos que auxiliam na prevenção de doenças. Sendo assim, folhas e frutos de *Averrhoa carambola*, Oxalidaceae, têm sido amplamente usadas de forma popular para prevenção e tratamento de diversas enfermidades. As fosfolipases e proteases são enzimas presentes em peçonhas de serpente. Essas enzimas são homólogas as enzimas humanas e podem ser utilizadas para testar a ação de inibidores naturais. Desta maneira, foi realizada atividade fosfolipásica, hemolítica, caseinolítica, trombolítica, coagulante e fibrinogenolítica, dos extratos aquosos e etanólicos de *A. carambola*. Os testes foram todos avaliados *in vitro*, as amostras contendo extratos e peçonhas foram incubadas durante 30 minutos à 37°C. Os extratos, em diferentes proporções, inibiram em 25 a 55% a atividade fosfolipásica induzida por peçonhas de *B. moojeni* e *B. alternatus*, em 20 a 100% a hemólise induzida por peçonhas de *B. atrox*, *B. moojeni* e *Crotalus durissus terrificus* e em 10 a 33% a atividade proteolítica sobre o substrato caseína. A proteólise do substrato fibrinogênio, induzida pela peçonha de *B. moojeni*, também foi inibida. A atividade trombolítica induzida pela peçonha de *B. atrox* foi potencializada pelos extratos, sendo observados valores superiores a 100% de atividade. Assim como observado para a peçonha de *B. moojeni* na maioria das proporções avaliadas, embora a peçonha de *Lachesis muta* tenha sido inibida 20 a 50% nas diferentes proporções dos extratos avaliados. Os extratos também foram capazes de alterar o tempo de coagulação induzido pelas peçonhas de *C.d.t.*, *L. muta* e *B. atrox*, prolongando ou reduzindo o tempo de coagulação nas diferentes condições avaliadas. Os resultados confirmam o potencial de uso da *A. carambola* para fins farmacológicos, podendo seus constituintes atuar como inibidor ou potencializador enzimático, e interferir em processos relacionados ao equilíbrio hemostático, como a coagulação, a dissolução de trombos e a fibrinogenólise, embora futuros estudos sejam necessários possibilitando o consumo humano com eficácia e segurança.

Palavras-chave: Compostos fenólicos. Plantas medicinais. Peçonhas de serpente. Hemostasia.

ABSTRACT

Hemostasis is a complex physiological defense mechanism of the body that aims to maintain the balance of the blood circulatory system. In the search for natural compounds that act on hemostatic processes, several plant species have been shown to contain bioactive compounds that aid in disease prevention. Thus, leaves and fruits of *Averrhoa carambola*, Oxalidaceae, have been widely used in popular form for prevention and treatment of various diseases. Phospholipases and proteases are enzymes present in snake venoms. These enzymes are homologous to human enzymes and can be used to test the action of natural inhibitors. In this way, phospholipase, hemolytic, caseinolytic, thrombolytic, coagulant and fibrinogenolytic activity of aqueous and ethanolic extracts of *A. carambola* were performed. The tests were all evaluated *in vitro*, the samples containing extracts and venoms were incubated for 30 minutes at 37°C. The extracts, in different proportions, inhibited the phospholipase activity induced by venoms of *B. moojeni* and *B. alternatus* by 25 to 55% in 20 to 100% the hemolysis induced by venoms of *B. atrox*, *B. moojeni* and *Crotalus durissus terrificus* and in 10 to 33% the proteolytic activity on the substrate casein. The proteolysis of the fibrinogen substrate, induced by *B. moojeni* venom, was also inhibited. The thrombolytic activity induced by *B. atrox* venom was potentiated by the extracts, with values higher than 100% of activity observed. As observed for the *B. moojeni* venom in most of the evaluated proportions, although the *Lachesis muta* venom has been inhibited 20 to 50% in the different proportions of the evaluated extracts. The extracts were also capable of altering the coagulation time induced by *C.d.t.*, *L. muta* and *B. atrox* venoms, prolonging or reducing coagulation time under the different conditions evaluated. The results confirm the potential of *A. carambola* for pharmacological purposes, and its constituents can act as inhibitor or enzymatic potentiator and interfere in processes related to hemostatic balance, such as coagulation, thrombus dissolution and fibrinogenolysis, although future studies are necessary to enable human consumption with efficacy and safety.

Keywords: Phenolic compounds. Medicinal plants. Snake venoms. Hemostasis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Modelo clássico da cascata de coagulação sanguínea.....	18
Figura 2 - Novo modelo da cascata de coagulação sanguínea	21
Figura 3 - Fruto da <i>Averrhoa carambola</i>	29
Figura 4 - Folha da <i>Averrhoa carambola</i>	30
Figura 5 - Estrutura química da apigenina-6-C- β -fucopyranoside e apigenina-6-C-(2''-O- α -rhamnopyranosyl)- β -fucopyranoside, isolado do extrato etanólico das folhas de <i>Averrhoa carambola</i>	43
Figura 6 - (1R*, 3S*)-1-(5-hidroximetilfuran-2-il)-3-carboxi-6-hidroxi-8-metoxil-1,2,3,4-tetrahidroisoquinoline	44
Figura 7 - (1S*, 3S*)-1-metil-3-carboxi-6-hidroxi-8-metioxil-1,2,3,4-tetrahidroisoquinoline.....	44
Figura 8 - Exemplos de flavonoides com atividade anti-inflamatória	45
Figura 9 - Exemplos de flavonoides com atividade anti-inflamatória	46
Figura 10 - Requisitos estruturais observados para atividade anti-inflamatória de flavonoides	47
Figura 11 - Formação de coágulo	55

LISTA DE ABREVIATURAS

ATIII	Antitrombina III
BthTX-I e II	Bothropstoxina I e II
Ca ²⁺	Cálcio
CAPM	Cininôgênio de alto peso molecular
Da	Dalton
FP3	Fator 3 plaquetário
FT	Fator tecidual
FVa	Fator V ativado
FVIIa	Fator VII ativado
FVIIIa	Fator VIII ativado
FIXa	Fator IX ativado
FXa	Fator X ativado
FXIa	Fator XI ativado
FXIIa	Fator XII ativado
FXIIIa	Fator XIII ativado
HNF	Heparina não fracionada
IAM	Infarto agudo do miocárdio
iNOS	Óxido nítrico sintase induzida
NO	Óxido nítrico
PKC	Proteína cinase C
PLA ₂ S	Fosfolipases A ₂
cPLA ₂ S	Fosfolipases A ₂ citosólica
iPLA ₂ S	Fosfolipases A ₂ independente de cálcio
sPLA ₂ S	Fosfolipases A ₂ secretada
svPLA ₂ S	Fosfolipases A ₂ de peçonha de serpente
t-PA	Plasminogênio tecidual
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SK	Streptoquinase
SVMPs	Metaloproteases de peçonha de serpente
SVSPs	Serinoproteases de peçonha de serpente
TPA	Ativador de plasminogênio tipo tecidual
UK	Uroquinase
Zn ²⁺	Zinco

SUMÁRIO

	PRIMEIRA PARTE.....	11
1	INTRODUÇÃO	12
2	REFERÊNCIAL TEÓRICO	16
2.1	Hemostasia	16
2.2	Plantas medicinais	22
2.2.1	<i>Averrhoa</i>.....	28
2.2.2	Plantas antiofídicas.....	33
2.3	Peçonhas de serpente.....	37
2.4	Inibidores naturais	40
2.5	Ensaio propostos	47
2.5.1	Hemólise	47
2.5.2	Coagulação	49
2.5.3	Atividade proteolítica.....	50
2.5.3.1	Degradação do fibrinogênio.....	51
2.5.3.2	Degradação da caseína	52
2.5.4	Trombolítico.....	53
3	CONCLUSÃO.....	58
	REFERÊNCIAS	59
	SEGUNDA PARTE	79
	ARTIGO I – <i>Averrhoa carambola</i>: EFFECTS ON HEMOSTASIS AND ENZIMATIC INHIBITION.....	80
	ARTIGO II - POTENCIAL FARMACOLÓGICO DE EXTRATOS DE FRUTOS DE <i>Averrhoa carambola</i> SOBRE ATIVIDADES ENZIMÁTICAS.....	123

PRIMEIRA PARTE

Introdução geral

1 INTRODUÇÃO

O Brasil é um país que possui uma grande diversidade vegetal, dono de uma reserva florestal considerada a maior do mundo, sendo conhecido internacionalmente por possuir uma flora ampla e diversificada. A biodiversidade oferece uma extensa quantidade de produtos com alta importância econômica, com destaque para os fitoterápicos. A fitoterapia pode ser um adicional ou mesmo uma alternativa interessante no tratamento de doenças. A fitoterapia é uma forma terapêutica baseada na utilização de plantas com caráter medicinal para tratamento de enfermidades, utilizando de formulações farmacêuticas que dispensam o isolamento de compostos vegetais. Diante de inúmeras patologias, e devido ao custo elevado dos medicamentos, muitas pessoas fazem uso de inúmeras plantas para tratar diversas doenças, na maioria das vezes até sem comprovação científica. Devido a carência de estudos suficientes, muitas plantas vêm sendo caracterizadas a fim de se comprovar sua eficácia e segurança com base em seu uso terapêutico popular.

As plantas constituem fontes importantíssimas de compostos ativos biologicamente, sendo responsáveis pela síntese de uma extensa gama de fármacos. Pesquisadores da área de produtos naturais destacam a relevância da natureza por nos fornecer essa ampla gama de produtos com grande variação estrutural resultando em diversas propriedades físico-químicas e biológicas (ATANASOV et al., 2015). Extratos de plantas têm se tornado de grande valia no tratamento de doenças, a sua eficácia é resultante de compostos pertencentes a diversas classes de moléculas como, por exemplo, alcaloides, taninos, cumarinas, lignanas, terpenos e flavonoides. Essas substâncias são responsáveis por diversos efeitos como, por exemplo, analgésico, antiespasmódico (JALILZADEH-AMIN; MAHAM, 2015), antioxidante (TUKUN et al., 2014), antialérgico (MACHADO et al., 2015), antiparasitário (MULIA; TANTULAR;

MUGHNI, 2012), hipoglicemiante (SILVA et al., 2014), antiviral, antimicrobiano, anticarcinogênico (KIM et al., 2004).

As plantas são também uma rica fonte de antioxidantes naturais, amplamente descritos na literatura (MORESCO et al., 2012; SINDHU; CHINNA; DIPANKAR, 2013; SAGHIR et al., 2013; TUKUN et al., 2014; YANG et al., 2014; LEITE et al., 2015). Esses antioxidantes exercem sua atividade por meio de vários mecanismos, como por exemplo, sequestro de íons eliminando assim esses radicais livres ativos (SINDHU; CHINNA; DIPANKAR, 2013).

Compostos com natureza antioxidante são de grande valia na prevenção e no tratamento de doenças relacionadas ao estresse oxidativo (ex: Parkinson, Alzheimer, câncer, epilepsias, escleroses, doenças cardiovasculares, entre outras) (CENCIONI et al., 2013; TUKUN et al., 2014).

Um exemplo de planta medicinal muito usada por populações de diversas regiões do Brasil e do mundo (Ásia, Malásia, Indonésia, Índia, Srilanka) é a *Averrhoa carambola* L., pertencente à família Oxalidaceae (TEIXEIRA et al., 2001). Esta planta caracteriza-se como uma pequena árvore frutífera, conhecida popularmente como carambola, de clima tropical, cujos frutos são consumidos *in natura*, sendo utilizado para a elaboração de sucos, tortas, doces, para decorar pratos, entre outros (PROVASI et al., 2005).

A *A. carambola* possui propriedades medicinais, comprovadas cientificamente, tais como anti-inflamatória com excelente potencial cicatrizante, antioxidante, além de ser muito utilizada no tratamento da diabetes mellitus do tipo II devido à presença de compostos em suas folhas que interferem no metabolismo glicêmico (PROVASI et al., 2005).

Estudos com *A. carambola*, destacaram dentre seus princípios ativos, taninos (em menor quantidade) e flavonoides (em maior quantidade). Mais de 4.200 flavonoides já foram identificados em plantas vasculares e variam quanto

ao tipo e quantidade, podendo apresentar propriedades farmacológicas tais como anti-inflamatória, anti-agregante de plaquetas e antioxidante (CAZAROLLI et al., 2008). Possuindo assim, ação benéfica na prevenção de doenças cardiovasculares, tumores, cataratas hereditárias, entre outras (TUKUN et al., 2014).

A utilização de anti-inflamatórios convencionais não tem sido bem-sucedida no tratamento de doenças inflamatórias crônicas (KIM et al., 2004). Surge-se então a necessidade de identificar e caracterizar novos agentes anti-inflamatórios ou compostos que possam ser utilizados em terapias complementares, destacando novamente o potencial de uso de substâncias vegetais com ênfase no potencial de aplicação dos flavonoides. Neste contexto, a *A. carambola* vem se destacando com elevado potencial anti-inflamatório além de atuar de forma benéfica em mecanismos correlacionados à hemostasia tendo potencial cicatrizante e inibidor de agregação de plaquetas. Isso faz da *A. carambola* uma planta que desperta grande interesse médico-científico, em busca de comprovação científica que possibilite seu uso, popularmente difundido, de forma eficaz e segura.

Algumas das diversas enzimas que atuam em nosso metabolismo são homólogas estruturalmente às enzimas presentes nas peçonhas de serpentes, possuindo atividade enzimática idêntica. Desta forma, fosfolipases A₂ (PLA₂s) e proteases de peçonhas são ferramentas de pesquisa valiosas para verificar a ação de inibidores naturais, *in vitro* e *in vivo*, uma vez que estas apresentam um amplo espectro de ações sobre a coagulação, a formação de trombos, a fibrinólise e a agregação de plaquetas (ROMERO et al., 2010; ASAD et al., 2014; DHANANJAYA; SUDARSHAN, 2015). No presente trabalho objetivou-se a realização da caracterização tóxico-farmacologicamente dos efeitos dos extratos aquoso e etanólico, obtidos das folhas e frutos de *A. carambola* sobre a

hemostasia e atividades enzimáticas exercidas por PLA₂ e proteases presentes em peçonhas de serpentes.

2 REFERÊNCIAL TEÓRICO

2.1 Hemostasia

A hemostasia tem o objetivo de deter a hemorragia ocorrida em consequência à lesão de um vaso sanguíneo através de uma série de fenômenos biológicos complexos. O mecanismo hemostático inclui três processos: hemostasia primária, coagulação (hemostasia secundária) e fibrinólise. Através desses processos a fluidez que o sangue necessita é mantida, sem que ocorra extravasamento pelos vasos ou o fechamento do fluxo sanguíneo pela presença de trombos (CAGNOLATI et al., 2015).

O sistema hemostático é um conjunto de processos altamente eficientes e devidamente regulados, incluindo a parede vascular, as estruturas e os agentes vasoativos envolvidos na vasoconstrição e na vasodilatação (YAMASHITA, 2013).

Quando se rompe a monocamada de células endoteliais que recobre os vasos sanguíneos e se expõe a matriz subendotelial, ocorre o início de uma série de processos que passam a acontecer visando amenizar a perda de sangue e manter a circulação sanguínea. No início as plaquetas se juntam as proteínas da matriz subendotelial, o que leva a ativação plaquetária, formando um agregado plaquetário instável. Devido á ativação simultânea do sistema de coagulação durante esse processo, o agregado plaquetário é estabilizado pela formação da rede de fibrina, o tampão hemostático definitivo é então formado (YAMASHITA, 2013).

Hemostasia primária é o processo inicial da coagulação desencadeado pela lesão vascular. Imediatamente, mecanismos locais produzem vasoconstrição, alteração da permeabilidade vascular com produção de edema, vasodilatação dos vasos na região em que ocorreu a lesão e adesão das

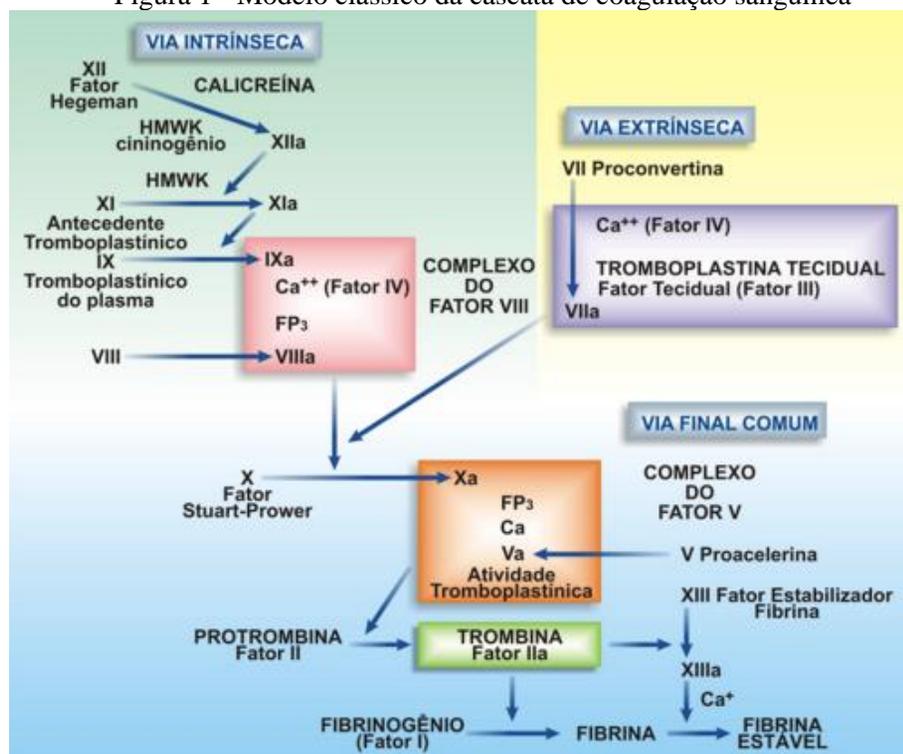
plaquetas. Assim, a vasoconstrição diminui o fluxo de sangue no sítio de sangramento, tornando preferencial o fluxo pelos ramos colaterais dilatados. Simultaneamente, a formação de edema intersticial diminui o gradiente de pressão entre o interior do vaso lesado e a região adjacente, produzindo um tamponamento natural e auxiliando a hemostasia (BERGER et al., 2014).

A adesão e a agregação das plaquetas circulantes, formando o tampão hemostático, são resultantes da ativação dos fatores da cascata de coagulação, que levam à formação de coágulos de fibrina (BERGER et al., 2014). O sistema fibrinolítico é o responsável pela subsequente degradação dos coágulos na total regeneração do tecido danificado. Alterações de qualquer um dos componentes desse mecanismo comprometem a hemostasia podendo resultar em trombose ou hemorragia (DAHLBÄCK, 2000).

A coagulação sanguínea consiste na sequência ativada de diferentes fatores plasmáticos que ocorre em três fases principais: iniciação, amplificação e propagação. Essas três fases acontecem em conjunto e em diferentes superfícies celulares, que focalizam o ferimento e garantem a ativação de todo o sistema e restringe o local da lesão tecidual. A iniciação acontece em células extra vasculares, na sua superfície, principalmente fibroblastos, e depende da expressão do fator tecidual, sendo responsável pela formação de trombina em pequenas quantidades. A trombina que foi gerada no local da lesão tem a função de ativar as plaquetas e outros fatores, que vão estimular a sua agregação no local da lesão. Assim, a superfície necessária é então preparada para a montagem de complexos de protrombinase e tenase, que participam nas fases de amplificação e propagação. Grandes quantidades de trombina são produzidas nessas fases de amplificação e propagação por fatores ativados na superfície das plaquetas aderidas, possibilitando a conversão de moléculas de fibrinogênio em coágulos de fibrina (BERGER et al., 2014).

O sistema de coagulação é formado por elementos celulares (principalmente plaquetas e células endoteliais) e proteínas (fatores de coagulação e fibrinólise, cofatores e proteínas inibitórias) (NEURATH, 1983). A cascata de coagulação (Figura 1) apresenta as reações enzimáticas divididas em dois sistemas distintos, a via extrínseca e a via intrínseca (RODRIGUES et al., 2012).

Figura 1 - Modelo clássico da cascata de coagulação sanguínea



Fonte: Rodrigues et al. (2012)

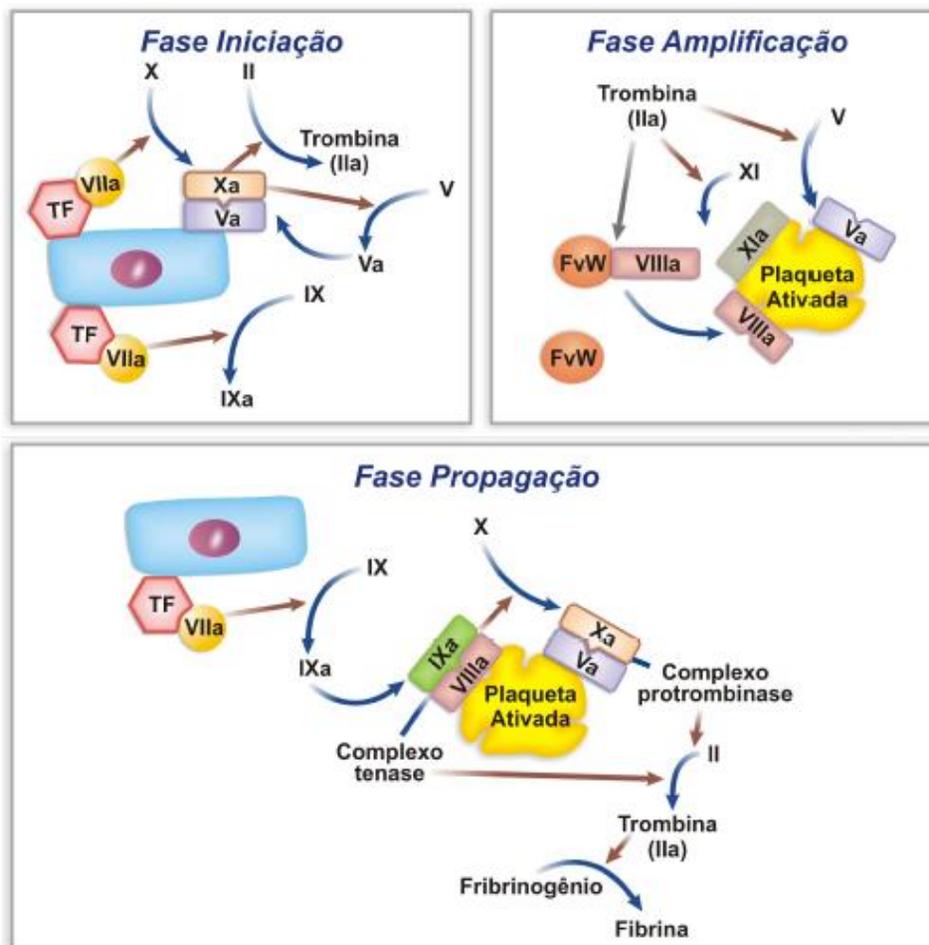
A via extrínseca ocorre quando a substância ativadora da protrombina é gerada em resposta ao contato do sangue com os tecidos extravasculares. A ativação do fator VII, pelo fator tecidual, produz a ativação do fator X, então o tecido que sofreu o trauma desprende um complexo contendo diversos fatores, conhecidos como fatores teciduais ou tromboplastina tecidual. O fator III, o cálcio e o fator VII formam um complexo com fosfolipídeos que atua na transformação do fator X em fator Xa (CARLOS; FREITAS, 2007). Esse complexo protrombinase, FXa/FVa/Ca²⁺/fosfolipídeos é responsável pela conversão da protrombina em trombina. A principal ação da trombina é catalisar a proteólise do fibrinogênio em monômeros de fibrina solúveis. Em seguida, os monômeros de fibrina sofrem ação do complexo trombina/FXIIIa/Ca²⁺, gerando enfim, o coágulo de fibrina insolúvel (HOFFMAN, 2003).

A via intrínseca começa pelo contato do sangue com a superfície do endotélio normal e das células sanguíneas. As reações enzimáticas ocorrem em sequência, produzindo o coágulo sanguíneo em várias etapas: fase de contato; ativação do fator X; formação de trombina; formação de fibrina insolúvel. A fase de contato requer quatro proteínas: fator XII, pré-caliceína, fator XI e o cininogênio de alto peso molecular (CAPM). O fator XI, na presença de CAPM, se liga a superfície exposta e é ativado pelo fator XIIa aderido à superfície. O sangue, quando perturbado, faz com que o fator XII se transforme em uma enzima proteolítica. A ativação do fator XII pode ser modulada pelas proteínas de alto peso molecular, a caliceína e o CAPM. A lesão é resultante da liberação de fosfolipídios plaquetários ou fator 3 plaquetário (FP3). O fator XII ativado atua enzimaticamente para ativar o fator XI, assim constitui a

segunda etapa da via intrínseca. O fator XI ativa enzimaticamente o fator IX, então denominado fator IXa, que atua junto ao fator VIIIa, aos fosfolípidios plaquetários e ao FP3, para ativação do fator X (CARLOS; FREITAS, 2007).

Atualmente, o entendimento a cerca da hemostasia considera a inter-relação dos processos físicos, celulares e bioquímicos que se apresentam em uma série de estágios ou fases, e não nas duas vias intrínseca e extrínseca. As fases da coagulação na teoria atual seria a iniciação, amplificação, propagação (Figura 2) e finalização demonstrando o processo que garante a circulação do sangue na forma líquida, exclusiva ao leito vascular. Na iniciação, o endotélio vascular e células sanguíneas circulantes são perturbados, ocorre interação do fator VIIa ativado derivado do plasma com o fator tecidual (FT). Na amplificação, a trombina ativa plaquetas, cofatores V e VIII, e fator XI na superfície das plaquetas. Na propagação, ocorre produção de grande quantidade de trombina, formação de um tampão estável no sítio da lesão e interrupção da perda sanguínea. Na finalização, o processo de coagulação é limitado para evitar oclusão trombótica ao redor das áreas íntegras dos vasos (FERREIRA et al., 2010).

Figura 2 - Novo modelo da cascata de coagulação sanguínea



Fonte: Rodrigues et al. (2012)

Assim, em condições normais, os vasos sanguíneos devem constituir um sistema tubular não trombotogênico capaz de desencadear, por mecanismos locais, os processos que iniciem a coagulação e que, após a recuperação da lesão anatômica, possam remover o coágulo e restabelecer a circulação local (fibrinólise) (CAGNOLATI et al., 2015).

A coagulação e a fibrinólise são os dois importantes eventos proteolíticos na hemostasia associados com a cicatrização de feridas. Uma lesão na pele e em tecidos moles é reparada por processo de cicatrização (DASH; MURTHY, 2011). Este processo é constituído de três fases: a inflamação, a proliferação e a remodelação (GUO; DIPIETRO, 2010). Na primeira fase ocorre interação entre tipos diferentes de células e matriz extracelular com ativação de mediadores da inflamação. Na segunda fase ocorre a reepitelização com formação de tecido de granulação e matriz extracelular, além de angiogênese. Na terceira fase há a substituição do colágeno e apoptose das células do epitélio que será descartado, assim a cicatriz é formada (EBELING et al., 2014).

Na busca por novos compostos naturais, que atuam induzindo ou inibindo a coagulação sanguínea, diversas espécies vegetais têm se mostrado valiosas fontes de princípios terapêuticos. Os primeiros registros feitos por civilizações já relatavam o uso de plantas medicinais com o intuito de aumentar o processo de cicatrização de feridas, sendo usados principalmente óleos vegetais e vinho (BARROS et al., 2014).

Clinicamente são utilizadas ainda hoje diversas substâncias isoladas de plantas, assim como muitas destas serviram como protótipos para a síntese de novos fármacos (VIEGAS; BOLZANI; BARREIRO, 2006). Estima-se que 40% dos medicamentos que estão disponíveis na terapêutica foram desenvolvidos a partir de fontes naturais: 25% de plantas, 13% de micro-organismos e 3% de animais (NEWMAN; CRAGG, 2007).

2.2 Plantas medicinais

Vários povos, entre eles, gregos e egípcios, tratavam doenças se utilizando de plantas, visto que nos tempos antigos o homem recorria à natureza em busca de recursos para garantir sua sobrevivência e melhoria da condição de

vida (PONTES et al., 2003). Dados da Organização Mundial de Saúde revelam que cerca de 80% da população mundial utiliza os vegetais na busca da cura para diversas doenças, ainda sem indicação clínica. Neste contexto, pesquisas na área de plantas medicinais podem contribuir para o uso consciente das plantas por meio da elucidação de mecanismos de ação terapêutica e indução de toxicidade, além de possibilitar o desenvolvimento de novos medicamentos, com maior segurança e com custos mais acessíveis a população (MAMEDE; PASA, 2014).

O Brasil é conhecido, internacionalmente, por possuir uma das maiores e mais diversificadas reservas florestais existentes no mundo. Essa flora tem sido potencialmente destacada no meio científico para fins medicinais, mas ainda é insuficiente o conhecimento acerca de sua aplicabilidade, principalmente quando consideramos apenas trabalhos científicos com ampla caracterização farmacotóxica de extratos e compostos isolados (MALAFAIA et al., 2006). Em torno de 80% da população brasileira não tem acesso aos medicamentos de primeira necessidade, ressaltando a importância das plantas medicinais, de fácil obtenção, manuseio e custo, que passam a ser a primeira ou até mesmo a única alternativa terapêutica de acesso à saúde (NOLLA; SEVERO, 2005). Em grandes cidades brasileiras e nas regiões mais pobres do país, as plantas medicinais são cultivadas em quintais e até mesmo vendidas em mercados populares e feiras livres (MACIEL; PINTO; VEIGA JR., 2002).

As plantas são usadas na medicina popular de diferentes maneiras, tais como infusão, decocção, maceração, cataplasma, compressas, inalação e em forma de chás. Estudos farmacológicos têm mostrado que extratos e frações de algumas plantas usadas pela medicina popular possuem atividades anti-inflamatória, antiviral, antiofídica, entre outras (MELIM, 2009). Existe uma diversidade de espécies sendo utilizadas contendo atividades antioxidantes e propriedades que ajudam na cicatrização de feridas (BRITO; CARVALHO; ALBUQUERQUE, 2007) como, por exemplo, as espécies *Averrhoa carambola*

(Oxalidaceae) (MORESCO et al., 2012), *Sideroxylon obtusifolium* (Sapotaceae) (LEITE et al., 2015), *Caesalpinia férrea* (Fabaceae), *Aloe vera* (Asphodelaceae) (SOARES et al., 2013), *Mauritia flexuosa* L. (Arecaceae) (BARROS et al., 2014), *Serjania erecta* (Sapindaceae) (FERNANDES et al., 2011), *Geoffroea decorticans* (Fabaceae) (COSTAMAGNA et al., 2016).

Espécies reativas como o óxido nítrico, oxigênio singlete, peróxido de hidrogênio, superóxido, hidroxila e peroxil (CENCIONI et al., 2013), desempenham um relevante papel em várias manifestações patológicas (LARANJINHA, 2011). Isto é devido ao potencial destas espécies reativas, quando presentes em quantidade excessiva nos organismos, induz ao estresse oxidativo, afetando a fisiologia celular e levando a inflamação crônica, câncer, aterosclerose, doenças vasculares, neurológicas, pulmonares, entre outras (CENCIONI et al., 2013). Diversas plantas têm demonstrado rica composição em compostos fenólicos, e contêm moléculas com propriedades antioxidantes podendo citar as espécies *Amaranthus viridis*, *Amaranthus spinosus*, *Altemanthera sessilis*, *Altemanthera philoxeroides*, *Senna tora*, *Centella asiática*, *Commelina benghalensis*, *Moringa oleifera*, *Murraya koenigii*, *Oxalis comiculata*, *Oxalis corymbosa*, *Physalis angulata*, *Piper retrofractum*, *Spilanthes calva* e *Zanthoxylum rhetsa* (TUKUN et al., 2014).

Compostos de origem vegetal, que representam diversas classes químicas, apresentam atividade anti-inflamatória cientificamente comprovada. Destacam-se, entre eles, os terpenos, taninos, alcaloides, lignanas, saponinas, cumarinas e flavonoides. Assim, diversas plantas medicinais são utilizadas popularmente no tratamento de patologias que envolvam processos inflamatórios e desordens do sistema imune (COUTINHO; MUZITANO; COSTA, 2009). Desta forma como muitas formulações tecnologicamente mais sofisticadas têm sido desenvolvidas pelo homem, fazendo uso de compostos vegetais (LORENZI; MATOS, 2002).

Contudo, a utilização de plantas medicinais começou a ser cientificamente investigada em uma série de países, buscando não apenas a comprovação de sua eficácia terapêutica, mas também da segurança de seu uso para o consumo humano (MAENTHAISONG et al., 2007).

A *Aloe vera*, conhecida popularmente como babosa, tem sido uma das plantas mais estudadas e usadas para acelerar o processo de cicatrização de tecidos cutâneos. Esta espécie pertencente à família Liliaceae e, como a maioria das plantas tropicais, se desenvolve facilmente em temperaturas quentes e climas secos. As folhas de *A. vera* contêm um gel rico em enzimas, vitaminas, sais minerais e aminoácidos que são indispensáveis ao homem (MAENTHAISONG et al., 2007; BACH; LOPES, 2007; RAMOS; PIMENTEL, 2011). Outra espécie de importância popular com atividade hipoglicêmica, anti-inflamatória, emoliente, digestiva e cicatrizante é a *Sedum dendroideum* (bálsamo), pertencente à família Crassulaceae. Entre as substâncias ativas encontradas nesta planta destacam-se alguns flavonoides como o kaempferol e o kaempferitrin como os mais abundantes presentes nesta espécie (DE MELO et al., 2005; SILVA et al., 2014).

A cura de feridas é um processo biológico extremamente complexo, dividido em fases, como a inflamação, formação de novo tecido e remodelação. Várias plantas de espécies e famílias diferentes são utilizadas no tratamento de reparo de feridas, elas contêm propriedades anti-inflamatórias, anestésica e cicatrizante (VELNAR; BAILEY; SMRKOLJ, 2009). Como exemplos temos a aroeira, *Myracrodruon urundeuva*, família Anacardiaceae (DANTAS, 2007); a babosa, *A. vera* L., família Asphodelaceae (SOARES et al., 2013); o barbatimão, *Stryphnodendron barbatiman*, família Fabaceae (DANTAS, 2007); o buriti, *Mauritia flexuosa* L., família Arecaceae (BARROS et al., 2014); o cajueiro roxo, *Anarcadium occidentale*, família Anacardiaceae (DANTAS, 2007); a cáscara sagrada, *Rhamnus purshianus*, família Ramnaceae (MELLO; MELLO;

LANGELOH, 2009); o confrei, *Symphytum officinale* L., família Boraginaceae; a copaíba, *Copaifera cearenses*, família Fabaceae; o cumarú, *Amburana cearenses*, família Fabaceae; o ipê roxo, *Tabebuia avellanedae*, família Bignoniaceae (DANTAS, 2007); o pau-ferro, *Caesalpinia ferrea*, família Fabaceae (SOARES et al., 2013); a quixabeira, *Sideroxylon obtusifolium*, família Sapotaceae (LEITE et al., 2015); a romã, *Punica granatum* L., família Lythraceae (DANTAS, 2007).

Shivalingu et al. (2015), utilizaram em seu trabalho os testes de atividade caseinolítica, fibrinogenolítica e coagulante para avaliar diferentes espécies vegetais, entre elas está a *Curcuma longa*, que é uma planta tradicionalmente utilizada para estancar sangramentos e auxiliar na cicatrização de feridas.

Esforços estão sendo concentrados na descoberta e desenvolvimento de produtos naturais provenientes de plantas que contêm anticoagulantes, anti-trombolíticos e atividade trombolítica (BRIGGS et al., 2001). Algumas partes de diversas plantas, em especial frutos e folhas têm sido estudados a fim de avaliar sua atividade anti-coagulante, anti-plaquetária e atividade fibrinolítica, e há evidências de que o consumo de tais plantas leva a prevenção de eventos coronarianos e acidente vascular cerebral (TORRES-URRUTIA et al., 2011). Segundo Emran et al. (2015), o extrato bruto de *Trema orientalis* e *Bacopa monnieri* tiveram significativa atividade trombolítica, e os extratos bruto de *Capsicum frutescens*, *Brassica oleracea* (couve-flor) e *Urena sinuata* apresentaram atividade trombolítica moderada.

