



**CAMILA LUIZ SENA**

**FITOTERÁPICOS A BASE DE *Uncaria tomentosa* E *Uncaria guianensis*: PROSPECÇÃO DE INIBIDORES ENZIMÁTICOS**

**LAVRAS – MG**

**2022**

**CAMILA LUIZ SENA**

**FITOTERÁPICOS A BASE DE *Uncaria tomentosa* E *Uncaria guianensis*:  
PROSPECÇÃO DE INIBIDORES ENZIMÁTICOS**

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

Profa. Dra. Silvana Marcussi  
Orientadora

Prof. Dr. Filippe Elias de Freitas Soares  
Coorientador

**LAVRAS – MG**

**2022**

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

Sena, Camila Luiz.

Fitoterápicos a base de *Uncaria tomentosa* e *Uncaria  
guianensis*: prospecção de inibidores enzimáticos / Camila Luiz

Sena. - 2022.

71 p.: il.

Orientador(a): Silvana Marcussi.

Coorientador(a): Filippe Elias de Freitas Soares.

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de  
Lavras, 2022.

Bibliografia.

1. Fitoterápicos. 2. Hemostasia. 3. Inibidores enzimáticos. I.  
Marcussi, Silvana. II. Soares, Filippe Elias de Freitas.

**CAMILA LUIZ SENA**

**FITOTERÁPICOS A BASE DE *Uncaria tomentosa* E *Uncaria guianensis*:  
PROSPECÇÃO DE INIBIDORES ENZIMÁTICOS**

**PHYTOTHERAPICS BASEED ON *Uncaria tomentosa* AND *Uncaria guianensis*:  
PROSPECTION OF ENZYME INHIBITIDORS**

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, para a obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 06 de abril de 2022.

Dra. Silvana Marcussi, UFLA

Dr. Filippe Elias de Freitas Soares, UFLA

Dra. Mariana Aparecida Braga, UFLA

Dr. Clayton Zambeli Oliveira, UFPB

Profa. Dra. Silvana Marcussi  
Orientadora

Prof. Dr. Filippe Elias de Freitas Soares  
Coorientador

**LAVRAS – MG**

**2022**

Aos meus pais Fátima e Carlos, pelos ensinamentos, dedicação, carinho e por sempre sonharem junto comigo. À Deus, pela coragem, amparo e perseverança.

**Dedico**

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos que torceram e compartilharam comigo esse sonho, principalmente nesse momento de angústia e incertezas que enfrentamos com a Pandemia, com vocês a caminhada foi mais leve. Agradeço também a Deus, pela vida, por me escutar, guiar e por estar sempre presente.

À toda minha família, pelas orações e apoio. Aos meus pais Fátima e Carlos, pelo cuidado, incentivo e por não medirem esforços na minha educação. À minha irmã Letícia, pela nossa amizade. À Suzy, cachorrinha da família, pela companhia durante a escrita desse trabalho.

A Paulo Henrique por todo companheirismo, amor e por acreditar em mim. Aos meus amigos por transmitirem alegria e conforto. As meninas do Ap 301, Thamires e Fabiane, por serem minha família em Lavras. A Isa, minha amiga de faculdade para toda a vida, por viver essa etapa comigo.

À professora Silvana Marcussi, por toda orientação, confiança, paciência e ensinamentos transmitidos. Ao professor Filipe por sua orientação e palavras de incentivo. E a todos os professores que de alguma forma contribuíram na minha formação.

À Universidade Federal de Lavras e ao Departamento de Química, pela oportunidade de estudo e infraestrutura. Às técnicas, Aline pela disponibilidade na coleta de sangue e a Lidiany pela ajuda nas análises cromatográficas.

A todos do Laboratório de Bioquímica, em especial ao Matheus, Mateus, Isaac e Mari, por toda contribuição na realização deste trabalho, aprendizado e parceria durante a nossa convivência.

Agradeço também à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001, pela concessão da bolsa de estudos.

**Muito obrigada!**

## RESUMO

Os fitoterápicos são medicamentos elaborados a partir de plantas medicinais, ou de seus derivados, sendo estes uma alternativa viável e eficaz de terapia. As doenças inflamatórias têm afetado de forma crescente a população mundial, destacando a necessidade de desenvolvimento e aplicação de tratamentos alternativos ou adjuvantes. Com base em conhecimentos populares e informações científicas, espécies do gênero *Uncaria* possuem propriedades farmacológicas. As espécies *Uncaria tomentosa* e *Uncaria guianensis*, popularmente conhecidas como unha-de-gato, são plantas medicinais ricas em compostos bioativos com propriedades anti-inflamatórias, e são amplamente utilizadas para o tratamento de dores articulares e musculares. Desta maneira, objetivou-se neste trabalho caracterizar os compostos fenólicos por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e avaliar os efeitos *in vitro* dos extratos aquosos de fitoterápicos a base de *U. tomentosa* e *U. guianensis* sobre fosfolipases A<sub>2</sub> e proteases (envolvidas na hemostasia e inflamação), utilizando peçonha de *Bothrops moojeni* como ferramenta laboratorial. O extrato aquoso de *U. guianensis* apresentou maior teor de compostos fenólicos detectados por CLAE quando comparado ao extrato de *U. tomentosa*. A atividade fosfolipásica induzida pela peçonha de *B. moojeni* foi inibida significativamente por ambos os extratos, variando de 10 a 18% e 10 a 46% para os extratos aquosos *U. tomentosa* e *U. guianensis*, respectivamente. A maior ação inibitória da hemólise foi observada para o extrato aquoso de *U. guianensis*, quando incubado com peçonha de *B. moojeni*, com resultados entre 14 a 60%. No ensaio de hemólise térmica, as maiores doses testadas exerceram maior efeito protetor nas membranas eritrocitárias. A atividade proteolítica foi inibida significativamente de 10 a 27% para o extrato aquoso de *U. tomentosa* e de 10 a 40% para *U. guianensis*. Para a atividade trombolítica observou-se inibição significativa apenas na maior dose de extrato aquoso de *U. guianensis* (53%) e os controles contendo apenas os extratos apresentaram ação trombolítica. Ambos os extratos foram capazes de prolongar o tempo de coagulação, induzido pela peçonha de *B. moojeni*. Os resultados demonstram que os extratos aquosos de fitoterápicos a base de *U. tomentosa* e *U. guianensis* apresentaram ação moduladora sobre fosfolipases A<sub>2</sub> e proteases, caracterizando esses fitoterápicos como alternativas promissoras para o tratamento de doenças relacionadas a distúrbios na hemostasia e processos inflamatórios. No entanto, estudos complementares são necessários para ampliar a caracterização destes extratos e elucidar mecanismos de interação dos compostos bioativos presentes nos fitoterápicos a base de unha-de-gato, visando a prospecção de novas indicações de uso terapêutico à saúde humana.

**Palavras-chave:** Plantas medicinais. Hemostasia. Peçonha como ferramenta laboratorial. Unha-de-gato. Inibidores enzimáticos.

## ABSTRACT

Herbal medicines are drugs made from medicinal plants or their derivatives, which are a viable and effective alternative therapy. Inflammatory diseases have increasingly affected the world population, highlighting the need for development and application of alternative or adjuvant treatments. Based on popular knowledge and scientific information, species of the genus *Uncaria* possess pharmacological properties. The species *Uncaria tomentosa* and *Uncaria guianensis*, popularly known as cat's claw, are medicinal plants rich in bioactive compounds with anti-inflammatory properties, and are widely used for the treatment of joint and muscle pain. Thus, the aim of this study was to characterize the phenolic compounds by high performance liquid chromatography (HPLC) and to evaluate the in vitro effects of aqueous extracts of *U. tomentosa* and *U. guianensis* on phospholipases A<sub>2</sub> and proteases (involved in hemostasis and inflammation), using *Bothrops moojeni* venom as a laboratory tool. The aqueous extract of *U. guianensis* showed higher content of phenolic compounds detected by HPLC when compared to the extract of *U. tomentosa*. The phospholipase activity induced by *B. moojeni* venom was significantly inhibited by both extracts, ranging from 10 to 18% and 10 to 46% for *U. tomentosa* and *U. guianensis* aqueous extracts, respectively. The greatest inhibitory action on hemolysis was observed for the aqueous extract of *U. guianensis* when incubated with *B. moojeni* venom, with results ranging from 14 to 60%. In the thermal hemolysis assay, the higher doses tested exerted a greater protective effect on erythrocyte membranes. The proteolytic activity was significantly inhibited from 10 to 27% for the aqueous extract of *U. tomentosa* and from 10 to 40% for *U. guianensis*. For the thrombolytic activity significant inhibition was observed only in the highest dose of aqueous extract of *U. guianensis* (53%) and the controls containing only the extracts showed thrombolytic action. Both extracts were able to prolong the coagulation time, induced by *B. moojeni* venom. The results show that the aqueous extracts of herbal medicines based on *U. tomentosa* and *U. guianensis* showed modulating action on phospholipases A<sub>2</sub> and proteases, characterizing these herbal medicines as promising alternatives for the treatment of diseases related to disorders in hemostasis and inflammatory processes. However, further studies are needed to expand the characterization of these extracts and elucidate mechanisms of interaction of bioactive compounds present in phytotherapeutics based on cat's claw, aiming the prospection of new indications of therapeutic use to human health.

**Keywords:** Medicinal Plants. Hemostasis. Venom as a laboratory tool. Cat's claw. Enzyme inhibitors.



## LISTA DE FIGURAS

### PRIMEIRA PARTE

Figura 1 – Espécies de <i>Uncaria tomentosa</i> e <i>Uncaria guianensis</i> . .....	18
Figura 2 – Exemplos de metabólitos secundários de <i>Uncaria tomentosa</i> e <i>Uncaria guianensis</i> . .....	20
Figura 3 – Modelo da cascata de coagulação. ....	23
Figura 4 – Ação catalítica das fosfolipases nos sítios da molécula de fosfolipídio. ....	27
Figura 5 - Locais de atuação de serinoproteases de peçonha de serpentes na coagulação sanguínea. ....	29
Figura 6 - Locais de atuação de metaloproteases de peçonhas de serpente na coagulação sanguínea. ....	30

### SEGUNDA PARTE – ARTIGO

Figura 1 – Atividade fosfolipásica (%) induzida pela peçonha de <i>Bothrops moojeni</i> .....	56
Figura 2 – Atividade hemolítica (%) induzida pela peçonha de <i>Bothrops moojeni</i> .....	58
Figura 3 – Atividade proteolítica (%) induzida pela peçonha de <i>Bothrops moojeni</i> .....	61
Figura 4 – Atividade trombolítica (%) induzida pela peçonha de <i>Bothrops moojeni</i> .....	63

## LISTA DE TABELAS

### SEGUNDA PARTE – ARTIGO

Tabela 1 – Teor de compostos fenólicos dos extratos aquosos dos fitoterápicos de <i>Uncaria tomentosa</i> e <i>Uncaria guianensis</i> . .....	54
Tabela 2 – Avaliação da hemólise térmica na presença de anti-inflamatórios e dos extratos aquosos dos fitoterápicos de <i>Uncaria tomentosa</i> e <i>Uncaria guianensis</i> . .....	60
Tabela 3 – Efeito dos extratos aquosos dos fitoterápicos de <i>Uncaria tomentosa</i> e <i>Uncaria guianensis</i> sobre a atividade coagulante induzida pela peçonha de <i>Bothrops moojeni</i> no plasma humano citratado. ....	65

## SUMÁRIO

<b>PRIMEIRA PARTE</b> .....	<b>13</b>
<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>14</b>
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	<b>15</b>
2.1 Objetivo Geral .....	15
2.2 Objetivos Específicos.....	15
<b>3 REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	<b>16</b>
3.1 Plantas medicinais e fitoterápicos .....	16
3.2 <i>Uncaria tomentosa</i> (Willd.) DC. e <i>Uncaria guianensis</i> (Aubl.) Gmel. ....	18
3.3 Hemostasia .....	21
3.4 Processos inflamatórios.....	24
3.5 Peçonhas de serpentes como ferramentas laboratoriais .....	26
3.6 Enzimas a serem estudadas e seu papel na hemostasia e inflamação .....	27
3.6.1 Fosfolipases A <sub>2</sub> .....	27
3.6.2 Proteases .....	28
<b>4 CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	<b>31</b>
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>32</b>
<b>ANEXO</b> .....	<b>40</b>
<b>SEGUNDA PARTE – ARTIGO</b> .....	<b>46</b>
<b>RESUMO</b> .....	<b>48</b>
<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>49</b>
<b>2 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>50</b>
2.1 Obtenção das amostras e preparo dos fitoterápicos a base de <i>Uncaria tomentosa</i> e <i>Uncaria guianensis</i> .....	50
2.2 Identificação e quantificação de compostos fenólicos por CLAE .....	50
2.3 Obtenção de sangue humano .....	51
2.4 Obtenção da peçonha de serpente.....	51
2.5 Atividade fosfolipásica e hemolítica .....	51
2.6 Ensaio de estabilização da membrana de eritrócitos por meio da inibição da hemólise térmica .....	52
2.7 Atividade proteolítica sobre a caseína .....	52
2.8 Atividade trombolítica .....	53
2.9 Atividade coagulante .....	53
2.10 Análise estatística.....	53
<b>3 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>54</b>
3.1 Compostos fenólicos .....	54

<b>3.2 Atividade fosfolipásica e hemolítica .....</b>	<b>55</b>
<b>3.3 Ensaio de estabilização da membrana de eritrócitos por meio da inibição da hemólise térmica .....</b>	<b>59</b>
<b>3.4 Atividade proteolítica sobre a caseína .....</b>	<b>61</b>
<b>3.5 Atividade trombolítica .....</b>	<b>62</b>
<b>3.6 Atividade coagulante .....</b>	<b>64</b>
<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>66</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>67</b>

## **PRIMEIRA PARTE**

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

## 1 INTRODUÇÃO

A fitoterapia é um método terapêutico baseado na utilização de plantas medicinais para o tratamento de diversas doenças, e essa prática tem acompanhado a humanidade ao longo dos anos. De acordo com a Organização Mundial de Saúde, 80% da população mundial faz uso de algum tipo de planta medicinal. Além de ser uma alternativa para o tratamento de doenças, essas práticas podem representar um fator essencial para a manutenção das condições de saúde das pessoas.

As plantas medicinais, segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), são toda planta ou partes da mesma que contenham as substâncias responsáveis pela ação terapêutica. As plantas medicinais são ricas em compostos biologicamente ativos, e são amplamente utilizadas na elaboração de medicamentos fitoterápicos e fitofármacos, para o tratamento de diversas patologias, tais como as doenças inflamatórias.

O processo inflamatório é acionado quando ocorrem lesões traumáticas ou processos infecciosos. Essa resposta inflamatória envolve a liberação sequencial de mediadores e o recrutamento de leucócitos circulantes, que são ativados no local da inflamação. Para o tratamento dessas condições, os anti-inflamatórios convencionais, embora muitas vezes mostrem-se eficazes na redução de sinais e sintomas, estão associados a uma série de efeitos adversos a curto e longo prazo. Com isso, a atividade anti-inflamatória de compostos naturais tem atraído grande interesse científico devido à capacidade de atuar no controle da resposta inflamatória, com menos efeitos adversos quando comparados aos medicamentos sintéticos.

Dentre as diversas plantas medicinais com potencial anti-inflamatório, destacam-se duas espécies conhecidas popularmente por unha-de-gato: *Uncaria tomentosa* e *Uncaria guianensis*. Elas têm sido amplamente utilizadas no tratamento de doenças articulares e musculares agudas. Em decorrência de suas propriedades farmacológicas, o medicamento fitoterápico de *U. tomentosa* e *U. guianensis* é reconhecido pela ANVISA e faz parte da Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS (RENISUS), com o objetivo de ampliar as opções terapêuticas em saúde pública básica.

Neste contexto, as espécies *U. tomentosa* e *U. guianensis* podem atuar de forma benéfica em mecanismos correlacionados à hemostasia e processos inflamatórios, bem como pode estar associada a modulação de enzimas envolvidas na manutenção ou desordem destes processos, tais como fosfolipases A<sub>2</sub> e proteases em geral. Assim, são necessários estudos científicos que possibilitem seu uso, já difundido popularmente, de forma eficaz e segura.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo Geral

O objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos dos extratos aquosos dos medicamentos fitoterápicos elaborados com *Uncaria tomentosa* e *Uncaria guianensis*, como moduladores enzimáticos de fosfolipases A<sub>2</sub> e proteases, utilizando peçonha de *Bothrops moojeni* como ferramenta laboratorial, com foco em processos inflamatórios e hemostáticos.

### 2.2 Objetivos Específicos

- Caracterizar os compostos fenólicos presentes nos extratos aquosos dos fitoterápicos de *U. tomentosa* e *U. guianensis* por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).
- Avaliar os efeitos dos extratos sobre a atividade de fosfolipases A<sub>2</sub>.
- Analisar os efeitos dos extratos sobre eritrócitos humanos (citotoxicidade), e seu potencial de inibição sobre a lise de eritrócitos induzida por proteases, presentes na peçonha de *B. moojeni*.
- Investigar o potencial anti-inflamatório dos extratos pelo ensaio de estabilidade da membrana de eritrócitos, avaliado em diferentes temperaturas.
- Avaliar os efeitos dos extratos sobre a atividade proteolítica em geral (utilizando o substrato caseína).
- Avaliar os efeitos dos extratos sobre a atividade de proteases hemorrágicas, utilizando o teste trombolítico.
- Avaliar os efeitos dos extratos sobre a coagulação do plasma citratado.
- Analisar os resultados obtidos visando prospectar embasamentos para aplicações descritas popularmente para os extratos, assim como complementar dados científicos, ampliando a caracterização dos extratos e possibilitando sua futura utilização terapêutica de forma eficaz e segura.

### 3 REFERENCIAL TEÓRICO

#### 3.1 Plantas medicinais e fitoterápicos

As plantas medicinais são utilizadas desde a antiguidade como uma alternativa para o tratamento de diversas doenças (DUTRA et al., 2016). A Organização Mundial da Saúde (OMS) define planta medicinal como sendo "todo e qualquer vegetal que possui, em um ou mais órgãos, substâncias que podem ser utilizadas com fins terapêuticos ou que sejam precursores de fármacos semi-sintéticos" (WHO, 1998).

Segundo dados da OMS, cerca de 80% da população mundial utilizam tratamentos com plantas medicinais para atender às necessidades de saúde primária (WANG et al., 2020). As principais vantagens do uso de plantas medicinais e seus derivados são o baixo custo, acessibilidade e geralmente menos efeitos colaterais. Desse modo, é importante realizar pesquisas para confirmar sua segurança e eficácia (BHATTACHARYA, 2017).

A fitoterapia é um método de tratamento caracterizado pela utilização de plantas medicinais em suas diversas preparações. Essa prática se faz presente na medicina tradicional, e constitui a base dos estudos da Etnofarmacologia, uma ciência voltada para sistemas tradicionais de tratamento. Tais tratamentos despertaram o interesse em estudos químicos, farmacológicos e toxicológicos do princípio ativo dessas plantas. Embora, muitas vezes, esses princípios de senso comum sejam usados pelo homem sem embasamento científico (ARAÚJO et al., 2014; MORAES; MEZZOMO; OLIVEIRA, 2018).