A análise da atividade trombolítica de plantas medicinais comprovou que a *Averrhoa bilimbi* da família Oxalidaceae, a *Clerodendrum viscosum* L. da família Verbanaceae, *Drynaria quercifolia* da família Polypodiaceae (ALI et al., 2014) e a *Enhydra fluctuans* Lour da família Asteraceae têm significativa atividade trombolítica. Estas espécies possuem composição rica em taninos,

saponinas e alcaloides que são capazes de participar na degradação de coágulos (ALI et al., 2013).

O extrato etanólico das folhas de *Brownea rosademonte* apresentou significativa atividade anticoagulante e anti-hemorrágica *in vitro* sobre os efeitos induzidos pela peçonha de serpentes da espécie *Bothrops asper*. O extrato prolongou o tempo de coagulação do plasma citratado quando previamente incubado com a peçonha indutora de coagulação (SALAZAR et al., 2014).

Compostos vegetais isolados também têm sido avaliados, como, por exemplo, um diterpenóide obtido do extrato etanólico da erva *Leonurus japonicus* que apresentou atividade coagulante *in vitro*, este composto induziu um aumento nos níveis de fibrinogênio, o que faz com que seja um potencial coagulante (PENG; XIONG; ZHAO, 2013). As saponinas apresentam vários efeitos biológicos, entre eles a atividade hemolítica. A hemólise corresponde ao mais rápido bioensaio empregado para detectar e quantificar algumas saponinas em materiais vegetais (CHOI et al., 2001). Hassan et al. (2010), investigaram quatro espécies de plantas ricas em saponinas, quillaja, mandioca, soja e yucca. Estes autores observaram que o extrato metanólico de quillaja exibiu significativa atividade hemolítica, sendo esta mais elevada do que a observada para a mandioca e a soja.

Existem relatos de diversos trabalhos que se utilizaram da atividade fibrinogenolítica, tais como, o de Félix-Silva et al. (2014), que relataram a ação do extrato aquoso das folhas de *Jatropha gossypifolia* L. (Euphorbiaceae) em inibir esta atividade proteolítica induzida por peçonha de serpentes da espécie *Bothrops jararaca*; o de Fernandes et al. (2011), que constataram impedimento da degradação total do fibrinogênio por peçonhas de serpentes quando incubadas com extratos metanólico das partes aéreas de *Serjania erecta*. O extrato aquoso da casca do caule de *Mangifera indica* L. em diferentes quantidades, inibiu a atividade proteolítica do veneno de *Daboia russellii* (DHANANJAYA et al.,

2011). A enzima Batx-I, isolada de uma peçonha de serpente, degrada cadeias α e β do fibrinogênio, o extrato etanólico das folhas de *Renealmia alpinia* quando incubado com esta enzima, não evitou a degradação da cadeia α , mas impediu a degradação da cadeia β (PATIÑO; BENJUMEA; PEREAÑEZ, 2013).

Avaliações dos efeitos dos extratos das sementes de *Cassia tora* L. e *Senna tora* L. sobre proteases isoladas de *Bacillus sp* e *Aspergillus flavus*, utilizando o teste caseinolítico, demonstraram uma redução progressiva da atividade proteolítica (TRIPATHI; KUMAR; GARG, 2011). Extratos vegetais têm se mostrado ativos em inibir a quebra do substrato caseína, induzida por peçonhas de serpentes (DE PAULA et al., 2010; PATIÑO; BENJUMEA; PEREAÑEZ, 2013; FÉLIX-SILVA et al., 2014; MOLANDER et al., 2014).

2.2.1 *Averrhoa*

A família Oxalidaceae compreende mais de 900 espécies destacando-se os gêneros, *Oxalis*, *Biophytum*, *Sarcotheca*, *Dapania*, *Eichleria*, *Hypseocharis* e *Averrhoa* (ZONLEFER, 1994) que representam mais de duzentas espécies, distribuídas principalmente nas regiões tropicais e sub-tropicais do mundo. Dentre as espécies do gênero *Averrhoa* se destacam a bilimbi (*Averrhoa bilimbi* L.) e a carambola (*Averrhoa carambola* L.) (HAYES, 1960).

Das duas espécies, *A. carambola* e *A. bilimbi*, a *A. carambola* é a mais importante, o fruto (Figura 3) é cultivado de forma intensa na Índia e China (HAYES, 1960). Esta planta é um arbusto pequeno que pode crescer até 4-6 metros de altura (PANIZZA, 1998). O seu fruto é o único que possui forma de estrela e rico na cor dourada, sendo consumido como fruto fresco e em preparos de geleias, ele fornece um considerável potencial de mercado sendo também usados como enfeites em saladas e bebidas.

Figura 3 – Fruto da *Averrhoa carambola*

Fonte: França e Jorge (2013)

Em alguns países asiáticos, o fruto é apreciado verde, em contraste nos países ocidentais, o fruto é ingerido quando em estágios maduros, apresentando cor amarela (NARAIN et al., 2001). É baixo em calorias e rico em vitamina C, vitamina A, cálcio e potássio (AVINASH; SWAPNEEL; ANITA, 2012). No Brasil, o seu cultivo é feito em pomares domésticos para a produção de frutos, e em várias regiões do país os frutos e folhas (Figura 4) são utilizados na medicina popular. Recomenda-se o suco do fruto para dietas de emagrecimento, mas o fruto contém ácido oxálico em quantidades elevadas, assim, pessoas com sensibilidade a esse ácido e/ou com enfermidades renais devem restringir seu consumo (LORENZI; MATOS, 2002). A elevada porcentagem de ácido oxálico resulta em efeito estimulante de apetite, febrífugo, antidesintérico e antiescorbútico (PROVASI et al., 2005).

Figura 4 – Folha da *Averrhoa carambola*

Fonte: França e Jorge (2013)

Entretanto, comprovou-se que o ácido oxálico contido no suco do fruto de *A. carambola* causa intoxicação em pacientes que fazem hemodiálise. A intoxicação relatada é provavelmente resultante da presença de uma neurotoxina no fruto (PROVASI et al., 2005). O oxalato é nefrotóxico e se encontra em altas concentrações em determinados frutos, vegetais e castanhas. Quando ingerido em jejum, os sais solúveis do oxalato são absorvidos com rapidez e se depositam nos túbulos renais, provocando lesão renal aguda ou estimulando o desenvolvimento de doença renal crônica (MOYSES NETO; VIEIRA NETO; DANTAS, 2010). O oxalato pode induzir obstrução, dilatação e reações inflamatórias nos túbulos, além de apoptose em células epiteliais (MISIARA, 2013). Ao contrário do fruto, o extrato hidro alcóolico das folhas não induziu toxicidade aguda quando avaliado *in vivo* (PUSHAPARAJ; TAN; TAN, 2001).

Distúrbios no sistema nervoso central de alguns pacientes que apresentavam distúrbios renais e observações de alterações clínicas frequentes relacionadas à ingestão dos frutos da *A. carambola* impulsionaram a realização de estudos mais aprofundados sobre a toxicidade dos frutos desta planta. Estudos realizados com injeção de diferentes doses de extrato obtido dos frutos de

carambola na cavidade peritoneal de camundongos, e na cavidade injeção intracerebro, resultaram em indução de epilepsia tônico-crônica, indicando uma possível atividade convulsivante. A toxina encontrada nos frutos de *A. carambola* possui baixo peso molecular, podendo o fruto ser ingerido por organismos saudáveis, sendo a toxina excretada pela via renal. Em organismos com insuficiência renal, não ocorreria à excreção adequada desta toxina, levando a níveis séricos elevados dessa neurotoxina, permitindo assim a sua passagem pela barreira hemato-encefálica com ação no sistema nervoso central (RODRIGUES et al., 2010).

Apesar do potencial tóxico relatado para os frutos de *A. carambola*, este possui alto valor nutritivo, sendo relevante para a saúde humana. Em adição, várias partes da planta têm sido utilizadas pela medicina por apresentar atividade anti-inflamatória (folhas), atividade antioxidante (hastes e frutos), atividade antimicrobiana, hipocolesterolêmico, hipolipidêmica e hipoglicemiante (frutos e extratos de resíduos dos frutos), além de suas enzimas terem efeitos sobre o metabolismo apresentando, por exemplo, atividade antiúlcera (SINDHU; CHINNA; DIPANKAR, 2013). Esses antioxidantes e especialmente compostos polifenóis, reagem contra espécies reativas de oxigênio, contudo estudos fitoquímicos dos frutos de *A. carambola* têm demonstrado alto potencial de aplicação médica (CABRINI et al., 2011).

Na medicina popular a *A. carambola* é usada para o tratamento de dores de cabeça, vômitos, tosse e ressacas, estimulante de apetite, diurético, antidiarreico, agente febrifugal, (CABRINI et al., 2011), aflições nos olhos, dor de garganta, dor de dente, disúria, escorbuto, febre, hiperdipsia, hemorroidas, hepatodínia, sarnas e eczemas (GHEEWAILA et al., 2012). *A. carambola* apresenta compostos ativos com ação terapêutica (RUDDER, 2002), contra eczemas. A decoção das folhas é muito usada no tratamento de diabetes (PROVASI et al., 2001). As fibras insolúveis da *A. carambola* retardam a

absorção de hidratos de carbono, assim os níveis de glicose no sangue são altamente reduzidos pelo seu consumo. As fibras podem atuar na prevenção de doenças cardiovasculares, reduzindo os triglicérides no soro e o nível de colesterol total (CABRINI et al., 2011). O extrato alcoólico das hastes de *A. carambola* exibe atividade seletiva contra células de tumor cerebral, enquanto que as folhas apresentam eficácia contra células de carcinoma do fígado e o extrato aquoso das folhas inibe inotropismo atrial em cobaias (MORESCO et al., 2012).

A *A. carambola* é rica em flavonoides bioativos (KHANAM et al., 2015). Segundo Cabrini et al. (2011), as folhas da *A. carambola* apresentaram um efeito anti-inflamatório tópico em modelos de ratos com inflamação cutânea. Os autores induziram edema superficial utilizando o óleo de cróton, extraído de *Trigium L.*, (Euphorbiaceae), que provoca irritação cutânea. A aplicação tópica do óleo de cróton promove reação inflamatória aguda caracterizada por vasodilatação, infiltração de leucócitos polimorfonucleares e formação de edema nos tecidos. A proteína cinase C (PKC) aciona essas alterações promovendo aumento da atividade de fosfolipases A₂ (PLA₂s), que induz aumentos nos níveis de ácido araquidônico e seus metabólitos, como prostaglandinas, prostaciclina, tromboxanos e leucotrienos. Em adição, a PKC promove a secreção e ativação de diversos mediadores, como as citocinas e quimiocinas que aumentam e mantêm a resposta inflamatória na pele. Contudo, ainda fazem-se necessários estudos mecanicistas que apontem interações entre princípios ativos vegetais e moléculas e/ou células presentes em nosso organismo, com vistas a melhor compreensão dos efeitos terapêuticos observados.

O óxido nítrico (NO) é um potente mediador de processos fisiológicos, tais como relaxante de músculo liso, sinalizador neuronal, inibidor da agregação de plaquetas e regulador da toxicidade mediada por células. Em adição, também é um radical com ação vasodilatadora, antimicrobiana e atividade antitumoral.

Embora o NO e seus radicais superóxido estejam envolvidos na defesa do hospedeiro, a produção desses radicais pode contribuir para a patogênese de algumas doenças inflamatórias, o NO reage com o íon do superóxido formando peroxinitrito, que apresenta potencial altamente citotóxico (GUO et al., 1999). Inibidores de NO como os extratos das hastes de *A. carambola* têm demonstrado efeitos benéficos quanto a aspectos relacionados a danos teciduais observados em doenças inflamatórias (SINDHU; CHINNA; DIPANKAR, 2013). Várias patologias estão envolvidas no processo inflamatório, entre elas estão contusões, tendinites, infecções respiratórias, asma e doenças autoimunes (COUTINHO; MUZITANO; COSTA, 2009).

2.2.2 Plantas antiofídicas

As plantas medicinais apresentam um potencial promissor no tratamento contra envenenamentos, o que gera muito interesse entre os pesquisadores (AMBIKABOTHY et al., 2011). A toxicidade da peçonha de serpentes se deve a uma complexa mistura de substâncias tóxicas e digestivas com teor lipídico, glicídico e principalmente protéico que desencadeiam ações letais, distúrbios na coagulação e no sistema nervoso, miotoxicidade, indução de edema e consequentemente algesia e inflamação (SILVA et al., 2012), em que todas essas podem ser minimizadas ou até inibidas por extratos vegetais (MARCUSSE et al., 2011). Extratos de plantas contém uma grande diversidade de compostos químicos que apresentam várias atividades farmacológicas, esses extratos são utilizados popularmente no tratamento de pessoas acidentadas por serpentes peçonhentas (AHMED et al., 2010).

A *Bellucia dichotoma* Cogn. pertencente a família Melastomataceas, é popularmente conhecida como muúba ou goiaba de anta, é encontrada em alguns estados brasileiros como Acre, Amazônia, Amapá e Pará, sendo uma planta

nativa da região amazônica (BAUMGRATZ, 2013), e sua casca tem sido utilizada na medicina popular em forma de um chá (decoção) para tratar picadas de serpentes nas comunidades no oeste do estado do Pará (MOURA et al., 2013). MOURA et al. (2014), prepararam um extrato aquoso de acordo com o tradicional método utilizado pelas comunidades locais, no extrato foi encontrado flavonoides, terpenoides e taninos hidrolisáveis que inibiram a atividade hemorrágica quando incubado com a peçonha de serpente da espécie *Bothrops atrox*. O extrato aquoso de *Bellucia dichotoma* também inibiu a atividade edematogênica do veneno bruto de *B. atrox*.

Outra planta nativa do estado do Amazonas é a *Marsypianthes chamaedrys* (Lamiaceae), esta planta é utilizada por comunidades rurais de forma oral e também como cataplasma no tratamento contra picada de serpente para aliviar os efeitos secundários do veneno (MAGALHÃES et al., 2011). Já foi isolado da *Marsypianthes chamaedrys*, esteroides (lupeol e sitosterol), flavonoides (rutina) que apresentaram ação anti-inflamatória, ação antinociceptiva e ação antiedematogênica (PEREIRA; GONÇALVES; PEREIRA, 1992). O extrato aquoso das partes aéreas apresentou atividade antifosfolipásica e anticoagulante sobre o veneno de *B. atrox*. Esses resultados mostraram a importância de como o conhecimento popular é relevante na busca por medicamentos fitomedicinais eficazes (MAGALHÃES et al., 2011).

Moura et al. (2013), avaliaram extratos de plantas *Connarus favosus* Planch, *Plathyenia reticulata* Benth, *Aniba fragrans* Ducke, *Philodendron megalophyllum* Schott e constataram atividade anti-hemorrágica nestes extratos contra veneno bruto da serpente *B. atrox*. As enzimas metaloproteases contida nos venenos têm elevada importância nos casos de envenenamento (FOX; SERRANO, 2008). Diante disso, essa inibição da atividade das metaloproteases pode estar relacionada com a ligação dos compostos químicos contidos nos extratos que inibiram a ação dos venenos (CASTRO et al., 1999).

Esteves et al., (2011) demonstraram a atividade anti-inflamatória de *Casearia sylvestris* (Salicaceae) quando o óleo essencial obtido de suas folhas foi testado na peçonha de *B. alternatus*, e comparado com outros fármacos anti-inflamatórios (dexametazona e prometazina).

Óleos essenciais e extratos etanólicos da folha de *Nectandra angustifolia* (Lauraceae) apresentaram atividade contra a peçonha de *B. neuwiedi*, em que ela inibiu as atividades coagulantes e hemolíticas causadas pelo veneno (TORRES et al., 2011a). Outros compostos que demonstraram atividade contra a *B. neuwiedi pauloensis* foram alcaloides extraídos da folha de *Solanum campaniforme*, inibindo a atividade hemorrágica da peçonha, assim como os efeitos miotóxicos e necrozantes (TORRES et al., 2011b).

Segundo Silva et al., (2012), frações do extrato da espécie *Sapindus saponaria* mostraram significativa inibição de miotoxinas como a BthTX-I e II isoladas de *B. jararacussu* e da atividade da PLA₂ de peçonha de *Crotalus durissus terrificus* (C.d.t.).

Belo et al., (2013), comprovaram a eficácia do extrato de *Hypericum brasiliense* e seu composto isolado, quercetina, contra a atividade miotóxica de serpente do gênero *C. d. t.* e foram além disso e mostraram que o extrato e seu composto isolado neutralizaram os efeitos nocivos induzidos pela serpente (MONTECUCCO; GUTIÉRREZ; LOMONTE, 2008). Outro estudo que demonstrou a atividade da *H. brasiliense*, foram o de Assafim, Coriolano e Fuly (2011), o efeito da planta reduziu a letalidade produzida pela peçonha de *B. jararaca*.

Um composto isolada de *Primula denticulata* apresentou um potencial inibitor de lipooxigenases e foi capaz de inibir em 40% a atividade de uma SPLA₂ isolada da peçonha de *C. d. t.* (COTRIM et al., 2011).

A planta *Curcuma zedoaroides* (Zingiberaceae) tem despertado a atenção de pesquisadores, sendo esta amplamente utilizada na Tailândia de forma

popular. O rizoma desta planta é utilizado via oral ou uso tópico sobre a pele e tem demonstrado eficácia contra pessoas acidentadas por serpente (LATTMANN et al., 2010). Moradores aplicam o rizoma em pó diretamente na mordida ou comem normalmente de 50-100g do rizoma (GILON; SHALEY; BENBASSAT, 1989). Do extrato de *Curcuma zedoaroides* isolou-se um composto que, antagonizou o efeito tóxico do veneno de serpente da espécie *Ophiophagus hannah*. Assume-se que a fração do composto isolado atuou como um modelo para reconhecimento molecular guiando o terpeno irreversivelmente ao alvo peptídico (veneno). O complexo que se forma é incapaz de bloquear os receptores da acetilcolina. Esse composto pode levar a novas aplicações medicinais (LATTMANN et al., 2010).

Polifenóis isolados de plantas tem-se mostrado interagir com enzimas de venenos de serpentes agindo como um antídoto (BORGES et al., 2005). O chá das folhas de *Camellia sinensis* L. (Theaceae) é muito usado popularmente e é rica fonte de polifenóis (CAVALCANTI et al., 2007). Pithayanukul, Leanpolchareanchai e Bavovada (2010), inibiram a atividade PLA₂s, protease e hemorrágica de duas espécies de venenos de serpente, a *Calloselasma rhodostoma* Kuhl (Viperidae) e a *Naja naja kaouthia* (Elapidae). Para Ketelhut et al. (2003), a atividade PLA₂s são capazes de quebrar as membranas dos eritrócitos. Portanto, os chás de *Camellia sinensis* inibiram a atividade PLA₂s de ambos os venenos e pode resultar na prevenção da ruptura de eritrócitos e, assim, diminuir a hemorragia nos tecidos locais (PITHAYANUKUL; LEANPOLCHAREANCHAI; BAVOVADA, 2010).

O extrato metanólico da raiz de *Emblica officinalis* Linn (Euphorbiaceae), neutralizou a atividade hemorrágica, desfibrinogenante, edema, PLAs, miotoxicidade, cardiotoxicidade, neurotoxicidade e letalidade dos venenos de duas serpentes *Naja kaouthia* e *Vípera russellii*. Moradores de zonas rurais aplicam o extrato na forma de uma pasta sobre a área afetada (SARKHEL

et al., 2011). A *Emblica officinalis* Linn é uma planta indiana, popularmente conhecida como Amloki e é bastante conhecido seu potencial antiofídico, há relatos de trabalhos científicos com animais experimentais (ALAM; GOMES, 2003).

Ambikabothly et al. (2011) não conseguiram *in vivo* demonstrar a eficácia da neutralização do veneno de *Naja kaouthia* pelo extrato de *Mimosa pudica*, mas comprovaram *in vitro* que compostos tânicos isolados da *Mimosa pudica* interagiram com proteínas do veneno de *Naja kaouthia* neutralizando-as, mostrando assim capacidade de neutralizar o efeito tóxico das proteínas letais (SIA et al., 2011).

2.3 Peçonhas de serpente

As peçonhas de serpente são obtidas a partir de glândulas salivares modificadas (DA SILVA et al., 2008; CALGAROTTO et al., 2008). Peçonhas de serpente são misturas de proteínas e peptídeos ativos farmacologicamente (HARVEY, 1991; TU, 1991), combinações complexas de proteínas, na qual diversas moléculas diferentes podem ser detectadas usando eletroforese bidimensional (VALENTE et al., 2009). As principais toxinas presentes em peçonhas de serpentes são as serinoproteases, metaloproteases, L-aminoácidos oxidases e fosfolipases A₂ (PLA₂s). As peçonhas contém ainda substâncias como desintegrinas, lectinas do tipo C, peptídeos miotóxicos, neurotoxinas, citotoxinas e potenciadores de bradicinina (CALVETE et al., 2009). As enzimas encontradas nas peçonhas de serpente são em sua maioria hidrolases que desagregam moléculas biológicas como proteínas, ácidos nucleicos e fosfolipídios.

Peçonhas botrópicas e crotálicas são ricas principalmente em metaloproteases e serinoproteases (KINI; KOH, 2016). As metaloproteases de peçonha de serpente (SVMPs) são enzimas endoproteolíticas que dependem de

Zn²⁺ e são classificadas em três classes diferentes: P-I, P-II e P-III (DU; CLEMETSON, 2002; FOX; SERRANO, 2005). As SVMPs clivam um número pequeno de proteínas da cascata de coagulação e da agregação plaquetária seletivamente. Essas proteólises limitada, conduz a ativação ou inativação das proteínas envolvida nos processos, o que resulta em interferência na coagulação sanguínea e agregação plaquetária (KINI; KOH, 2016).

As serinoproteases de peçonhas de serpente (SVSPs) são glicoproteínas em sua maioria, com números de sítios de glicosilações N- ou O- distintos, o que diferencia umas das outras (RODRIGUES, 2010) e atuam sobre um grande número de substratos proteicos (SAJEVIC; LEONARDI; KRIZAJ, 2011). As SVSPs agem sobre o fibrinogênio e participam da quebra do fator V e da proteína C, que estão presentes na cascata de coagulação (MATSUI; FUJIMURA; TITANI, 2000). Elas atuam sobre o fibrinogênio de forma semelhante a trombina, no qual possuem certa homologia (CASTRO et al., 2004). As SVSPs podem também apresentar atividade fibrinolítica, agindo sobre a fibrina e liberar fibrinopeptídeo A e/ou B, degradando coágulos e aumentando ocorrências de hemorragia (SAJEVIC; LEONARDI; KRIZAJ, 2011).

Peçonhas de serpentes são ricas fontes de enzimas PLA₂s que se mostram uma notável diversidade funcional. As PLA₂s de peçonhas de serpente (svPLA₂s), podem induzir diversos efeitos como cardiotoxicidade, miotoxicidade, pré ou pós-sináptica neurotoxicidade, edema, hemólise, hipotensão, convulsão, inibição da agregação plaquetária e anticoagulação (GUTIÉRREZ; LOMONTE, 1995; TEIXEIRA et al. 2009). As svPLA₂s catalisam a hidrólise de ligações éster-2-acil de 3-sn-fosfolipídios que produzem ácidos graxos e lisofosfolipídios (YU et al., 1998).

As PLA₂s foram recentemente dividida em grupos baseando-se em 15 critérios estruturais e bioquímicos, levando-se em consideração o peso molecular, o perfil das ligações dissulfeto, os substratos de fosfolipídios, a

sequência de aminoácidos e quanto a sensibilidade do íon Ca^{2+} (BALSINDE et al., 1999; SIX; DENNIS, 2000).

Peçonhas de serpente são ricas especialmente em PLA_2s dos grupos I e II, que estão presentes nas famílias Elapidae e Viperidae, respectivamente (FARIA et al., 2001; FERNÁNDEZ et al., 2010). As fosfolipases A_2 secretadas (s PLA_2s), são conhecidas por regular a via do ácido araquidônico, na qual mediadores pró-inflamatórios de inflamação são libertados (NANDA et al., 2007). Foi identificado nas peçonhas de serpente dois grupos de s PLA_2s (GI e GII). O grupo I que inclui sv PLA_2s de Elapidae com 115-120 resíduos de aminoácidos e são homólogas as PLA_2s de pâncreas de mamíferos.

O grupo II compreende as sv PLA_2s de Crotalidae e Viperidae com 120-125 resíduos de aminoácidos (BURKE, DENNIS, 2009). Estes grupos de sv PLA_2s são conhecidos por exibir uma ampla variedade de efeitos fisiológicos e patológicos como indução de reações inflamatórias (DOLEY; ZHOU; KINI, 2010). As PLA_2s miotóxicas isoladas do gênero *Bothrops* pertencem ao grupo II e pode ser dividida em duas subclasses: (1) miotoxinas Asp49 que contém atividade catalítica moderada; (2) variantes Lys49, miotoxinas sem atividade hidrolítica sobre o substrato (GUTIÉRREZ; LOMONTE, 1997; OWNBY et al., 1999).

Foi isolado da peçonha de *Bothrops jararacussu*, duas miotoxinas básicas, a Bothropstoxina I (BthTX-I) e a Bothropstoxina II (BTX-II). A BthTX-I não apresentou atividade fosfolipásica sobre fosfolipídios de gema de ovo, enquanto a BthTX-II revelou ter atividade catalítica relativamente baixa (HOMSI-BRANDERBURGO et al., 1988; ANDRIÃO-ESCARSO et al., 2002). A determinação da estrutura primária revelou que a BthTX-I foi uma variante Lys49 (CINTRA et al., 1993), enquanto a BthTX-II era uma miotoxina Asp49 (PEREIRA et al., 1998). Os efeitos tóxicos e farmacológicos das peçonhas de serpente diferem nas isoformas ácidas, como por exemplo, foi isolado uma

PLA₂ ácida da *Lachesis muta* que apresentou atividade proteolítica, anticoagulante e inibidor da agregação plaquetária (SAMMY; GOPALAKRISHNAKONE; CHOW, 2012).

2.4 Inibidores naturais

As fosfolipases A₂ (PLA₂s) têm a habilidade de produzir substratos para gerar mediadores inflamatórios lipídicos, quando um tecido é lesionado e no desenvolvimento de artrite reumatoide, fazendo desta classe de enzimas alvo importantíssimo na busca de novos inibidores de PLA₂ (CHANDRA et al., 2002). Diferentes organismos podem conter inibidores de PLA₂s. A partir da esponja marinha *Luffariella variabilis* pode se extrair o Manoalide (A), um sesquiterpeno não esteroide, que inibe PLA₂s de serpentes, abelhas e mamíferos de forma irreversível (REYNOLDS; MIHELICH; DENNIS, 1991). O extrato aquoso de *Mandevilla illustris* inibiu totalmente a atividade fosfolipásica da peçonha bruta da serpente da espécie *C. d. t.* e de uma PLA₂ isolada da mesma peçonha (BIONDO et al., 2004). O extrato aquoso de *Casearia sylvestris* neutralizou PLA₂s presentes em peçonhas de diferentes espécies do gênero *Bothrops* (BORGES et al., 2001).

O potencial terapêutico de plantas medicinais é atribuído a algumas classes de constituintes, incluindo flavonoides, alcaloides, sesquiterpenos, lignanas, entre outros (MARCUSSE et al., 2007).

Os polifenóis são os antioxidantes mais abundantes na dieta sendo encontrados em cereais, leguminosas, frutos e produtos derivados de vegetais, tais como suco de frutas, chás, café, chocolate e vinho tinto. O consumo de alimentos contendo polifenóis é bastante elevado se comparado com outras classes de fitoquímicos e antioxidantes conhecidos da dieta (SCALBERT; JOHNSON; SALTMARSH, 2005).

Entre os polifenóis se destacam nas pesquisas os flavonoides por trazer benefícios à saúde através de estudos epidemiológicos. Os polifenóis demonstram várias propriedades farmacológicas entre elas a prevenção de doenças neurodegenerativas, diabetes mellitus, doenças cardiovasculares e câncer (LAMBERT et al., 2005). Os antioxidantes ou pro-oxidantes encontrados em polifenóis atuam melhorando a sobrevivência celular, induzindo a apoptose e impedindo o crescimento de tumores, assim, pesquisas estão sendo realizadas visando identificar os efeitos protetores dos polifenóis contra as mais variadas doenças (KHANAM et al., 2015).

Diversas substâncias naturais têm apresentado atividade anti-inflamatória. Entre estas se destacam os flavonoides, taninos, esteroides e terpenos. Essas substâncias interferem em vários componentes da cascata inflamatória (CABRINI et al., 2011).

Bauman, Bruchhausen e Wurm (1980) investigaram a atividade inibitória dos flavonoides contra enzimas que metabolizam o ácido araquidônico. Em continuidade, vários estudos demonstraram o efeito dos flavonoides sobre estas enzimas. O ácido araquidônico é liberado a partir da quebra de fosfolípidios e as enzimas responsáveis são PLA₂s. Muitas isoformas das PLA₂s foram descobertas e classificadas em três grandes categorias, tais como a fosfolipase secretada (sPLA₂), a fosfolipase citosólica (cPLA₂) e a independente de cálcio (iPLA₂). Estas PLA₂s estão distribuídas em uma ampla variedade de células e tecidos (MURAKAMI; KUDO, 2004).

O primeiro flavonoide encontrado que inibiu uma PLA₂ foi a quercetina. A quercetina inibiu uma PLA₂ obtida a partir de neutrófilos humanos (LEE; MATTELIANO; MIDDLETONE, 1982). Flavonóis como o kampferol, a quercetina e a miricetina inibem significativamente a atividade enzimática de PLA₂ de peçonhas de diversas espécies de serpentes (WELTON et al., 1986).

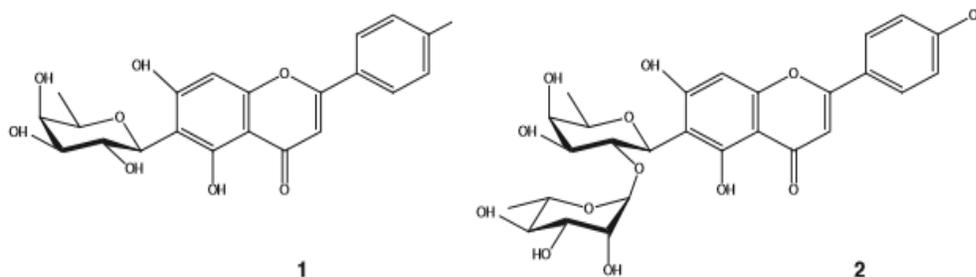
A *A. carambola* é rica nestes compostos, mais precisamente em flavonas (CABRINI et al., 2011). Flavonoides, taninos e triterpenos são alguns compostos identificados nas folhas de *A. carambola* a partir do seu extrato bruto hidroalcoólico (RODRIGUES et al., 2010). Os flavonoides são metabólitos secundários facilmente encontrados em frutos e produtos hortícolas, esses metabólitos também protegem contra a degradação celular, stress, funcionam como moléculas sinalizadoras, fitoalexinas, funcionam como agentes desintoxicantes (BALA et al., 2010). Estudos científicos indicaram que os flavonoides podem ser nutricionalmente úteis na modulação de enzimas envolvidas em diversas doenças, reduzindo assim o risco de desenvolvimento de alguns cânceres, doenças cardíacas e doenças degenerativas relacionadas à idade. Apresentam também um papel quimiopreventivo atuando sobre a transdução de sinais, a proliferação celular e a angiogênese (BALA et al., 2010). Entre os flavonoides mais comuns a quercetina e a kaempferol são os principais representantes (MANACH et al., 2004).

Foi encontrado nas folhas de *A. bilimbi* L., a luteolina. A luteolina é um flavonoide e tem sido identificada como um agente antimalárico com potencial para inibir a enzima Fab I plasmodium (TADESMIR, 2006). Segundo Lehane e Saliba (2008) a luteolina é o mais ativo composto na inibição do crescimento do Plasmodium cepas 3D7 e 7G8 em comparação com outros tipos de flavonoides já estudados (kaempferol, miricetina, quercetina, acacetin, apigenina, baicaleína, chrysin, naringenina e genisteína). Isto indica que o extrato metanólico de folhas de *A. bilimbi* L. possui alto potencial de inibição sobre o crescimento do parasita podendo ser amplamente explorado na busca de um novo medicamento antimalárico (MULIA; TANTULAR; MUGHNI, 2012).

Recentemente, foi isolado da *A. carambola* dois flavonoides, apigenina-6-C- β -fucopyranoside (composto 1) e apigenina-6-C-(2''-O- α -rhamnopyranosyl)- β -fucopyranoside (composto 2) (Figura 5), que apresentaram

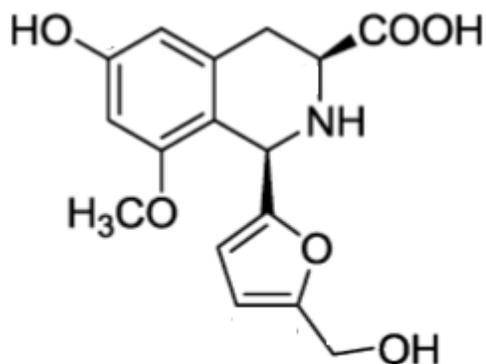
efeitos anti-hiperglicêmicos significativos *in vivo* (CAZAROLLI et al., 2012). Esse efeito deve-se que nos mamíferos, os hidratos de carbono são armazenados na forma de glicogênio, tendo o músculo esquelético e fígado como os principais locais de armazenamento. O metabolismo do glicogênio é regulado por inibição de várias enzimas e proteínas (FERRER et al., 2003). Ambos flavonoides acima revelaram causar um aumento significativo no teor de glicogênio e foram capazes de aumentar a secreção de insulina pelo pâncreas (CAZAROLLI et al., 2012). Foi isolado também recentemente da fruta *A. carambola* dois alcaloides (Figura 6 e 7) que podem apresentar atividades antioxidantes e hipoglicêmicas (YANG et al., 2014).

Figura 5 - Estrutura química da apigenina-6-C- β -fucopyranoside (composto 1) e apigenina-6-C-(2''-O- α -rhamnopyranosyl)- β -fucopyranoside, isolado do extrato etanólico das folhas de *Averrhoa carambola*



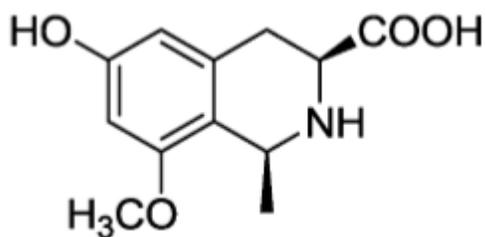
Fonte: Cazarolli et al. (2012)

Figura 6 - (1R*, 3S*)-1-(5-hidroximetilfuran-2-il)-3-carboxi-6-hidroxi-8-metoxil-1,2,3,4-tetrahidroisoquinoline



Fonte: Yang et al. (2014)

Figura 7 - (1S*, 3S*)-1-metil-3-carboxi-6-hidroxi-8-metoxil-1,2,3,4-tetrahidroisoquinoline

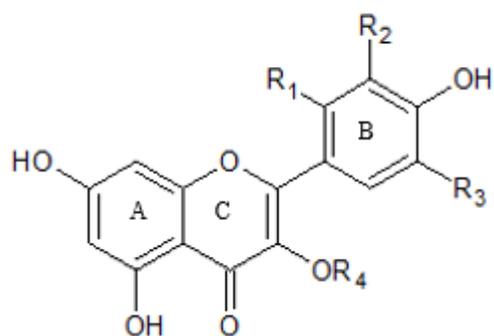


Fonte: Yang et al. (2014)

Sobre a atividade anti-inflamatória dos flavonoides, mas precisamente a quercetina e o kaempferol (Figura 8) (SANTANGELO et al., 2007), estes atuam modulando as células envolvidas na inflamação, inibindo a proliferação de

linfócitos T, reduzindo assim a produção de citocinas pró-inflamatórias (como exemplo, a TNF- α e IL-1), além de regular a atividade das enzimas da via do ácido araquidônico, como as PLA₂s, ciclooxigenases e lipooxigenases, e a enzima formadora de óxido nítrico (NO), a óxido nítrico sintase induzida (iNOS) (COUTINHO; MUZITANO; COSTA, 2009). Há ainda outros flavonoides que tem a capacidade de diminuir a produção de NO e a expressão da enzima iNOS, como exemplo temos as flavonas apigenina, luteolina e crisina (Figura 9) (CAZAROLLI et al., 2008).

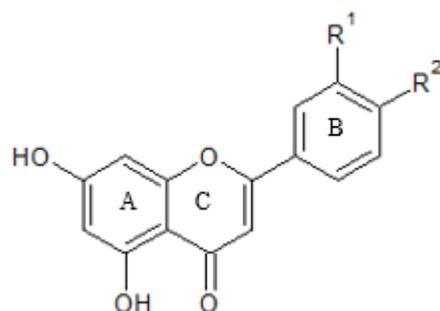
Figura 8 - Exemplos de flavonoides com atividade anti-inflamatória



quercetina R1=H; R2=OH; R3=H; R4=H
kaempferol R1=H; R2=H; R3=H; R4=H

Fonte: Coutinho, Muzitano e Costa (2009)

Figura 9 - Exemplos de flavonoides com atividade anti-inflamatória

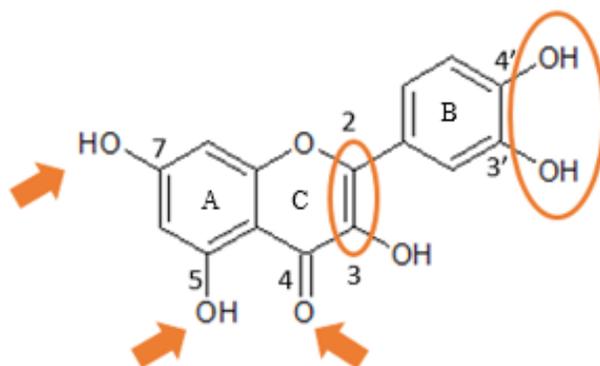


apigenina	R1=H; R2=OH
luteolina	R1=OH; R2=OH
crisina	R1=H; R2=H

Fonte: Coutinho, Muzitano e Costa (2009)

Kim et al. (2004), observaram que o agrupamento das hidroxilas nas posições 5 e 7 (Anel A) e nas posições 3' e 4' (Anel B) tem grande importância no processo de atividade anti-inflamatória, enquanto que a glicosilação desses grupos reduz a atividade anti-inflamatória. Entre os vários fatores estruturais mais importantes para a atividade anti-inflamatória de flavonoides está a instauração do anel C (posições 2-3), o número e a posição de agrupamentos hidroxilas. No entanto, subclasses de flavonoides que não se enquadram no padrão dessa estrutura como a aglicona kaempferol, também apresentaram atividade sobre a enzima da cascata de inflamação. Os requisitos estruturais de um flavonoide com atividade anti-inflamatória aceitos atualmente estão mostrados na Figura 10 (COUTINHO; MUZITANO; COSTA, 2009).

Figura 10 - Requisitos estruturais observados para atividade anti-inflamatória de flavonoides



Fonte: Coutinho, Muzitano e Costa (2009)

2.5 Ensaio propostos

2.5.1 Hemólise

O ensaio hemolítico tem sido amplamente utilizado para avaliar atividade hemolítica de diversos compostos, como parte da caracterização toxicológica, visando obter informações acerca da segurança de seu uso (DE PAULA et al., 2010; FÉLIX-SILVA et al., 2014; ANJOLETTE et al., 2015; ESTRADA-GOMEZ et al., 2015; ZARE-ZARDINI et al., 2015). Em adição, o teste de hemólise também tem sido explorado com o objetivo de caracterizar inibidores de fosfolipases A₂ (PLA₂s) com potencial de aplicação terapêutica (MARCUSI et al., 2007; FERNANDES et al., 2011; FÉLIX-SILVA et al., 2014; MOLANDER et al., 2014; COSTAMAGNA et al., 2016; DHANANJAYA; SUDARSHAN, 2015).

O teste de hemólise, adaptado do ensaio de hemólise indireta descrito por Gutiérrez et al. (1988); e de Selistre-de-Araújo e Souza, (2007), é realizado na ausência do substrato fosfolipídico, permitindo a observação da ação lítica sobre eritrócitos humanos ou a inibição deste efeito por diversos compostos. Extratos, óleos essenciais ou mesmo compostos naturais isolados podem apresentar potencial tóxico dependente da dose, forma de administração, uso contínuo, entre outros. Assim, o ensaio de hemólise pode ser utilizado para *screening* de diversas amostras e doses, possibilitando a seleção de doses potencialmente seguras. O teste permite a avaliação de doses calculadas com base nos volumes sanguíneos de indivíduos adultos e massa e/ou volume de consumo diário. Outra vantagem deste ensaio é a possibilidade de avaliar a inibição da atividade utilizando indutores enzimáticos como, por exemplo, PLA₂s e proteases. Para os ensaios de inibição é possível prospectar o potencial de futuro uso dos inibidores, visto que a inibição de fosfolipases está relacionada a inibição de resposta inflamatória e a inibição de proteases pode relacionar-se a processos digestivos, cascata de coagulação, entre outros.

As PLA₂s são enzimas que hidrolisam fosfolipídeos presentes nas membranas celulares. No organismo humano, elas participam de uma série de processos fisiológicos, tais como remodelagem de membranas, digestão de fosfolipídeos e mecanismos de transdução de sinais. A quebra de fosfolipídeos de membrana resulta na liberação de ácido araquidônico, precursor para a síntese de lipídios bioativos, tais como prostaglandinas, leucotrienos e tromboxanos. Estes lipídios, denominados eicosanoides, são responsáveis diretamente pela resposta inflamatória (KUDO; MURAKAMI, 2002).

2.5.2 Coagulação

Os testes de coagulação podem ser realizados de forma rápida e com baixo custo por meio de avaliação visual (formação de coágulo rígido e/ou redes de fibrina) e cronometragem do tempo. Efeitos sobre a coagulação também têm sido avaliados com o uso de equipamentos como coagulômetros e leitores de microplacas (UV/Vis). É importante ressaltar que todas as adaptações desta metodologia são altamente reproduzíveis e apresentam resultados confiáveis.

Em adição, o teste permite avaliação de inibidores da coagulação podendo trazer informações sobre possíveis mecanismos, utilizando incubação prévia dos inibidores com enzimas indutoras da formação do coágulo ou adição dos inibidores ao plasma com posterior adição das enzimas coagulantes. As variações metodológicas permitem definir se os compostos naturais (inibidores) interagem com as enzimas coagulantes ou com proteínas do plasma que participam da cascata de coagulação de forma a proteger suas estruturas da eminente degradação. Em complementação aos testes de coagulação a atividade fibrinogenolítica complementa os resultados de coagulação auxiliando na interpretação dos dados.

Uma vez que a cascata de coagulação é iniciada, é operada através das vias intrínseca e extrínseca, dependendo das condições fisiológicas, intervenção das serinoproteases e fatores de coagulação. Assim, proteases atuam sequencialmente ao longo de todo o percurso para parar o processo de escoamento (HABIBOALLAH et al., 2008).

Serinoproteases são enzimas do sistema fibrinolítico, enquanto as serpinas são membros dos inibidores da fibrinólise, responsáveis pela inibição de proteases séricas (COSTA, 2010). As serinoproteases e metaloproteases presentes nas peçonhas de serpentes apresentam funções enzimáticas similares

às proteases endógenas humanas, principalmente as atuantes nos processos de coagulação, como trombina símile, e agregação de plaquetas.

No sistema de coagulação, a trombina é uma molécula crítica, sendo responsável pela conversão do fibrinogênio em fibrina e também pela ativação dos FV, FVIII, FXIII e plaquetas. O coágulo é formado a partir da ativação da trombina após sua ação sobre o fibrinogênio clivando as cadeias $A\alpha$ e $B\beta$, o resultado é a liberação de fibrinopeptídeos A e B, que vão formar os monômeros de fibrina. Os monômeros vão se unir uns aos outros de forma espontânea, formando assim um coágulo solúvel de fibrina. Esses coágulos são estabilizados com a inserção de ligações cruzadas que são catalisadas pelo FXIIIa, sendo que o FXIIIa é ativado pela trombina. Diversas peçonhas de serpentes Viperidae contém enzimas capazes de coagular o fibrinogênio (OUYANG; TENG; HUANG, 1992). Essas enzimas são conhecidas como trombina-símile, elas têm a capacidade de liberar fibrinopeptídeo A e/ ou B, produzindo assim coágulos anormais e instáveis, que são formados por polímeros de fibrina (VIEIRA et al., 2004).

Assim, peçonhas configuram rica fonte enzimática, amplamente utilizada para avaliação de inibidores de diversas naturezas (naturais e /ou sintéticos) simulando possíveis ações sobre o organismo humano.

2.5.3 Atividade proteolítica

Os ensaios de proteólise também permitem avaliar diversos fatores como a ação de inibidores (naturais, químicos ou sintéticos), cofatores, íons e variações de temperatura e pH, procedendo com permanência das amostras, a serem avaliadas, nas diferentes condições e posterior avaliação da atividade proteolítica.

2.5.3.1 Degradação do fibrinogênio

Moléculas de fibrinogênio correspondem a glicoproteínas de estrutura trimérica com peso molecular de 340.000 Da, cujas cadeias polipeptídicas denominam-se A α (63.500 Da), B β (56.000 Da) e γ (47.000 Da). Estas cadeias estão interconectadas por pontes de dissulfeto e podem ser clivadas pela trombina resultando na formação de redes de fibrina. Algumas enzimas proteolíticas presentes nas peçonhas de serpentes atuam sobre as cadeias do fibrinogênio *in vitro*, sendo denominadas α , β ou α , β -fibrinogenases (KAMIGUTI et al., 1996; MARKLAND JÚNIOR, 1998; SWENSON; MARKLAND, 2005).

Geralmente, as metaloproteases fibrino(geno)líticas de peçonhas de serpentes degradam a cadeia α do fibrinogênio de forma rápida e a cadeia β de forma lenta, e as serinoproteases preferencialmente degradam a cadeia β sem exercer fibrinólise (degradação de fibrina). No entanto, existem algumas metaloproteases que degradam preferencialmente a cadeia β , assim como existem serinoproteases com atividade fibrinolítica (MARKLAND JÚNIOR, 1998). As enzimas fibrinogenolíticas, presentes nas peçonhas de serpentes da família Viperidae, são, em sua maioria, capazes de degradar também à fibrina, apesar desta conter fortes ligações cruzadas no coágulo, adicionadas pelo FXIII (SELISTRE-DE-ARAÚJO; SOUZA, 2007).

Eletroforese em gel de poliacrilamida, na presença de SDS (SDS-PAGE), pode ser usada para visualizar a atividade fibrinogenolítica de uma amostra, possibilitando a observação da degradação das cadeias do fibrinogênio com surgimento de bandas com peso molecular menor, correspondentes aos fibrinopeptídios. O ensaio permite avaliar variações no tempo de incubação, temperatura, presença de cofatores, presença de inibidores, assim como

possibilita prospectar se os inibidores, em sua maioria compostos vegetais, interagem com as estruturas das enzimas fibrinogenolíticas (incubação prévia destes) ou com as moléculas de fibrinogênio (incubação dos inibidores com o fibrinogênio e posterior adição das enzimas proteolíticas) exercendo efeito protetor sobre elas (LAEMMLI, 1970).

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

2.5.3.2 Degradação da caseína

A atividade caseinolítica é um teste rápido e de baixo custo, utilizado para complementação dos dados de atividade fibrinogenolítica, visto que possibilita prospectar a especificidade de interação dos inibidores com as enzimas. O uso de atividades proteolíticas realizadas com variados substratos permite a elaboração de hipóteses sobre quais classes de enzimas estão sendo inibidas e assim sugerir possíveis mecanismos de inibição.

A atividade caseinolítica pode ser realizada em meio líquido conforme descrito por Hebert, Raya e Giori (2000), assim como pode ser avaliada em meio sólido, com adaptações do teste descrito por Gutiérrez et al. (1988), incorporando a caseína ao gel em substituição ao substrato fosfolipídico.

A adaptação do ensaio para meio sólido pode ser feito com caseína pura, realizando, ao término do ensaio, coloração dos géis com soluções de amido

black ou azul de Coomassie e descoloração em solução de ácido acético a 10%, possibilitando a visualização dos halos translúcidos correspondentes à proteólise da caseína. Em outra adaptação do método, pode-se fazer uso do substrato caseína conjugado à azocorante (azocaseína), assim, a solução de substrato colorida perde a cor ao ser hidrolisada, possibilitando a observação dos halos de degradação em meio sólido, assim como a quantificação da atividade por método colorimétrico (utilizando espectrofotometria com aferição em comprimentos de onda entre 360 nm e 450 nm), em meio líquido (SERRANO; MAROUN, 2005).

As proteases constituem um dos maiores grupos funcionais de proteínas envolvidas em muitos processos patológicos. A inibição de proteases de organismos patogênicos é de grande valia para o controle de diversas doenças (SUPURAN; SCOZZAFAVA; CLARE, 2002). As plantas são conhecidas por sintetizar compostos para sua auto-proteção (HUYNH; BORGMEYER; ZOBEL, 1992) e muitos destes possuem aplicação médico-científica. Com o advento da biotecnologia e abordagens farmacêuticas torna-se possível a aplicação de inibidores de proteases, isolados de plantas, para conter doenças humanas.

2.5.4 Trombolítico

Em 1933, trabalhos “*in vitro*” de Tillet e Garner, especialistas em doenças infecciosas, mostraram que o caldo de cultura filtrado de certas cepas de estreptococos beta-hemolíticos continha uma substância com capacidade de desencadear uma fibrinólise rápida de coágulos obtidos a partir de sangue humano. Esta substância, posteriormente isolada, recebeu a denominação de “fibrinolisisina estreptocócica” (OLIVEIRA, 2001). Segundo Milstone (1941), coágulos preparados com fibrinogênio e trombina purificados não sofriam a ação

da fibrinolisina estreptocócica, sendo necessário acrescentar a euglobulina do soro humano à mistura para que a atividade enzimática fosse observada. Christensen (1945) comprovou em seus estudos que a euglobulina plasmática, era o precursor inativo de uma enzima proteolítica e fibrinolítica que era ativada rapidamente pela fibrinolisina estreptocócica. Como o derivado estreptocócico era um ativador ao invés da fibrinolisina, ele sugeriu o nome de estreptoquinase.

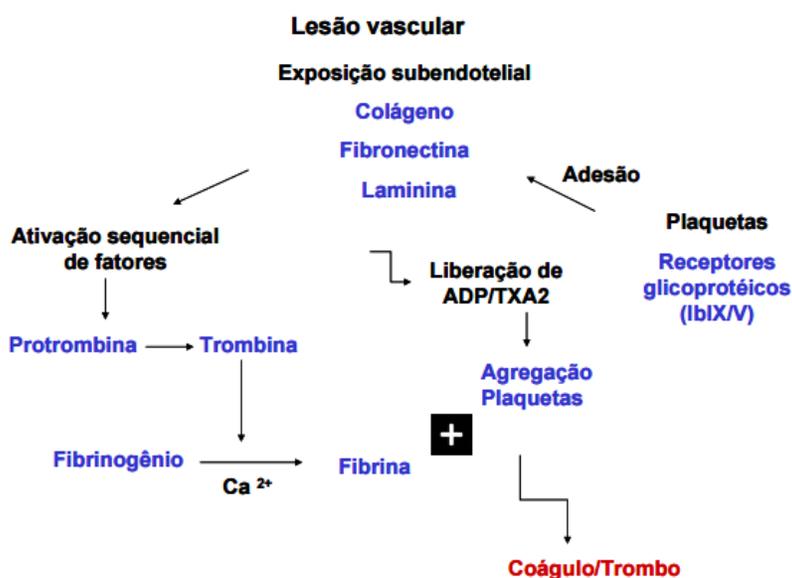
Após décadas de estudos realizados por diversos grupos de pesquisa, descobriu-se que a ação “trombolítica” era resultante da ativação do plasminogênio, sendo este convertido à plasmina. A plasmina é capaz de degradar a fibrina, o maior componente que atribui rigidez ao trombo, sendo considerada como mais adequada a denominação “fibrinolítico” em substituição a “trombolítico” para agentes que atuam na dissolução de trombos.

Um grave problema de circulação do sangue é a formação de coágulos sanguíneos. O trombo ou êmbolo impossibilita o sangue de fluir através do bloqueio no vaso sanguíneo, assim os tecidos ficam privados do fluxo sanguíneo normal, não recebem oxigênio nem excretam gás carbônico, além de outros suprimentos e descartes necessários ao metabolismo celular. Como consequência ocorre a necrose tecidual no local (LAURENCE; BENNETT, 1992).

A heparina não fracionada (HNF) é um anticoagulante, e é muito utilizada tanto na prevenção quanto no tratamento da trombose há mais ou menos 80 anos, sendo um agente parentérico, administrado por via intravenosa ou subcutânea (LINHARDT; CLAUDE, 2003). A HNF é um produto oriundo de fontes bovina ou porcina, uma mistura de cadeias de polissacarídeos de diversos tamanhos (CORREIA-DA-SILVA et al., 2013). A HNF aumenta a taxa de inibição, por parte de ativadores da antitrombina III (ATIII), bem como da trombina, o FXa, FIXa, FXIa, FXIIa e FT/FVIIa, em condições fisiológicas. A HNF apresenta uma desvantagem de depender da ATIII, sua ação é imediata,

mas apresenta curta duração (OLSON et al., 2004). Diversas patologias estão associadas às alterações na fluidez sanguínea e formação de trombos, como por exemplo infartos, acidentes vasculares, trombose, entre outros.

Figura 11 – Formação do coágulo



Fonte: Toni (2011)

A atividade fibrinolítica e ensaios de inibição desta têm sido empregados para complementar à avaliação do potencial farmacológico de diversas moléculas de origem animal e vegetal, como por exemplo, toxinas isoladas de peçonhas de serpentes (NEVES-FERREIRA et al., 1997; OLIVEIRA et al., 2008; LIN et al., 2011; TANG et al., 2013; GIMENES et al., 2014), extratos vegetais e compostos isolados (SAMU; GOPALAKRISHNAKONE; CHOW, 2012; MURATA et al., 2014; PEREIRA; BRAZÓN, 2015). Recentemente, estudos de dissolução direta de trombos têm sido realizados seguindo metodologia descrita por Cintra et al. (2012). Este método permitiu a verificação

do potencial trombolítico de BpirMP, uma metaloprotease P-I isolada da serpente *Bothrops pirajai* (BERNARDES et al., 2013) e anti-trombolítico de Bacethrombase, enzima isolada a partir de um *Bacillus cereus* (MAJUMDAR et al., 2015).

A Batroxase, uma proteinase isolada a partir da peçonha de *B. atrox* induziu atividade trombolítica *in vitro* tendo ação dependente da dose. Um trombo é formado pela agregação de plaquetas sobre a malha do coágulo de fibrina, a Batroxase tem a capacidade de induzir a fibrinólise, degradando completamente o coágulo (CINTRA et al., 2012). Kwon et al. (2013), demonstraram que a Saxatilin tem um forte efeito trombolítico *in vivo* e *in vitro*, além de atuar prevenindo a retrombose.

A estreptoquinase (SK), a uroquinase (UK) e o ativador de plasminogênio tipo tecidual (TPA) são as drogas fibrinolíticas mais utilizadas na terapia trombolítica, sendo a UK e o TPA de custo mais elevado, portanto a SK é a mais utilizada (LUNARDI, 2011).

A SK é amplamente utilizada para tratar o infarto agudo do miocárdio (IAM) (THEISEN; MACHADO, 2012). Contudo, a SK pode causar reações alérgicas, incluindo anafilaxia, sendo recomendado seu uso apenas uma vez em toda a vida do indivíduo (GUALANDE; COSTA; BORGES, 2014). A UK, enzima produzida e isolada de culturas de células renais humanas, é um trombolítico que promove fibrinólise, estimulando o sistema fibrinolítico endógeno a converter plasminogênio em plasmina (VASQUES et al., 2013). A UK é bastante utilizada para trombólise e tratamento da embolia pulmonar grave, mas não é utilizado para tratamento do IAM (OLIVEIRA, 2001). O TPA é secretado pelo endotélio vascular normal e tem alta especificidade pela fibrina, degradando-a em outras proteínas plasmáticas (VASQUES et al., 2013). Sendo o TPA um ativador direto do fibrinogênio, sua principal complicação é o sangramento (OLIVEIRA, 2001).

Na trombose ocorre o bloqueio dos vasos sanguíneos por coágulos, podendo levar ao infarto agudo do miocárdio e ao acidente vascular cerebral, estes estão envolvidos nas principais causas de morte. Com exceção da intervenção cirúrgica para remover ou passar pelo bloqueio, o único tratamento disponível é a administração de agentes trombolíticos para dissolver o coágulo (KUNAMNENI; ABDELGHANI; ELLAIAH, 2007).

Agentes trombolíticos como o plasminogênio tecidual (t-PA), UK, SK, entre outros, são os utilizados em todo o mundo para o tratamento destas doenças (MUCKLOW, 1995). Todo trombolítico disponível ainda apresenta deficiências significativas. Devido a essas deficiências dos trombolíticos, tentativas estão em andamento para desenvolver melhores medicamentos (FURIE; FURIE, 2008).

3 CONCLUSÃO

As plantas medicinais têm sido utilizadas popularmente no tratamento de doenças, pois são de fácil obtenção e de baixo custo. Os extratos aquosos e etanólicos de folhas e frutos de diversas plantas contém fitoconstituintes e compostos bioativos que podem apresentar atividades importantes na prevenção de doenças, podendo ser nutricionalmente úteis quando inseridos na dieta humana. Os extratos podem ser capazes de inibir enzimas que são precursoras de diversas doenças. Extratos de *Averrhoa carambola* têm demonstrado ter um potencial promissor podendo desempenhar um papel fundamental na descoberta de novos medicamentos. No entanto estudos científicos em relação a ação de seus bioconstituintes e importância terapêutica precisam ser realizados para que esta planta possa ser utilizada com segurança como agente terapêutico. Portanto, estudos são necessários para entender quais seriam os compostos e seus mecanismos de ação que causam efeitos benéficos à saúde humana.

REFERÊNCIAS

- AHMED, A. et al. Anti-snake venom activity of diferente extracts of *Pouzolzia indica* against Russel Viper venom. **International Journal of ChemTech Research**, Manipal, v. 2, n. 1, p. 744-751, 2010.
- ALAM, M. I.; GOMES, A. Snake venom neutralization by Indian medicinal plants (*Vitex negundo* & *Embllica officinalis* Linn.) root extracts. **Journal Ethnopharmacol**, Sidhra, v. 86, n. 1, p. 75-80, 2003.
- ALI, M. R. et al. Preliminary phytochemical screening and *in vitro* thrombolytic potential of the methanolic extract of *Enhydra fluctuans* Lour (leaves). **International Journal Pharmamedix**, India, v. 1, n. 2, p. 270-280, 2013.
- ALI, M. R. et al. Evaluation of thrombolytic potential of three medicinal plants available in Bangladesh, as a potent source of thrombolytic compounds. **Avicenna Journal of Phytomedicine**, Noakhali, v. 4, n. 6, p. 430-436, nov-dec, 2014.
- AMBIKABOTHY, J. et al. Efficacy evaluations of *Mimosa pudica* tannin isolate (MPT) for its anti-ophidian properties. **Journal of Ethnopharmacology**, Selangor, v. 137, n. 1, p. 257-262, 2011.
- ANDRIÃO-ESCARSO, S.H. et al. Structural and functional characterization of an acidic platelet aggregation inhibitor and hypotensive phospholipase A2 from *Bothrops jararacussu* snake venom. **Biochemical Pharmacology**, Ribeirão Preto, v.64, p. 723-732, 2002.
- ANJOLETTE, F. A. P. et al. Biological characterization of compounds from *Rhinella schneideri* poison that act on the complement system. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, Ribeirão Preto, v. 21, n. 25, 2015.
- ASAD, M. H. H. B. et al. Phospholipases A2: enzymatic assay for snake venom (*Naja naja karachiensis*) with their neutralization by medicinal plants of Pakistan. **Acta Poloniae Pharmaceutica - Drug Research**, Abbottabad, v. 71, n. 4, p. 625-630, 2014.

ASSAFIM, M.; CORIOLANO, E. C.; FULY, A. L. *Hypericum brasiliense* extrato da planta neutraliza alguns efeitos biológicos da *Bothrops jararaca* veneno de cobra. **Journal Venom Research**, Niterói, v. 2, p. 11-16, 2011.

ATANASOV, A. G. et al. Discovery and resupply of pharmacologically active plant-derived natural products: A review. **Biotechnology Advances**, Althanstrasse, v. 33, n. 8, p. 1582-1614, 2015.

AVINASH, P., SWAPNEEL, K.; ANITA, P. A comprehensive review of an important medicinal plant – *Averrhoa carambola* L. **Pharmacognosy Communications**, Kalyan, v. 2, n. 2, p. 13-17, 2012.

BACH, D. B.; LOPES, M. A. Study of economic viability of the *Aloe vera* L. culture. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 31, n. 4, p. 1136-1144, jul./ago., 2007.

BALA, A. et al. Evaluation of anticancer activity of *Cleome gynandra* on Ehrlich's ascites carcinoma treated mice. **Journal Ethnopharmacology**, Kolkata, v. 129, n. 1, p. 131-134, 2010.

BALSINDE, J. et al. Group V phospholipase A2-dependent induction of cyclooxygenase-2 in macrophages. **The Journal of Biological Chemistry**, La Jolla, v. 274, n. 37, p. 25967-25970, 1999.

BARROS, E. M. L. et al. Study of buriti (*Mauritia flexuosa* L.) cream in the healing process. **ConScientiae Saúde**, Teresina, v. 13, n. 4, p. 603-610, 2014.

BAUMAN, J.; BRUCHHAUSEN, F. V.; WURM, G. Flavonoids and related compounds as inhibitors of arachidonic acid peroxidation. **Prostaglandins**, v. 20, p. 627-639, 1980.

BAUMGRATZ, J. F. A. Lista de espécies da flora do Brasil: *Bellucia dichotoma*. Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2013. Disponível em: <<http://www.reflora.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB23691>>. Acessado em 02 dez. 2015.

BELO, C. A. D. et al. *In Vitro* antiophidian mechanisms of *Hypericum brasiliense* Choisy standardized extract: quercetin-dependent neuroprotection. **BioMed Research International**, São Gabriel, p. 1-6, 2013.

BERGER, M. et al. Haemostasis: a brief review. **Pedagogical notebook**. Lajeado, v. 11, n. 1, p. 140-148, 2014.

BERNARDES, C. P. et al. Proteomic analysis of *Bothrops pirajai* snake venom and characterization of BpirMP, a new P-I metalloproteinase. **Journal of Proteomics**, Ribeirão Preto, v. 80, p. 250-267, 2013.

BIONDO, R. et al. Direct organogenesis of *Mandevilla illustris* (Vell) Woodson and effects of its aqueous extract on the enzymatic and toxic activities of *Crotallus durissus terrificus* snake venom. **Plant Cell Reports**, Ribeirão Preto, v. 22, n. 8, p. 549-552, 2004.

BORGES, M. H. et al. Neutralization of proteases from *Bothrops* snake venoms by the aqueous extract from *Casearia sylvestris* (Flacourtiaceae). **Toxicon**, Uberlândia, v. 39, n. 12, p. 1863-1869, 2001.

BORGES, M. H. et al. Neutralizing properties of *Musa paradisiaca* L. (Musaceae) juice on phospholipase A2, myotoxic, hemorrhagic and lethal activities of crotalidae venoms. **Journal Ethnopharmacology**, Belo Horizonte, v. 98, n. 1-2, p. 21-29, 2005.

BRIGGS, W. H. et al. Administration of raw onion inhibits platelet-mediated thrombosis in dogs. **Journal Nutrition**, Madison, v. 131, n. 10, p. 2619-2622, 2001.

BRITO, M. V. H; CARVALHO, D. S; ALBUQUERQUE, A. M. M. Efeito do extrato de matruz em culturas de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. **Revista Paraense Medicina**, v. 21, n. 1, p. 21-25, 2007.

BURKE, J. E.; DENNIS, E. A. Phospholipase A2 structure/function, mechanism, and signaling. **Journal of Lipid Research**, San Diego, v. 50, p. 237-242, 2009.

CABRINI, D. A. et al. Analysis of the potencial topical anti-inflammatory activity of *Averrhoa carambola* L. in Mice. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, Curitiba, p. 1-7, 2011.

CAGNOLATI, D. et al. **Hemostasia e distúrbios da coagulação**. Programa Clínica, USP. Disponível em: <http://rca.fmrp.usp.br/servico/gastro/documentos/cirurgia/gastro/capitulos/hemostasia_revisado.pdf>. Acesso em: 14 jul. 2015.

CALGAROTTO, A. K. et al. Biological and biochemical characterization of new basic phospholipase A₂ BmTX-I isolated from *Bothrops moojeni* snake venom. **Toxicon**, Campinas, v. 51, p. 1509-1519, 2008.

CALVETE, J. J. et al. Snake venomomics and antivenomics of *Bothrops colombiensis*, a medically important pitviper of the *Bothrops atrox-asper* complex endemic to Venezuela: contributing to its taxonomy and snakebite management. **Journal of Proteomics**, Valencia, v. 72, p. 227-240, 2009.

CARLOS, M. M. L.; FREITAS, P. D. F. S. Study of blood coagulation cascade and the reference values. **Acta Veterinaria Brasília**, Mossoró, v. 1, n. 2, p. 49-55, 2007.

CASTRO, O. et al. Neutralización del efecto hemorrágico inducido por veneno de *Bothrops asper* (Serpentes:Viperidae) por extractos de plantas tropicales. **Revista de Biología Tropical**, Heredia, v.47, n. 3, p. 605-616, 1999.

CASTRO, H. C. et al. Snake venom thrombin-like enzymes: from Reptilase to now. **Cellular and Molecular Life Sciences**, Niterói, v. 61, n. 7-8, p. 843-856, abr. 2004.

CAVALCANTI, A. S. S. et al. The use of green tea, *Camellia sinensis* L. (Theaceae) in topical products – a review. **Natureza on line**, Vila Velha, v. 5, n. 2, p. 76-84, 2007.

CAZAROLLI, L. H. et al. Flavonoids: Prospective Drug Candidates. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, Florianópolis, v. 8, n. 13, p. 1429-1440, 2008.

CAZAROLLI, L. H. et al. Anti-hyperglycemic action of apigenin-6-C- β -fucopyranoside from *Averrhoa carambola*. **Fitoterapia**, Laranjeiras do Sul, v. 83, n. 7, p. 1176-1183, 2012.

CENCIONI, C. et al. Oxidative stress and epigenetic regulation in ageing and age-related diseasesnt. **International Journal Molecular Science**, Frankfurt am Main, v. 14, n. 9, p. 17643- 17663, 2013.

CHANDRA, V. et al. Design of specific peptide inhibitors of phospholipase A₂: structure of a complex formed between Russell's viper phospholipase A₂ and a designed peptide Leu-Ala-Ile-Tyr-Ser (LAIYS). **Acta Crystallographica D**, New Delhi, v. 58, p. 1813-1819, 2002.

CHOI, S. et al. Effect of ginsenosides on voltage-dependent Ca²⁺ channel subtypes in bovine chromaffin cells. **Journal of Ethnopharmacology**, Kwangju, v. 74, n. 1, p. 75-81, 2001.

CHRISTENSEN, L. R. Streptococcal fibrinolysis: A proteolytic reaction due to a serum enzyme activated by streptococcal fibrinolysin. **Journal of General Physiology**, New York, v. 28, n. 1, p. 363-383, 1945.

CINTRA, A. C. O. et al. Bothropstoxin-I: amino acid sequence and function. **Journal of Protein Chemistry**, Ribeirão Preto, v. 12, p. 57-64, 1993.

CINTRA, A. C. O. et al. Batroxase, a new metalloproteinase from *B. atrox* snake venom with strong fibrinolytic activity. **Toxicon**, Ribeirão Preto, v. 60, n. 1, p. 70-82, 2012.

CORREIA-DA-SILVA, M. et al. Estado da arte na terapêutica anticoagulante: Novas abordagens. **Acta Farmacêutica Portuguesa**, Porto, v. 2, n. 2, p. 5-18, 2013.

COSTA, J. O. **Caracterização funcional e estrutural de novas proteases isoladas da peçonha de *Bothrops alternatus* e do látex de *Euphorbia milii* var. *hislopii***. 2010. Tese (Doutorado em Genética e Bioquímica) - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2010.

COSTAMAGNA, M. S. et al. Polyphenols rich fraction from *Geoffroea decorticans* fruits flour affects key enzymes involved in metabolic syndrome, oxidative stress and inflammatory process. **Food Chemistry**, San Miguel de Tucumán, v. 190, p. 392-402, 2016.

COTRIM, C.A. et al. Quercetin as an inhibitor of snake venom secretory phospholipase A2. **Chemico-Biological Interactions**, Campinas, v. 189, n. 1-2, p. 9-16, 2011.

COUTINHO, M. A. S.; MUZITANO, M. F.; COSTA, S. S. Flavonoids: Potential therapeutic agents for the inflammatory process. **Revista Virtual de Química**, Rio de Janeiro, v. 1, n. 3, p. 241-256, 2009.

DA SILVA, S. L. et al. Isolation and characterization of ellagic acid derivatives isolated from *Casearia sylvestris* SW aqueous extract with anti-PLA2 activity. **Toxicon**, Divinópolis, v. 52, p. 655-666, 2008.

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

DANTAS, I. C. O Raizeiro. Campo Grande. 22 ed. Campina Grande – PB EDUEPB, 2007.

DASH, G. K.; MURTHY, P. N. Studies on wound healing activity of *Heliotropium indicum* Linn. leaves on rats. **International Scholarly Research Network Pharmacology**, Odisha, p.1-8, 2011.

DE MELO, G. O. et al. Phytochemical and pharmacological study of *Sedum dendroideum* leaf juice. **Journal of Ethnopharmacology**, Rio de Janeiro, v. 102, p. 217-220, 2005.

DE PAULA, R. C. et al. Antiophidian properties of plant extracts against *Lachesis muta* venom. **Journal Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases**, Niterói, v. 16, n. 2, p. 311-323, 2010.

DHANANJAYA, B. L. et al. Anti-venom potential of aqueous extract of stem bark of *Mangifera indica* L. *Daboia russellii* (Russell's viper) venom. **Indian Journal of Biochemistry & Biophysics**, Kerala, v. 48, n. 3, p. 175-183, 2011.

DHANANJAYA, B. L.; SUDARSHAN, S. Inhibition of secretory PLA2 – VRV-PL-VIIIa of Russell's viper venom by standard aqueous stem bark extract of *Mangifera indica* L. **Tropical Biomedicine**, Karnataka, v. 32, n. 1, p. 24-35, 2015.

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.

DU, X. Y.; CLEMETSON, K. J. Snake venom L-amino acid oxidases. **Toxicon**, Berne, v. 40, p. 659-665, 2002.

EBELING, S. et al. From a traditional medicinal plant to a rational drug: understanding the clinically proven wound healing efficacy of birch bark extract. **PLOS ONE**, Freiburg, v. 9, n. 1, 2014.

EMRAN, T. B. et al. Effects of organic extracts and their different fractions of five Bangladeshi plants on *in vitro* thrombolysis. **BioMed Central Complementary and Alternative Medicine**, Chittagong, v. 15, n. 128, 2015.

ESTEVES, I. et al. *Casearia sylvestris* SW essential oil activity in inflammation in rats induced by *Bothrops alternatus* venom. **International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research**, Alfenas, v. 7, n. 2, p. 28-32, 2011.

ESTRADA-GOMEZ, S. et al. Partial characterization of venom from the Colombian spider *Phoneutria Boliviensis* (Aranae:Ctenidae). **Toxins**, Medellín, v. 7, p. 2872-2887, 2015.

FARIA, L. et al. Pharmacological characterization of the rat paw edema induced by *Bothrops lanceolatus* (fer de lance) venom. **Toxicon**, Campinas, v. 39, n. 6, p. 825-830, 2001.

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

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

FERNÁNDEZ, J. et al. Isolation of an acidic phospholipase A₂ from the venom of the snake *Bothrops asper* of Costa Rica: biochemical and toxicological characterization. **Biochime**, San José, v. 92, n. 3, p. 273-283, 2010.

FERREIRA, C. N. et al. A cell-based model of coagulation and its implications. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, São Paulo, v. 32, n. 5, p. 416-421, 2010.

FERRER, J. C. et al. Control of glycogen deposition. **FEBS Letters**, Barcelona, v. 546, n. 1, p. 127-132, 2003.