As plantas medicinais produzem uma variedade de metabólitos secundários com atividades biológicas promissoras para a saúde humana. Muitos metabólitos secundários como alcaloides, ácidos fenólicos, flavonoides, estilbenos, lignanas são alvo de pesquisas por estarem diretamente relacionados ao efeito terapêutico, e estes sendo utilizados para o desenvolvimento de medicamentos farmacêuticos industriais, bem como remédios fitoterápicos derivados de plantas medicinais (LI et al., 2020; WAWROSCH; ZOTCHEV, 2021).

Existem diversos produtos à base de plantas medicinais, e estes se diferenciam pelo processamento farmacêutico utilizado na sua preparação. Os fitoterápicos englobam todos os produtos elaborados a partir de plantas medicinais, ou de seus derivados, exceto substâncias isoladas, e envolvem pouco ou nenhum processamento. Já os medicamentos contendo fitofármacos possuem substâncias isoladas de matérias-primas vegetais com atividade farmacológica comprovada, envolvendo elevado processamento tecnológico em pesquisa e desenvolvimento (BRASIL, 2008; PEREIRA, 2013). Um exemplo notável de fitofármaco é a vincristina, isolado de folhas de *Catharanthus roseus* (L.) G. Don, sendo amplamente estudado devido a suas propriedades antitumorais (GUIMARÃES et al., 2012).



As plantas medicinais utilizadas na medicina tradicional e popular são denominadas remédios caseiros de origem vegetal. Quando são rasuradas, trituradas ou pulverizadas, estabilizadas ou não, são classificadas como drogas vegetais. Quando ocorre extração da planta medicinal *in natura* ou da droga vegetal é denominado como derivado vegetal. Já a matéria-prima vegetal se dá ao conjunto de todos esses produtos utilizados no processo de fabricação de medicamentos fitoterápicos (PEREIRA, 2013).

Os medicamentos fitoterápicos são medicamentos cujos princípios ativos são a droga vegetal ou o derivado vegetal, podendo ser adicionados excipientes e apresentados em formas farmacêuticas como cápsulas e comprimidos, podendo ser manipulados ou industrializados. Esses medicamentos apresentam um marcador, que é o composto ou a classe de compostos químicos (exemplo: ácidos fenólicos, alcaloides, flavonoides, dentre outros) presente na matéria-prima vegetal (CARVALHO, 2011; PEREIRA, 2013).

A utilização de plantas medicinais no Brasil despertou a atenção dos programas de assistência à saúde e profissionais, devido à grande biodiversidade e baixo custo de terapia (MORAES; MEZZOMO; OLIVEIRA, 2018; RIBEIRO et al., 2018). Para garantir o acesso seguro e o uso racional de plantas medicinais e fitoterápicos, o Governo Brasileiro implementou a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos, juntamente com a Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS (RENISUS) em 2009, com o objetivo de ampliar as opções terapêuticas em saúde pública básica (BRASIL, 2008).

A Agência Nacional da Vigilância Sanitária (ANVISA) é o órgão regulador que tem por finalidade institucional promover a proteção da saúde à população, também é responsável por publicar o Formulário de Fitoterápicos e o Memento Fitoterápicos. Ambos são embasados em vasta literatura científica internacional, trazendo dados de nomenclatura, parte utilizada, posologia, indicações de uso e efeitos adversos, além de dados de segurança e eficácia das plantas medicinais nas formulações utilizadas (ANVISA, 2016; 2021).

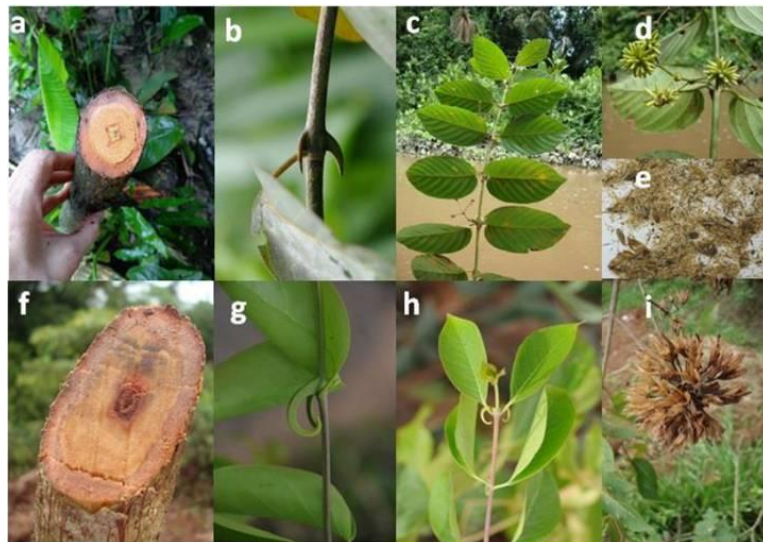
As plantas medicinais fornecem tratamento para uma variedade de distúrbios, incluindo inflamatórios, parasitários, neurológicos, cardiovasculares, doenças metabólicas, oncológicas e relacionadas à dor (SOARES-BEZERRA et al., 2013). O uso de plantas medicinais com atividade anti-inflamatória propõe uma alternativa as estratégias terapêuticas convencionais. Dentre essas espécies, encontra-se as plantas do gênero *Uncaria* (RIBEIRO et al., 2018; SERRANO; ROS; NIETO, 2018). O uso dessa planta medicinal está regulamentado pela ANVISA e o seu medicamento fitoterápico a base de droga vegetal é disponibilizado pelo SUS para a população (BRASIL, 2015).

### 3.2 *Uncaria tomentosa* (Willd.) DC. e *Uncaria guianensis* (Aubl.) Gmel.

O gênero *Uncaria*, pertence à família Rubiaceae, ordem Rubiales, subclasse Asteridae e classe Magnoliopsida, divisão Magnoliophyta. Existem cerca de 60 espécies, caracterizam-se por plantas lenhosas, geralmente trepadeiras, e alguns arbustos (PEREIRA; LOPES, 2006). Ocorrem em florestas tropicais da América Central e do Sul, principalmente na Amazônia (HEITZMAN et al., 2005). As espécies deste gênero estão entre as plantas com um expressivo potencial terapêutico e são utilizadas há mais de 2.000 anos na medicina tradicional de algumas tribos peruanas (PEÑALOZA et al., 2015).

As espécies *Uncaria tomentosa* (Willd.) DC. e *Uncaria guianensis* (Aubl.) Gmel. (Figura 1) estão entre as espécies mais comercializadas em todo o mundo por conta de suas propriedades medicinais. Essas espécies são típicas de climas úmidos tropicais e subtropicais, sendo encontradas em diversos países das Américas do Sul e Central (HONÓRIO; BERTONI, 2016). No Brasil, a espécie *U. tomentosa* é encontrada nos estados do Acre, Amapá, Amazonas e Pará; enquanto a espécie *U. guianensis* é distribuído nos estados do Acre, Amazonas, Amapá, Maranhão, Mato Grosso, Pará, Rondônia, Roraima e Tocantins (VALENTE, 2006).

Figura 1 – Espécies de *Uncaria tomentosa* e *Uncaria guianensis*.



Legenda: *U. tomentosa*: a) haste, b) espinhos, c) folhas, d) inflorescência e e) sementes. *U. guianensis*: f) caule, g) espinhos, h) folhas e i) frutos.

Fonte: Honório & Bertoni (2016).

Ambas as espécies são popularmente conhecidas como unha-de-gato, devido a presença de espinhos no caule, semelhantes às unhas de um gato (Figura 1). A *U. tomentosa* é uma planta trepadeira com altura de 10-30 m, possuem folhas perenes, flores amareladas e espinhos que facilitam sua aderência às cascas e galhos de árvores. Já a espécie *U. guianensis*, é uma planta

trepadeira rasteira com altura de 5-10 m e apresenta espinhos com a ponta dobrada para dentro que prejudicam sua aderência com outras plantas (HONÓRIO; BERTONI, 2016).

As espécies de *Uncaria* são bastante utilizadas na medicina tradicional para o tratamento de várias doenças como asma, artrite, dermatite, diabetes, gastrite, gonorreia, inflamação do trato gênito-urinário, irregularidade no ciclo menstrual, processos virais, tumores, feridas, úlceras, dor de cabeça e infecções bacterianas/fúngicas (QIN et al., 2021; ZHANG et al., 2015).

Além dos dados etnofarmacológicos, vários testes *in vitro* e *in vivo* com extratos de *U. tomentosa* e *U. guianensis* confirmaram suas atividades imunostimulantes e anti-inflamatórias (AZEVEDO et al., 2018; ELGAWISH et al., 2019; SANDOVAL et al., 2000; URDANIBIA et al., 2013), antioxidante (AZEVEDO et al., 2019; BUKOWSKA et al., 2012; NAVARRO et al., 2019), anticancerígena/antitumoral (CIANI et al., 2021; RIBEIRO et al., 2020; URDANIBIA et al., 2013; ZARI et al., 2021), antidiabéticas (DOMINGUES et al., 2011; KIM, 2016), antimicrobianas (BLANCK et al., 2022; CALDAS et al., 2021), anti-herpética (CAON et al., 2014), anticoncepcional (NOGUEIRA NETO et al., 2011), antirreabsortivas (LIMA et al., 2020) e neuroprotetora (SNOW et al., 2019). Recentemente, foram publicados estudos sugerindo o potencial da *Uncaria tomentosa* na medicina complementar e/ou alternativa para o tratamento da COVID-19, devido as suas propriedades antivirais (FERREIRA; POLONINI; DIJKERS, 2020; YEPES-PÉREZ; HERRERA-CALDERON; QUINTERO-SAUMETH, 2020).

A unha-de-gato é bastante comercializada na forma de medicamento fitoterápico, indicada na medicina popular como anti-inflamatório, auxiliando no tratamento sintomático de dores articulares e musculares agudas (SANDOVAL et al., 2002), como imunostimulantes, antivirais e antitumorais (HEITZMAN et al., 2005; KEPLINGER et al., 1999; REINHARD, 1999).

Devido ao uso tradicional, diversas pesquisas farmacológicas comprovam a eficácia terapêutica, bem como estudos fitoquímicos e analíticos que possibilitam o controle de qualidade de medicamentos produzidos a partir de *U. tomentosa*, e estão sendo estimulados por programas governamentais brasileiros voltados à Atenção Primária à Saúde. Dessa forma, *U. tomentosa* foi inserida na lista de plantas descritas nas monografias sobre plantas medicinais publicadas pela Organização Mundial da Saúde (WHO, 1997) e na Lista de Medicamentos Essenciais publicada pelo Governo Brasileiro (RENAME) (BRASIL, 2015).

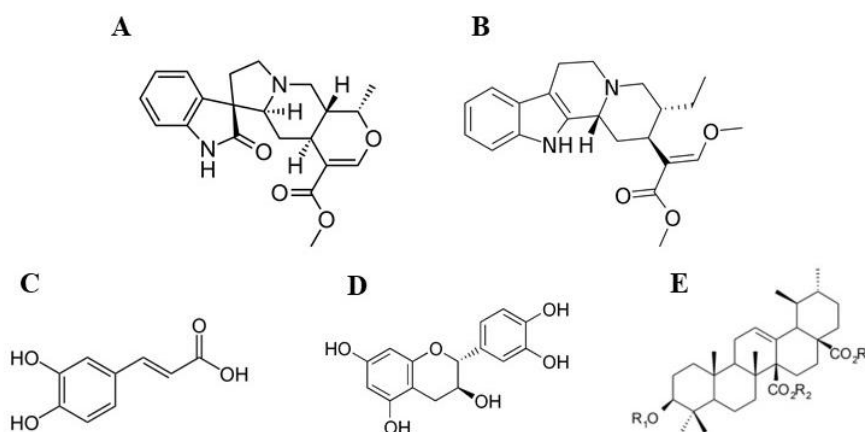
No Brasil, de acordo com o Memento Fitoterápico, é recomendado utilizar comprimido contendo 350 mg de extrato seco, duas vezes ao dia; cápsula (droga vegetal) contendo 300-500 mg, 1 cápsula, 2 a 3 vezes ao dia. E o tempo de utilização não deve ultrapassar 8 semanas (ANVISA, 2016). Mur e colaboradores (2002) realizaram um ensaio clínico com dois grupos

utilizando extrato aquoso de *U. tomentosa* em cápsulas, para artrite reumatoide. Os resultados demonstraram que os pacientes tratados com o medicamento fitoterápico, apresentaram menos dores articulares em relação ao tratamento com o placebo.

Os dados da literatura sugerem que uma dose oral de fitoterápico de *U. tomentosa* variando de 0,5 g a 1 g/dia na forma de comprimidos ou cápsulas pode ser a mais eficaz. Em países como Alemanha e Áustria, extratos padronizados da raiz de *U. tomentosa*, na forma de pó, são usados 2-3 vezes ao dia em doses de 20 a 60 mg/dia (KOŁODZIEJCZYK-CZEPAS et al., 2021).

Os constituintes químicos do gênero *Uncaria* têm sido amplamente estudados desde o início de 1900. Até o momento, mais de 100 compostos foram isolados de espécies de *Uncaria*, os principais são alcaloides indólicos e oxindólicos, polifenólicos, flavonoides, triterpenos e saponinas. Outros constituintes também foram isolados como cumarinas, lignanas, derivados de benzeno, esteroides e alcanos (LIANG et al., 2020; ZHANG et al., 2015).

Figura 2 – Exemplos de metabólitos secundários de *Uncaria tomentosa* e *Uncaria guianensis*.



Legenda: A) Alcaloide oxindólico: Mitrafilina. B) Alcaloide indólico: Hirsutina. C) Ácido fenólico: Ácido cafeico. D) Flavonoide: Catequina. E) Terpeno glicosilado (derivado do ácido quinóvico).

Fonte: Kaiser (2016).

Dentre os princípios ativos presentes nesta planta, os mais citados como responsáveis pelas atividades farmacológicas descritas são os alcaloides (ZHANG et al., 2015). No entanto, estudos sugerem que os efeitos terapêuticos da unha-de-gato podem ser atribuídos a uma interação sinérgica entre os diferentes compostos presentes nessa planta (FALKIEWICZ; ŁUKASIAK, 2001). No entanto, alguns pesquisadores apresentaram evidências de que a atividade anti-inflamatória de *U. tomentosa* fosse correlacionado ao teor de compostos fenólicos (GONÇALVES; DINIS; BATISTA, 2005; SANDOVAL et al., 2002).

Os compostos fenólicos correspondem aos fitoquímicos mais difundidos nas plantas. Esses compostos têm sido associados a uma série de benefícios para a saúde humana, em razão de suas propriedades antioxidantes e pró-oxidativas, dessa forma, possuem efeitos protetores contra doenças degenerativas, como inflamação, diabetes e câncer (TATIPAMULA; KUKAVICA, 2021).

Já foram relatadas diferenças na composição fenólica das espécies de *U. tomentosa* e *U. guianensis*. Níveis mais elevados, principalmente de flavonóides, são encontrados em *U. guianensis* quando comparado com *U. tomentosa*. (KAISER et al., 2020).

Navarro e colaboradores (2019) avaliaram a composição fenólica de fitoterápicos de *U. tomentosa* e identificaram 25 compostos, incluindo ácidos hidroxibenzoico (ácido benzoico, salicílico, 4-hidroxibenzoico, protocatecuico, gálico, siríngico e vanílico) e hidroxicinâmico (p-cumárico, cafeico, ferúlico e isoferúlico), monômeros de flavan-3-ol (catequina e epicatequina), dímeros de procianidina, trímeros de procianidina, bem como dímeros de propelargodina. Os mesmos pesquisadores em outro estudo correlacionaram a alta atividade antioxidante com a composição fenólica de extratos de cascas e folhas de *U. tomentosa* (NAVARRO-HOYOS et al., 2017, 2018).

Kolodziejczyk-Czepas et al. (2021) realizaram um estudo pioneiro sobre os efeitos de *U. tomentosa* no sistema hemostático. Os extratos demonstraram potencial anticoagulante, efeitos antiplaquetários, atividade trombolítica e fibrinolítica. Os estudos *in silico* incluíram as interações da trombina com os principais componentes dos extratos, esses compostos interagiram com a trombina dentro e fora do sítio ativo.

De modo geral, há poucos estudos científicos que relatam o efeito modulador de *U. tomentosa* e *U. guianensis* sobre os processos relacionados à hemostasia, destacando-se a necessidade de pesquisas complementares que poderão contribuir para um uso mais eficaz e seguro dessa planta no tratamento e prevenção de doenças relacionadas a distúrbios hemostáticos e inflamatórios.

### **3.3 Hemostasia**

A hemostasia refere-se ao conjunto de fenômenos biológicos que ocorre em imediata resposta à lesão de um vaso sanguíneo com o objetivo de conter a hemorragia. O sistema hemostático inclui três processos: hemostasia primária, coagulação (hemostasia secundária) e fibrinólise, e em conjunto, mantêm a normalidade da fluidez do sangue, sem haver extravasamento pelos vasos (hemorragia) ou obstrução do fluxo pela presença de trombos (coagulação) (LIPPI; FAVALORO, 2018).

O sistema hemostático é resultado de diversos processos altamente eficientes e devidamente regulados, incluindo a parede celular, as estruturas e os agentes vasoativos relacionados na vasoconstrição e na vasodilatação. Em condições fisiológicas, as células endoteliais, que revestem os vasos sanguíneos, expressam substâncias com propriedades anticoagulantes (REZENDE, 2010).

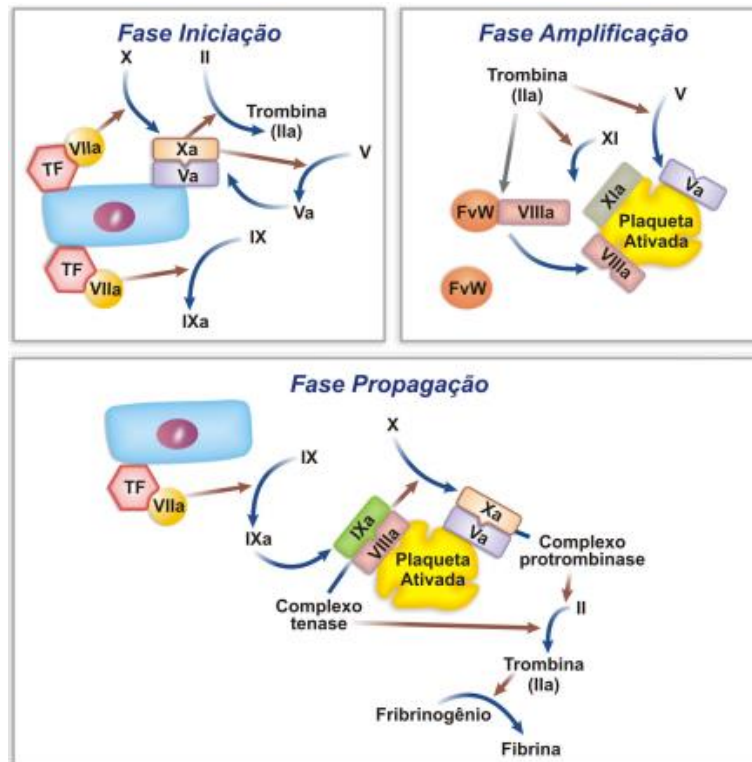
Quando ocorre uma lesão na monocamada de células endoteliais vasculares, o sistema hemostático garante o fechamento da ruptura da parede, através de uma série de eventos, visando minimizar a perda de sangue e manter a circulação sanguínea. Primeiramente, a vasoconstrição limita o fluxo de sangue e as plaquetas aderem às proteínas da matriz endotelial formando um agregado instável no local (INTAGLIATA; DAVIS; CALDWELL, 2018; YAMASHITA, 2013).