FOX, J. W.; SERRANO, S. M. Structural considerations of the snake venom metalloproteinases, key members of the M12 reprotolysin family of metalloproteinases. **Toxicon**, Charlottesville, v. 45, p. 969-985, 2005.

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

FRANÇA, E. S.; JORGE, L. H. A. Dossiê técnico: cultivo da carambola. Serviço Brasileiro de Respostas Técnicas, 2013.

FURIE, B.; FURIE, B. C. Mechanisms of thrombus formation. **The New England Journal Medicine**, v. 359, n. 9, p. 938-949, 2008.

GHEEWALA, P. et al. Phytochemical and pharmacological profile of *Averrhoa carambola* Linn.: an overview. **International Research Journal of Pharmacy**, Mangalore, v. 3, n. 1, p. 88-92, 2012.

GILON, D.; SHALEY, O.; BENBASSAT, J. Treatment of envenomation by echis coloratus (mid-east saw scaled viper): a decision tree. **Toxicon**, Jerusalem, v. 27, n. 10, p. 1105-1112, 1989.

GIMENES, S. N. C. et al. Isolation and biochemical characterization of a g-type phospholipase A2 inhibitor from *Crotalus durissus collilineatus* snake serum. **Toxicon**, Uberlândia, v. 81, p. 58-66, 2014.

GUALANDE, V. B. M.; COSTA, R. R.; BORGES, F. V. Assistência de enfermagem: O manejo do trombolítico estreptoquinase no tratamento inicial ao paciente com infarto agudo do miocárdio (IAM). **Revista Científica Interdisciplinar**, Bom Jesus do Itabapoana, v. 1, n. 2, p. 117-159, 2014.

GUO, X. et al. *Gastroenterology*, v. 117, n. 4, 1999.

GUO, S.; DIPIETRO, L. A. Factors affecting wound healing. **Journal of Dental Research**, Chicago, v. 89, n. 3, p. 219-229, 2010.

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

GUTIÉRREZ, J. M.; LOMOMTE, B. Phospholipase A₂ myotoxins from *Bothrops* snake venoms. **Toxicon**, San José, v. 33, n. 11, p. 1405-1424, 1995.

GUTIÉRREZ, J. M., LOMONTE, B. In: Kini, R.M. (Ed.), Phospholipase A₂ myotoxins from *Bothrops* snake venoms. Wiley, London, p. 321-352, 1997.

HABIBOALLAH, G. et al. Histological evaluation of *Curcuma longa*-ghee formulation and hyaluronic acid on gingival healing in dog. **Journal of Ethnopharmacology**, Mashhad, v. 120, p. 335-341, 2008.

HARVEY, A. L. Snake toxins. Pergamon: New York, NY, USA, 1991.

HASSAN, S. M. et al. Hemolytic and antimicrobial activities differ among saponin-rich extracts from guar, quillaja, yucca and soybean. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Ismailia City, v.162, p. 1008-1017, 2010.

HAYES, W. B. Fruit growing in India. Kitabistan, Allahabad. 1960.

HEBERT, E. M.; RAYA, R. R.; GIORI, G.S. Nutritional requirements and nitrogen-dependent regulation of proteinase activity of *Lactobacillus helveticus* CRL 1062. **Applied and Environmental Microbiology**, San Miguel de Tucumán, v. 66, n. 12, p. 5316-5321, 2000.

HOFFMAN, M. Remodeling the blood coagulation cascade. **Journal of Thrombosis and Thrombolysis**, Durham, v. 16, n. 1-2, p. 17-20, 2003.

HOMSI-BRANDEBURGO, M. I. et al. Fractionation of *Bothrops jararacussu* snake venom partial chemical characterization and biological activity of bothropstoxin. **Toxicon**, Ribeirão Preto, v. 26, p. 615-627, 1988.

HUYNH, Q. K.; BORGMEYER, J. R.; ZOBEL, J. F. Isolation and characterization of a 22 kDa protein with antifungal properties from maize seeds. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, St. Louis, v. 182, n. 1, p. 1-5, 1992.

JALILZADEH-AMIN, G.; MAHAM, M. Antidiarrheal activity and acute oral toxicity of *Mentha longifolia* L. essential oil. **Avicenna Journal of Phytomedicine**, Urmia, v. 5, n. 2, p. 128-137, 2015.

KAMIGUTI, A. S. et al. Insights into the mechanism of haemorrhage caused by snake venom metalloproteinases. **Toxicon**, Liverpool, v. 34, n. 6, p. 627-642, 1996.

KETELHUT, D. F. J. et al. Isolation, characterization and biological activity of acidic phospholipase A2 isoforms from *Bothrops jararacussu* snake venom. **Biochimie**, Ribeirão Preto, v. 85, p. 983-991, 2003.

KHANAM, Z. et al. Determination of polyphenolic content, HPLC analyses and DNA cleavage activity of Malaysian *Averrhoa carambola* L. fruit extracts. **Journal of King Saud University - Science**, Kelantan, 2015.

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

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

KUDO, I.; MURAKAMI, M. Phospholipase A₂ enzymes. **Prostaglandins & Other Lipid Mediators**, n. 68-69, p. 3-58, 2002.

KUNAMNENI, A.; ABDELGHANI, T. T.; ELLAIAH, P. Streptokinase-the drug of choice for thrombolytic therapy. **Journal of Thrombosis and Thrombolysis**, Visahhapatnam, v. 23, n. 1, p. 9-23, 2007.

KWON, I. I. et al. Thrombolytic effects of the snake venom disintegrin Saxatilin determined by novel assessment methods: A FeCl₃-induced thrombosis model in mice. **PLOS ONE**, Seoul, v. 8, n. 11, 2013.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Reprinted from Nature**, Cambridge, v. 227, n. 5259, p. 680-685, 1970.

LAMBERT, J. D. et al. Inhibition of carcinogenesis by polyphenols: evidence from laboratory investigations. **The American Journal of Clinical Nutrition**, Piscataway, 81, p. 284-291, 2005.

LARANJINHA, J. Translation of chemical properties of polyphenols into biological activity with impact on human health. In: Santos-Buelga C, Escribano-Bailon MT, Lattanzio V, editors. Recent advances in polyphenol research. v. 2. Oxford: Wiley-Blackwell Publishing; 2011.

LATTMANN, E. et al. *In-vitro* and *in-vivo* antivenin activity of 2-[2-(5,5,8a-trimethyl-2-methylene-decahydro-naphthalen-1-yl)-ethylidene]-succinaldehyde against *Ophiophagus hannah* venom. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, Birmingham, v. 62, p. 257-262, 2010.

LAURENCE, D. R.; BENNETT, P. N. Clinical Pharmacology. Churchill Livingstone, seventh edition, New York, p. 483, 1992.

LEE, T. P.; MATTELIANO, M. L.; MIDDLETONE, E. Effect of quercetin on human polymorphonuclear leukocyte lysosomal enzyme release and phospholipid metabolism. **Life Sciences**, New York, v. 31, p. 2765-2774, 1982.

LEHANE, A. M.; SALIBA, K. J. Common dietary flavonoids inhibit the growth of the intraerythrocytic malaria parasite. **Bio-Med Central Research Notes**, Canberra, v. 1, p. 5-9, 2008.

LEITE, N. S. et al. Avaliação das atividades cicatrizante, anti-inflamatória tópica e antioxidante do extrato etanólico da *Sideroxylon obtusifolium* (quixabeira). **Revista Brasileira Plantas Mediciniais**, São Cristóvão, v. 17, n. 1, p. 164-170, 2015.

LIN, X. et al. The effect of the fibrinolytic enzyme FIIa from *Agkistrodon acutus* venom on acute pulmonary thromboembolism. **Acta Pharmacologica Sinica**, Guangzhou, v. 32, p. 239-244, 2011.

LINHARDT, R. J.; CLAUDE, S. Hudson Award address in carbohydrate chemistry. Heparin: Structure and activity. **Journal of Medicinal Chemistry**, Iowa City, v. 46, p. 2551-2564, 2003.

LORENZI, H. F.; MATOS, F. J. A. Plantas medicinais do Brasil, nativas e exóticas. 1ª Edição. Nova Odessa - SP: Instituto Plantarum, 2002, 512p.

LUNARDI, J. **Produção de proteína recombinante estreptoquinase (*Streptococcus dysgalactiae subsp. equisimilis*) em biorreator utilizando diferentes estratégias de batelada alimentar**, 2011. 79p. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular) - Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2011.

MACHADO, M. S. S. et al. The anti-allergic activity of *Cymbopogon citratus* is mediated via inhibition of nuclear factor kappa B (Nf-Kb) activation. **Bio-Med Central Complementary and Alternative Medicine**, Salvador, v. 15, n. 168, 2015.

MAENTHAISONG, R. et al. The efficacy of *Aloe vera* used for burn wound healing: A systematic review. **Burns**, Phitsanulok, v. 33, n. 6, p. 713-718, 2007.

MAGALHÃES, A. et al. Inhibition of the inflammatory and coagulant action of *Bothrops atrox* venom by the plant species *Marsypianthes chamaedrys*. **Journal of Ethnopharmacology**, Manaus, v. 134, p. 82-88, 2011.

MAJUMDAR, S. et al. Antiplatelet and antithrombotic activity of a fibrin(ogen)olytic protease from *Bacillus cereus* strain FF01. **International Journal of Biological Macromolecules**, Assam, v. 79, p. 477-489, 2015.

MALAFAIA, O. et al. Os fitoterápicos e seu potencial na cicatrização em cirurgia. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 21, p. 1-2, 2006.

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

MANACH, C. et al. Polyphenols: food sources and bioavailability. **The American Journal Clinical Nutrition**, v. 79, p. 727-747, 2004.

MARCUSSI, S. et al. Snake venom phospholipase A2 inhibitors: medicinal chemistry and therapeutic potential. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, Ribeirão Preto, v. 7, n. ?, 2007.

MARCUSSI, S. et al. Evaluation of the genotoxicity of *Crotalus durissus terrificus* snake venom and its isolated toxins on human lymphocytes. **Mutation Research-Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, Ribeirão Preto, v. 724, n. 1-2, p. 59-63, 2011.

MARKLAND JÚNIOR, F. S. Snake venom fibrinogenolytic and fibrinolytic enzymes: na updated inventory, **Thrombosis and Haemostasis**, v. 79, n. 3, p. 668-679, 1998.

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

MELIM, L. I. S. H. **Estudo das interações entre fosfolipases A₂ e o inibidor vegetal, ácido rosmarínico de *Cordia verbenaceae* (Boraginaceae) por cocristalização e modelagem molecular**, 2009. 159 p. Tese (Doutorado em Toxicologia) - Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2009.

MELLO, J. R. B.; MELLO, F. B.; LANGELOH, A. Toxicidade pré-clínica de fitoterápico contendo *Aloe ferox*, *Quassia amara*, *Cynara scolymus*, *Gentiana lutea*, *Peumus boldus*, *Rhamnus purshiana*, *Solanum paniculatum* e *Valeriana*

officinalis. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 28, n. 2, p. 183-191, 2009.

MILSTONE, H. A factor in normal human blood which participates in streptococcal fibrinolysis. **Journal of Immunology**, v. 42, n. 2, p. 109-116, 1941.

MISIARA, G. P. **Alterações funcionais e histopatológicas renais precoces na nefropatia aguda pelo oxalato por ingestão de *Averrhoa carambola***. 2013. (Tese de doutorado) - Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2013.

MOLANDER, M. et al. Hyaluronidase, phospholipase A2 and protease inhibitory activity of plants used in traditional treatment of snakebite-induced tissue necrosis in Mali, DR Congo and South Africa. **Journal of Ethnopharmacology**, Copenhagen, v. 157, p. 171-180, 2014.

MONTECUCCO, C.; GUTIÉRREZ, J. M.; LOMONTE, B. Cellular pathology induced by snake venom phospholipase A2 myotoxins and neurotoxins: common aspects of their mechanisms of action. **Cellular and Molecular Life Sciences**, San José, v. 65, n. 18, p. 2897-2912, 2008.

MORESCO, H. H. et al. Chemical constituents and evaluation of the toxic and antioxidant activities of *Averrhoa carambola* leaves. **Brazilian Journal Pharmacognosy**, v. 22, n. 2, p. 319-324, mar./apr., 2012.

MOURA, V. M. et al. Inhibition of the principal enzymatic and biological effects of the crude venom of *Bothrops atrox* by plant extracts. **Journal of Medicinal Plants Research**, Viçosa, v. 7, n. 31, p. 2330-2337, 2013.

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**, Manaus, v. 85, p.59-68, 2014.

MOYSES NETO, M.; VIEIRA NETO, O. M.; DANTAS, M. Carambola e nefropatia pelo oxalato. In: Cruz, J; Cruz, HMZ; Kirsztajn, GM; Barros, RT eds. *Atualidades em Nefrologia*. 11a ed. São Paulo: Sarvier; p.284-290, 2010.

MUCKLOW, J. C. Thrombolytic treatment: Streptokinase is more economical than alteplase. **British Medical Journal**, Keele, v. 311, n. 7018, 1995.

MULIA, E. P. B.; TANTULAR, I. S.; MUGHNI, A. *In vitro* antimalarial activity of belimbing wuluh (*Averrhoa Bilimbi*) leaves extract on *Plasmodium*

falciparum. **Folia Medica Indonesiana**, v. 48, n. 3, july-september, p. 96-101, 2012.

MURAKAMI, M.; KUDO, I. Recent advances in molecular biology and physiology of the prostaglandin E2-biosynthetic pathway. **Progress in Lipid Research**, Shinagawa-Ku, v. 43, n. 1, p. 3-35, 2004.

MURATA, K. et al. Effect of *Morinda citrifolia* fruit extract and its iridoid glycosides on blood fluidity. **Journal of Natural Medicines**, Osaka, v. 68, p. 498-504, 2014.

NANDA, B. L. et al. PLA₂ mediated arachidonate free radicals: PLA₂ inhibition and neutralization of free radicals by anti-oxidants – A new role as anti-inflammatory molecule. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 7, p. 765-777, 2007.

NARAIN, N. et al. Physical and chemical composition of carambola fruit (*Averrhoa carambola* L.) at three stages of maturity. **Ciencia y Tecnologia Alimentaria**, João Pessoa, v. 3, n. 3, p. 144-148, 2001.

NEURATH, H. Evolution of proteolytic enzymes. **Science**, v. 224, n. 4647, p. 350-357, 1983.

NEVES-FERREIRA, A. G. C. et al. Inhibitory properties of the antithrombotic complex from the south American opossum (*Didelphis marsupialis*) serum. **Toxicon**, Rio de Janeiro, v. 35, n. 6, p. 849-863, 1997.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural Products as sources of new drugs over the last 25 Years. **Journal of Natural Products**, v. 70, p. 461-477, 2007.

NOLLA, D.; SEVERO, B.M.A. Plantas medicinais. Passo Fundo: UPF, 2005.

OLIVEIRA, C. C. Trombolíticos. **Revista Sociedade de Cardiologia do Estado do Rio de Janeiro - SOCERJ**, v. XIV, n. 1, p. 47-52, jan/fev/mar, 2001.

OLIVEIRA, C. Z. et al. An α -type phospholipase A2 inhibitor from *Bothrops jararacussu* snake plasma: Structural and functional characterization. **Biochimie**, Ribeirão Preto, v. 90, p. 1506-1514, 2008.

OLSON, S. T. et al. Accelerating ability of synthetic oligosaccharides on antithrombin inhibition of proteinases of the clotting and fibrinolytic systems -

Comparison with heparin and low-molecular-weight heparin. **Thrombosis and Haemostasis**, v. 92, p. 929-939, 2004.

OUYANG, C.; TENG, C. M.; HUANG, T. F. Characterization of snake venom componentes acting on blood coagulation and platelet function. **Toxicon**, Taipei, v. 30, n. 9, p. 945-966, 1992.

OWNBY, C. L. et al. Lysine 49 phospholipase A₂ proteins. **Toxicon**, Stillwater, v. 37, p. 411-445, 1999.

PANIZZA, S. Plantas que curam (Cheiro de Mato). São Paulo: IBRASA, 1998.

PATIÑO, A. C.; BENJUMEA, D. M.; PEREAÑEZ, J.A. Inhibition of venom serine proteinase and metalloproteinase activities by *Renealmia alpinia* (Zingiberaceae) extracts: Comparison of wild and *in vitro* propagated plants. **Journal of Ethnopharmacology**, Medellín, v. 149, p. 590-596, 2013.

PENG, F.; XIONG, L.; ZHAO, X. M. A bicyclic diterpenoid with a new 15,16-dinorlabdane carbon skeleton from *Leonurus japonicus* and its coagulant bioactivity. **Molecules**, Chengdu, v. 18, p. 13904-13909, 2013.

PEREIRA, B. M. R.; GONÇALVES, L. C.; PEREIRA, N. A. Abordagem farmacológica de plantas recomendadas pela medicina folclórica como antiofídicas III – Atividade antiedematogênica. **Revista Brasileira de Farmácia**, v.73, p. 85-86, 1992.

PEREIRA, B.; BRAZÓN, J. Aqueous extract from *Brownea grandiceps* flowers with effect on coagulation and fibrinolytic system. **Journal of Ethnopharmacology**, Caracas, v. 160, p. 6-13, 2015.

PITHAYANUKUL, P.; LEANPOLCHAREANCHAI, J.; BAVOVADA, R. Inhibitory effect of tea polyphenols on local tissue damage induced by snake venoms. **Phytotherapy Research**, Bangkok, v. 24, p. 56-62, 2010.

PONTES, A. B. et al. Emulsão dermatológica a base de copaíba. **Revista Analytica**, v. 7, p. 36-42, 2003.

PROVASI, M. et al. Evaluation of the toxicity and antyhyperglycemic potential of *Averrhoa carambola* L. (Oxalidaceae). **Acta Scientiarum**, Maringá, v. 23, n. 3, p. 665-669, 2001.

PROVASI, M. et al. Effect of hydroalcoholic extract and fractions of *Averrhoa carambola* L. (Oxalidaceae) leaves on the glycemic metabolism of *Wistar* rats. **Acta Scientiarum Health Sciences**, Maringá, v. 27, n. 1, p. 45-48, 2005.

PUSHAPARAJ, P. N.; TAN, B. K. H.; TAN, C. H. The mechanism of hypoglycemic action of the semi-purified fractions of *Averrhoa bilimbi* in streptozotocin-diabetic rats. **Life Sciences**, Singapore, v. 70, n. 5, p. 535-547, 2001.

RAMOS, A. P.; PIMENTEL, L. C. Effectiveness of *Aloe vera* on the tissue repair and healing process. **Brazilian Journal of Health**, São Paulo, v. 2, n. 1, p. 40-48, janeiro/abril, 2011.

REYNOLDS, L. J.; MIHELICH, E. D.; DENNIS, E. A. Inhibition of venom phospholipases A₂ by Manoalide and Manoalogue. Stoichiometry of Incorporation. **Journal of Biological Chemistry**, La Jolla, v. 266, n. 25, p. 16512-16517, 1991.

RODRIGUES, R. et al. Evaluation of glycemic profile of patients with diabetes mellitus type 2 with or without administration of *Averrhoa carambola* infusion. **Scientia Médica**, Lajeado, v. 20, n. 2, p. 161-165, 2010.

RODRIGUES, R. S. **Análise do perfil de expressão gênica da glândula de peçonha de *Bothrops pauloensis* (*Bothropoides pauloensis*)**. 2010. Tese (Doutorado em Genética e Bioquímica) - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2010.

RODRIGUES, E. S. et al. New concepts on the physiology of hemostasis. **Revista da Universidade Vale do Rio Verde**, v. 10, n. 1, p. 218-233, 2012.

ROMERO, L. et al. Enzymatic and structural characterization of a basic phospholipase A₂ from the sea anemone *Condylactis gigantea*. **Biochimie**, Cuba, v. 92, p. 1063-1071, 2010.

RUDDER, E. A. M. C. Guia compacto de plantas medicinais. 1ª edição, Editora Rideel. São Paulo, SP, 2002.

SAGHIR, S. A. M. et al. Star fruit (*Averrhoa carambola* L.): From traditional uses to pharmacological activities. **Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas**, Penang, v. 12, n. 3, p. 209-219, 2013.

SAJEVIC, T.; LEONARDI, A.; KRIŽAJ, I. Haemostatically active proteins in snake venoms. **Toxicon**, Ljubljana, v. 57, n. 5, p. 627-645, abr. 2011.

SALAZAR, M. et al. Evaluation of anti-*Bothrops asper* venom activity of ethanolic extract of *Brownea rosademonte* leaves. **Acta Pharmaceutica**, v. 64, p. 475-483, 2014.

SAMY, R. P.; GOPALAKRISHNAKONE, P.; CHOW, V. T. K. Therapeutic application of natural inhibitors against snake venom phospholipase A2. **Bioinformation**, Singapore, v. 8, n. 1, p. 48-57, 2012.

SANTANGELO, C. et al. Polyphenols, intracellular signalling and inflammation. **Annali dell'Istituto Superiore di Sanità**, Rome, v. 43, n. 4, p. 394-405, 2007.

SARKHEL, S. et al. Snake venom neutralising factor from the root extract of *Emblica officinalis* Linn. **Oriental Pharmacy and Experimental Medicine**, Kolkata, v.11, p. 25-33, 2011.

SCALBERT, A.; JOHNSON, I. T.; SALTMARSH, M. Polyphenols antioxidants and beyond. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 81, p. 215-217, 2005.

SELISTRE-DE-ARAÚJO, H. S.; SOUZA, D. H. F. Métodos em toxicologia. São Carlos: EdUFSCar, 258p., 2007.

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

SHIVALINGU, B. R. et al. Comparative analysis of procoagulant and fibrinolytic activity of crude protease fractions of turmeric species. **Journal of Ethnopharmacology**, Mysuru, v. 172, p. 261-264, 2015.

SIA, F.Y. et al. Efficacy of tannins from *Mimosa pudica* and tannic acid in neutralizing cobra (*Naja kaouthia*) venom. **The Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases**, Kuala Lumpur, v. 17, n. 1, p.42-48, 2011.

SILVA, M. L. et al. Anti-snake venom activities of extracts and fractions from callus cultures of *Sapindus saponaria*. **Pharmaceutical Biology**, Maharashtra, v.50, p. 366-375, 2012.

SILVA, D. et al. Antidiabetic activity of *Sedum dendroideum*: Metabolic enzymes as putative targets for the bioactive flavonoid kaempferitrin. **International Union of Biochemistry and Molecular Biology**, Rio de Janeiro, v. 66, n. 5, p. 361-370, 2014.

SINDHU, N.; CHINNA, E. M.; DIPANKAR, B. Evaluation of *in-vitro* antioxidant activity of *Averrhoa carambola* Stem ethanolic extract. **International Journal of PharmTech Research**, Andhra Pradesh, v. 5, n. 4, p. 1611-1618, oct-dec, 2013.

SIX, D. A.; DENNIS, E. A. The expanding superfamily of phospholipase A₂ enzymes: classification and characterization. **Biochimica et Biophysica Acta**, La Jolla, v. 1488, n. 1-2, p. 1-19, 2000.

SOARES, J. A. et al. Avaliação da atividade cicatrizante da *Caesalpinia férrea* ex. TUL. var ferrea e da *Aloe vera* (L.) Burm. f. em lesões cutâneas totais em ratos. **Ciências Biológicas e da Saúde**, Ribeirão Preto, v. 11, n. 3, p. 33-42, 2013.

SUPURAN, C. T.; SCOZZAFAVA, A.; CLARE, B. W. Bacterial protease inhibitors. **Medicinal Research Reviews**, v. 22, n. 4, p. 329-372, 2002.

SWENSON, S.; MARKLAND, F. S. Snake venom fibrin(ogen)olytic enzymes. **Toxicon**, Los Angeles, v. 45, n. 8, p. 1021-1039, 2005.

TANG, S. S. et al. Biochemical properties and comparative pharmacology of a coagulant from *Deinagkistrodon acutus* snake venom. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, Guangzhou, v. 49, p. 90-98, 2013.

TASDEMIR, D. Type II fatty acid biosynthesis, a new approach in antimalarial natural product discovery. **Phytochemistry Reviews**, London, v. 5, p. 99-108, 2006.

TEIXEIRA, G. H. A. et al. Postharvest characterization of six star fruit (*Averrhoa carambola* L.) genotypes. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 23, n. 3, p. 546-550, 2001.

TEIXEIRA, C. et al. Inflammation induced by *Bothrops asper* venom. **Toxicon**, São Paulo, v. 54, n. 1, p. 67-76, 2009.

THEISEN, C. I.; MACHADO, M. E. Atención de enfermería en el tratamiento trombolítico en pacientes después de un infarto agudo de miocardio. **Revista Saúde e Desenvolvimento**, v. 1, n.2, p. 116-132, 2012.

TILLET, W. S.; GARNER, R. L. The fibrinolytic activity of hemolytic streptococci. **Journal of Experimental Medicine**, Baltimore, v. 58, p. 485-502, 1933.

TONI, L. G. B. **Batroxase, uma nova metaloprotease da classe PI isolada da peçonha de *Bothrops atrox*: avaliação da atividade funcional**. 2011. 130 p. Dissertação (Mestre em Ciências) - Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2011.

TORRES, A. M. et al. Neutralizing effects of *Nectandra angustifolia* extracts against *Bothrops neuwiedi* snake venom. **Natural Product Communications**, Montevideo, v. 6, n. 9, p. 1393-1396, 2011a.

TORRES, M. C. et al. Antiophidic solanidane steroidal alkaloids from *Solanum campaniforme*. **Journal of Natural Products**, Fortaleza, v. 74, n. 10, p. 2168-2173, 2011b.

TORRES-URRUTIA, C. et al. Anti-platelet, anti-coagulant and fibrinolytic activity *in vitro* of extracts from selected fruits and vegetables. **Blood Coagulation & Fibrinolysis**, Talca, v. 22, n. 3, p. 197-205, 2011.

TRIPATHI, V. R.; KUMAR, S.; GARG, S. K. A study on trypsin, *Aspergillus flavus* and *Bacillus sp.* protease inhibitory activity in *Cassia tora* (L.) syn *Senna tora* (L.) Roxb. seed extract. **Bio-Med Central Complementary and Alternative Medicine**, Uttar Pradesh, v. 11, n. 56, 2011.

TU, A. T. Reptile venoms and toxins. Marcel Decker. New York, NY, USA, 1991.

TUKUN, A. B. et al. Antioxidant capacity and total phenolic contents in hydrophilic extracts of selected Bangladeshi medicinal plants. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, Bangladesh, v. 7, p. 568-573, 2014.

VALENTE, R. H. et al. *Bothrops insularis* venomomics: a proteomic analysis supported by transcriptomic-generated sequence data. **Journal of Proteomics**, Rio de Janeiro, v. 72, p. 241-255, 2009, Warrell.

VASQUES, C. I. et al. Drugs used for long-term central venous catheter desobstruction in oncology: systematic review. **RECOM**, Brasília, v. 3, n. 3, p. 873-882, 2013.

VELNAR, T.; BAILEY, T.; SMRKOLJ, V. The wound healing process: an overview of the cellular and molecular mechanisms. **Journal of International Medical Research**, v. 37, p. 1528-1542, 2009.

VIEGAS JR., C.; BOLZANI, V. S.; BARREIRO, E. J. Os produtos naturais e a química medicinal moderna. **Química Nova**, Rio de Janeiro, v. 29, n. 2, p. 326-337, 2006.

VIEIRA, D. F. et al. Purification and characterization of jararassin-I, A thrombin-like enzyme from *Bothrops jararaca* snake venom. **Acta Biochimica et Biophysica Sinica**, São José do Rio Preto, v. 36, n. 12, p. 798-802, 2004.

WELTON, A. F. et al. Effect of flavonoids on arachidonic acid metabolism. In: Cody, V.; Middleton, E.; Harborne, J. B., editors. *Plant flavonoids in biology and medicine*. New York: Alan R. Liss, p. 231-242, 1986.

YAMASHITA, K. M. **Patogênese dos distúrbios hemostáticos sistêmicos induzidos pelo veneno da serpente *Bothrops jararaca***. 2013. 85 p. Dissertação (Mestre em Ciências) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

YANG, D. et al. Two tetrahydroisoquinoline alkaloids from the fruit of *Averrhoa carambola*. **Phytochemistry Letters**, Guangzhou, v. 7, p. 217-220, 2014.

YU, B. Z. et al. Catalytic significance of the specificity of divalent cations as KS^* and $Kcat^*$ cofactors for secreted phospholipase A2. **Biochemistry**, Newark, v. 37, n. 36, p. 12576-12587, 1998.

ZARE-ZARDINI, H. et al. Identification and biochemical characterization of a new antibacterial and antifungal peptide derived from the insect *Sphodromantis viridis*. **Biochemistry (Moscow)**, Yazd, v. 80, n. 4, p. 433-440, 2015.

ZONLEFER, W. B. *Guide to flowering plant families*. Chapel Hill: University of North Carolina Press, 1994.

SEGUNDA PARTE
Artigos

**ARTIGO I – *Averrhoa carambola*: EFFECTS ON
HEMOSTASIS AND ENZIMATIC INHIBITION**

DANIELA APARECIDA OLIVEIRA¹, ANDERSON ASSAID SIMÃO¹,
PEDRO HENRIQUE SOUZA CESAR¹, SILVANA MARCUSSI^{1*}

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

**Artigo formatado Segundo as normas da revista International Journal of
Pharmaceutical Sciences and Research**

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

ABSTRACT

Herbal medicines represent an advantageous alternative for the treatment of several diseases, when considering their effectiveness, their low cost, and their greater safety when compared to the allopathic medicines. *Averrhoa carambola* (Oxalidaceae family) is a plant popularly known to contain medicinal properties such as anti-inflammatory, antioxidant, and hypoglycemic, and also being rich in phenolic compounds. Different enzymes of the human organism (e.g. phospholipases and proteases) participate in physiological processes such as healing, which involve hemostasis, inflammation and formation of new tissue, highlighting these enzymes as pharmaceutical targets for the treatment of numerous pathologies. Considering the high degree of homology between some human enzymes and toxins found in snake venoms, and the greater ethical ease in obtaining and using venom toxins for scientific purposes, venoms have been widely used as laboratory tools in inducing activities that mimic those exerted by human molecules. In this context, the objective of the present work was to evaluate the potential of aqueous and ethanolic extracts of *A. carambola* leaves on phospholipase, hemolytic, caseinolytic, thrombolytic, coagulant, and fibrinogenolytic activities induced by phospholipases A₂ and proteases presented in venoms of different snakes. The results confirm the pharmacological potential of *A. carambola*. Its constituents may act as inhibitor or enzymatic potentiator, interfering in processes related to hemostatic balance, such as coagulation, thrombus dissolution, and fibrinogenolysis. However, future studies are necessary to enable human consumption to be effective and safe.

Keywords: venoms as Laboratory tools; medicinal plants; phenolic compounds; enzymes inhibitors.

1 Introduction

The most well-known and ancient way in the treatment of diseases is using herbal medicine. Plants constitute a rich source of bioactive compounds and many drugs that are available in the market were obtained directly or indirectly from them [1]. Around 50% of all medicines have their origin from plants and have an important role in the development of the pharmaceutical industry [2]. Data from the World Health Organization show that more than 80% of the world population depends on herbal medicines for disease prevention and treatment. Many herbal medicines have advantages compared to allopathic ones such as low cost to obtain, greater safety in their use, and fewer adverse effects [3].

One of the aggravating factors of ophidian accidents is the local effect, which is conditioned to tissue damages such as necrosis, edema, myotoxicity, and hemorrhage [4]. Poisoning is caused by the collective action of different classes of toxins, such as phospholipases A₂, metalloproteases, serine proteases, L-amino acid oxidases, and hyaluronidases [5].

Some plants are rich in bioactive compounds that are responsible for inhibiting the toxic and/or pharmacological effects induced by snake venoms, acting as enzymatic inhibitors [6,7]. Due to the large number of biological activities induced by these toxins and the high degree of homology that many of them present with enzymes of the human organism, acting in different physiological and/or pathological processes, numerous researches have been developed with the use of toxins and venoms as laboratory tools, inducing pharmacological effects and simulating the modulation of human enzymes [8].

Several investigations involve mechanisms of action of natural compounds that act as enzymatic inhibitors and the main classes of toxins used as targets are those involved in inflammatory response and hemostasis (phospholipases A_2 , metalloproteases, and serine proteases) [9,10,11,12,13,14,15,16,17]. However, mechanisms of interaction between enzymes and natural compounds are poorly described and require extensive studies of structural and functional characterization [18], thus enabling future applications of these compounds in the therapy of human diseases.

Studies point out to different parts of *Averrhoa carambola* L., Oxalidaceae family (popularly known as 'Carambola' - star fruit), with pharmacological properties [19,20] such as antioxidant and hypoglycemic activity in fruits [21], and anti-inflammatory, hepatoprotective, and anti-ulcer activity in leaves and stems [22]. Phytochemical analyzes of the leaves revealed that in their composition they present bioactive compounds such as saponins, alkaloids, flavonoids, and tannins [23].

Considering reports of popular use, the crushed leaves are used externally in the treatment of varicella, ringworm and headache. The decoction of the leaves is used to alleviate aphthous stomatitis and angina. The leaves are also used to treat boils, in postpartum treatment, edema, gastroenteritis, traumatic injury [20], stomach ulcers, and also improve digestion [24].

Secondary metabolites present in different plant formulations such as flavonoids, terpenes, alkaloids, α -tocopherol and carotenoids have stood out with medical-scientific relevance in the last decades, as it contains several pharmacological properties such as cytotoxic and chemopreventive effects [25].

The so called wounds (injuries of diverse origins) affect a large number of people and drastically reduce their quality of life [26]. In developing countries, wounds are among one of the five most common reasons for people to seek medical care [27]. However, the mechanisms of wound healing resulting

from the action of plant active ingredient are still under study, considering the complexity of the plant constituents and the various activities they perform.

Coagulation and fibrinolysis represent two events based on proteolysis of major importance in the process of wound healing, involving several proteolytic enzymes and different substrates. Medicinal plants may present proteolytic activity as well as inhibitory action on proteases, acting on the blood coagulation process [28] and causing alterations in hemostasis.

Hemostasis have great importance in healing wounds. It corresponds to the complex system and efficient physiological mechanism of defense of the organism against the uncontrolled loss of blood [29]. The efficiency of the traditional practice of applying trellises of plants on fresh wounds to stop bleeding has been scientifically proven, being observed the involvement of proteolytic enzymes that act through the activation of different zymogens that participate in several stages of the coagulation cascade [30].

The objective of this study was to perform the toxicological and pharmacological characterization of aqueous and ethanolic extracts of leaves of *A. carambola*, evaluating their action on hemostasis and enzymatic activities exerted by phospholipases A₂ and proteases. Venoms of different snakes were used as laboratory tools, once they are rich sources of these enzymes and broadly characterized.

2 Material and methods

2.1 Collection and identification of plant material

Leaves of *Averrhoa carambola* (Oxalidaceae) were collected in an orchard in the municipality of Lavras, M.G., Brazil, altitude 845 m, latitude 21.15 ° S and longitude 45.22 ° W, in december 2015. The leaves were oven dried with forced air ventilation at 35 ° C, and then milled in a Willey type mill

and the powder obtained was kept at room temperature. Exsicates of the species were deposited in the Herbarium of the Federal University of Lavras, Brazil, under no. 24201.

2.1.1 Preparation of aqueous and ethanolic extracts

The powder obtained from the leaves of *A. carambola* was extracted in two different solvents, water (infusion of 30 minutes of 40 g in 400 mL of freshly boiled water) and ethanol at 92.8°C at room temperature by extractive process percolation. The ethanolic extract was subjected to removal of the residual solvent in a rotary evaporator at 40°C and both aqueous and ethanolic extracts were immediately frozen and then lyophilized. Prior to use, the extracts were weighed and dissolved in PBS.

2.1.2 Total phenolic compounds

The determination of the total phenolic compound contents was performed according to the method of Folin-Denis [31,32]. Aliquots of 200 µL of aqueous and ethanolic extract from *A. carambola* leaves were transferred to test tubes, followed by addition of 100 µL of Folin-Denis reagent and 200 µL of Na₂CO₃ with the volume adjusted to 2mL of water. After 30 minutes, absorbances were read at 760 nm (BioSystems spectrophotometer - model BTS-330). The results were expressed as mg compounds/100 g of sample. The analytical curve was performed with five concentrations of tannic acid (TAE) (4, 8, 12, 16 and 20 µg mL⁻¹).