A coagulação sanguínea consiste na conversão de uma proteína solúvel do plasma, o fibrinogênio, em moléculas de fibrina que formam um polímero insolúvel, por ação de uma enzima denominada trombina. O tampão hemostático é formado por meio da adesão e agregação das plaquetas circulantes, levando a formação de coágulos de fibrina (YAMASHITA, 2013).

O sistema fibrinolítico é responsável pela subsequente eliminação dos coágulos para regeneração do tecido danificado. Quando ocorre qualquer alteração em um dos componentes desse mecanismo, pode ocorrer o comprometimento da hemostasia e resultar em trombose ou hemorragia (BERGER et al., 2014; DAHLBÄCK, 2000).

O modelo do sistema de coagulação (Figura 2) consiste na sequência ativada de diferentes fatores plasmáticos que ocorre sobre superfícies celulares distintas em três fases simultâneas: iniciação, amplificação e propagação (RODRIGUES et al., 2012).

Figura 3 – Modelo da cascata de coagulação.



Fonte: Rodrigues e colaboradores (2012).

Na fase de iniciação, o endotélio vascular e as células sanguíneas circulantes são perturbados, ocorre a interação do fator FVIIa ativado derivado do plasma com o fator tecidual (FT), formando o complexo FT-VIIa. Em seguida, esse complexo ativa o fator X formando Xa, esse por sua vez, ativa o fator V em fator Va. Esse associa-se ao fator Xa e converte protrombina (fator II) em trombina. Além disso, nessa fase o complexo FT-VIIa ativa o fator IX, formando o fator IXa. Na fase de amplificação, a trombina gerada ativa plaquetas, cofatores Va, e VIIa, e fator XI na superfície das plaquetas.

O fator VIIa é ativado após dissociar-se do complexo FvW/FVIIa. Com esses fatores ativados na superfície das plaquetas inicia-se a fase de propagação. Nessa fase ocorre uma grande produção de dois complexos: tenase (IXa/VIIa) e protrombinase (Xa/Va), esses complexos ativam a protombina formando trombina. E esta última etapa, resulta na clivagem de fibrinogênio em monômeros de fibrina. As fibrinas se polimerizam pela ação do fator XII, para que, junto com as plaquetas, forme um tampão hemostático impedindo a perda de sangue, e resultando na formação de coágulo estável de fibrina (RODRIGUES et al., 2012; SMITH; TRAVERS; MORRISSEY, 2015).

As plaquetas presentes no local da injúria, além de essenciais à formação desse tampão homeostático, também liberam múltiplos mediadores químicos, incluindo fatores de

crescimento tais como TGF- $\beta$  2 e VEGF 3, que atuam na ativação e regulação de cascatas de sinalização do processo de reparação tecidual no sítio de inflamação (PAKYARI et al., 2013).

O processo de cicatrização é constituído de três fases: a inflamação, a proliferação e a remodelação. Na primeira fase ocorre a interação entre células e matriz extracelular com a ativação de mediadores da inflamação. Na fase proliferativa ocorre a epitelização com formação de tecido de granulação, além de angiogênese. Na terceira fase há a substituição do colágeno e apoptose das células do epitélio que serão descartados, assim a cicatriz é formada (CAMPOS; BORGES-BRANCO; GROTH, 2007).

Quando ocorrem alterações no sistema hemostático, podem surgir diversas patologias que prejudicam o funcionamento normal do organismo, ou até mesmo provocar a morte de indivíduos (ARNETH, 2019). Deste modo, compreender e elucidar os mecanismos da hemostasia tornam-se de suma relevância, assim como, o estudo de compostos e fármacos que possam atuar modulando os diferentes processos relacionados à hemostasia.

### **3.4 Processos inflamatórios**

O processo inflamatório envolve uma complexa cascata de eventos bioquímicos e celulares, e é uma resposta adaptativa do organismo que ocorre no tecido frente a qualquer lesão celular, provocada por patógenos ou por agentes físicos. O papel da inflamação é proteger o organismo no sentido de remover e/ou eliminar o agente lesivo através do sistema imune e mediadores moleculares. As manifestações clínicas do processo inflamatório são calor, rubor, edema e dor/perda de função (SALES et al., 2017).

A exposição celular aos patógenos e ao tecido lesionado resultam na produção e na liberação de diversos mediadores químicos na área inflamada. Dentre esses mediadores encontram-se histamina, metabólitos do ácido araquidônico (prostaglandinas, tromboxanos e leucotrienos), fator de ativação plaquetária, bradicinina, óxido nítrico, neuropeptídios e citocinas (COUTINHO; MUZITANO; COSTA, 2009).

Por meio de estímulos, os fosfolipídios das membranas celulares liberam o ácido araquidônico através de enzimas fosfolipases A<sub>2</sub>. Esse ácido pode ser metabolizado por duas classes de enzimas: as cicloxigenases, sendo a isoforma COX-2 induzida e expressa predominantemente durante o processo inflamatório, dando início a biossíntese de prostaglandinas e tromboxanos e as lipoxigenases (LOX), originando a biossíntese de leucotrienos (LT) (CARVALHO; CARVALHO; RIOS-SANTOS, 2004)

O óxido nítrico (NO) é produzido pelas células endoteliais do tecido lesionado e possui uma forte ação vasodilatadora, provocando um aumento da permeabilidade vascular, além de agir como regulador do recrutamento de leucócitos e exercer ação citotóxica contra patógenos.



No decorrer das reações imunes e inflamatórias, as citocinas são liberadas de modo a regular a ação das células destes sistemas (OLIVEIRA et al., 2011).

A inflamação pode ser crônica ou aguda, dependendo das características da resposta humoral e das moléculas envolvidas. Quando o equilíbrio inflamatório é alterado, com sinais pro-inflamatórios excessivos (por exemplo, na via cicloxigenase), podem ocorrer danos fisiológicos (SALES et al., 2017; SERRANO; ROS; NIETO, 2018). A inflamação é geralmente descrita como crônicas, embora haja sobreposição entre esses processos. Uma resposta inflamatória aguda se manifesta como vermelhidão, calor, inchaço, dor e perda de função. A permeabilidade vascular aumentada, o fluxo sanguíneo acelerado e a sensibilização das fibras nervosas estão associadas ao inchaço, vermelhidão e dor, respectivamente (SINGH et al., 2019; YEUNG et al., 2018).

Na fase aguda, leucócitos, principalmente granulócitos, migram para o local da adesão, mediados por citocinas e proteínas de fase aguda, com o objetivo de remover o estímulo inflamatório (por exemplo: agente infeccioso, material estranho) ou danos às células envelhecidas por lesão e assim, iniciar a cicatrização. Dependendo do grau de lesão, essa fase celular aguda pode ser suficiente para resolver qualquer danificação. A inflamação persistente, como resultado de uma prolongada exposição a estímulos inflamatórios ou reação inadequada, pode levar à fase crônica, na qual podem ocorrer danos nos tecidos e fibrose (GERMOLEC et al., 2018).

A inflamação crônica é geralmente caracterizada pela destruição do tecido e a tentativa de reparar os danos, simultaneamente. Ocorre devido a infecções persistentes, exposição prolongada a uma série de substâncias patogênicas e a autoimunidade. Essas substâncias são principalmente mediadores inflamatórios, como o fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) e estão ligados ao início do câncer. A combinação desses fatores leva a um estado inflamatório desequilibrado com um incremento de marcadores como citocinas inflamatórias, incluindo TNF- $\alpha$ , interleucinas (IL)-6 e IL-1 $\beta$ , que também estão associados a doenças cardiometabólicas (SERRANO; ROS; NIETO, 2018).

Se não controlada, a inflamação pode surgir em numerosos estados doentes, como artrite reumatoide, esclerose múltipla, doença inflamatória intestinal, psoríase, doenças imunoinflamatórias e transformações neoplásicas. Além disso, a inflamação crônica também está ligada a várias etapas da tumorigênese e é reconhecida como fator de risco para a ocorrência de diferentes tipos de câncer (PATIL et al., 2019).

Para o tratamento dessas condições inflamatórias, os anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs) são os medicamentos mais utilizados, pois inibem precocemente etapas na biossíntese de eicosanoides através da inibição da cicloxigenase (COX). Apesar de sua ampla utilização, o

uso crônico dessa classe de medicamentos anti-inflamatórios causa vários efeitos adversos, como toxicidade cardiovascular, gastrointestinal e hepatotoxicidade, entre outras doenças. Por esse motivo, há um grande interesse na caracterização e/ou desenvolvimento de novos compostos que podem atuar como agentes anti-inflamatórios, de forma eficiente, com menos efeitos adversos e maior segurança (RIBEIRO et al., 2018; YAHFOUFI et al., 2018).