2.1.3 Total Flavonoids

For the determination of flavonoid contents, the methodology described by Woisky and Salatino [33] was used. Lyophilized (0.1 g) samples of the aqueous and ethanolic extracts from *A. carambola* leaves were weighed and

dissolved in 25 ml of methanol. Aliquots of 50, 200 and 400 μL of the extracts were added to 500 μL of methanolic solution of aluminum chloride 2% ($\text{w}:\text{v}^{-1}$) and the volume filled with methanolic acetic acid solution 5% ($\text{v}:\text{v}^{-1}$). After 30 minutes, absorbances were read at 425 nm. The analytical curve was performed with aliquots of 50, 100, 200, 300, 400 and 500 μL of quercetin (QE) (solution at $100 \mu\text{g mL}^{-1}$).

2.2 Snake venoms

The crystalline crude venoms were purchased commercially from the serpentarium Bioagents (Batatais-SP). The venoms were weighed (10 mg) and dissolved in 1 mL of phosphate buffered saline (PBS, pH 7.4) to perform the assays.

2.3 Obtaining Human Blood

The blood used for hemolytic, thrombolytic and coagulation activity tests was obtained from healthy volunteers who did not use medication during a period of 30 days prior to collection. Blood was collected by venipuncture in tubes containing heparin (for hemolytic activity), and citrate (for coagulant activity) and without anticoagulant for thrombolytic activity.

All tests using human cells or blood components were carried out with the prior authorization of the Ethics Committee on Human Research (COEP) of the Federal University of Lavras, under the registration number: CAAE: 56619816.6.0000.5148.

2.4 Phospholipasic and hemolytic activity

The phospholipase and hemolytic activities were evaluated in solid medium as described by Gutiérrez et al. [34]. The gel for evaluation of phospholipase activity was prepared with 0.01 mol L^{-1} CaCl_2 ; egg yolk lecithins

1:3 v:v; PBS (pH 7.4); 1% bacteriological agar and 0.005% sodium azide, the medium being poured at 45-50°C into petri dishes. After gel solidification, the treatments were applied in 0.5 cm diameter holes, and the plates were maintained in cell culture chamber for 12 hours at 37°C.

Inhibition assays of phospholipases A₂ were performed using venoms from *Bothrops jararacussu*, *B. moojeni* and *B. alternatus* for the induction of phospholipid cleavage. When 30 µg of each venom was previously incubated with the aqueous and ethanolic extracts of leaves of *A. carambola*, for 30 minutes at 37°C, in proportion 1:0.5; 1:1; 1:2; 1:4 and 1:8 (venom:extract, w:w).

For the hemolytic activity the gel was made by replacing the egg yolk lecithins with a human erythrocyte concentrate in the same volume. To obtain the erythrocytes, the newly collected blood was centrifuged at 700xg for 5 minutes. The plasma was then removed, and the erythrocytes were suspended in 5 mmol L⁻¹ of PBS, pH 7.4 and centrifuged under the same conditions, this washing step being repeated twice. The inhibition of hemolytic activity was evaluated for venoms of *B. moojeni* (60 µg), *B. atrox* and *Crotalus durissus terrificus* (*C.d.t.*) (30 µg), which were preincubated with extracts of leaves of *A. carambola* for 30 minutes at 37 °C in the proportions 1:0.1; 1:0.25 and 1:0.5 (venom:extract, w:w). Controls containing only venoms or extracts were also performed.

2.5 Caseinolytic activity

For the evaluation of caseinolytic activity, the methodology described by Wang, Shih and Huang [35] was used, with modifications. A gel was prepared following methodology of phospholipase activity described by Gutiérrez et al. [34], replacing egg yolk lecithins with casein solution. The casein concentration was adjusted to obtain the same amount of substrate per test, described by Wang, Shih and Huang [35], for liquid activity. The venoms

of *B. jararacussu*, *B. moojeni* and *B. alternatus* (30µg) and *A. carambola* leaf extracts were preincubated in proportion 1:0.5; 1:1; 1:2; 1:4 and 1:8 (venom:extract, w:w) for 30 minutes at 37°C. Samples were then applied to orifices made in the gel, followed by incubation for a period of 12 hours at 37 °C in cell culture chamber. Controls containing only venoms and extracts alone were also evaluated.

The activities described in items 2.4 and 2.5 were evaluated by measuring the diameters of the translucent halos, formed in the gel around the holes, being the results expressed in percentage, where the controls containing only the venom correspond to 100% of activity.

2.6 Thrombolytic activity

Thrombolytic activity was assessed on human blood clots formed *in vitro* according to the methodology described by Cintra et al. [36]. The clots were incubated for 24 hours at 37 °C with samples containing *B. atrox*, *B. moojeni* and *Lachesis muta* (40 µg), PBS or venom previously incubated (30 minutes at 37 °C) with extracts of *A. carambola* leaves in the proportions 1:0.5; 1:1; 1:2 and 1:4 (venom:extract, w:w). Activities were estimated by measuring the volume of fluid released by each thrombus and controls containing only venoms were considered as 100% activity.

2.7 Coagulant / anticoagulant activity

The evaluation of coagulation time was performed as described by Rodrigues et al. [37]. The leaf extracts of *A. carambola* were previously incubated with the *C.d.t.*, *L. muta* and *B. atrox* venoms for a period of 10 minutes at 37°C in the proportions of 1:0.1; 1:0.25; 1:0.5; 1:1; 1:2 and 1:4 (venom:extract, w:w). Tubes containing citrated plasma were kept in a 37°C bath until the temperature stabilized he incubated samples were added to the

plasma (200 μ L) and the timed time to formation of a rigid clot. Controls containing only venoms were performed. The minimum coagulant dose was previously defined, which is the lowest amount of venom capable of inducing plasma coagulation in a range between 50 and 180 seconds [38].

2.8 Fibrinogenolytic activity

For the evaluation of fibrinogenolytic activity, polyacrylamide gel electrophoresis under denaturing conditions, previously described by Laemmli [39], was used. The protease inhibition assays were performed with preincubation of the *B. moojeni* venom (60 μ g), with extracts of *A. carambola* leaves in the proportion 1:2.5; 1:5 and 1:10 (venom:extract, w:w), per period of 30 minutes at 37°C. Then, the fibrinogen was added to the samples and they remained in the same temperature bath for another 90 minutes. The samples were analyzed in 15% polyacrylamide gel (w:v), allowing observation of the α , β and γ chains of the control fibrinogen. Controls containing venom and fibrinogen were used as compared to observe the proteolysis profile of the fibrinogen molecules.

2.9 Statistical analysis

The results were presented as the mean of triplicates \pm standard deviation. The data were statistically evaluated by analysis of variance, and means were compared using the Scott Knott test ($p < 0.05$) using the statistical program [40].

3 Results and discussion

In recent years there has been a growing search for bioactive molecules isolated from medicinal plants [41]. It is believed that much of the

pharmacological potential of plants comes from compounds derived from their secondary metabolism. These compounds can form a complex with proteins by hydrogen bonds and have the function of antioxidant agents (e.g. phenolic compounds) [42], or even act as regulators of endocrine function (e.g. terpenoids) [43].

There is great interest in phenolic compounds because of their various properties, including antioxidant and anti-inflammatory. The leaves of *Averrhoa carambola* are rich in flavonoids [44,45,46], and their medicinal properties are largely attributed to them.

3.1 Total phenolic compounds and total flavonoids

Plant extracts with high levels of phenolic compounds can be applied in the synthesis of new drugs and cosmetics. *Averrhoa carambola* is scientifically proven to contain properties as an antioxidant [47], anti-inflammatory [22], and antihyperglycaemic [44]. In our work the results of total phenolic compound contents and total flavonoids of extracts of *A. carambola* leaves are shown in Table 1. The ethanolic extract was the one with the highest total phenolic content (72.49mg TAE/g) and total flavonoids (67.95mg QE/g). In literature, it was found that the ethanolic extract of *A. carambola* leaves produced 79.07mg GAE/g for phenolic compounds and 35.25mg QE/g for flavonoids [47]. However, in the present work, the flavonoid content was higher than in the literature. The different percentage of flavonoid concentration observed in the study described is possibly due to climatic disturbances and other regional variables to which the plants are submitted.

The higher levels of phenolic compounds and flavonoids observed in the ethanolic extract probably result from the higher ethanol efficiency in extracting secondary metabolites, when compared to water, due to the character of intermediate polarity.

Table 1: Contents of yields, total phenolic compounds (TAE) and total flavonoids (QE) in extracts of leaves of *Averrhoa carambola*

Extracts	Yield %	mg phenolic TAE/100g sample	mg flavonoids QE/100g sample
Aqueous	18.48	4950	1628
ETOH	7.10	7249	6795

Among the products derived from plant material, flavonoids are the most important ones [48]. Many of the biological activities reported for flavonoids as antitumor, antioxidant and anti-inflammatory [49,50] make these compounds pharmacologically active [51]. Thus, flavonoids are promising molecules in the treatment of tumors [52]. They may interfere in the cell growth regulating pathways, energy metabolism, apoptosis, cell division, transcription, repair genes, inflammation, stress response, and may act on tumor formation [53].

Flavonoids act on cells that are involved in inflammation by inhibiting the proliferation of T lymphocytes, inhibit the production of proinflammatory cytokines (TNF- α and IL-1) and act by modulating the activity of enzymes on the arachidonic acid pathways such as phospholipases A₂, cyclooxygenase, and lipoxygenase [54,55] which are important mediators of inflammatory response [56]. Quercetin was the first flavonoid to inhibit the phospholipase A₂ activity of human neutrophils. Other flavonoids, such as hesperetin, naringenin, kaempferol and myricetin, also inhibited the activity of phospholipase A₂ [57]. The flavonoid luteolin inhibited the activity of the enzyme cyclooxygenase (COX) [58]. Flavonols such as campherol, quercetin and myricetin were inhibitors of the enzyme lipoxygenase [59].

3.2 Phospholipase activity

The breakdown of membrane phospholipids may result in the generation of arachidonic acid [60], which is the precursor molecule of bioactive lipids such as prostaglandins and leukotrienes [61], which are responsible for triggering inflammatory processes. Inflammation is known as a major risk factor for a number of diseases such as cancer, neurological diseases, metabolic disorders, and cardiovascular diseases [62].

In addition, the lipids synthesized by the body from the structure of arachidonic acid, prostaglandins and thromboxanes, also act in the blood coagulation processes and platelet aggregation. Thus, the inhibition of phospholipases A2 by natural compounds is directly related to the anticoagulant and anti-platelet action [63,64].

In this context, the relevance of studies aiming to characterize natural phospholipase A2 inhibitors is highlighted, making it possible to prospect future therapeutic applications of these molecules.

Significant inhibitions of phospholipase activity were observed after incubation of the extracts with venoms of *B. moojeni* and *B. alternatus*. The aqueous extract inhibited the phospholipase activity of *B. moojeni* venom by 30% in the ratios of 1:0.5 and 1:2 (w:w), 40% and 25% in 1:1 and 1:8 ratios (w:w), respectively. The ethanolic extract inhibited the activity of the same venom in 25%, when evaluated in the ratio of 1:1 and 1:2 (w:w), and 30% in 1:4 (w:w) (Figure 1).

For *B. alternatus* venom, the aqueous extract was responsible for 25% of inhibition after incubation at 1:1 and 1:2 (w:w) ratios, and 32% at 1:4 and 1:8 (w:w). Meanwhile, the ethanolic extract reduced phospholipase activity by 25% in the proportions of 1:0.5 and 1:1 (w:w), and 32% in 1:2, 1:4, and 1:8 (w:w).

No significant inhibitions by the extracts were observed on the phospholipase activity induced by the *B. jararacussu* venom (Figure 1).

Several plant extracts, such as *Emblica officinalis* Gaerth [65], *Mangifera indica* L. [66], *Mimosa pudica* L. [67], *Sapindus saponaria* [68], *Renealmia alpinia* [69] and *Plathymenia reticulata* B. [18] have already been described containing inhibitory activity on phospholipases A₂. Inhibition of phospholipases A₂ by natural compounds of great importance in the scientific context, with the aim of prospecting mechanisms of action of plant molecules present in therapeutically used formulations for the treatment of numerous diseases [70,71,11,72]. In addition, inhibition of phospholipases A₂ is related to physiological processes involving mainly inflammatory response and blood coagulation. This being said, the medical-scientific interest for the search of extracts or isolated active principles that act as inhibitors of these enzymes [51,73,74].

One of the mechanisms of inhibition proposed in literature is described by Moura et al. [18], which highlight the action of plant compounds in the formation of complexes with calcium ions, interfering in the binding of these to the phospholipases A₂ and consequently in the performance of their function as cofactors.

Polyhydroxylated flavonoids are inhibitors of PLA_{2s} [56] and still have the ability to bind to amide groups of different proteins strong hydrogen bonds [43], being this one of the possible mechanisms of inhibition to explain the reductions of phospholipase activity observed in the present work.

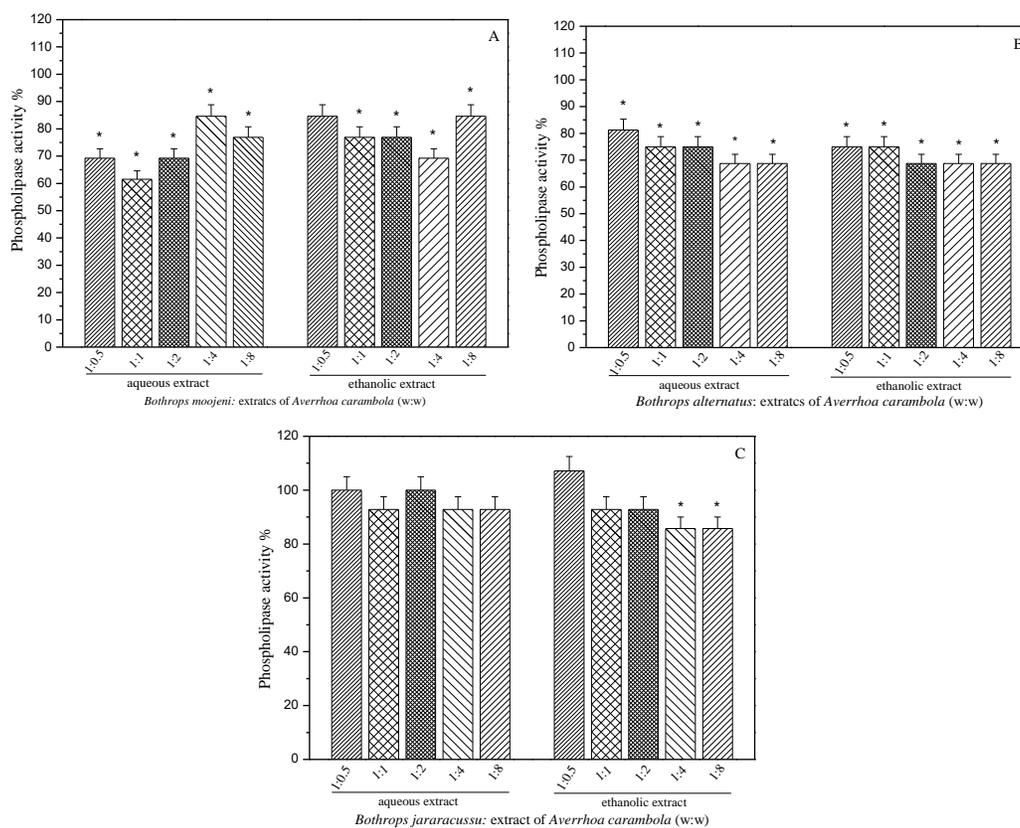


Figure 1: Phospholipase activity (%) of snakes venom of the species *Bothrops moojeni* (A), *B. alternatus* (B) and *B. jararacussu* (C), previously incubated with extracts of *Averrhoa carambola*. Control (+) containing only venom (10 μ g) was considered as 100% activity. The results correspond to the means of data triplicates obtained in each proportion (venom:extract, w:w) and the calculated standard deviations. *Statistically different from positive control.

3.3 Hemolytic activity

Hemolytic activity was performed to evaluate the direct effects of the extracts on erythrocyte membranes as well as the extracts inhibition potential in venom-induced cytotoxicity. The extracts of *Averrhoa carambola* alone did not induce hemolysis under the conditions, concentrations, and incubation time evaluated.

In the present work, the ethanolic extract showed an inhibitory action on *B. atrox* venom, reducing its hemolytic activity by 22% in the proportion of 1:0.25 (w:w), while the aqueous extract was responsible for reducing the activity of this venom by 30% in the proportions of 1:0.1 and 1:0.25, and 38% in the proportion of 1:0.5 (w:w) (Figure 2A). For the venom of *C. d. t.* a reduction of 37% in hemolytic activity was observed after incubation with 1:0.5 (w:w) of the aqueous extract and 50% in 1:0.1 and 1:0.25 (w:w) proportions. No significant inhibition was observed for the ethanolic extract (Figure 2B). The *B. moojeni* venom had its activity inhibited in 22% when previously incubated with the aqueous extract in the proportion of 1:0.1 (w:w), and in 27% when incubated with the ethanolic extract in the proportions of 1:0.25 and 1:0.5 (w:w) (Figure 2C).

Félix-Silva et al. [75], when evaluating the aqueous extract of leaves of *Jatropha gossypifolia* L., observed absence of hemolytic activity, under the conditions studied by them. It is considered for this type of extraction a greater amount of molecules coming from primary metabolism (e.g. proteins, amino acids, and carbohydrates) which would justify the absence of toxicity even when the extracts are evaluated in high concentrations. *Solanum tuberosum* extracts also did not present hemolytic activity in any of the doses evaluated without cytotoxicity [76].

The aqueous extract from the bark of *Bellucia dichotoma* Cogn. inhibited 100% of the indirect hemolytic activity of the *B. atrox* venom, in

proportions of 1:10, 1:20 and 1:30 (w:w). In the extract of this plant was identified high content of condensed and hydrolysable tannins and low flavonoid content [77]. Performing the same test and using the *B. atrox* venom, Moura et al. [78], obtained 100% inhibition of the activity by the aqueous extracts of *Connarus favosus* P. and *Plathymenia reticulata* B. and 50% by the aqueous extract of *Aniba fragaus* D. The ethanolic extract of *Hypericum brasiliense* inhibited the hemolytic activity of *B. jararaca* in the proportion of 1:50. This plant presented powerful analgesic and anti-inflammatory action [79]. The methanolic extract from the leaves of *Acacia hydaspica* R. exhibited potent dose-dependent anti-hemolytic action when evaluated by the liquid hemolysis test [80]. From the *Euphorbia hirta* methanolic extract, a flavonoid was isolated, reducing the hemolytic activity by 56% in the proportion of 1:2 on the action of the *Naja naja* venom [73].

Snake venoms are rich in cardiotoxins, cytotoxins, hemotoxins, myotoxins [81], among other components contained in the venoms that can cause hemolysis. The main toxins are enzymes such as serine proteases, metalloproteases, L-amino acid oxidases and phospholipases A₂ [82]. Phospholipases A₂ hydrolyzes the phospholipids contained in the erythrocyte membrane causing haemolysis [83]. The hemostatic system components are the main physiological targets of these toxins [84]. It is suggested that the inhibitory effects presented by these extracts are due to secondary metabolites present in the plant that were able to inhibit the harmful effects of snake venoms acting as enzymatic inhibitors, mineral chelants, chemical inactivators or immunomodulators that interacted with target macromolecules [43].

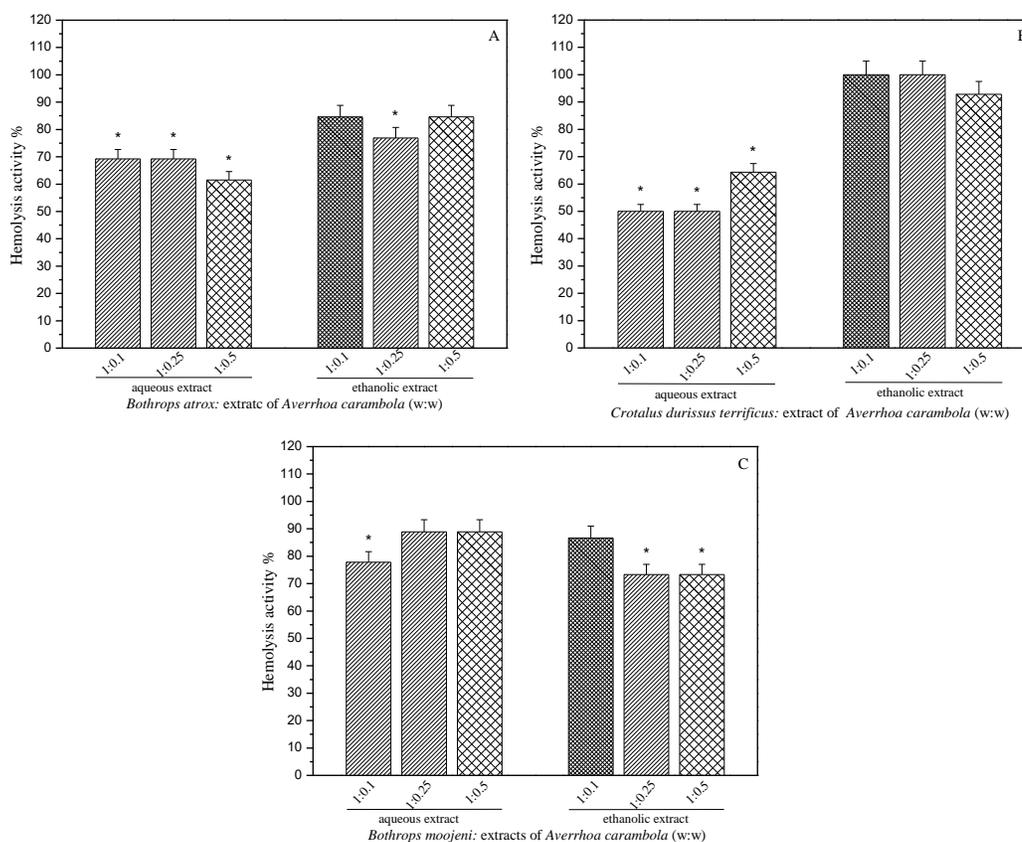


Figure 2: Hemolytic activity (%) of snakes venoms of the species *Bothrops atrox* (A), *Crotalus durissus terrificus* (C.d.t.) (B) and *B. moojeni* (C), previously incubated with extracts of *Averrhoa carambola*. Controls (+) containing only venom were considered as 100% activity (*B. atrox*, 30 μ g, *C.d.t.*, 30 μ g and *B. moojeni*, 60 μ g). The results correspond to the means of data triplicates obtained in each proportion (venom:extract, w:w) and calculated standard deviations. *Statistically different from positive control.

3.4 Caseinolytic activity

Proteases are among the largest functional groups of proteins involved in various pathological processes. Inhibition of proteases of pathogenic organisms represents an advance in the control of various diseases [85].

In our study, the most significant inhibitions of caseinolytic activity were observed for the *B. moojeni* venom, with 20% inhibitions in the proportion of 1:8 (w:w) and for the ethanolic extract inhibitions between 20 and 27% in proportions of 1:0.5; 1:4, and 1:8 (w:w) (Figure 3A). Only the ethanolic extract, in proportions of 1:1 and 1:2 (m:m) exerted inhibition on the proteolytic activity induced by the *B. alternatus* venom (Figure 3B).

The aqueous extracts potentiated the proteolytic activity induced by *B. jararacussu* venom in 1:1, 1:2, 1:4 and 1:8 (w:w) proportions and inhibited proteolysis by 10% in the proportion of 1:0.5 (w:w). The ethanolic extract, when previously incubated with the same venom, potentiated the activity, inducing a 10% increase in proteolysis, at the ratios of 1:4 and 1:8 (w:w) (Figure 3C).

The aqueous extracts of *Lannea acida* and *Bauhinia thonningii* and the ethanolic extracts of *Grewia mollis*, *Waltheria indica* and *Pentanisia prunelloides* showed 90% inhibition of the proteolytic activity of *Bitis arietans* venom. In the extracts were found significant amounts of polyphenols such as tannins [86]. Tannins are found in a variety of plants, possess astringent properties [87] and wide medical application [88]. Tannins, through non-specific binding, interact with enzymes present in venoms, inactivating them or reducing some of their activities [89]. The ethanolic extract of the leaves of *Brownea rosademonte* failed to neutralize the proteolytic activity of the *B. asper* venom. In this extract, steroids, triterpenes, flavonoids and tannins were identified [90].

However, the ethanolic extract from the leaves of *Renealmia alpinia* inhibited a metalloprotease isolated from the venom of *B. atrox*, at 25.9; 35.2; 48.4; and 65.1 ratios, and 75.8% at 1:1; 1:2.5; 1:5; 1:10 and 1:20 (w:w) ratios,

respectively, with increasing inhibitions being directly proportional to the dose increase. In this extract were found flavonoids, terpenoids, and coumarins [91]. The flavonoids galocatechin and myricetin-3-o-glycoside were inhibitors of metalloprotease activity [92].

Although many plant extracts have been evaluated and shown to be promising at exerting inhibitory action on several classes of toxins present in different venoms, there are few mechanisms of action described so far.

The direct action on enzymes present in venoms, through weak interactions (mainly hydrogen), as well as interactions of plant compounds with cofactors essential for the catalytic activity of these enzymes, have already been described [89,93]. Plant extracts containing significant amounts of flavonoids can act as metal chelators and act in the sequestration of zinc ions, essential for the catalytic activity of several proteases present in venoms [94, 95].

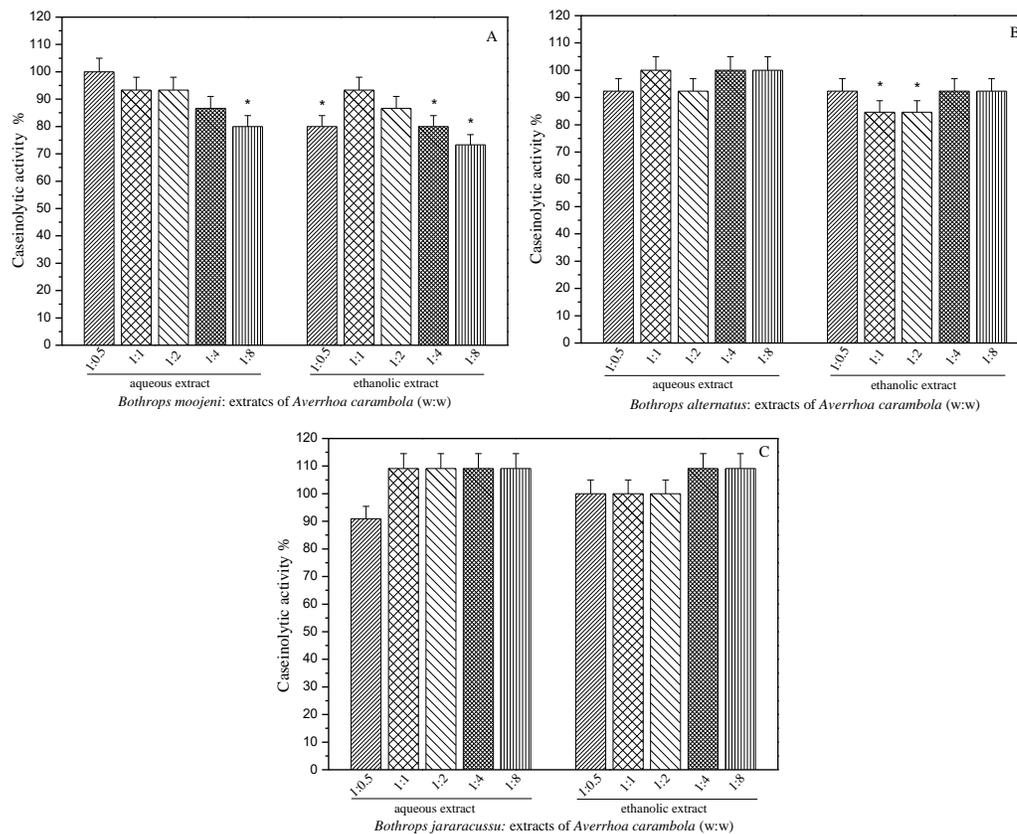


Figure 3: Caseinolytic activity (%) of snake venoms of the species *Bothrops moojeni* (A), *B. alternatus* (B) and *B. jararacussu* (C), previously incubated with extracts of *Averrhoa carambola*. Controls (+) containing only venom (10 μ g) were considered as 100% activity. The results correspond to the means of data triplicates obtained in each proportion (venom: extract, w: w) and the calculated standard deviations. *Statistically different from positive control.

3.5 Thrombolytic activity

The thrombosis process occurs when blood clots, formed in damaged regions on the surface of endothelial cells or blood vessels, are blocked by

platelet deposition, tissue factor and fibrin networks [96]. Plant extracts or isolated active ingredients that act to inhibit enzymes from the blood clotting cascade, such as thrombin, reduce fibrin formation as well as platelet aggregation. The inhibition by natural compounds of some proteases present in snake venoms simulates the anticoagulant effects of these compounds on animal organisms, since these proteases act on the clotting factors of the coagulation cascade as well as can exert similar thrombin function, exhibiting high homology with human enzymes [97,98].

Previous incubations of the *B. atrox* venom with the aqueous extract of *A. carambola* leaves resulted in a significant increase in thrombolytic activity of 75, 85 and 50% in the proportions of 1:0.5; 1:1 and 1:2 (w:w), respectively. For the ethanolic extract the percentage increases observed in the thrombolytic activity were 80, 120, 140 and 40% for the proportion 1:0.5; 1:1, 1:2 and 1:4 (w:w), respectively (Figure 4A).

Differently, the thrombolytic activity induced by *L. muta* venom was reduced by 30, 43 and 45%, after incubation with the aqueous extract in proportion of 1:0.5; 1:2 and 1:4 (w:w), respectively. Significant inhibitions were also observed after incubation of this venom with the ethanolic extract, with reductions in activity of 20 and 50% for the proportion 1:0.5 and 1:4 (w:w), respectively (Figure 4B).

B. moojeni venom-induced thrombus lysis was significantly increased by the aqueous extract in 50 and 70% in the proportion of 1:1 and 1:2 (w:w), respectively. However, when evaluated at the proportion of 1:0.5 (w:w) the aqueous extract inhibited thrombolytic activity by 50%. The ethanolic extract, in the proportions of 1:1, 1:2 and 1:4 (w:w), induced a significant increase in thrombus lysis induced by the same venom, with potentiation of 30 to 48% (Figure 4C).

Bothrops venoms contain thrombin-like activity (similar to thrombin), thus *B. atrox* has high coagulant activity *in vitro* [99]. The aqueous extracts from the barks of *Bellucia dichotoma*, *Plathymenia reticulata* and *Connarus favosus* were evaluated against *B. atrox* venom. For all extracts, at all doses evaluated, a significant increase in coagulation time was observed - from 28 seconds (control containing only venoms) to 6 minutes [78], approximately - suggesting the inhibition of thrombin-like proteases.

The aqueous extract from *Mangifera indica* stem bark was incubated with *Daboia russellii* venom and prolonged plasma coagulation time at all doses evaluated [66]. The ethanolic extract of *Hypericum brasiliense* also inhibited the coagulant activity of *B. jararaca* venom [79]. Extracts from plants that show high anticoagulant activity may be promising for future uses as thrombolytic agents.

The metalloproteinases contained in the venoms induce mainly hemorrhage and debridement of tissues, which characterize the severe effects of the poisoning by *Bothrops* snakes and, for the development of these effects, the enzymes require as cofactors bivalent ions such as zinc, calcium, magnesium, and manganese [100, 101]. Tannins and flavonoids present in plant extracts act to inhibit metalloproteases by zinc chelation [102] and may be reducing the action of the proteases, consequently preventing the degradation of the components responsible for hemostatic balance.

Studies have reported the isolation of jararhagin, a class III metalloprotease that induces hemorrhage, from *B. jararaca* venom. Jararhagin accumulates near blood vessels, binding to components of the extracellular matrix and induces local bleeding [103]. It is suggested the use of plant extracts, in local administration, allowing its action in the inhibition of metalloproteases, such as the aqueous extract of the bark of *Bellucia dichotoma*, which was able to totally inhibit the hemorrhagic activity induced by *B. atrox* [77].

In previous studies, Magalhães et al. [104] demonstrated that the ethanolic extract of the paracari leaves, *Marsipyanthes chamaedrys* (Lamiaceae), reduces the inflammatory and coagulant activities induced by *B. atrox* venom, characterizing inhibitory action on phospholipases A2 and proteases.

The ethanolic extract of the leaves of *Brownea rosademonte* was also described with anticoagulant properties, when evaluated on the activity of the *B. asper* venom, indicating its possible inhibitory action on thrombin-like proteins present in the venom [90]. Thrombin acts at the end of the coagulation cascade and is responsible for the conversion of fibrinogen to fibrin, which results in the formation of fibrin clots [105], thus the inhibition of this enzyme by plant compounds would also result in anticoagulant and/or thrombolytic action.

In the present study, the aqueous and ethanolic extracts of *A. carambola* showed anticoagulant activity when evaluated in conjunction with different venoms (Table 2). In addition to the proposed mechanisms related to enzymatic inhibition, prolongation of coagulation time and dissolution of blood clots, they may also be the result of the action of flavonoids present in *A. carambola* leaves on the production of nitric oxide in blood platelets, inhibiting platelet aggregation and delaying the formation of blood clots [106].

Rodrigues et al. [107], evaluated the methanolic extract of the leaves of *Laguncularia racemosa* L. and identified thrombin inhibitor flavonoids that act as natural anticoagulants or thrombolytics.

The hydroalcoholic extract of the leaves of *Litsea glutinosa* showed significant thrombolytic activity [108], as well as the flavonoid quercetin, when evaluated alone, proved to be a potent thrombin inhibitor [15].

In the present study, different proportions of the extracts incubated with *B. atrox* and *B. moojeni* venoms presented thrombolytic activity (Figure 4A and 4C), suggesting that flavonoids contained in the extracts may be acting as

inhibitors of thrombin, thus having great potential of application in the treatment of thrombotic diseases [107].

Differently, when observing the results obtained for the action of extracts on *C.d.t.* in the coagulation test (Table 2) and on the *L. muta* venom in the thrombolytic test (Figure 4B), it is suggested for the extracts evaluated a potential of application in the treatment of hemorrhagic diseases, since they accelerated the formation of a clot (pro-coagulant action) and significantly decrease thrombolytic activity.

In view of the above, it is necessary to carry out complementary studies that allow to evaluate effective and safe doses and formulations of use that allow the therapeutic use of these natural compounds, considering the different mechanisms of action they can perform as well as the various target molecules on which they can act.

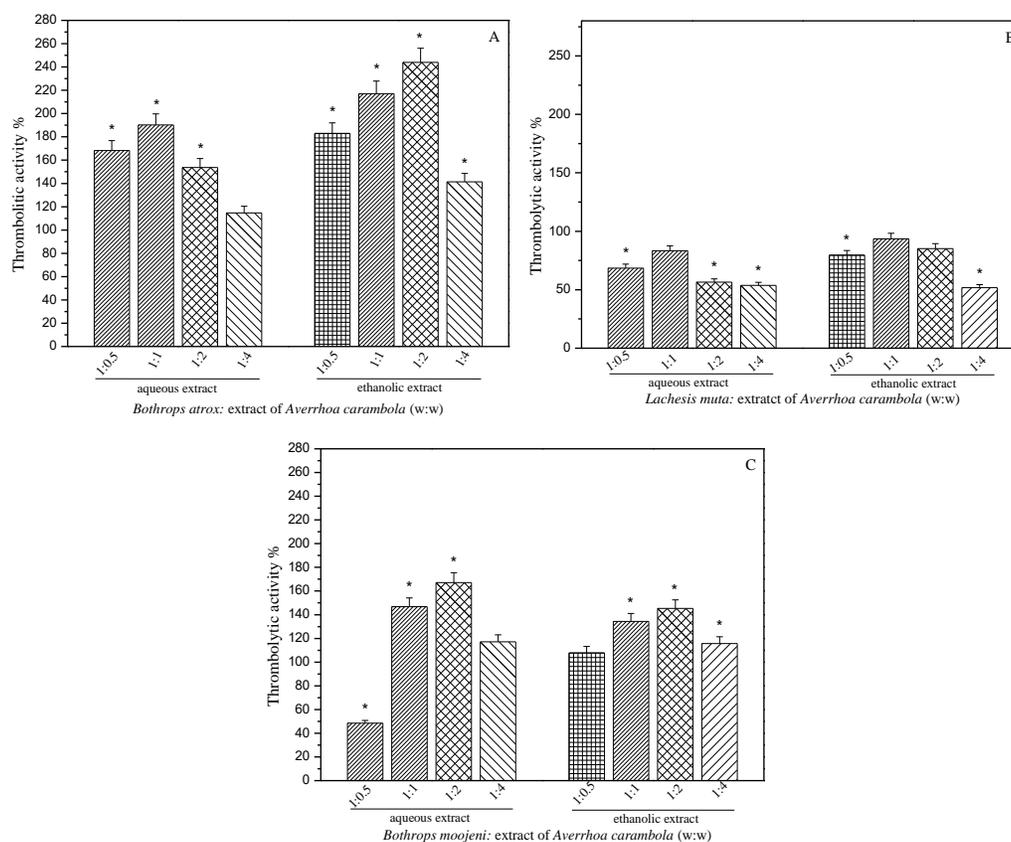


Figure 4: Thrombolytic activity (%) induced by venoms of *Bothrops atrox* (A), *Lachesis muta* (B) and *B. moojeni* (C), previously incubated with extracts of *Averrhoa carambola*. Controls (+) containing only venom (40 μ g) were considered as 100% activity. The results correspond to the means of data triplicates obtained in each proportion (venom:extract, w:w) and calculated standard deviations. *Statistically different from positive control.

3.6 Coagulant/anticoagulant activity

The aqueous extract of *A. carambola* leaves exerted pro-coagulant action, reducing the coagulation time between 8 and 50 seconds, when previously incubated with the *C.d.t.* in proportions of 1:0.1; 1:0.25; 1:1; 1:2 and 1:4 (w:w). The ethanolic extract, acting on the same venom, showed to be pro-

coagulant in proportions 1:0.1; 1:0.25 and 1:1 (w:w), with reductions between 6 and 24 seconds in coagulation time and anti-coagulant in proportion 1:2 and 1:4 (w:w), with coagulation time increases of 15 and 38 seconds, respectively (Table 2).

For the *L. muta* venom, incubations with the aqueous extract resulted in an increase in coagulation time, characterizing an anti-coagulant action at 1:0.1; 1:2 and 1:4 (w:w), with times of 9 to 20 seconds higher than the control. It was observed pro-coagulant action only in the proportion of 1:0.25 (w:w), with reduction of 25 seconds in coagulation time (Table 2).

The ethanolic extract was responsible for increasing the coagulation time induced by the *L. muta* venom when evaluated at the proportions of 1:0.1; 1:0.25 and 1:1 (w:w), with values between 5 and 18 seconds higher than the control containing only venom. However, when evaluated in the proportions 1:2 and 1:4 (w:w), the extract induced reductions in coagulation time obtained for the same venom, although the reductions were not considered significant (Table 2).

Previous incubations of the aqueous extract with the *B. atrox* venom in proportions 1:0.1; 1:2 and 1:4 (w:w) resulted in anticoagulant action, with increases in coagulation time between 18 and 39 seconds. Although the values observed for the 1:0.25 and 1:1 (w:w) proportion did not present a statistically significant difference in relation to the control, a procoagulant action potential in these proportions is observed (Table 2).

Similarly, ethanolic extract exerted a procoagulant action potential when evaluated on *B. atrox* venom at the proportion 1:0.25 (w:w), although it acts as an anti-coagulant when evaluated in proportions of 1:0.1; 1:1; 1:2 and 1:4 (w:w), inducing increases in coagulation time between 6 and 32 seconds (Table 2).

Procoagulant and anti-coagulant actions observed for the same extract acting on the same venom, when evaluated in different proportions suggests the presence in the composition of the extract of inhibitory active principles of some classes of proteases, as well as of molecules potentiating some classes of enzymes. Thus, different amounts of these plant molecules may be favoring or inhibiting the action of different enzymes present in the venom. For the coagulation test, some hemorrhagic metalloproteinases act as anticoagulants; other fibrinogenolytics act as procoagulants generating fibrin networks; serinoproteases responsible for the formation of friable clots can also act as anticoagulants, but with less efficiency and still some phospholipases A₂ can act as pro-coagulants [97,109].

The action of plant compounds on the formation of complexes with calcium ions may result not only in the inhibition of phospholipases A₂ but also in anti-coagulant action since calcium is essential cofactor for the activity of enzymes that act in the coagulation cascade [18].

In this context of varied enzymes acting differently on blood coagulation makes it necessary to evaluate different concentrations of the extracts allowing to define adequate amounts of active plant molecules that will provide the expected action. Whether it is the formation of a clot if the expectation of use is for healing and stagnation of hemorrhages or the dissolution of clots if the study aims to search for anticoagulant agents of wide application in the treatment of cardiovascular diseases.

Table 2: Effect of leaf from *Averrhoa carambola* on the coagulant activity induced by different snake venoms.

		Clotting time (s)		
		<i>Crotalus durissus</i> <i>terrificus</i>	<i>Lachesis</i> <i>muta</i>	<i>Bothrops</i> <i>atrox</i>
*Control		175.00 ± 8.75	76.00 ± 3.80	51.00 ± 2.55
Sample	Proportion (w:w)			
Aqueous extract	1:0.1	136.00 ± 6.80	85.00 ± 4.25	90.00 ± 4.50
	1:0.25	167.00 ± 8.35	51.00 ± 2.55	49.00 ± 2.45
	1:1	125.00 ± 6.25	77.00 ± 3.85	50.00 ± 2.50
	1:2	153.00 ± 7.65	96.00 ± 4.80	88.00 ± 4.40
	1:4	158.00 ± 7.90	90.00 ± 4.50	69.00 ± 3.45
Ethanollic extract	1:0.1	151.00 ± 7.55	85.00 ± 4.25	57.00 ± 2.85
	1:0.25	155.00 ± 7.75	94.00 ± 4.70	39.00 ± 1.95
	1:1	169.00 ± 8.45	81.00 ± 4.05	65.00 ± 3.25
	1:2	190.00 ± 9.50	72.00 ± 3.60	83.00 ± 4.15
	1:4	213.00 ± 10.65	74.00 ± 3.70	81.00 ± 4.05

a – Differ from the positive control (5% probability) in reduction.

b – Differ from the positive control (5% probability) in increase.

*The controls were carried out with 10µg each evaluated venom.

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

3.7 Fibrinogenolytic activity

The two extracts evaluated were efficient in inhibiting the degradation of fibrinogen molecules, induced by the *B. moojeni* venom, in all proportions evaluated (Figure 5).

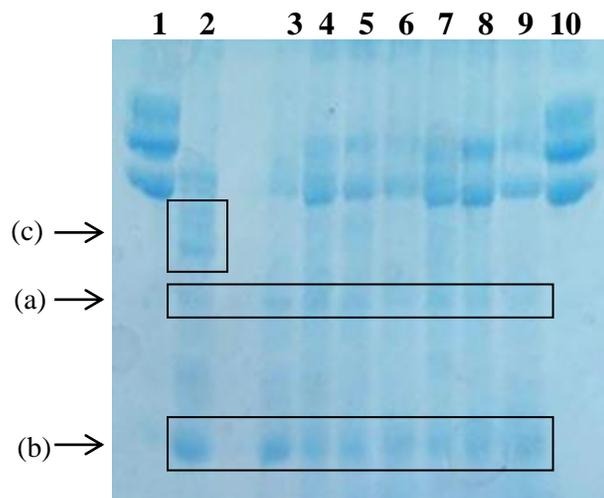


Figure 5: Electrophoretic profile (SDS-PAGE) of the proteolytic action of *Bothrops moojeni* venom on fibrinogen. Effect of extracts of leaves of *Averrhoa carambola* on the activity of the venom. 1- fibrinogen (60 μg); 2- *B. moojeni* (60 μg) + fibrinogen; 3- *B. moojeni*; 4- *B. moojeni* + fibrinogen + aqueous extract of *A. carambola* (1:2.5; w:w); 5- *B. moojeni* + fibrinogen + aqueous extract of *A. carambola* (1:5; w:w); 6- *B. moojeni* + fibrinogen + aqueous extract of *A. carambola* (1:10; w:w); 7- *B. moojeni* + fibrinogen + ethanolic extract of *A. carambola* (1:2.5; w:w); 8- *B. moojeni* + fibrinogen + ethanolic extract of *A. carambola* (1:5; w:w); 9- *B. moojeni* + fibrinogen + ethanolic extract of *A. carambola* (1:10; w:w). (a) proteases present in the venom. (b) phospholipases A2 present in the venom. (c) fibrinopeptides released from the breakdown of the α and β chains of fibrinogen molecules.

In our study, the extracts prevented the breakdown of fibrinogen (Figure 5) by proteolytic enzymes of the venom, which results in non-formation of the fibrin networks, consequently reducing the formation of clots. The results of the coagulant activity corroborate the inhibition of fibrinogenolytic activity since coagulation time prolongations (anticoagulant action) were observed for the different extracts in different doses (Table 2).

One of the proposed mechanisms of action for plant molecules involves the formation of complexes with zinc ions contained in binding sites present in the structures of metalloproteases, resulting in inhibition of these enzymes [102]. Thus, the changes observed in this work, mainly in the caseinolytic, thrombolytic, fibrinogenolytic and coagulant activities, whose proteases play a fundamental role, can be partially attributed to the formation of ionic complexes with plant compounds.

The ability of flavonoids to bind to amide groups of proteins by means of hydrogen bonds [43] can result in structural alterations that lead to partial or total loss of activities performed by enzymes, being this one more mechanism of action that would explain the inhibitions of proteases observed in the present work.

4 Conclusion

The aqueous and ethanolic extracts obtained from *Averrhoa carambola* present bioactive substances that confer therapeutic potential for the treatment of several diseases related to the imbalance of the hemostatic system, after its broad characterization. The present work highlighted the high content of phenolic compounds and total flavonoids present in the leaves of *Averrhoa carambola*. These compounds are probably related to the activities observed, such as the inhibitory action on phospholipases A₂ and proteases (mainly fibrinogenolytic and thrombin-simile), coagulant/anticoagulant, and thrombolytic/thrombotic activity. All of them can be suitable for human use once doses, formulation, and routes of administration can be defined.

References

- [1] Yadav JP, Kumar S and Siwach P: Folk medicine used in gynecological and other related problems by rural population in Haryana. *Indian Journal of Traditional Knowledge* 2006; 5:323-326.
- [2] Mukherjee-Pulok K: Quality control of herbal drugs. *Business Horizons Publication*. New Delhi. 2002; 2:2-24.
- [3] Rangari VD: *Pharmacognosy and Phytochemistry*, Nashik: Career Publications, 2nd Edition 2008.
- [4] Warrel DA: Clinical toxicology of snakebite in Africa and the Middle East/Arabian Peninsula, in: J. Meier, J. White (Eds.) *Handbook of Clinical Toxicology of Animal Venoms And Poisons*, First ed. CRC Press, Boca Raton 1995; 433-492.
- [5] Gutiérrez JM, Lomonte B, Leon G, Rucavado A, Chaves F and Angulo Y: Trends in snakebite envenomation therapy: scientific, technological and public health considerations. *Current Pharmaceutical Design* 2007; 13:2935-2950.
- [6] Santhosh MS, Hemshekhar M, Sunitha K, Thushara RM, Jnaneshwari S, Kemparaju K and Girish KS: Snake venom induced local toxicities, plant secondary metabolites as an auxiliary therapy. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry* 2013; 13:106-123.
- [7] Nanjaraj UAN, Yariswamy M, Joshi V, Nataraju A, Gowda TV and Vishwanath BS: Implications of phytochemicals in snakebite management: present status and future prospective. *Toxin Reviews* 2013; 33:1-24.
- [8] Romero L, Marcussi S, Marchi-Salvador DP, Silva Jr. FP, Fuly AL, Stábeli RG, Da Silva S.L, González J, Monte A and Soares AM: Enzymatic and structural characterization of a basic phospholipase A(2) from the sea anemone *Condylactis gigantea*. *Biochimie* 2010; 92:1063-1071.
- [9] Magrioti V and Kokotos G: Phospholipase A2 inhibitors as potential therapeutic agents for the treatment of inflammatory diseases. *Expert Opinion Therapeutic Patents* 2010; 20:1-18.

- [10] Magrioti V and Kokotos G. Phospholipase A2 inhibitors for the treatment of inflammatory diseases: a patent review (2010 – present). *Expert Opinion Therapeutic Patents* 2013; 23:333-344.
- [11] Carvalho BMA, Santos JDL, Xavier BM, Almeida JR, Resende LM, Martins W, Marcussi S, Marangoni S, Stábeli RG, Calderon LA, Soares AM, Da Silva SL and Marchi-Salvador DP: Snake venom PLA₂s inhibitors isolated from Brazilian plants: synthetic and natural molecules. *BioMed Research International* 2013; 1-8.
- [12] Kokotou MG, Limnios D, Nikolaou A, Psarra A and Kokotos G. Inhibitors of phospholipase A2 and their therapeutic potential: an update on patents (2012-2016). *Expert Opinion Therapeutic Patents* 2016; 2:217-225.
- [13] Eatemadi A, Aiyelabegan HT, Negahdari B, Mazlomi MA, Daraee H, Daraee N, Eatemadi R and Sadroddiny E. Role of protease and protease inhibitors in cancer pathogenesis and treatment. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 2017; 86:221-231.
- [14] Srikanth S and Chen Z: Plant protease inhibitors in therapeutics-focus on cancer therapy. *Frontiers in Pharmacology* 2016; 7.
- [15] Bijak M, Ponczek MB and Nowak P: Polyphenol compounds belonging to flavonoids inhibit activity of coagulation factor X. *International Journal of Biological Macromolecules* 2014; 65:129-135.
- [16] Sałaga M, Sobczak M, Fichna J: Inhibition of proteases as a novel therapeutic strategy in the treatment of metabolic, inflammatory and functional diseases of the gastrointestinal tract. *Drug Discovery Today* 2013; 18:708-715.
- [17] Vergnolle N: Protease inhibition as new therapeutic strategy for GI diseases. *Gut* 2016; 65:1215-1224.
- [18] Moura, VM, Silva WCR, Raposo JDA, Freitas-de-Sousa LA, Dos-Santos MC, Oliveira RB and Mourão RHV: The inhibitory potential of the condensed-tannin-rich fraction of *Plathymenia reticulata* Benth. (Fabaceae) against *Bothrops atrox* envenomation. *Journal of Ethnopharmacology* 2016; 183:136-142.
- [19] Evance WC: Saunders. Text book of Pharmacognosy. Singapore: Harcourt Brace Asia, 14th Edition 1997.

- [20] Dasgupta P, Chakraborty P, Bala NN: *Averrhoa carambola*: an updated review. International Journal of Pharma Research & Review 2013; 2:54-63.
- [21] Gunasekara LCA, Fernando PHP and Sivakanesan R: A preliminary study on the hypoglycemic effect of *Averrhoa carambola* (starfruit) in rats. Proceedings of the Peradeniya University Research Sessions 2011; 16:83.
- [22] Cabrini DA, Moresco HH, Imazu P, Silva CD, Pietrovski EF, Mendes DAGB, Prudente AS, Pizzolatti MG, Brighente IMC and Otuki MF: Analysis of the potential topical anti-inflammatory activity of *Averrhoa carambola* L. in mice. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine 2011; 1-7.
- [23] Thomas S, Patil DA, Patil A, Gand N C: Pharmacognostic evaluation & physiochemical analysis of A.C. L. fruit. Journal of Herbal medicine & Toxicology 2008; 2 51-54.
- [24] Hitesh K and Tejpal A: Starfruit: A fruit for healthy life. Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry 2016; 5:132-137.
- [25] Dai J and Mumper R: Plant phenolics: extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. Molecules 2010; 15:7313-7352.
- [26] Kumar B, Vijayakumar M, Govindarajan R and Pushpangadan P: Ethnopharmacological approaches to wound healing exploring medicinal plants of India. Journal of Ethnopharmacology 2007; 114:103-113.
- [27] Ryan TJ: International Foundation for Dermatology - solving the problems of skin disease in the developing world. Tropical Doctor 1992; 22:42-43.
- [28] Shivaprasad HV, Rajesh R, Yariswamy M and Vishwanath BS: Procoagulant properties of plant latex proteases (2011). In: RM Kini et al. (eds) Toxins and hemostasis. Springer, New York. Journal of Thrombosis and Thrombolysis 2015; 39:43-49.
- [29] Berger M, Silva WOB, Santi L and Guimarães J. A: Haemostasis: a brief review. Pedagogical notebook. Lajeado 2014; 11:140-148.
- [30] Venkatesh BK, Achar RR, Sharanappal P, Priya BS and Swamy SN: Synergistic caseinolytic activity and differential fibrinolytic action of multiple proteases of *Maclura spinosa* (Roxb. ex Willd.) látex. Pharmacognosy Magazine 2016; 12.

- [31] Beltrame FL, Ferroni DC, Alves BRV, Pereira AV and Esmerino LA: Avaliação da qualidade das amostras comerciais de *Baccharis trimera* L. (Carqueja) vendidas no Estado do Paraná. *Acta Scientiarum Health Sciences* 2009; 31:37-43.
- [32] Farmacopéia Brasileira. Atheneu, 4 Edition 2002.
- [33] Woisky RG and Salatino A: Analysis os propolis: some parameters ond prodecore for chemical fuality control. *Journal Apicultural Research* 1998.
- [34] Gutiérrez JM, Avila C, Rojas E and Cerdas L: An alternative *in vitro* method for testing the potency of the polyvalent antivenom produced in Costa Rica. *Toxicon* 1988; 26:411-413.
- [35] Wang WJ, Shih CH and Huang TF: A novel P-I class metalloproteinase with broad substrate-cleaving activity, agkislysin, from *Agkistrodon acutus* venom. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; 324:224-230.
- [36] Cintra AC, De Toni LG, Sartim MA, Franco JJ, Caetano RC, Murakami MT and Sampaio SV: Batroxase, a new metalloproteinase from *B. atrox* snake venom with strong fibrinolytic activity. *Toxicon* 2012; 60:70-82, 2012.
- [37] Rodrigues VM, Soares AM, Guerra-Sá R, Rodrigues V, Fontes MR and Giglio JR: Structural and functional characterization of neuwiedase, a nonhemorrhagic fibrin(ogen)olytic metalloprotease from *Bothrops neuwiedi* snake venom. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 2000; 381:213-324.
- [38] Selistre HS, Queiroz LS, Cunha OAB, De Souza GEP and Giglio JR: Isolation and characterization of hemorrhagic, myonecrotic and edema-inducing toxins from *Bothrops insularis* (jararaca ilhoa) snake venom. *Toxicon* 1990; 28:261-273.
- [39] Laemmli UK: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970; 227:680-685.
- [40] R Core Team: R: A Language and Environment for Statistical Computing. Viena: Viena: R Foundation for Statistical Computing 2012.
- [41] Soares AM, Ticli FK, Marcussi S, Lourenço MV, Januário AH, Sampaio SV, Giglio JR, Lomonte B and Pereira PS: Medicinal plants with inhibitory properties against snake venoms. *Current Medicinal Chemistry* 2005; 12:2625-2641.

- [42] Harborne JB: *Phytochemical Methods: A Guide to Modern Techniques of Plants Analysis*. Chapman & Hall: London, UK, 1998.
- [43] Mors WB, do Nascimento MC, Parente JP, da Silva MH, Melo PA and Suarez-Kurtz G: Plant natural products active against snake bite – the molecular approach. *Phytochemistry* 2000; 55:627-642.
- [44] Cazarolli LH, Kappel VD, Pereira DF, Moresco HH, Brighente IMC, Pizzolatti MG and Silva FRMB: Anti-hyperglycemic action of apigenin-6-C- β -fucopyranoside from *Averrhoa carambola*. *Fitoterapia* 2012; 83:1176-1183.
- [45] Araho D, Miyakoshi M, Chou WH, Kambara T, Mizutani K and Ikeda T: A new flavone C-glycoside from the leaves of *Averrhoa carambola*. *Natural Medicines* 2005; 59:113–116.
- [46] Tadros SH and Sleem AA: Pharmacognostical and biological study of the stem and leaf of *Averrhoa carambola* L. *Bulletin of Faculty of Pharmacy* 2004; 42:225–246.
- [47] Moresco HH, Queiroz GS, Pizzolatti MG and Brighente IMC: Chemical constituents and evaluation of the toxic and antioxidant activities of *Averrhoa carambola* leaves. *Brazilian Journal of Pharmacognosy* 2012; 22:319-324.
- [48] Simões CMO, Schenkel EP, Gosmann G, Mello JCP, Mentz LA and Petrovick PR: *Farmacognosia – da Planta ao Medicamento*. Editora da UFSC: Santa Catarina, 5^a Edition 2004.
- [49] Cazarolli LH, Zanatta L, Alberton EH and Figueiredo MSRB: Flavonoids: Prospective Drug Candidates. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry* 2008; 8:1429-1440.
- [50] Veitch NC and Grayer RJ: Flavonoids and their glycosides, including anthocyanins. *Journal Natural Product Reports* 2008; 555-611.
- [51] Coutinho MAS, Muzitano MF and Costa SS: Flavonoids: potential therapeutic agents for the inflammatory process. *Revista Virtual de Quimica* 2009; 1:241-256.
- [52] Li Y, Fang H and Xu W: Recent advance in the research of flavonoids as anticancer agents. *Mini Reviews in Medicinal Chemistry* 2007; 7:663-678.

- [53] Havsteen BH: The biochemistry and medical significance of the flavonoids. *Pharmacology & Therapeutics* 2002; 96:67-202.
- [54] Biesalski HK: Polyphenols and inflammation: basic interactions. *Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care* 2007; 10:724-728.
- [55] López-Posadas R, Ballester I, Abadía-Molina AC, Suárez MD, Zarzuelo A, Martínez-Augustin O and De Medina FS: Effect of flavonoids on rat splenocytes, a structure-activity relationship study. *Biochemical Pharmacology* 2008; 76:495-506.
- [56] Kim HP, Son KH, Chang HW and Kang SS: Anti-inflammatory plant flavonoids and cellular action mechanisms. *Journal of Pharmacological Sciences* 2004; 96:229-245.
- [57] Lättig J, Böhl M, Fischer P, Tischer S, Tietböhl C, Menschikowski M, Gutzeit HO, Metz P and Pisabarro MT: Mechanism of inhibition of human secretory phospholipase A2 by flavonoids: rationale for lead design. *Journal of Computer-Aided Molecular Design* 2007; 21:473-483.
- [58] Baumann J, Bruchhausen FV and Wurm G: Flavonoids and related compounds as inhibitors of arachidonic acid peroxidation. *Prostaglandins* 1980; 20:627-639.
- [59] Burnett BP, Jia Q, Zhao Y and Levy RM: A medicinal extract of *Scutellaria baicalensis* and *Acacia catechu* acts as a dual inhibitor of cyclooxygenase and 5-lipoxygenase to reduce inflammation. *Journal of Medicinal Food* 2007; 10:442-451.
- [60] Funk CD: Prostaglandins and leukotrienes: advances in eicosanoid biology. *Science* 2001; 294:1871-1875.
- [61] Balsinde J, Winstead MV and Dennis EA: Phospholipase A2 regulation of arachidonic acid mobilization. *Federation of European Biochemical Societies Letters* 2002; 531:2-6.
- [62] Pan MH, Lai CS and Ho CT: Anti-inflammatory activity of natural dietary flavonoids. *Food Funct.* 2010; 1:15-31.
- [63] Lu Q, Clemetson JM and Clemetson J: Snake venoms and hemostasis. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 2005; 3:1791-1799.

- [64] Zingali RB: Interaction of snake-venom proteins with blood coagulation factors: mechanisms of anticoagulant activity. *Toxin Reviews* 2008; 10:25-46.
- [65] Sarkhel S, Chakravarty AK, Das R, Gomes A and Gomes A: Snake venom neutralizing factor from the root extract of *Emblca officinalis* Linn. *Oriental Pharmacy and Experimental Medicine* 2011; 11:25-33.
- [66] Dhananjaya BL, Zanieer F, Girish KS and D'Souza CJ: Anti-venom potential of aqueous extract of stem bark of *Mangifera indica* L. against *Daboia russellii* (Russell's viper) venom. *Indian Journal of Biochemistry & Biophysics* 2011; 48:175-183.
- [67] Ambikabothy J, Ibrahim H, Ambu S, Chakravarthi S, Awang K and Vejayan J: Efficacy evaluations of *Mimosa pudica* tannin isolate (MPT) for its antiophidian properties. *Journal of Ethnopharmacology* 2011; 137:257-262.
- [68] Silva ML, Marcussi S, Fernandes RS, Pereira PS, Januário AH, França SC, Da Silva SL, Soares AM and Lourenço MV: Anti-snake venom activities of extracts and fractions from callus cultures of *Sapindus saponaria*. *Pharmaceutical Biology* 2012; 50:366-375.
- [69] Gómez-Betancura I, Benjumea D, Patiño A, Jiménez N and Osorio E: Inhibition of the toxic effects of *Bothrops asper* venom by pinostrobin, a flavanone isolated from *Renealmia alpinia* (Rottb.) MAAS. *Journal of Ethnopharmacology* 2014; 155:1609–1615.
- [70] Samy RP, Gopalakrishnakone P and Chow VTK: Therapeutic application of natural inhibitors against snake venom phospholipase A₂. *Bioinformation* 2012; 8:48-57.
- [71] Dey A and De JN: Phytopharmacology of antiophidian botanicals: a review. *International Journal of Pharmacology* 2012; 8:62-79.
- [72] Hage-Melim LI: Phospholipase A₂ inhibitors isolated from medicinal plants: alternative treatment against snakebites. *Mini Reviews in Medicinal Chemistry* 2013; 13:1348-1356.
- [73] Gopi K, Anbarasu K, Renu K, Jayanthi S, Vishwanath BS and Jayaraman G: Quercetin-o-rhamnoside from *Euphorbia hirta* protects against snake venom induced toxicity. *Biochimica et Biophysica Acta* 2016; 1860:1528-1540.

[74] Kishore V, Yarla NS, Zameer F, Prasad MNN, Santosh MS, More SS, Rao DG and Dhananjaya BL: 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* 2016; 8:213-216.

[75] Félix-Silva J, Souza T, Menezes YAS, Cabral B, Câmara RBG, Silva-Junior AA, Rocha HAO, Rebecchi IMM, Zucolotto SM and Fernandes-Pedrosa MF: Aqueous leaf extract of *Jatropha gossypifolia* L. (Euphorbiaceae) inhibits enzymatic and biological actions of *Bothrops jararaca* snake venom. *PLOS ONE* 2014; 9:1-14.

[76] Pepe A, Frey ME, Muñoz F, Fernández MB, Pedraza A, Galbán G, García DN, Daleo GR and Guevara MG: Fibrin(ogen)olytic and antiplatelet activities of a subtilisin-like protease from *Solanum tuberosum* (StSBTc-3). *Biochimie* 2016; 125:163-170.

[77] Moura VM, Bezerra ANS, Mourão RHV, Lameiras JLV, Raposo JDA, Sousa RL, Boechat AL, Oliveira RB, Chalkidis HM and Dos-Santos MC: A comparison of the ability of *Bellucia dichotoma* Cogn. (Melastomataceae) extract to inhibit the local effects of *Bothrops atrox* venom when pre-incubated and when used according to traditional methods. *Toxicon* 2014; 85:59-68.

[78] Moura VM, Sousa LAF, Oliveira RB, Silva AMM, Chalkidis HM, Silva MN, Pacheco S and Mourão RHV: Inhibition of the principal enzymatic and biological effects of the crude venom of *Bothrops atrox* by plant extracts. *Journal of Medicinal Plants Research* 2013; 7:2330-2337.

[79] Assafim M, Coriolano EC, Benedito SE, Fernandes CP, Lobo JFR, Sanchez EF, Rocha LM and Fuly AL: *Hypericum brasiliense* plant extract neutralizes some biological effects of *Bothrops jararaca* snake venom. *Journal of Venom Research* 2011; 2:11-16.

[80] Afsar T, Razak S, Khan MR, Mawash S, Almajwal A, Shabir M and Haq IU: Evaluation of antioxidant, anti-hemolytic and anticancer activity of various solvent extracts of *Acacia hydasypica* R. Parker aerial parts. *BMC Complementary and Alternative Medicine* 2016; 16:1-16.

[81] Dufton MJ and Hider RC: Structure and pharmacology of elapid cytotoxins. *Pharmacology & Therapeutics* 1988; 36:1-40.

- [82] Calvete JJ, Borges A, Segura A, Flores-Díaz M, Alape-Girón A, Gutiérrez JM, Diez N, De Sousa L, Kiriakos D, Sánchez E, Faks JG, Escolano J and Sanz L: Snake venomics and antivenomics of *Bothrops colombiensis*, a medically important pitviper of the *Bothrops atrox-asper* complex endemic to Venezuela: Contributing to its taxonomy and snakebite management. *Journal of Proteomics* 2009; 72:227-240.
- [83] Demel RA, Geurts van Kessel WS, Zwaal RF, Roelofsen B and van Deenen LL: Relation between various phospholipase actions on human red cell membranes and the interfacial phospholipid pressure in monolayers. *Biochimica et Biophysica Acta* 1975; 406:97-107.
- [84] Cardoso DF, Yamaguchi IK and Moura-da-silva AM: Produção de soros antitoxinas e perspectivas de modernização por técnicas de biologia molecular. In: *Animais peçonhentos no Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos acidentes* 2009; p. 419.
- [85] Supuran CT, Scozzafava A and Clare BW: Bacterial protease inhibitors. *Med. Res. Rev.* 2002; 22:329-372.
- [86] Molander M, Nielsen L, Søgaaard S, Staerk D, Rønsted N, Diallo D, Chifundera KZ, Staden JV and Jäger AK: Hyaluronidase, phospholipase A2 and protease inhibitory activity of plants used in traditional treatment of snakebite-induced tissue necrosis in Mali, DR Congo and South Africa. *Journal of Ethnopharmacology* 2014; 157:171-180.
- [87] Abubakar MS, Sule MI, Abdurahman EM, Haruna AK and Jahun BM: *In vitro* snake venom detoxifying action of the leaf extract of *Guiera senegalensis*. *Journal of Ethnopharmacology* 2000; 69:253-257.
- [88] Pithayanukul P, Leanpolchareanchai J and Bavovada R: Inhibitory effect of tea polyphenols on local tissue damage induced by snake venoms. *Phytotherapy Research* 2010; 24:56-62.
- [89] Borges MH, Alves DLF, Raslan DS, Pilo-Veloso D, Rodrigues VM, Homsí-Brandeburgo MI and de Lima ME: Neutralising properties of *Musa paradisiaca* L. (Musaceae) juice on phospholipase A(2), myotoxic, hemorrhagic and lethal activities of crotalidae venoms. *Journal of Ethnopharmacology* 2005; 98:21-29.

- [90] Salazar M, Chérigo L, Acosta H, Otero R and Martínez-Luis S: Evaluation of anti-*Bothrops asper* venom activity of ethanolic extract of *Brownea rosademonte* leaves. *Acta Pharmaceutica* 2014; 64:475–483.
- [91] Patiño AC, Benjumea DM and Pereañez JA: Inhibition of venom serine proteinase and metalloproteinase activities by *Renalmia alpinia* (Zingiberaceae) extracts: Comparison of wild and *in vitro* propagated plants. *Journal of Ethnopharmacology* 2013; 149:590-596.
- [92] Vale F, Mendes LH, Fernandes MM, Costa RS, Hage-Melin S, Sousa M, Hamaguchi A, Homsí-Brandeburgo MI, Franca SC, Silva CH, Pereira PS, Soares AM and Rodrigues VM: Protective effect of *Schizolobium parahyba* flavonoids against snake venoms and isolated toxins. *Current Topics in Medicinal Chemistry* 2011; 11:2566-2577.
- [93] Núñez V, Castro V, Murillo R, Ponce-Soto LA, Merfort I and Lomonte B: Inhibitory effects of *Piper umbellatum* and *Piper peltatum* extracts towards myotoxic phospholipases A2 from *Bothrops* snake venoms: isolation of 4-nerolidylcatechol as active principle. *Phytochemistry* 2005; 66:1017-1025.
- [94] Fernández MT, Mira ML, Florêncio MH and Jennings KR: Iron and copper chelation by flavonoids: an electrospray mass spectrometry study. *Journal of Inorganic Biochemistry* 2002; 92:105-111.
- [95] Mira L, Fernandez MT, Santos M, Rocha R, Florêncio MH and Jennings KR: Interactions of flavonoids with iron and copper ions: a mechanism for their antioxidant activity. *Free Radical Research* 2002; 36:1199-1208.
- [96] Furie B and Furie BC: Mechanisms of thrombus formation. *New England Journal of Medicine* 2008; 359:938-949.
- [97] Meier J and Stocker K: Effects of snake venoms on hemostasis. *Critical Reviews in Toxicology* 1991; 21:171-182.
- [98] Marsh N.A: Snake venoms affecting the haemostatic mechanism-a consideration of their mechanisms, practical applications and biological significance. *Blood Coagulation & Fibrinolysis* 1994; 5:399–410.
- [99] Furtado MF, Colletto GMDD and Da Silva WD: Controle de qualidade dos venenos animais e dos correspondentes antivenenos: I Padronização dos métodos de ensaio das atividades bioquímicas e farmacológicas dos venenos de algumas

espécies do gênero *Bothrops* e *Crotallus*. Memórias do Instituto Butantan 1991; 53:149-159.

[100] Gutiérrez JM, León G, Rojas G, Lomonte B, Rucavado A and Chaves F: Neutralization of local tissue damage induced by *Bothrops asper* (terciopelo) snake venom. *Toxicon* 1998; 36:1529-1538.

[101] Fox JW and Serrano SMT: Insights into and speculations about snake venom metalloproteinase (SVMP) synthesis, folding and disulfide bond formation and their contribution to venom complexity. *The Federation of European Biochemical Societies Journal* 2008; 275:3016-3030.

[102] Castro O, Gutiérrez JM, Barrios M, Castro I, Romero M and Umanã E: Neutralización del efecto hemorrágico inducido por veneno de *Bothrops asper* (Serpentes: viperidae) por extratos de plantas tropicales. *Revista de Biología Tropical* 1999; 47:605-616.

[103] Baldo C, Jamora C, Yamanouye N, Zorn TM and Moura-da-Silva AM: Mechanisms of vascular damage by hemorrhagic snake venom metalloproteinases: tissue distribution and in situ hydrolysis. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 2010; 4:727.

[104] Magalhães A, Santos GB, Verdam MCS, Fraporti L, Malheiro A, Lima EM and Dos-Santos MC: Inhibition of the inflammatory and coagulant action of *Bothrops atrox* venom by the plant species *Marsypianthes chamaedrys*. *Journal of Ethnopharmacology* 2011; 134:82-88.

[105] Bauer KA: Recent progress in anticoagulant therapy: Oral direct inhibitors of thrombin and factor Xa. *Journal of Thrombosis Haemostasis* 2011; 9:12–19.

[106] Diallo S: Etude des propriétés antioxydantes et antiplasmodium des *Lanea* couramment rencontrés au Mali [Thèse de Doctorat]. Mali: Université de Bamako 2005.

[107] Rodrigues CFB, Gaeta HH, Belchor MN, Ferreira MJP, Pinho MVT, Toyama DO and Toyama MH: Evaluation of potential thrombin inhibitors from the white Mangrove (*Laguncularia racemosa* (L.) C.F. Gaertn.). *Mar. Drugs* 2015; 13:4505-4519.

[108] Bhowmick R, Sarwar MS, Dewan SMR, Das A, Das B, Uddin MMN, Islam MS and Islam MS: *In vivo* analgesic, antipyretic, and anti-inflammatory potential in Swiss albino mice and *in vitro* thrombolytic activity of

hydroalcoholic extract from *Litsea glutinosa* leaves. *Biological Research* 2014; 47:1-8.

[109] Braud S, Bon C and Wisner A: Snake venom proteins acting on hemostasis. *Biochimie* 2000; 82:851–859.

**ARTIGO II – POTENCIAL FARMACOLÓGICO DE
EXTRATOS DO FRUTO DE *Averrhoa carambola* SOBRE
ATIVIDADES ENZIMÁTICAS**

DANIELA APARECIDA OLIVEIRA¹, ANDERSON ASSAID SIMÃO¹,
MARCUS VINICIUS CARDOSO TRENTO¹, SILVANA MARCUSSI^{1*}

¹Departamento de Química, Universidade Federal de Lavras, CP: 3037, Lavras,
CEP: 37200-000, Minas Gerais, Brasil. danioliveira.ufla@hotmail.com;
andersonsbufla@yahoo.com.br; marcussi@dqi.ufla.br

*Autor para correspondência: Dra. Silvana Marcussi, Laboratório de
Bioquímica, Departamento de Química, Universidade Federal de Lavras,
Campus Universitário, CP: 3037, Lavras 37200-000, Brasil (telefax número:
+55(35)3829-1271, e-mail: marcussi@dqi.ufla.br).