### **3.5 Peçonhas de serpentes como ferramentas laboratoriais**

As peçonhas de serpentes contêm uma grande quantidade de moléculas bioativas, conhecidas como toxinas. Essas toxinas podem ser classificadas como proteínas enzimáticas (metaloproteases, serinoproteases, fosfolipases A<sub>2</sub> e L-aminoácido oxidases) e proteínas não enzimáticas (desintegrinas e proteínas do tipo C), essas toxinas interagem com vários sistemas fisiológicos, incluindo a hemostasia (LARRÉCHÉ et al., 2021).

As serpentes do gênero *Bothrops* pertencem à família Viperidae e à subfamília Crotalidae, possuem cerca de 50 espécies amplamente distribuídas na América do Sul e Central (CARRASCO et al., 2016) e estão envolvidas na maioria dos casos de acidentes ofídicos no Brasil (MAGALHÃES et al., 2019; RORIZ et al., 2018). Envenenamentos pelo gênero *Bothrops* geram manifestações locais e sistêmicas, que podem resultar em complicações clínicas como insuficiência renal, choque, hemorragia ou até mesmo morte. No local da picada, observam-se dor, edema, sangramento das marcas de presas, manchas vermelhas, equimoses, bolhas e necrose (GUTIÉRREZ et al., 2009; MONTEIRO et al., 2020; SANTORO et al., 2008).

Em nível laboratorial, os pacientes envenenados apresentam alterações hemostáticas – por exemplo, consumo de fatores de coagulação sanguínea, principalmente de fibrinogênio, fator V e VII, trombocitopenia e níveis aumentados de fibrinogênio/produtos de degradação de fibrina – e alterações inflamatórias, como níveis aumentados de proteína C reativa e interleucina (THOMAZINI et al., 2021).

As toxinas de peçonha podem apresentar diferentes efeitos farmacológicos e toxicológicos (FERRAZ et al., 2019). As peçonhas de serpentes, são amplamente utilizadas como ferramentas laboratoriais na indução de efeitos tóxicos e farmacológicos, possibilitando o estudo de agentes químicos e naturais que atuem inibindo ações tóxicas e/ou modulando efeitos farmacológicos. Muitas enzimas presentes nestas peçonhas se assemelham estrutural e funcionalmente às enzimas humanas, permitindo assim, a prospecção dos efeitos de diversas substâncias sobre processos bioquímicos/fisiológicos/patológicos que ocorrem no organismo humano (OLIVEIRA et al., 2021). Nesse contexto, o uso de toxinas como ferramentas laboratoriais contribuem para a elucidação de diversos processos e mecanismos celulares, além

de gerar conhecimentos que possibilitem o desenvolvimento de novos agentes terapêuticos para o tratamento de doenças hemostáticas e inflamatórias.

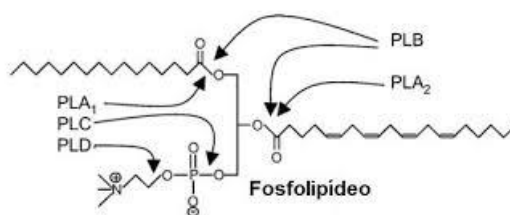
### 3.6 Enzimas a serem estudadas e seu papel na hemostasia e inflamação

#### 3.6.1 Fosfolipases A<sub>2</sub>

As fosfolipases (PLs) são enzimas que atuam no metabolismo de fosfolipídios, os quais são componentes essenciais das membranas celulares e participam de sua estrutura e funcionamento. Estas enzimas são identificadas como A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub>, B, C ou D, conforme a posição em que atuam na hidrólise lipídica. As fosfolipases catalisam a hidrólise de ácidos graxos na posição sn-2 de fosfolipídios das membranas (Figura 4) e, desta maneira, liberam lisofosfolipídeos ou ácidos graxos livres, principalmente os ácidos poli-insaturados como o ácido araquidônico (CEDRO et al., 2018).

As fosfolipases A<sub>2</sub> (PLA<sub>2s</sub>) (EC 3.1.1.4) são enzimas estáveis, relativamente pequenas (~ 14 kDa), dependentes de Ca<sup>2+</sup> e ricas em interações dissulfeto, fundamentais em diversos processos biológicos, incluindo a geração de mediadores pro-inflamatórios (metabolizados por COX e LOX), tais como prostaglandinas, leucotrienos e tromboxanos, e na regulação do metabolismo lipídico. Os fosfolipídios podem ser degradados por inúmeras substâncias e dessa forma, provocar alterações na membrana celular, ocasionando mudanças na entrada e saída de líquidos e íons (YARLA et al., 2015).

Figura 4 – Ação catalítica das fosfolipases nos sítios da molécula de fosfolipídio.



Legenda: As setas indicam a posição de hidrólise das enzimas fosfolipase A1 (PLA<sub>1</sub>), fosfolipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>), fosfolipase B (PLB), fosfolipase C (PLC) e fosfolipase D (PLD).

Fonte: Magalhães (2017).

As PLA<sub>2</sub> de peçonhas de serpentes são responsáveis por efeitos biológicos locais e sistêmicos como miotoxicidade, bloqueio neuromuscular, cardiotoxicidade, hemólise e atividades anticoagulantes, antiplaquetárias e formadoras de edema (LARRÉCHÉ et al., 2021). O uso de PLA<sub>2s</sub> de peçonhas de serpentes para o entendimento da atividade e mecanismos de ação da PLA<sub>2s</sub> humana, tem sido proposto devido à alta homologia estrutural entre as duas enzimas (TEIXEIRA et al., 2003).

Vários estudos com plantas medicinais e seus derivados, já foram descritos com atividade inibitória sobre fosfolipases A<sub>2</sub> (ALAM et al., 2016; CESAR et al., 2020; MARQUES et al., 2018). Os compostos bioativos de plantas medicinais geralmente atuam como inibidores enzimáticos capazes de interagir com as macromoléculas alvo da peçonha por meio de diferentes mecanismos. Com isso, as PLA<sub>2</sub> podem servir como ferramentas úteis para elucidar os mecanismos de ação envolvidos no processo, além de avaliar o potencial de novos agentes terapêuticos anti-inflamatórios (MARCUSSE et al., 2007; SALES et al., 2017).

### 3.6.2 Proteases

As proteases representam uma classe de enzimas com papéis importantes em processos biológicos essenciais, como a coagulação sanguínea, morte celular, e diferenciação de tecidos, entre outros (SAŁAGA; SOBCZAK; FICHNA, 2013). Essas enzimas catalisam a hidrólise de ligações peptídicas em proteínas ou peptídeos, liberando peptídeos de tamanho variável ou aminoácidos livres. As proteases podem ser classificadas quanto à natureza química do sítio catalítico, como: serinoproteases, cisteína proteases, aspártico proteases, treonina proteases e metaloproteases (LÓPEZ-OTÍN; OVERALL, 2002; MURI, 2014).

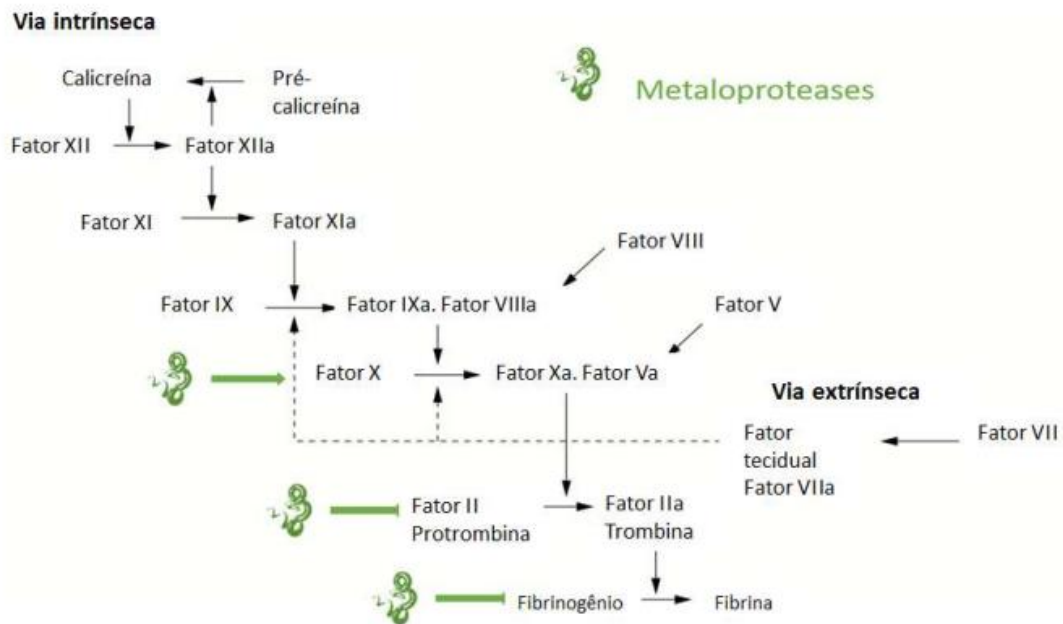
Entre as proteases envolvidas na hemostasia destacam-se as serinoproteases (EC 3.4.21) que atuam de forma seletiva nos fatores da cascata de coagulação, com efeito na agregação plaquetária, fibrinólise e coagulação, e as metaloproteases (EC 3.4.17) são responsáveis por hemorragias, necrose e danos teciduais, podendo acarretar na perda de função, inflamação local e/ou amputação do membro (GUTIÉRREZ et al., 2010).