Resumo

A hemostasia se define como o processo em manter a coagulação e o sangramento em equilíbrio. Plantas medicinais contém substâncias bioativas e podem atuar em processos hemostáticos. A *Averrhoa carambola*, é uma planta utilizada popularmente no tratamento de diversas doenças. Conhecida medicinalmente por conter compostos bioativos representados por metabólitos primários e secundários que atuam no tratamento de diversas doenças, sendo cientificamente descritas para estas espécies, ações como anti-inflamatória, antioxidante e hipoglicêmica. Peçonhas de serpentes correspondem a fontes ricas de fosfolipases A₂ e proteases, sendo alvos farmacológicos na busca por inibidores naturais dessas enzimas. As fosfolipases A₂ e proteases estão envolvidas em processos como coagulação sanguínea, hemorragia, agregação de plaquetas e inflamação, assim, a inibição destas está relacionada ao tratamento de uma série de doenças. Objetivou-se neste estudo avaliar o potencial farmacológico exercido pelos extratos aquosos e etanólicos de frutos de *A. carambola* sobre atividades fosfolipásicas, hemolíticas e proteolíticas, induzidas por peçonhas de serpentes das espécies *Bothrops jararacussu*, *B. moojeni*, *B. alternatus*, *B. atrox*, *Crotalus durissus terrificus* e *Lachesis muta*, cujas as principais classes de enzimas que compõem estas peçonhas possuem alto grau de homologia com enzimas humanas. Foram identificados nos extratos de *A. carambola* compostos fenólicos e flavonoides que atuaram inibindo significativamente as atividades fosfolipásica (20-50%), hemolítica e fibrinogenolítica (até 100%). Os extratos apresentaram principalmente ação pró-coagulante sobre a atividade exercida pela peçonha de *C.d.t.* e anti-coagulante sobre a coagulação induzida pela peçonha de *B. atrox*. Para a atividade trombolítica foram observadas inibições significativas (acima de 20%) apenas utilizando a peçonha de *L. muta* como indutora. A lise de trombos induzida por

peçonhas botrópicas foi potencializada pelos dois extratos avaliados. Os resultados obtidos mostram que os extratos apresentam ação farmacológica inibindo ou potencializando as atividades induzidas pelas toxinas. Entretanto, estudos complementares são necessários visando o conhecimento dos mecanismos de ação de compostos presentes nos extratos.

Palavras-chave: plantas medicinais, peçonhas de serpentes, compostos fenólicos, ação sobre a hemostasia.

1 Introdução

A hemostasia envolve processos complexos e configura um eficiente mecanismo de defesa do nosso organismo contra a perda descontrolada de sangue. Quando ocorre uma lesão vascular, três processos são ativados para evitar a perda descontrolada de sangue, a vasoconstrição, a agregação plaquetária e a coagulação sanguínea (Berger et al., 2014). Compostos naturais podem participar em processos hemostáticos induzindo ou inibindo a coagulação sanguínea, atuando em várias etapas da cascata de coagulação, assim como na fibrinólise. Civilizações humanas antigas já relatavam o uso de plantas com o intuito de acelerar o processo de estancamento de hemorragias e a cicatrização de feridas (Barros et al., 2014).

Durante anos as plantas vêm servindo como uma importante fonte de alimentos e medicamentos para inúmeros povos (Dey; De, 2011). Os compostos bioativos presentes nessas plantas responsáveis pelos seus efeitos terapêuticos são principalmente os compostos fenólicos, alcaloides, carotenoides, vitaminas e fibras (Dey; De, 2012).

Vários são os mecanismos pelos quais os compostos bioativos exercem seus efeitos e entre eles destacam-se a ação antioxidante, inibidora de enzimas,

anti-inflamatória e a proteção sobre o material genético. Apesar dos efeitos benéficos, os compostos presentes em plantas medicinais, em determinadas situações, podem não ser inócuos e apresentar efeitos tóxicos, genotóxicos e carcinogênicos (Boeira et al., 2010; Osowsk et al., 2010). Evidenciando a necessidade de uma ampla caracterização fármaco-tóxica *in vitro* e *in vivo* dos extratos dessas plantas para comprovação de seus efeitos terapêuticos e toxicológicos.

Um exemplo de planta utilizada medicinalmente no Brasil e em vários outros países é a *Averrhoa carambola*, família Oxalidacea, popularmente conhecida como carambola, que chama a atenção pela sua expressividade econômica, sabor, aroma e diversidade de usos. Da *A. carambola* a parte mais apreciável é o fruto, que apresenta baixa caloria e é rico em macronutrientes como os carboidratos (Manda et al., 2012), as vitamina A e C, e os minerais cálcio e potássio. É também rica fonte de metabólitos secundários como os polifenóis, alcaloides, flavonoides, saponinas e taninos (Avinash; Swapneel; Anita, 2012; Gheewala et al., 2012). Popularmente a *A. carambola* é usada para tratar irritações nos olhos, dor de garganta, dor de dente, disúria, escorbuto, eczema, febre, hemorróidas, vômitos, sarna e diferentes tipos de envenenamento (Gheewala et al., 2012). Estudos fitoquímicos já identificaram no fruto de *A. carambola*, dois alcaloides, três compostos fenólicos e um triterpenoide (Yang et al., 2014), destacando assim o potencial farmacológico destes frutos e abrindo diversas perspectivas para sua aplicação terapêutica.

Neste contexto muitos estudos *in vitro* e *in vivo* já foram realizados inúmeros trabalhos envolvendo extratos obtidos de diversas partes de *A. carambola*, sendo encontradas as atividades anti-inflamatória, antioxidante, antimicrobiana, hipocolesterolêmica e hipoglicemiante (Gheewala et al., 2012).

Peçonhas de serpentes são ricas em fosfolipases A₂ e proteases e se tornaram ferramentas laboratoriais, principalmente por suas enzimas serem

homólogas as enzimas humanas, abrindo caminho para o desenvolvimento e a descoberta de produtos naturais inibidores de proteases e fosfolipases A₂ (Salaga; Sobczar; Fichna, 2013).

Com base nessas informações, a *A. carambola* possui grande potencial farmacológico para atuar como uma alternativa aos medicamentos convencionais ou em complementação a eles, no tratamento de diversas doenças. Assim, diante da busca de alternativas terapêuticas de menor custo, fácil acesso e segurança comprovada, bem como a falta de informações científicas sobre os frutos de *A. carambola* amplamente utilizados na nutrição e medicina popular. Objetivou-se neste estudo investigar as atividades farmacológicas dos extratos aquosos e etanólicos de frutos de *A. carambola* sobre atividades induzidas por peçonhas de diferentes serpentes.

2 Materiais e métodos

2.1 Coleta, identificação do material vegetal e preparação dos extratos

Frutos de *Averrhoa carambola* (Oxalidaceae) foram adquiridos na cidade de Lavras, M.G., Brasil, de um produtor local. Os frutos foram lavados, secos em temperatura ambiente, em seguida foram cortados em pedaços, embalados e congelados. As exsiccatas da espécie foram depositadas no Herbário da Universidade Federal de Lavras, M. G., Brasil, sob nº 24201.

Foram preparados dois extratos utilizando solventes e métodos diferentes. No preparo do extrato aquoso foram utilizados 80 g do fruto de *A. carambola* em 800 mL de água, procedendo com trituração do material em liquidificador industrial, e filtração do extrato em tecido de organza. No preparo do extrato etanólico foi utilizado o método da percolação. O extrato etanólico foi submetido a remoção do solvente em evaporador rotativo a 40°C e, ambos

extratos aquoso e etanólico foram imediatamente congelados, em seguida liofilizados, pesados e armazenados a -4°C .

2.2 Determinação de compostos fenólicos totais

A determinação dos teores de compostos fenólicos totais foi realizada de acordo com o método de Folin-Denis (Farmacopéia Brasileira, 2002; Beltrame et al., 2009). Alíquotas de 800 μL de extrato aquoso e 200 μL de extrato etanólico do fruto de *A. carambola* (em dose final de 3200 e 160 μg) foram transferidas para tubos de ensaio, seguindo com adição de 100 μL do reagente de Folin-Denis, e 200 μL Na_2CO_3 e ajuste de volume para 2 mL utilizando água. Após 30 minutos, foi realizada a leitura das absorbâncias em 760 nm, utilizando-se um espectrofotômetro BioSystems - modelo BTS-330. O branco foi preparado da mesma forma, substituindo-se a solução-amostra por água destilada. Os resultados foram expressos em mg compostos/100 g de amostra. A curva analítica foi realizada com cinco concentrações conhecidas de ácido tânico (4, 8, 12, 16 e 20 $\mu\text{g mL}^{-1}$) a partir de uma solução-estoque de 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$, da mesma forma como descrito para as amostras.

2.3 Determinação de flavonoides totais

Para a determinação dos teores de flavonoides totais foi utilizada a metodologia descrita por Woisky e Salatino (1998). Foram pesados, dos extratos aquoso e etanólico de frutos de *A. carambola*, 0,1 g e dissolvidos em 25 mL de metanol. Alíquotas de 120 μL (480 μg) e 400 μL (1600 μg) dos extratos foram adicionados a 500 μL de solução metanólica de cloreto de alumínio a 2% (m v^{-1}) e o volume completado com solução metanólica de ácido acético a 5% (v v^{-1}). Após 30 minutos, as absorbâncias foram lidas a 425 nm. Para cada amostra foi preparado um branco, substituindo os volumes de amostra por metanol. A curva

analítica foi realizada com alíquotas de 50, 100, 200, 300, 400 e 500 μL de quercetina, retiradas de uma solução-estoque de $100 \mu\text{g mL}^{-1}$.

2.4 Peçonhas de serpentes

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

2.5 Obtenção do sangue humano

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

Todos os ensaios que se utilizaram de células ou componentes sanguíneos humanos foram realizados com autorização prévia do Comitê de Ética em Pesquisas com Seres Humanos (COEP) da Universidade Federal de Lavras, sob o número de registro CAAE:56619816.6.0000.5148.

2.6 Atividades fosfolipásica e hemolítica

As atividades fosfolipásica e hemolítica foram avaliadas conforme descrito por Gutiérrez et al. (1988). A atividade fosfolipásica foi avaliada em géis de ágar. O gel foi preparado em CaCl_2 $0,01 \text{ mol L}^{-1}$; gema de ovo 1:3 v:v; PBS (pH 7,4); ágar bacteriológico 1% e azida de sódio 0,005%, sendo o meio vertido à temperatura de 45-50 °C em placas de petri. Após a solidificação do gel, os tratamentos foram aplicados, em volume final de 30 μL , em orifícios de 0,5 cm

de diâmetro. Os géis contendo os tratamentos permaneceram em câmara de cultivo celular à 37 °C por 12 horas.

Os ensaios de inibição de fosfolipases A₂ foram realizados utilizando peçonhas (10 µg) de *Bothrops jararacussu*, *B. moojeni* e *B. alternatus* para a indução da quebra de fosfolipídios. As peçonhas foram incubadas previamente com os extratos aquoso e etanólico de frutos de *A. carambola*, por 30 minutos a 37 °C, nas proporções 1:0,5; 1:1; 1:2; 1:4 e 1:8 (peçonha:extrato; m:m).

Para a atividade hemolítica foi utilizado o mesmo método descrito para a atividade fosfolipásica, com a substituição da gema de ovo por um concentrado de eritrócitos humanos em mesmo volume. Para a obtenção dos eritrócitos, o sangue coletado foi centrifugado a 700xg por 5 minutos. O plasma foi removido, e os eritrócitos foram suspensos em PBS, pH 7,4 e centrifugados nas mesmas condições. Esta etapa de lavagem foi repetida duas vezes. A inibição da atividade hemolítica foi avaliada para as peçonhas de *B. moojeni* (60 µg), *B. atrox* (30 µg) e *Crotalus durissus terrificus* (30 µg). As peçonhas foram previamente incubadas com os extratos de frutos de *A. carambola*, por 30 minutos a 37 °C, nas proporções 1:0,1; 1:0,25 e 1:0,5 (peçonha:extrato; m:m). Ambas as atividades fosfolipásica e hemolítica foram avaliadas pela medida (mm) do halo translúcido formado ao redor dos orifícios nos géis, onde as amostras foram aplicadas. Os resultados foram expressos em porcentagem, em que os controles contendo apenas as peçonhas corresponderam a 100% de atividade. Controles contendo apenas peçonhas ou os extratos também foram realizados.

2.7 Atividade caseinolítica

Para a avaliação da atividade caseinolítica foram elaborados géis seguindo metodologia descrita por Gutiérrez (1988). Entretanto, foi realizada a substituição da gema de ovo por solução de caseína, que teve sua concentração

ajustada para obter a mesma quantidade de substrato por teste, descrita por Wang, Shih e Huang (2004), para a atividade em meio líquido. As peçonhas de *B. jararacussu*, *B. moojeni* e *B. alternatus* (10 µg) e os extratos de frutos de *A. carambola* foram incubados previamente nas proporções 1:0,5; 1:1; 1:2; 1:4 e 1:8 (peçonha:extrato; m:m) por 30 minutos à 37 °C. Posteriormente os tratamentos foram aplicados à orifícios elaborados no gel, seguindo com incubação por um período de 12 horas à 37 °C em câmara de cultivo celular. Controles contendo apenas as peçonhas e os extratos isoladamente também foram avaliados. A atividade proteolítica foi avaliada pela medida dos diâmetros dos halos translúcidos, formados no gel ao redor dos orifícios, após coloração com amido black 1% e descoloração com ácido acético 20%. Os resultados foram expressos em porcentagem, em que os controles contendo apenas as peçonhas corresponderam a 100% de atividade proteolítica.

2.8 Atividade trombolítica

A atividade trombolítica foi avaliada sobre coágulos sanguíneos humanos formados *in vitro* de acordo com metodologia descrita por Cintra et al. (2012). Os coágulos foram incubados por 24 horas a 37 °C com amostras contendo peçonha de *B. atrox*, *B. moojeni* e *Lachesis muta* (40 µg), PBS ou peçonha previamente incubada (30 minutos à 37 °C) com os extratos de frutos de *A. carambola* nas proporções 1:0,5; 1:1; 1:2 e 1:4 (peçonha:extrato; m:m). As atividades foram estimadas pela medida do volume de líquido liberado por cada trombo, os controles contendo apenas peçonhas foram considerados como 100% de atividade e o volume médio, obtido nos controles negativos (PBS), foi subtraído de todos os tratamentos.

2.9 Atividade coagulante

A avaliação do tempo de coagulação foi realizada conforme descrito por Rodrigues et al. (2000). Os extratos de frutos de *A. carambola* foram incubados previamente com as peçonhas de *C.d.t.*, *L. muta* e *B. atrox*, por um período de 10 minutos, a 37 °C, nas proporções de 1:0,1; 1:0,25; 1:0,5; 1:1; 1:2 e 1:4 (peçonha:extrato; m:m). Tubos contendo plasma citratado foram mantidos em banho a 37 °C até a estabilização da temperatura. As amostras incubadas foram adicionadas ao plasma (200 µL) e o tempo cronometrado até formação de um coágulo rígido. Controles contendo somente as peçonhas ou os extratos foram realizados. A dose mínima foi definida previamente, sendo esta a quantidade mínima de peçonha capaz de induzir a coagulação do plasma em um intervalo entre 1 minuto e 25 segundos (Selistre et al., 1990).

2.10 Atividade fibrinogenolítica

Para a avaliação da atividade fibrinogenolítica foi utilizada a metodologia de eletroforese em gel de poliacrilamida previamente descrita por Laemmli (1970). Os ensaios de inibição de proteases foram realizados com incubação prévia da peçonha de *B. moojeni* (60 µg), com os extratos de frutos de *A. carambola* nas proporções 1:2,5; 1:5 e 1:10 (peçonha:extrato; m:m), por período de 30 minutos à 37 °C. Em seguida foi adicionado o fibrinogênio (60 µg), procedendo com incubação por mais 90 minutos, em mesma temperatura. As amostras foram analisadas em gel de poliacrilamida a 15% (m/v), possibilitando a observação das cadeias α , β e γ do fibrinogênio controle e as bandas correspondentes aos fibrinopeptídios nas amostras as quais houve proteólise.

2.11 Análise estatística

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

3 Resultados

3.1 Compostos fenólicos totais e flavonoides totais

Os compostos fenólicos constituem um dos maiores grupos de metabólitos secundários em plantas. Sendo assim fez-se a determinação de compostos fenólicos e flavonoides em extratos aquosos e etanólicos de frutos de *Averrhoa carambola*, visando obter a quantificação desses compostos. Os teores de compostos fenólicos totais e flavonoides totais dos extratos do fruto de *A. carambola* são mostrados na Tabela 1. O extrato etanólico foi o que apresentou o maior teor de fenólicos totais (1415,00 mg TAE/100 g) e de flavonoides totais (224,70 mg QE/100 g) em comparação com o extrato aquoso que foi de 521,6 mg TA/100 g e 138,6 mg QE/100 g, respectivamente.

Tabela 1: Conteúdos de rendimentos, compostos fenólicos totais (TAE) e flavonoides totais (QE) em extratos de frutos de *Averrhoa carambola*

Extratos	Rendimento %	mg fenólicos TAE/100g amostra	mg flavonoides QE/100g amostra
Aquoso	6,10	521,60	138,60
ETOH	4,51	1415,00	224,70

3.2 Atividade fosfolipásica

O extrato etanólico do fruto de *A. carambola* inibiu a atividade fosfolipásica da peçonha de *B. moojeni* em 55, 42 e 45% nas proporções de 1:0,5; 1:1 e 1:2 (m:m), respectivamente. Já o extrato aquoso não inibiu de forma significativa a atividade fosfolipásica desta peçonha (Figura 1A), embora tenha exercido inibição de aproximadamente 15% nas proporções 1:0,5; 1:1 e 1:2.

Os dois extratos avaliados, aquoso e etanólico, inibiram significativamente a atividade fosfolipásica da peçonha de *B. alternatus* em todas as proporções avaliadas, com destaque para o extrato etanólico que na proporção 1:4 (m:m) reduziu a atividade em 38% (Figura 1B). A atividade fosfolipásica induzida pela peçonha de *B. jararacussu* (Figura 1C) foi parcialmente inibida pelos extratos, sendo observadas reduções da atividade que variaram entre 1 a 15%. Entretanto, os valores obtidos não foram considerados estatisticamente diferentes do controle contendo apenas peçonha.

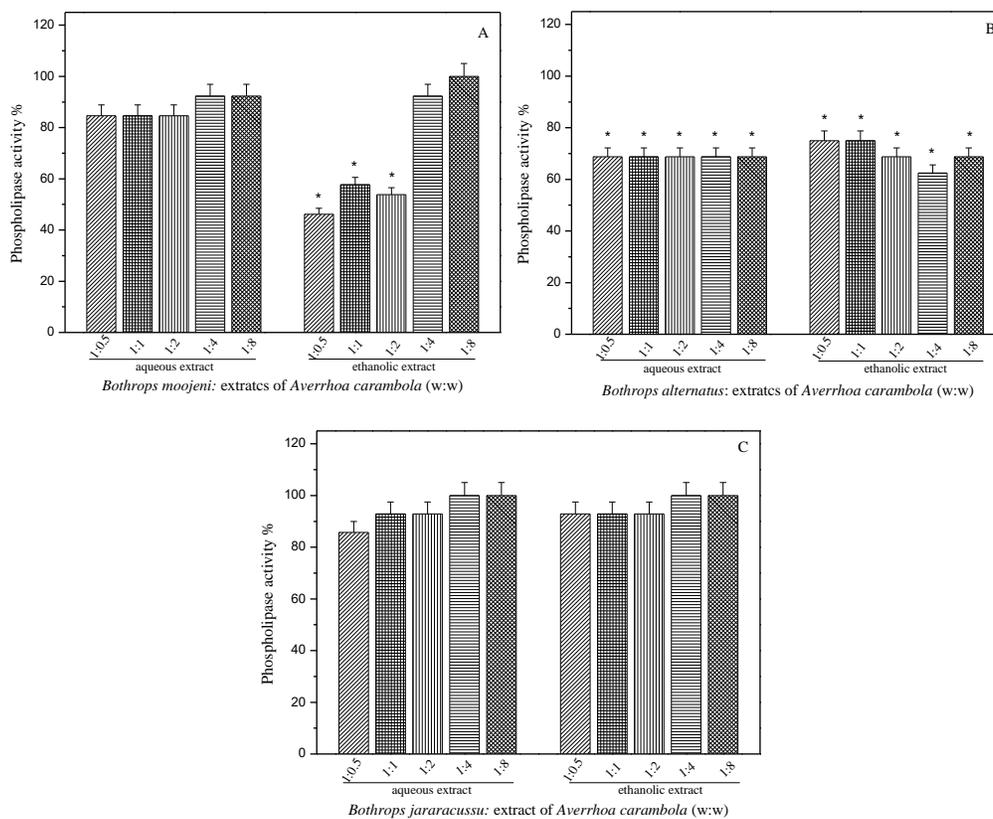


Figura 1: Atividade fosfolipásica (%) induzida por peçonhas de serpentes das espécies *Bothrops moojeni* (A), *B. alternatus* (B) e *B. jararacussu* (C), previamente incubadas com extratos do fruto de *Averrhoa carambola*. Controle (+): apenas peçonha (10 µg), foi considerado como 100% de atividade. Os resultados correspondem as médias de triplicatas de dados obtidos em cada proporção (peçonha:extrato; m:m) e os desvios padrão calculados. *Difere estatisticamente do respectivo controle positivo, $p < 0,05$.

3.3 Atividade hemolítica

Realizou-se a atividade hemolítica a fim de verificar se os extratos puros induzem hemólise e se pré-incubados com as peçonhas, seriam capazes de inibir sua atividade citotóxica. Constatou-se inibições significativas dos extratos do

fruto de *A. carambola* sobre a citotoxicidade exercida por todas as peçonhas avaliadas.

A atividade hemolítica exercida pela peçonha de *B. atrox* foi inibida de forma significativa (24%) pelo extrato aquoso apenas na proporção 1:0,25 (m:m), enquanto que para o extrato etanólico observou-se inibições em todas das proporções avaliadas, e estas variaram entre 20 e 40% (Figura 2A).

Os extratos aquoso e etanólico se mostraram eficientes em inibir a atividade hemolítica induzida pela peçonha de *C.d.t.* em todas as proporções avaliadas. Para o extrato aquoso a inibição mais efetiva foi de 28% e ocorreu nas proporções 1:0,25 e 1:0,5 (m:m). Já o extrato etanólico mostrou-se mais efetivo inibindo totalmente a atividade hemolítica desta peçonha em todas as proporções avaliadas (Figura 1B).

Quando incubados, o extrato aquoso e a peçonha de *B. moojeni*, foram observadas inibições da atividade hemolítica exercida pela peçonha de 20% na proporção 1:0,25 (m:m) e de 27% nas proporções 1:0,1 e 1:0,5 (m:m). Já o extrato etanólico inibiu em 22 e 34% a atividade da peçonha, nas proporções 1:0,1 e 1:0,25 (m:m), respectivamente (Figura 2C).

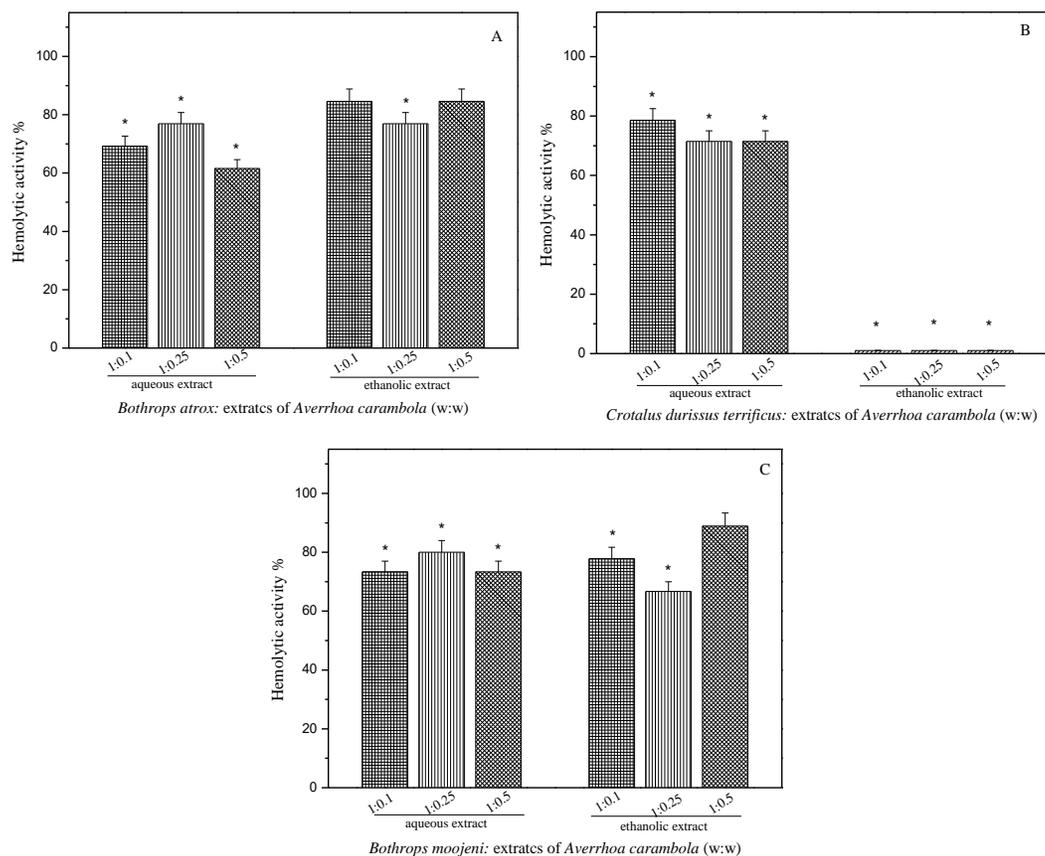


Figura 2: Atividade hemolítica (%) induzida por peçonha de serpentes das espécies *Bothrops atrox* (A), *Crotalus durissus terrificus* (C.d.t.) (B) e *B. moojeni* (C), previamente incubadas com extratos do fruto de *Averrhoa carambola*. Controle (+): contendo apenas peçonha, foram considerados como 100% de atividade (*B. atrox*, 30 µg, *C.d.t.*, 30 µg e *B. moojeni*, 60 µg). Os resultados correspondem às médias de triplicatas de dados obtidos em cada proporção (peçonha:extrato, m:m) e os desvios padrão calculados. *Difere estatisticamente do respectivo controle positivo, $p < 0,05$.

3.4 Atividade caseinolítica

Para a atividade caseinolítica foi observada inibição significativa da proteólise exercida pela peçonha de *B. moojeni* na proporção 1:0,5 (m:m), em torno de 33%, e pela peçonha de *B. alternatus* na proporção 1:8 (m:m) em torno de 23%, apenas para o extrato aquoso do fruto de *A. carambola*. Embora outras proporções tenham exercido inibições entre 5 e 15% sobre a atividade destas peçonhas, estas não foram consideradas estatisticamente significantes (Figura 3A e B).

Para a peçonha de *B. jararacussu*, o extrato aquoso nas proporções 1:0,5 e 1:1, exerceu efeito potencializador sobre a proteólise, assim como observado para o extrato etanólico na proporção 1:0,5 (m:m) (Figura 3C).

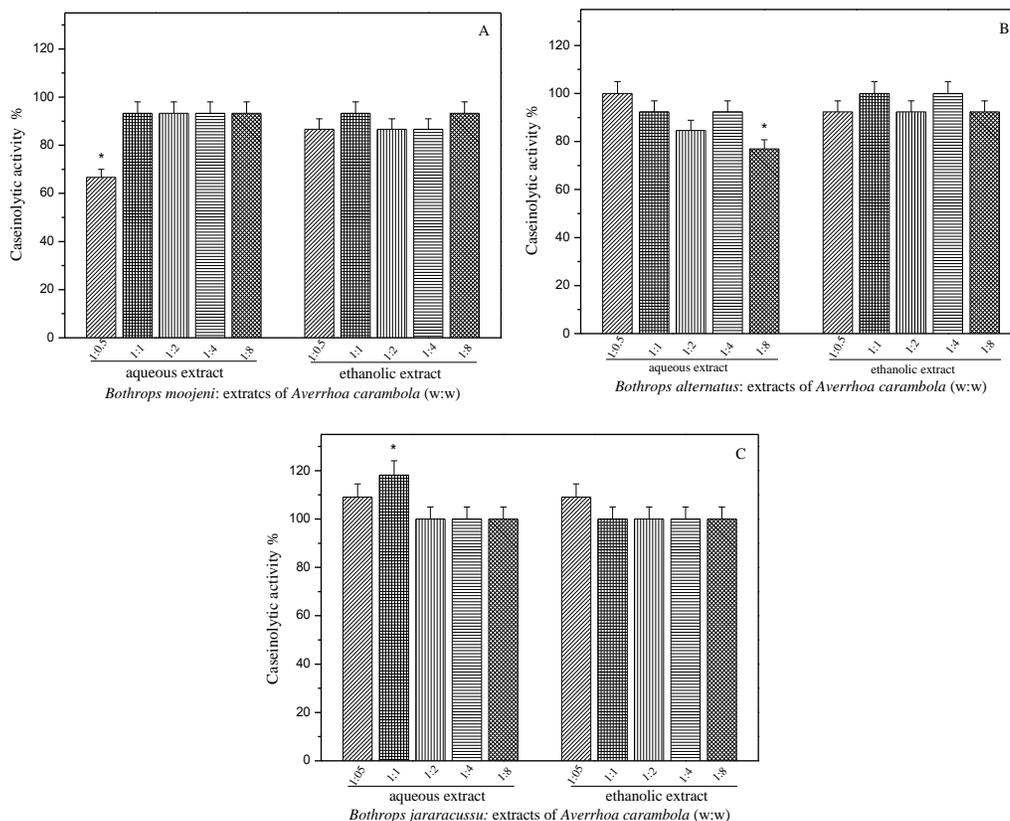


Figura 3: Atividade caseinolítica (%) induzida por peçonhas de serpentes das espécies *Bothrops moojeni* (A), *B. alternatus* (B) e *B. jararacussu* (C), previamente incubadas com extratos de *Averrhoa carambola*. Controle (+): contendo apenas peçonha (10 µg), foram considerados como 100% de atividade. Os resultados correspondem as médias de triplicatas de dados obtidos em cada proporção (peçonha:extrato; m:m) e os desvios padrão calculados. *Difere estatisticamente do respectivo controle positivo, $p < 0,05$.

3.5 Atividade trombolítica

Os extratos aquosos e etanólicos do fruto de *A. carambola* quando incubados com a peçonha de *B. atrox*, causaram potencialização da lise dos

trombos em todas as proporções avaliadas. O extrato aquoso induziu potencialização da atividade trombolítica em 25% na proporção 1:2 (m:m) e 68% nas proporções 1:1 e 1:4 (m:m). Já o extrato etanólico induziu potencializações sobre esta atividade em 75, 100, 93 e 30% nas proporções 1:0,5; 1:1, 1:2 e 1:4 (m:m), respectivamente (Figura 4A).

Para a peçonha de *L. muta* somente houve potencialização da lise dos trombos quando esta foi incubada com o extrato etanólico na proporção de 1:4 (m:m), sendo observado um aumento de 35% da atividade trombolítica. Observou-se também, para o extrato etanólico, inibições da atividade trombolítica, exercida pela peçonha de *L. muta* de 22 e 23% nas proporções 1:0,5 e 1:1 (m:m), respectivamente. O extrato aquoso inibiu a atividade trombolítica induzida pela peçonha de *L. muta* em 25, 23 e 33% nas proporções 1:0,5, 1:2 (m:m) e 1:4 (m:m), respectivamente (Figura 4B).

A atividade trombolítica da peçonha *B. moojeni*, foi potencializada pelo extrato aquoso em 20 e 25% nas proporções 1:2 (m:m) e 1:4 (m:m), respectivamente. O extrato etanólico não influenciou de forma significativa a atividade trombolítica exercida pela peçonha de *B. moojeni*.

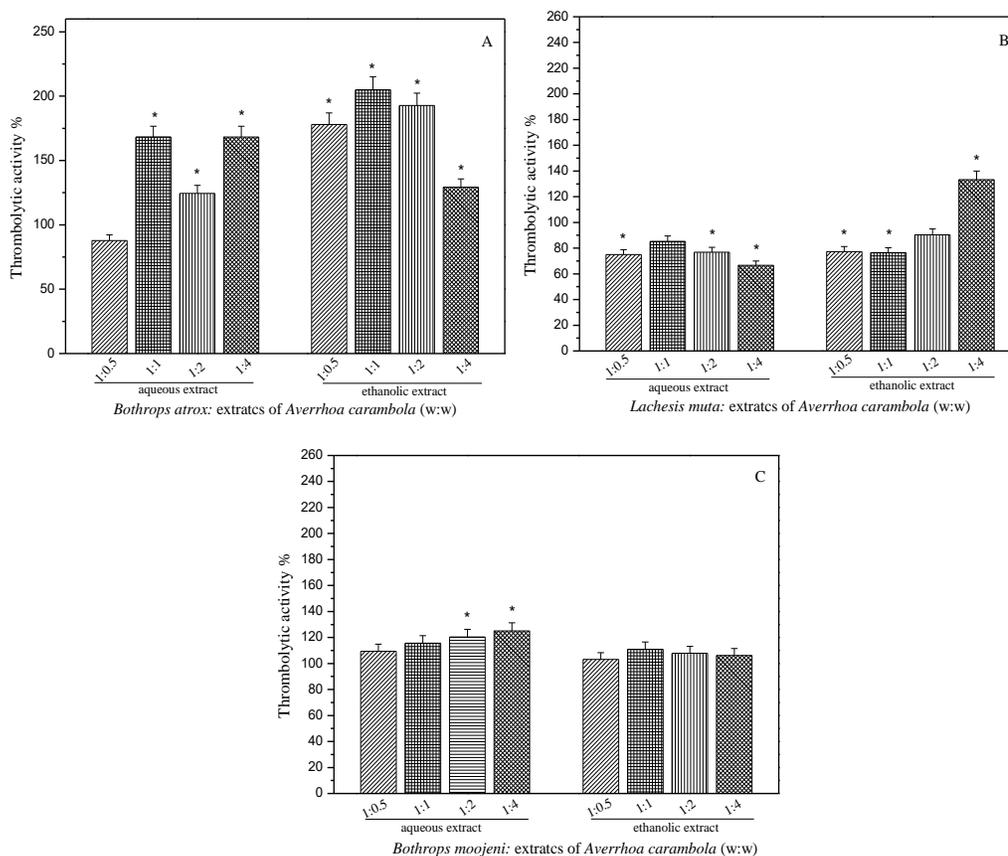


Figura 4: Atividade trombolítica (%) induzida pelas peçonhas de *Bothrops atrox* (A), *Lachesis muta* (B) e *B. moojeni* (C), previamente incubadas com extratos do fruto de *Averrhoa carambola*. Controle (C+): contendo apenas peçonha (40 µg), foram considerados como 100% de atividade. Os resultados correspondem às médias de triplicatas de dados obtidos em cada proporção (peçonha:extrato; m:m) e os desvios padrão calculados. *Difere estatisticamente do respectivo controle positivo, $p < 0.05$.

3.6 Atividade coagulante

Na Tabela 2 são mostrados os efeitos dos extratos aquoso e etanólico do fruto de *A. carambola* sobre as enzimas presentes nas peçonhas de *C.d.t.*, *L.*

muta e *B. atrox* responsáveis pela quebra de proteínas plasmáticas envolvidas no processo de coagulação. O extrato aquoso proporcionou significativa diminuição do tempo de coagulação induzida pela peçonha de *C.d.t.* em todas as proporções avaliadas. Já o extrato etanólico proporcionou diminuição do tempo de coagulação desta peçonha nas menores proporções avaliadas 1:0,1 e 1:0,5 (m:m), agindo de forma antagônica, com aumento no tempo de coagulação, nas demais proporções avaliadas.