As serinoproteases de peçonha de serpente pertencem à família S1 de proteases semelhantes à tripsina. Apresentam massas moleculares que variam de 26 a 67 kDa e dois domínios estruturais distintos. Essas enzimas catalisam a clivagem de cadeias polipeptídicas em seu lado C-terminal de resíduos de aminoácidos hidrofóbicos ou carregados positivamente (KINI, 2005; SERRANO, 2013).

As atividades das serinoproteases que interferem na hemostasia podem ser pró-coagulantes ou anticoagulantes. As proteases pró-coagulantes são distinguidas entre enzimas capazes de ativar os fatores II, VII e/ou X e enzimas denominadas enzimas semelhantes à trombina que clivam o fibrinogênio em fibrina. Outras atividades são a fibrinólise direta, ativação da proteína C e plasminogênio (LARRÉCHÉ et al., 2021). Na figura 5 estão apresentados os locais de ação mais frequentes das serinoproteases.



Figura 6 - Locais de atuação de metaloproteases de peçonhas de serpente na coagulação sanguínea.



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

As proteases presentes em peçonhas de serpentes possuem funções enzimáticas semelhantes às proteases endógenas humanas como as enzimas envolvidas nos processos de coagulação e agregação de plaquetas que compõem a hemostasia (SERRANO, 2013; SLAGBOOM et al., 2017; YAMASHITA et al., 2014). Dessa maneira, as proteases de peçonhas de serpentes têm sido utilizadas como ferramentas de estudos dos mecanismos envolvidos na ativação de fatores-chave que controlam a hemostasia, e na prospecção de novos agentes terapêuticos.

Diversas plantas medicinais e compostos naturais isolados foram descritos como inibidores de proteases (BRAGA et al., 2022; CESAR et al., 2019; MARQUES et al., 2021). Sugere-se que os compostos bioativos presentes em extratos vegetais podem interagir com as proteases através de interações hidrofóbicas com resíduos aromáticos presentes na estrutura da enzima e complexação com íons metálicos, resultando em redução ou até mesmo aumento da atividade enzimática (SAAVEDRA et al., 2018). Nesse sentido, o estudo de inibidores de proteases é de extrema importância no desenvolvimento de novos agentes terapêuticos que podem prevenir e tratar doenças inflamatórias e distúrbios na hemostasia.

#### **4 CONSIDERAÇÕES FINAIS**

O uso de plantas medicinais e de medicamentos fitoterápicos desempenha um papel importante, nas necessidades básicas de saúde nos países em desenvolvimento, para o tratamento e prevenção de doenças. Considerando as células e moléculas, principalmente enzimas, associadas à iniciação, desenvolvimento e manutenção das doenças inflamatórias humanas, os produtos naturais mostram-se relevantes, uma vez que, muitos possuem propriedades farmacológicas associadas às inibições enzimáticas, controle da expressão de enzimas e consequente redução na produção de mediadores inflamatórios. O estudo científico de extratos vegetais e compostos isolados com propriedades farmacológicas associadas à prevenção e tratamento de doenças humanas, embasam os conhecimentos populares sobre as plantas medicinais, destacando-se a relevância de promover continuidade à tradição de seu consumo bem como possibilitam o desenvolvimento de novos produtos e/ou formas de uso, que proporcionem benefícios à saúde humana de forma eficaz e segura.

## REFERÊNCIAS

- ALAM, M. I. et al. Molecular modeling and snake venom phospholipase A2 inhibition by phenolic compounds: Structure-activity relationship. **European journal of medicinal chemistry**, v. 114, p. 209–219, 23 maio 2016.
- ANVISA. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Memento Fitoterápico. Farmacopeia Brasileira**. 1. ed. Brasília: 2016.
- ANVISA. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Formulário de Fitoterápicos. Farmacopeia Brasileira**. 2. ed. Brasília: 2021.
- ARAÚJO, É. J. F. et al. **Visão de Aspectos toxicológicos da planta medicinal Casearia sylvestris Swartz: revisão de literatura**. Disponível em: <<https://rcfba.fcfar.unesp.br/index.php/ojs/article/view/108/106>>. Acesso em: 21 fev. 2022.
- ARNETH, B. Coevolution of the coagulation and immune systems. **Inflammation Research**, v. 68, n. 2, p. 117–123, 2 fev. 2019.
- AZEVEDO, B. et al. Antioxidant Activity of an Aqueous Leaf Extract from *Uncaria tomentosa* and Its Major Alkaloids Mitraphylline and Isomitraphylline in *Caenorhabditis elegans*. **Molecules**, v. 24, n. 18, p. 3299, 10 set. 2019.
- AZEVEDO, B. C. et al. Aqueous extracts from *Uncaria tomentosa* (Willd. ex Schult.) DC. reduce bronchial hyperresponsiveness and inflammation in a murine model of asthma. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 218, p. 76–89, 23 maio 2018.
- BERGER, M. ET AL. Hemostasia: uma breve revisão. **Caderno Pedagógico**, v. 11, n. 1, p. 140–148, 2014.
- BHATTACHARYA, S. Medicinal plants and natural products in amelioration of arsenic toxicity: a short review. **Pharmaceutical Biology**, v. 55, n. 1, p. 349–354, 1 jan. 2017.
- BLANCK, J. J. et al. Comprehensive Review of the Components in Cat's Claw (*Uncaria tomentosa*) and Their Antibacterial Activity. **Applied Chem**, v. 2, n. 1, p. 1–29, 22 fev. 2022.
- BRAGA, M. A. et al. *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC extracts acting as enzyme modulators: digestion, inflammation, and hemostasis. **Semina: Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 43, n. 1, p. 101, 13 jan. 2022.
- BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Portaria Interministerial nº 2.960, de 9 de dezembro de 2008. Aprova o Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos e cria o Comitê Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos**. Disponível em: <[https://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2008/pri2960\\_09\\_12\\_2008.html](https://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2008/pri2960_09_12_2008.html)>. Acesso em: 21 fev. 2022.
- BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Relação Nacional de Medicamentos Essenciais: RENAME 2014 / Ministério da Saúde, Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos, Departamento de Assistência Farmacêutica e Insumos Estratégicos**. 9. ed. 2014.
- BUKOWSKA, B. et al. *Uncaria tomentosa* extracts protect human erythrocyte catalase against damage induced by 2,4-D-Na and its metabolites. **Food and Chemical Toxicology**, v. 50, n. 6, p. 2123–2127, jun. 2012.



- CALDAS, N. L. et al. Cytotoxicity, and antimicrobial and physicochemical properties of sealers incorporated with *Uncaria tomentosa*. **Brazilian Oral Research**, v. 35, 2021.
- CAMPOS, A. C. L.; BORGES-BRANCO, A.; GROTH, A. K. Cicatrização de feridas. **ABCD. Arquivos Brasileiros de Cirurgia Digestiva**, v. 20, n. 1, p. 51–58, 2007.
- CAON, T. et al. Antimutagenic and antiherpetic activities of different preparations from *Uncaria tomentosa* (cat's claw). **Food and Chemical Toxicology**, v. 66, p. 30–35, abr. 2014.
- CARRASCO, P. A. et al. Nomenclatural instability in the venomous snakes of the *Bothrops* complex: Implications in toxinology and public health. **Toxicon: official journal of the International Society on Toxinology**, v. 119, p. 122–128, 1 set. 2016.
- CARVALHO, A. C. B. **Plantas medicinais e fitoterápicos: regulamentação sanitária e proposta de modelo de monografia para espécies vegetais oficializadas no Brasil**. Brasília: 2011.
- CARVALHO, W. A.; CARVALHO, R. D. S.; RIOS-SANTOS, F. Analgésicos inibidores específicos da ciclooxigenase-2: avanços terapêuticos. **Revista Brasileira de Anestesiologia**, v. 54, n. 3, p. 448–464, 2004.
- CEDRO, R. C. A. et al. Cytotoxic and inflammatory potential of a phospholipase A2 from *Bothrops jararaca* snake venom. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v. 24, n. 1, p. 33, 23 dez. 2018.
- CÉSAR, P. H. S. **Avaliação do potencial protetor de compostos fenólicos sobre atividades tóxicas induzidas por peçonhas de *Bothrops spp.* e *Crotalus durissus terrificus***. Dissertação—Lavras: Universidade Federal de Lavras, 2016.
- CESAR, P. H. S. et al. Molecular interactions between p-coumaric acid and snake venom toxins. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 120, n. 9, p. 14594–14603, 1 set. 2019.
- CESAR, P. H. S. et al. Catechin and epicatechin as an adjuvant in the therapy of hemostasis disorders induced by snake venoms. **Journal of biochemical and molecular toxicology**, v. 34, n. 12, 1 dez. 2020.
- CIANI, F. et al. *Uncaria tomentosa*: A promising source of therapeutic agents for prevention and treatment of oxidative stress and cancer. In: **Cancer**. [s.l.] Elsevier, 2021. p. 505–514.
- COUTINHO, M. A. S.; MUZITANO, M. F.; COSTA, S. S. Flavonoides: Potenciais Agentes Terapêuticos para o Processo Inflamatório. **Revista Virtual de Química**, v. 1, n. 3, p. 241–256, 2009.
- DAHLBÄCK, B. Blood coagulation. **Lancet (London, England)**, v. 355, n. 9215, p. 1627–1632, 6 maio 2000.
- DOMINGUES, A. et al. Prevention of experimental diabetes by *Uncaria tomentosa* extract: Th2 polarization, regulatory T cell preservation or both? **Journal of Ethnopharmacology**, v. 137, n. 1, p. 635–642, set. 2011.
- DUTRA, R. C. et al. Medicinal plants in Brazil: Pharmacological studies, drug discovery, challenges and perspectives. **Pharmacological research**, v. 112, p. 4–29, 1 out. 2016.