Para a peçonha de *L. muta*, o extrato aquoso demonstrou-se coagulante favorecendo a formação do coágulo nas proporções 1:0,1; 1:0,25; 1:0,5 e 1:2 (m:m). Os extratos aquoso e etanólico quando incubados com a peçonha *B. atrox* inibiram significativamente a atividade coagulante exercida pela peçonha em todas as proporções avaliadas.

Tabela 2: Efeitos dos extratos de frutos de *Averrhoa carambola* na atividade coagulante induzida por diferentes peçonhas de serpent

		Tempo de coagulação (s)		
		<i>Crotalus durissus</i> <i>terrificus</i>	<i>Lachesis</i> <i>muta</i>	<i>Bothrops atrox</i>
*Controle		175,00 ± 8,75	76,00 ± 3,80	51,00 ± 2,55
Amostras		Proporção (m:m)		
Extrato aquoso	(1:0.1)	97,00 ± 4,85 a	71,00 ± 3,55	188,00 ± 9,40 b
	(1:0.25)	111,00 ± 5,55 a	65,00 ± 3,25	85,00 ± 4,25 b
	(1:0.5)	116,00 ± 5,80 a	69,00 ± 3,45	81,00 ± 4,05 b
	(1:1)	106,00 ± 5,30 a	77,00 ± 3,85	81,00 ± 4,05 b
	(1:2)	119,00 ± 5,95 a	74,00 ± 3,70	235,00 ± 11,75 b
Extrato etanólico	(1:4)	110,00 ± 5,50 a	77,00 ± 3,85	92,00 ± 4,60 b
	(1:0.1)	111,00 ± 5,55 a	71,00 ± 3,55	59,00 ± 2,95
	(1:0.25)	177,00 ± 8,85	81,00 ± 4,05	96,00 ± 4,80 b
	(1:0.5)	162,00 ± 8,10	68,00 ± 3,40	98,00 ± 4,90 b
	(1:1)	181,00 ± 9,05	87,00 ± 4,35	78,00 ± 3,90 b
	(1:2)	197,00 ± 9,85 b	73,00 ± 3,65	89,00 ± 4,45 b
	(1:4)	199,00 ± 9,95 b	88,00 ± 4,40	66,00 ± 3,30

a – Difere do controle na redução (5% de probabilidade)

b – Difere do controle no aumento (5% de probabilidade)

*Os controles foram realizados com 10 µg de cada peçonha avaliada.

Os resultados estão apresentados como a media das triplicatas ± desvio padrão p < 0,05.

3.7 Atividade fibrinogenolítica

O extrato aquoso na proporção de 1:10 (m:m) e os extratos etanólicos em todas as proporções avaliadas inibiram totalmente a atividade proteolítica induzida pela peçonha *B. moojeni* sobre as cadeias α , β e γ do fibrinogênio. Foi observada uma pequena degradação das cadeias do fibrinogênio após incubação da peçonha de *B. moojeni* com extrato aquoso nas proporções 1:25 e 1:5 (m:m) (Figura 5).

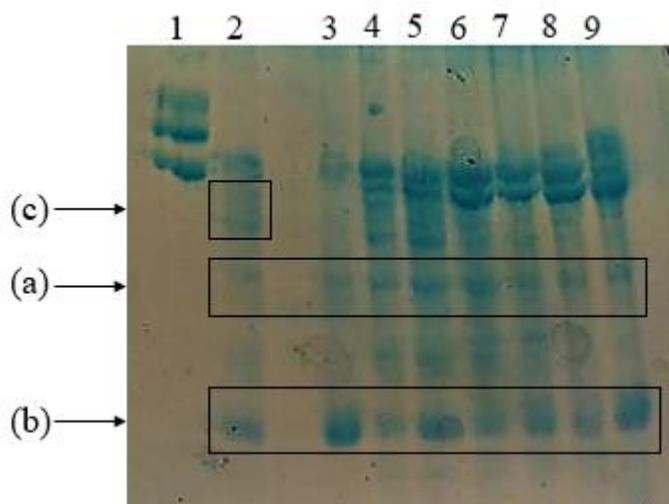


Figura 5: Perfil eletroforético (SDS-PAGE) da ação proteolítica de peçonha de *Bothrops moojeni* sobre o fibrinogênio. Efeito dos extratos de fruto de *Averrhoa carambola* sobre a atividade exercida pela peçonha. 1- fibrinogênio (60 µg); 2- *B. moojeni* (60 µg) + fibrinogênio; 3- *B. moojeni*; 4- *B. moojeni* + fibrinogênio + extrato aquoso de *Averrhoa carambola* (1:2,5, m:m); 5 - *B. moojeni* + fibrinogênio + extrato aquoso de *A. carambola* (1:5, m:m); 6 - *B. moojeni* + fibrinogênio + extrato aquoso de *A. carambola* (1:10, m:m); 7- *B. moojeni* + fibrinogênio + extrato etanólico de *A. carambola* (1:2,5, m:m); 8- *B. moojeni* + fibrinogênio + extrato etanólico de *A. carambola* (1:5, m:m); 9- *B. moojeni* + fibrinogênio + extrato etanólico de *A. carambola* (1:10, m:m). (a) proteases presentes na peçonha. (b) fosfolipases A₂ presentes na peçonha. (c) fibrinopeptídios liberados da quebra das cadeias α e β de moléculas de fibrinogênio.

4 Discussão

Os polifenóis mais precisamente os flavonoides correspondem ao grupo mais importante e mais estudado de compostos ativos encontrados em frutos (Sikora et al, 2014). O efeito benéfico dos compostos fenólicos contra doenças gerou um interesse em quantificar tais compostos ativos em *Averrhoa carambola*. Khanam et al. (2015), encontrou teores de compostos fenólicos em

extratos aquoso e etanólico dos frutos de *A. carambola* 77,00 mg GAE/g e 97,16 mg GAE/g, respectivamente, e de flavonoides, 17,04-18,92 mg QE/g e 41,00-43,56 mg QE/g, respectivamente. Os valores relatados por estes autores são superiores aos encontrados no presente trabalho (Tabela 1).

O fruto maduro tem menor quantidade de compostos fenólicos do que o fruto verde (Das, 2012). Em nosso estudo essa determinação foi feita em frutos maduros prontos para consumo, isso pode justificar o fato de termos encontrado menor quantidade de compostos fenólicos em ambos os extratos. Entretanto quando comparamos extrato aquoso e etanólico, foi observado que o extrato etanólico apresentou maior porcentagem de compostos fenólicos e flavonoides. Isto pode ser explicado pelo fato do etanol ser responsável por precipitar compostos não-fenólicos e/ou arrastar maior concentração de compostos menos polares, resultando assim na extração de maior teor de compostos fenólicos e flavonoides (Rispaill; Morris; Webb, 2005).

O diferencial de inibição exercido pelos extratos aquoso e etanólico do fruto de *A. carambola*, sobre as diferentes atividades induzidas pelas peçonhas, pode estar relacionado: com as diferentes composições das peçonhas avaliadas; com diferentes concentrações dos compostos bioativos presentes nos extratos e suas interações com as toxinas presentes nas peçonhas avaliadas. Assim, as doses dos extratos avaliadas se mostraram efetivas na inibição e potencialização de algumas atividades destacando-se efeitos inibidores sobre fosfolipases A₂ (PLA₂) e tanto inibidores quanto potencializadores sobre as diversas classes de proteases.

A toxicidade da peçonha de serpentes se deve a uma complexa mistura de substâncias com teor principalmente proteico, que desencadeiam ações letais, distúrbios na coagulação e no sistema nervoso, miotoxicidade, indução de edema e consequentemente algesia e inflamação (Silva et al., 2012). Essa toxicidade deve-se principalmente as PLA₂s, metaloproteases, lecitinas e serinoproteinasas

(Guércio et al., 2006; Neiva et al., 2009), podendo estas serem inibidas por diversos extratos vegetais (Marcussi et al., 2011).

Compostos bioativos como os compostos fenólicos presentes nos extratos aquoso e etanólico de frutos de *A. carambola* podem ser usados como suplementos a fim de melhorar a saúde humana (Khanam et al., 2015). Entre as propriedades farmacológicas destes compostos destacam-se o potencial antioxidante, antitumoral (Anantharaju et al., 2016), ação citoprotetora (Lewandowska et al., 2016), antibacteriana, antiviral, antiprotozoária, imunorreguladora, hepatoprotetora, anti-inflamatória, hipocolesterolêmica e analgésica (Simões et al., 2004).

Ações inibidoras específicas de compostos bioativos amplamente distribuídos na natureza, sobre PLA₂, proteases, dentre outras classes de enzimas presentes na peçonha de serpentes, apontam para diversas perspectivas de aplicação destes compostos. Alguns exemplos são: a suplementação da soroterapia tradicional ou a substituição desta nos casos em que ela não for acessível; a terapia de diversas doenças humanas relacionadas a processos inflamatórios considerando a ação sobre fosfolipases (Zhang et al., 2013); e a terapia de diversas doenças humanas relacionadas à ação de proteases, como disfunções gastrointestinais, processos de descontrole nos mecanismos de apoptose e proliferação celular. Em adição, muitos compostos vegetais atuam na prevenção de doenças por meio de ação protetora sobre moléculas, organelas e células contra a ação oxidante de radicais livres e enzimas. Dentre outras diversas aplicações que podem atender demandas de uso, nutricional, farmacêutico e cosmético (Salaga; Sobczak; Fichna, 2013).

Flavonoides podem impedir a quebra de fosfolipídios de membrana por PLA₂s, inibindo também a formação do ácido araquidônico e dos eicosanoides dele derivados (Silva et al., 2008).

Diversas plantas têm sido estudadas a fim de avaliar sua atividade anti-fosfolipásica e anti-hemolítica, como por exemplo, o extrato hidroalcoólico de frutos de *Geoffroea decorticans* que inibiu moléculas pró-inflamatórias provenientes da quebra de fosfolipídios (Costamagna et al., 2016). Frações do extrato da espécie *Sapindus saponaria* que mostraram significativa inibição de miotoxinas como a BthTX-I e II isoladas de *B. jararacussu* e da atividade da PLA₂s exercida pela peçonha de *C. d. t.* (Silva et al., 2012). Taninos isolados do fruto de *Persimmon* inibiram a atividade enzimática de uma PLA₂ isolada da peçonha de *Naja atra* (Zhang et al., 2013). O extrato aquoso de *Casearia sylvestris* que neutralizou PLA₂s presentes em peçonhas de diferentes espécies do gênero *Bothrops* (Borges et al., 2001). E o extrato etanólico das sementes de *Tamarindus indicus* L. inibiu de forma significativa a atividade PLA₂ da peçonha de *Daboia russelli siamensis* (Maung; Lynn, 2012).

Houve inibição significativa do extrato etanólico sobre a atividade PLA₂ da peçonha de *B. moojeni* e *B. alternatus* e do extrato aquoso sobre a atividade PLA₂ da peçonha de *B. alternatus* (Figura 1A e B). No teste de hemólise, em que as PLA₂s desempenham importante papel, constataram-se também inibições significativas exercidas por ambos os extratos avaliados sobre a atividade induzida pelas peçonhas de *B. moojeni*, *B. atrox* e *C.d.t* (Figura 2A, B e C). Esta inibição pode ser explorada visando prevenir a ruptura de eritrócitos e, assim, diminuir hemorragias locais (Pithayanukul; Leanpolchareanchai; Bavovada, 2010). Os polifenóis podem inibir a atividade PLA₂ formando ligações de hidrogênio com o sítio ativo da enzima (Pereanez et al., 2011).

Alam et al. (2016) relataram que a inibição das PLA₂s por compostos fenólicos, ocorre quando os hidróxidos fenólicos se ligam a aminoácidos ASP 49 e GLY 30 que influenciam na capacidade da enzima de coordenação do cálcio, cofator essencial para a atividade catalítica. A eficiência dos compostos também é aumentada pela presença de um grupo metoxila no anel benzênico que se liga

muito fortemente com ASP 49 e GLY 30 das PLA₂s, resultando em inibição da atividade catalítica das PLA₂.

As proteases tem a função catalítica de hidrolisar proteínas, atuando de forma seletiva sobre diferentes substratos proteicos, assim como em ligações específicas, podendo atuar, por exemplo, na ativação de zimogênios, na lise de coágulos e na coagulação sanguínea (Shen; Chou, 2009).

Em relação aos resultados de proteólise observados neste estudo, as diferentes estruturas dos substratos avaliados (caseína, fibrinogênio, entre outros), sofrem a ação de diferentes proteases resultando em diferentes formas e intensidades de interação com os inibidores, o que justifica as variações nas porcentagens de inibição observadas em cada teste proteolítico.

Compostos bioativos presentes em extratos de plantas são capazes de interagir com sítios de coordenação dos cofatores presentes nas estruturas das proteases, e modificar sua forma, interferindo assim na ligação dos cofatores e consequentemente resultando em redução ou até mesmo aumento da atividade enzimática (Patiño; Benjumea; Pereañez, 2013; Oliveira et al., 2015). Como exemplo, pode-se citar a ação de grupos tióis que foram descritos com a capacidade tanto de quelar cofatores enzimáticos quanto com a capacidade de interferir em reações redox enzimáticas em ensaios farmacológicos induzidos por peçonha de viperídeos (Sunitha et al., 2011). Esta hipótese é reafirmada pela inibição de atividade proteolítica pelos ácidos rosmarínico, cinâmico e seus análogos (Aung et al., 2011). Assim, as interações mencionadas podem corresponder à parte dos mecanismos de inibição ou potencialização, exercidos pelos extratos de *A. carambola*, sobre as atividades (trombolítica, coagulante e proteolítica sobre caseína e fibrinogênio) induzidas por diferentes proteases.

A trombose é o bloqueio dos vasos sanguíneos pela formação de coágulos, e estes também podem levar a problemas como o infarto agudo e o acidente vascular cerebral. O tratamento disponível para a trombose é a

administração de agentes trombolíticos para dissolução de coágulos sanguíneos (Kunamneni; Abdelghani; Ellaiah, 2007). No entanto, estes agentes trombolíticos apresentaram deficiências significativas, e diante destes fatos tem-se buscado alternativas como o uso de produtos naturais (Furie; Furie, 2008), que contêm anticoagulantes, anti-agregantes de plaquetas, atividade trombolítica e fibrinolítica (Briggs et al., 2001), mostrando que o seu consumo pode levar a prevenção de doenças trombóticas (Torres-Urrutia et al., 2011).

A degradação das proteínas da matriz e da membrana basal resulta na ruptura de células endoteliais nas paredes dos vasos sanguíneos (Pinto et al., 2007). A coagulação sanguínea e agregação plaquetária são então perturbadas, ocorrendo extravasamento de conteúdo vascular. Várias toxinas exibem atividades anticoagulantes e antiplaquetárias (McCleary; Kini, 2013; Berling; Isbister, 2015), e podem participar da degradação de coágulos. Neste trabalho, os extratos do fruto de *A. carambola* apresentaram-se como excelentes agentes trombolíticos pois aumentaram a lise dos trombos formados pela ação das peçonhas de *B. atrox* (extrato aquoso e etanólico) (Figura 4A), *L. muta* (extrato etanólico) (Figura 4B) e *B. moojeni* (extrato aquoso) (Figura 4C). Contudo, houve inibição do efeito trombolítico da peçonha *L. muta* (extrato aquoso e etanólico) e da *B. moojeni* (extrato aquoso) dependente da dose avaliada, sugerindo a presença, nos extratos, de inibidores de proteases, principalmente serinoproteases trombina-símile e metaloproteases hemorrágicas.

Devido a composição variada de compostos bioativos e suas diferentes concentrações em extratos de plantas estes podem apresentar ação trombolítica ou anti-trombolítica. Neste sentido, estudos tem sido realizados para melhor caracterização destes efeitos, como os realizados com os extratos metanólico dos frutos de *Capsicum frutescens* (Emran et al., 2015), e dos fruto de *Averrhoa bilimbi* (Ali et al., 2014) que apresentaram significativa atividade trombolítica.

Estas espécies possuem composição rica em taninos, saponinas e alcaloides que são capazes de participar na degradação de coágulos (Ali et al., 2013).

As proteases prolongam (anticoagulantes) ou reduzem (pró-coagulantes) o tempo de coagulação do sangue (Kini, 2006). Elas estão presentes principalmente em peçonhas de serpentes das famílias Viperidae e Elapidae (Gopi et al., 2016). Para a atividade coagulante também houve aumento e diminuição do tempo de coagulação dependente do tipo e das concentrações dos extratos avaliados. Os extratos aquosos e etanólicos incubados com a peçonha de *B. atrox* apresentaram atividade anticoagulante significativa em todas as doses avaliadas (Tabela 2). Peçonhas pró-coagulantes contêm proteases que ativam os zimogênios de fatores da cascata de coagulação e aceleram a formação de coágulos (Serrano, 2013). Algumas metaloproteases presentes nas peçonhas participam como enzimas procoagulantes pois ativam dois fatores-chave da coagulação, o fator X (FX) e a protrombina (Kini; Koh, 2016). Já outros atuam como anticoagulantes degradando fatores da cascata de coagulação e reduzindo a formação de redes de fibrina.

As metaloproteases de peçonhas podem agir sobre diversos substratos como as proteínas do plasma, as proteínas de membrana, as proteínas envolvidas na agregação plaquetária, na resposta de células inflamatórias, além de algumas serem capazes de provocar grave hemorragia local (Fox; Serrano, 2009). O extrato etanólico do fruto de *Piper longum* L. e a piperina (alcaloide isolado do fruto), por exemplo, neutralizaram *in vitro* o efeito hemorrágico da peçonha de *Daboia russelli* (Shenoy et al., 2013). O extrato etanólico da semente de *Tamarindus indicus* L. inibiu a atividade da enzima coagulase da peçonha de serpentes desta mesma espécie (Maung; Lynn, 2012). Compostos vegetais isolados também têm sido avaliados, como, por exemplo, um diterpenóide obtido do extrato etanólico da planta *Leonurus japonicus*, que apresentou atividade coagulante *in vitro*, o composto induziu um aumento nos níveis de

fibrinogênio, sendo um potencial coagulante (Peng; Xiong; Zhao, 2013). O extrato aquoso das partes aéreas de *Marsypianthes chamaedrys* apresentou atividade anti-fosfolipásica e anticoagulante sobre a peçonha de *B. atrox* (Pereira; Gonçalves; Pereira, 1992).

O fibrinogênio, uma glicoproteína composta pelas subunidades α , β e γ (Nafeesa et al, 2015), tem função crucial na formação de redes de fibrina atuando contra a perda de sangue após uma lesão tecidual. Serinoproteases e metaloproteases de peçonhas clivam o fibrinogênio, as serinoproteases clivam a extremidade N-terminal das cadeias $A\alpha$ e $B\beta$ dos fibrinopeptídios A ou B liberando os fibrinopeptídios α e β , respectivamente, ao contrário da trombina, que não liberta ambos peptídios (Bell Jr., 1997). A degradação de suas cadeias pode levar a alterações no processo de coagulação como consequência pode ocorrer hemorragia ou formação de coágulos sanguíneos (Markland, 1998). A ação dos extratos foi também avaliada sobre a atividade fibrinogenolítica induzida pela peçonha de *B. moojeni* e foi observado um significativo efeito protetor sobre o fibrinogênio, estando ausentes no perfil eletroforético bandas correspondentes a produtos da degradação do fibrinogênio (fibrinopeptídios), em todas as amostras incubadas com os extratos nas diferentes proporções (Figura 5).

Diversos trabalhos relataram a ação de extratos de plantas em inibir a proteólise induzida por peçonhas, como o de Fernandes et al. (2011), que observaram impedimento da degradação total do fibrinogênio por peçonhas de serpentes quando incubadas com extrato metanólico das partes aéreas de *Serjania erecta*; o de Dhananjaya et al. (2011) que descreve inibições exercidas pelo extrato aquoso da casca do caule de *Mangifera indica* L. em diferentes concentrações, sobre a atividade proteolítica induzida pela peçonha de *Daboia russelli*; e o de Patiño, Benjumea e Pereañez (2013) que demonstra que o extrato

etanólico das folhas de *Renalmia alpinia*, impediu a degradação da cadeia β do fibrinogênio pela metaloprotease Batx-1, isolada da peçonha *B. atrox*.

Conclusão

Os efeitos inibitórios e indutores proporcionados pelos extratos do fruto de *A. carambola*, analisados neste trabalho, sobre as atividades biológicas induzidas pelas peçonhas botrópicas, crotálica e lachética, ainda não possuem seus mecanismos esclarecidos, porém, parte destes efeitos provavelmente é resultante de atividade antioxidante de compostos bioativos presentes nestes extratos (ex: compostos fenólicos) assim como de possíveis interações de compostos vegetais com sítios catalíticos (principalmente por interações de hidrogênio já descritas em literatura) das enzimas, a sítios ligantes de cofatores (considerando que muitos compostos de metabolismo secundário formam complexos com íons metálicos) ou ainda a regiões hidrofóbicas presentes nas enzimas. Contudo, novos estudos são necessários para ampliar as discussões mecanísticas acerca das interações entre os compostos bioativos e toxinas, componentes celulares ou moléculas animais, com vistas à formulação de terapias complementares aumentando a eficiência na prevenção e tratamento de doenças.

Referências

Alam MI, Alam MA, Alam O, Nargotra A, Taneja SC, Koul S. Molecular modeling and snake venom phospholipase A2 inhibition by phenolic compounds: Structure-activity relationship. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 1-12, 2016.

Ali Md R, Kuri S, Das A, Islam MA. Preliminary phytochemical screening and *in vitro* thrombolytic potential of the methanolic extract of *Enhydra fluctuans*

Lour (leaves). *International Journal of Pharmamedix, India*, v. 1, p. 270-280, 2013.

Ali Md R, Hossain M, Runa JF, Hasanuzzaman Md, Islam Md M. Evaluation of thrombolytic potential of three medicinal plants available in Bangladesh, as a potent source of thrombolytic compounds. *Avicenna Journal el Phytomedicine*, v. 4, n. 6, nov-dec, 2014.

Anantharaju PG, Gowda PC, Vimalambike MG, Madhunapantula SV. An overview on the role of dietary phenolics for the treatment of cancers. *Nutrition Journal*, v. 15, n. 99, p. 1-16, 2016.

Aung HT, Furukawa T, Nikai T, Niwa M, Takaya Y. Contribution of cinnamic acid analogues in rosmarinic acid to inhibition of snake venom induced hemorrhage, *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, v. 19, n. 7, p. 2392-2396, 2011.

Avinash P, Swapneel K, Anita P. A comprehensive review of an important medicinal plant – *Averrhoa carambola* L. *Pharmacognosy Communications*, v.2, p. 26-39, 2012.

Barros EML, Lira SRS, Lemos SIA, Barros TL, Rizo MS. Study of buriti (*Mauritia flexuosa* L.) cream in the healing process. *ConScientiae Saúde*, v. 13, n. 4, p. 603-610, 2014.

Bell Jr. WR. Defibrinogenating enzymes. *Drugs*, v. 54, p. 18-30, 1997.

Beltrame FL, Ferroni DC, Alves BRV, Pereira AV, Esmerino LA. Avaliação da qualidade das amostras comerciais de *Baccharis trimera* L. (Carqueja) vendidas no Estado do Paraná. *Acta Scientiarum. Health Sciences*, v. 31, n. 1, p. 37-43, 2009.

Berger M, Silva WOB, Santi L, Guimarães JA. Haemostasis: a brief review. *Pedagogical notebook. Lajeado*, v. 11, n. 1, p. 140-148, 2014.

Berling I, Isbister GK. Hematologic effects and complications of snake envenoming. *Transfusion Medicine Reviews*, v. 29, p. 82-89, 2015.

Boeira JM, Fenner R, Betti AH, Provensi G, Lacerda LA, Barbosa PR, González FHD, Corrêa AMR, Driemeier D, Dall'Alba MP. Toxicity and genotoxicity evaluation of *Passiflora alata* Curtis (Passifloraceae). *Journal of Ethnopharmacology*, v. 128, n.2, p. 526-532, 2010.

Borges MH, Soares AM, Rodrigues VM, Oliveira F, Fransheschi AM, Rucavado A, Giglio JR, Homs-Brandeburgo MI. Neutralization of proteases from *Bothrops* snake venoms by the aqueous extract from *Casearia sylvestris* (Flacourtiaceae). *Toxicon*, v. 39, n. 12, p. 1863-1869, 2001.

Briggs WH, Folts JD, Osman HE, Goldman IL. Administration of raw onion inhibits platelet-mediated thrombosis in dogs. *Journal of Nutrition*, v. 131, n. 10, p. 2619-2622, 2001.

Cintra ACO, De Toni LGB, Sartim MA, Franco JJ, Caetano RC, Murakami MT, Sampaio S V. Batroxase, a new metalloproteinase from *Bothrops atrox* snake venom with strong fibrinolytic activity. *Toxicon*, v. 60, p. 70-82, 2012.

Costamagna MS, Zampini IC, Alberto MR, Cuello S, Torres S, Pérez J, Quispe C, Schmeda-Hirschmann G, Isla MI. Polyphenols rich fraction from *Geoffroea decorticans* fruits flour affects key enzymes involved in metabolic syndrome, oxidative stress and inflammatory process. *Food Chemistry*, v. 190, p. 392-402, 2016.

Das S. Antimicrobial and antioxidant activities of green and ripe fruits of *Averrhoa carambola* Linn. and *Zizyphus mauritiana* Lam. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, v. 5, p. 102-105, 2012.

Dey A, De JN. *Aristolochia indica* L.: a review. *Asian Journal of Plant Sciences*, v. 10, p. 108-116, 2011.

Dey A, De JN. Antioxidative potential of bryophytes: stress tolerance and commercial perspectives: *Pharmacological Reviews*, v. 3, p. 151-159, 2012.

Dhananjaya BL, Zanieer F, Girish KS, D'Souza CJ. Anti-venom potential of aqueous extract of stem bark of *Mangifera indica* L. against *Daboia russellii* (Russell's viper) venom. *Indian Journal of Biochemistry & Biophysics*, v. 48, p. 175-183, 2011.

Emran TB, Rahman Md A, Uddin MMN, Rahman Md M, Uddin Md Z, Dash R, Layzu C. Effects of organic extracts and their different fractions of five Bangladeshi plants on *in vitro* thrombolysis. *BioMed Central Complementary and Alternative Medicine*, v. 15, 128, 2015.

Farmacopéia Brasileira. 4. ed. São Paulo: Atheneu, 2002.

Fernandes RS, Costa TR, Marcussi S, Bernardes CP, Menaldo DL, González IIR, Pereira PS, Soares AM. Neutralization of pharmacological and toxic activities of *Bothrops jararacussu* snake venom and isolated myotoxins by *Serjania erecta* methanolic extract and its fractions. *The Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases*, v. 17, n. 1, p. 85-93, 2011.

Fox JW, Serrano SM. Timeline of key events in snake venom metalloproteinase research. *Journal of Proteome*, v. 72, p. 200-209, 2009.

Furie B, Furie BC. Mechanisms of thrombus formation. *New England Journal of Medicine*, v. 359, n. 9, p. 938-949, 2008.

Gheewala P, Pankti K, Manodeep C, Jagadish VK. Phytochemical and pharmacological profile of *Averrhoa carambola* Linn.: an overview. *International Research Journal of Pharmacy*, v. 3, p. 88-92, 2012.

Gopi K, Anbarasu K, Renu K, Jayanthi S, Vishwanath BS, Jayaraman G. Quercetin-3-o-rhamnoside from *Euphorbia hirta* protects against snake venom induced toxicity. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1860, p. 1528-1540, 2016.

Guércio RAP, Shevchenko A, Shevchenko A, López-Lozano JL, Paba J, Sousa MV, Ricart CAO. Ontogenetic variations in the venom proteome of the Amazonian snake *Bothrops atrox*. *Proteome Science*, Brasília, v. 4, n. 11, p. 1-14, 2006.

Gutiérrez JM, Avila C, Rojas E, Cerdas L. 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.

Khanam Z, Sam KH, Zakaria NHBM, Ching CH, Bhat IUH. Determination of polyphenolic content, HPLC analyses and DNA cleavage activity of Malaysian *Averrhoa carambola* L. fruit extracts. *Journal of King Saud University*, 2015.

Kini RM. Anticoagulant proteins from snake venoms: structure, function and mechanism. *Biochemical Journal*, v. 397, p. 377-387, 2006.

Kini RM, Koh CY. Metalloproteases affecting blood coagulation, fibrinolysis and platelet aggregation from snake venoms: definition and nomenclature of interaction sites. *Toxins*, v. 8, n. 284, p. 1-27, 2016.

Kunamneni A, Abdelghani TT, Ellaiah P. Streptokinase the drug of choice for thrombolytic therapy. *Journal of Thrombosis and Thrombolysis*, v. 23, n. 1, p. 9-23, 2007.

Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, v. 227, p. 680-685, 1970.

Lewandowska H, Kalinowska M, Lewandowski W, Stępkowski TM, Brzóska K. The role of natural polyphenols in cell signaling and cytoprotection against cancer development. *Journal of Nutritional Biochemistry*, v. 32, p. 1-19, 2016.

Manda H, Vyas K, Panday A, Singha GA. Complete review on: *Averrhoa carambola*. *World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, v. 1, p. 17-33, 2012.

Marcussi S, Santos PRS, Menaldo DL, Silveira LB, Santos-Filho NA, Mazzi MV, da Silva SL, Stábeli RG, Antunes LMG. Evaluation of the genotoxicity of *Crotalus durissus terrificus* snake venom and its isolated toxins on human lymphocytes. *Mutation Research-Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, v. 724, n. 1-2, p. 59-63, 2011.

Markland FS. Snake venoms and the hemostatic system. *Toxicon*, v. 36, p. 1749-1800, 1998.

Maung KM, Lynn Z. Effects of Tamarind (*Tamarindus indicus* Linn) seed extract on Russell's viper (*Daboia russelli siamensis*) venom. *Tropical Biomedicine*, v. 29, n. 4, p. 580-587, 2012.

McCleary RJR, Kini RM. Snake bites and hemostasis/thrombosis. *Thrombosis Research*, v. 132, p. 642-646, 2013.

Nafeesa Z, Shivalingu BR, Vivek HK, Priya BS, Nanjunda Swamy S. Exploring a new serine protease from *Cucumis sativus* L. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 175, p. 2787-2794, 2015.

Neiva M, Arraes FB, de Souza JV, Rádis-Baptista G, Prieto da Silva ARB, Walter MEMT, Brigido MM, Yamane T, Lopez Lozano JL, Astolfi-Filho S. Transcriptome analysis of the Amazonian viper *Bothrops atrox* venom gland using expressed sequence tags (ESTs). *Toxicon*, v. 53, p. 427-436, 2009.

Oliveira CHM, Simao AA, Marcussi S. Inhibitory effects of ascorbic acid, vitamin E, and vitamin B-complex on the biological activities induced by *Bothrops* venom. *Pharmaceutical Biology*, 2015.

Osowski A, Pietrzak M, Wieczorek Z, Wieczorek J. Natural compounds in the human diet and their ability to bind mutagens prevents DNA-mutagen intercalation. *Journal of Toxicology and Environmental Health: Part A*, v. 73, n. 17-18, p. 1141-1149, 2010.

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

Peng F, Xiong L, Zhao XM. A bicyclic diterpenoid with a new 15,16-dinorlabdane carbon skeleton from *Leonurus japonicus* and its coagulant bioactivity. *Molecules*, v. 18, p. 13904-13909, 2013.

Pereanez JA, Nunez V, Patino AC, Londono M, Quintana JC. Inhibitory effects of plant phenolic compounds on enzymatic and cytotoxic activities induced by a snake venom phospholipase A₂. *Vitae*, v. 18, p. 295-304, 2011.

Pereira BMR, Gonçalves LC, Pereira NA. Abordagem farmacológica de plantas recomendadas pela medicina folclórica como antiofídicas III – Atividade antiedematogênica. *Revista Brasileira de Farmácia*, v.73, p. 85-86, 1992.

Pinto AF, Terra RM, Guimaraes JA, Fox JW. Mapping von willebrand factor A domain binding sites on a snake venom metalloproteinase cysteine-rich domain. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, v. 457, p. 41-46, 2007.

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.

Rispail N, Morris P, Webb KJ. Phenolic compounds extraction and analysis. In: Marquez, AJ (Ed.), *Lotus Japonicas Handbook*. Springer, Netherlands, p. 349-355, 2005.

Rodrigues VM, Soares AM, Guerra-Sá R, Rodrigues V, Fontes MR, Giglio JR. Structural and functional characterization of neuwiedase, a nonhemorrhagic fibrin(ogen)olytic metalloprotease from *Bothrops neuwiedi* snake venom. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, v.381, p. 213-224, 2000.

Salaga M, Sobczak M, Fichna J. Inhibition of proteases as a novel therapeutic strategy in the treatment of metabolic, inflammatory and functional diseases of the gastrointestinal tract. *Drug Discovery Today*, v. 18, n. 15-16, 2013.

Selistre HS, Queiroz LS, Cunha OAB, De Souza GEP, Giglio JR. Isolation and characterization of hemorrhagic, myonecrotic and edema-inducing toxins from *Bothrops insularis* (jararaca ilhoa) snake venom. *Toxicon*, v. 28, p. 261-273, 1990.

Serrano SM. The long road of research on snake venom serine proteinases. *Toxicon*, v. 62, p. 19-26, 2013.

Shen HB, Chou KC. Identification of proteases and their types. *Analytical Biochemistry*, v. 385, p. 153-160, 2009.

Shenoy PA, Nipate SS, Sonpetkar JM, Salvi NC, Waghmare AB, Chaudhari PD. Anti-snake venom activities of ethanolic extract of fruits of *Piper longum* L. (Piperaceae) against Russell's viper venom: Characterization of piperine as active principle. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 147, p. 373-382, 2013.

Sikora J, Markowicz-Piasecka M, Broncel M, Mikiciuk-Olasik E. Extract of *Aronia melanocarpa*-modified hemostasis: *in vitro* studies. *European Journal of Nutrition*, v. 53, p. 1493-1502, 2014.

Silva SL, Comar Jr. M, Oliveira KMT, Chaar JS, Bezerra ERM, Calgarotto AK, Baldasso PA, Veber CL, Villar JAFP, Oliveira ARM, Marangoni S. Molecular modeling of the inhibition of enzyme PLA2 from snake venom by dipyrone and 1-phenyl-3-methyl-5-pyrazolone. *International Journal of Quantum Chemistry*, v. 108, n.13, p. 2576-2585, 2008.

Silva ML, Marcussi S, Fernandes RS, Pereira PS, Januário AH, França SC, Da Silva SL, Soares AM and Lourenço MV. Anti-snake venom activities of extracts and fractions from callus cultures of *Sapindus saponaria*. *Pharmaceutical Biology*, v. 50, p. 366-375, 2012.

Simões CMO, Schenkel EP, Gosmann G, Mello JCP, Mentz LA, Petrovick PR. *Farmacognosia – da Planta ao Medicamento*. Editora da UFSC: Santa Catarina, 5ª Edition 2004.

Sunitha K, Hemshekhar M, Santhosh MS, Kumar MS, Kemparaju K, Girish K. Inhibition of hemorrhagic activity of Viper venoms by N-acetyl and thiol

groups. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, v. 11, n. 20, p. 2589-2600, 2011.

Torres-Urrutia C, Guzmán L, Schmeda-Hirschmann G, Moore-Carrasco R, Alarcón M, Astudillo L, Gutierrez M, Carrasco G, Yuri JA., Aranda E, Palomo I. Antiplatelet, anticoagulant, and fibrinolytic activity *in vitro* of extracts from selected fruits and vegetables. *Blood Coagulation and Fibrinolysis*, v. 22, n. 3, 2011.

Wang WJ, Shih CH, Huang TF. A novel P-I class metalloproteinase with broad substrate-cleaving activity, agkislysin, from *Agkistrodon acutus* venom. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 324, p. 224-230, 2004.

Woisky, RG; Salatino, A. Analysis os propolis: some parameters ond prodecore for chemical fuality control. *Journal Apicultural Research*, 1998.

Yang D, Xie H, Yang B, Wei X. Two tetrahydroisoquinoline alkaloids from the fruit of *Averrhoa carambola*. *Phytochemistry Letters*, v. 7, p. 217-220, 2014.

Zhang Y, Zhong L, Zhou B, Chen Jin-yu, Li C. Interaction of characteristic structural elements of persimmon tannin with Chinese cobra PLA₂. *Toxicon*, v. 74, p. 34-43, 2013.