- ELGAWISH, R. A. et al. Hepatoprotective activity of *Uncaria tomentosa* extract against sub-chronic exposure to fipronil in male rats. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 26, n. 1, p. 199–207, 1 jan. 2019.
- FALKIEWICZ, B.; ŁUKASIAK, J. Vilcacora [*Uncaria tomentosa* (Willd.) DC. and *Uncaria guianensis* (Aublet) Gmell.]—a review of published scientific literature. **American Journal of Case Reports**, v. 2, n. 4, p. 305–316, 2001.
- FERRAZ, C. R. et al. Multifunctional toxins in snake venoms and therapeutic implications: From pain to hemorrhage and necrosis. **Frontiers in Ecology and Evolution**, v. 7, n. JUN, p. 218, 2019.
- FERREIRA, A. O.; POLONINI, H. C.; DIJKERS, E. C. F. Postulated Adjuvant Therapeutic Strategies for COVID-19. **Journal of Personalized Medicine**, v. 10, n. 3, p. 80, 5 ago. 2020.
- FOX, J. W.; SERRANO, S. M. T. Structural considerations of the snake venom metalloproteinases, key members of the M12 reprolysin family of metalloproteinases. **Toxicon**, v. 45, n. 8, p. 969–985, jun. 2005.
- GERMOLEC, D. R. et al. Markers of Inflammation. **Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)**, v. 1803, p. 57–79, 2018.
- GONÇALVES, C.; DINIS, T.; BATISTA, M. T. Antioxidant properties of proanthocyanidins of *Uncaria tomentosa* bark decoction: a mechanism for anti-inflammatory activity. **Phytochemistry**, v. 66, n. 1, p. 89–98, jan. 2005.
- GUIMARÃES, G. et al. Cytogenetic characterization and genome size of the medicinal plant *Catharanthus roseus* (L.) G. Don. **AoB PLANTS**, v. 2012, n. 1, 2012.
- GUTIÉRREZ, J. M. et al. Experimental pathology of local tissue damage induced by *Bothrops asper* snake venom. **Toxicon: official journal of the International Society on Toxinology**, v. 54, n. 7, p. 958–975, 1 dez. 2009.
- GUTIÉRREZ, J. M. et al. Tissue pathology induced by snake venoms: How to understand a complex pattern of alterations from a systems biology perspective? **Toxicon**, v. 55, n. 1, p. 166–170, jan. 2010.
- HEITZMAN, M. E. et al. Ethnobotany, phytochemistry and pharmacology of *Uncaria* (Rubiaceae). **Phytochemistry**, v. 66, n. 1, p. 5–29, jan. 2005.
- HONÓRIO, I. C. G.; BERTONI, B. W. *Uncaria tomentosa* e *Uncaria guianensis* uma história agrônômica a ser escrita. **Ciência Rural**, v. 46, n. 8, p. 1401–1410, 1 ago. 2016.
- INTAGLIATA, N.; DAVIS, J.; CALDWELL, S. Coagulation Pathways, Hemostasis, and Thrombosis in Liver Failure. **Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 39, n. 05, p. 598–608, 28 out. 2018.
- KAISER, S. **Relevância dos alcaloides oxindólicos em *Uncaria tomentosa* (Willd.) DC. (Unha-de-gato): adulteração, quimiotipos e isomerização**. Tese —Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2016.
- KAISER, S. et al. Chemical differentiation between *Uncaria tomentosa* and *Uncaria guianensis* by LC-PDA, FT-IR and UV methods coupled to multivariate analysis: A reliable tool for adulteration recognition. **Microchemical Journal**, v. 152, 1 jan. 2020.

- KEPLINGER, K. et al. *Uncaria tomentosa* (Willd.) DC.--ethnomedicinal use and new pharmacological, toxicological and botanical results. **Journal of ethnopharmacology**, v. 64, n. 1, p. 23–34, 1 jan. 1999.
- KIM, T. H. A novel  $\alpha$ -glucosidase inhibitory constituent from *Uncaria gambir*. **Journal of Natural Medicines**, v. 70, n. 4, p. 811–815, 4 out. 2016.
- KINI, R. M. Serine Proteases Affecting Blood Coagulation and Fibrinolysis from Snake Venoms. **Pathophysiology of Haemostasis and Thrombosis**, v. 34, n. 4–5, p. 200–204, 2005.
- KOŁODZIEJCZYK-CZEPAS, J. et al. Extracts from *Uncaria tomentosa* as antiplatelet agents and thrombin inhibitors – The in vitro and in silico study. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 267, p. 113494, mar. 2021.
- LARRÉCHÉ, S. et al. Bleeding and Thrombosis: Insights into Pathophysiology of *Bothrops* Venom-Related Hemostasis Disorders. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 17, p. 9643, 1 set. 2021.
- LI, Y. et al. The effect of developmental and environmental factors on secondary metabolites in medicinal plants. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 148, p. 80–89, mar. 2020.
- LIANG, J.-H. et al. The genus *Uncaria*: A review on phytochemical metabolites and biological aspects. **Fitoterapia**, v. 147, p. 104772, nov. 2020.
- LIMA, V. et al. *Uncaria tomentosa* reduces osteoclastic bone loss in vivo. **Phytomedicine**, v. 79, p. 153327, dez. 2020.
- LIPPI, G.; FAVALORO, E. J. Laboratory hemostasis: from biology to the bench. **Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM)**, v. 56, n. 7, p. 1035–1045, 27 jun. 2018.
- LÓPEZ-OTÍN, C.; OVERALL, C. M. Protease degradomics: A new challenge for proteomics. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 3, n. 7, p. 509–519, jul. 2002.
- MAGALHÃES, M. R. **Caracterização de enzimas em peçonhas animais: identificação de fosfolipases do escorpião *Hadrurus gerstchi* e atividades enzimáticas da arraia *Potamotrygon falkneri***. Brasília: 2017.
- MAGALHÃES, S. F. V. et al. Snakebite envenomation in the Brazilian Amazon: a descriptive study. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 113, n. 3, p. 143–151, 1 mar. 2019.
- MARCUSSI, S. et al. Snake venom phospholipase A2 inhibitors: medicinal chemistry and therapeutic potential. **Current topics in medicinal chemistry**, v. 7, n. 8, p. 743–756, 21 abr. 2007.
- MARKLAND, F. S.; SWENSON, S. Snake venom metalloproteinases. **Toxicon: official journal of the International Society on Toxinology**, v. 62, p. 3–18, fev. 2013.
- MARQUES, T. R. et al. Fruit Bagasse Phytochemicals from *Malpighia emarginata* Rich in Enzymatic Inhibitor with Modulatory Action on Hemostatic Processes. **Journal of food science**, v. 83, n. 11, p. 2840–2849, 1 nov. 2018.

- MARQUES, T. R. et al. Evaluation of the Brazilian functional fruit *Morinda citrifolia* as phospholipases A2 and proteases modulator: *Morinda citrifolia*: enzymatic modulation. **Phytomedicine Plus**, v. 1, n. 4, p. 100071, 1 nov. 2021.
- MONTEIRO, W. M. et al. *Bothrops atrox*, the most important snake involved in human envenomings in the amazon: How venomics contributes to the knowledge of snake biology and clinical toxinology. **Toxicon**: **X**, v. 6, 1 jun. 2020.
- MORAES, E. F.; MEZZOMO, T. R.; OLIVEIRA, V. B. Conhecimento e uso de plantas medicinais por usuários de unidades básicas de saúde na região de Colombo, PR. **Revista Brasileira de Ciências da Saúde**, v. 22, n. 1, p. 57–64, 6 mar. 2018.
- MUR, E. et al. Randomized double blind trial of an extract from the pentacyclic alkaloid-chemotype of *Uncaria tomentosa* for the treatment of rheumatoid arthritis. **The Journal of rheumatology**, v. 29, n. 4, p. 678–81, abr. 2002.
- MURI, E. M. F. Proteases virais: importantes alvos terapêuticos de compostos peptideomiméticos. **Química Nova**, v. 37, n. 2, p. 308–316, 2014.
- NAVARRO, M. et al. Polyphenolic Composition and Antioxidant Activity of *Uncaria tomentosa* Commercial Bark Products. **Antioxidants**, v. 8, n. 9, p. 339, 23 ago. 2019.
- NAVARRO-HOYOS, M. et al. Proanthocyanidin Characterization and Bioactivity of Extracts from Different Parts of *Uncaria tomentosa* L. (Cat's Claw). **Antioxidants (Basel, Switzerland)**, v. 6, n. 1, 1 mar. 2017.
- NAVARRO-HOYOS, M. et al. Polyphenolic Composition and Antioxidant Activity of Aqueous and Ethanolic Extracts from *Uncaria tomentosa* Bark and Leaves. **Antioxidants**, v. 7, n. 5, p. 65, 11 maio 2018.
- NOGUEIRA NETO, J. et al. Contraceptive effect of *Uncaria tomentosa* (cat's claw) in rats with experimental endometriosis. **Acta Cirurgica Brasileira**, v. 26, n. suppl 2, p. 15–19, 2011.
- OLIVEIRA, D. A. et al. Lipases and proteases inhibition by *Averrhoa carambola* L. fruit extracts. **Phytomedicine Plus**, v. 1, n. 4, p. 100119, 1 nov. 2021.
- OLIVEIRA, C. M. B. DE et al. Citocinas e dor. **Revista Brasileira de Anestesiologia**, v. 61, n. 2, p. 260–265, abr. 2011.
- PAKYARI, M. et al. Critical Role of Transforming Growth Factor Beta in Different Phases of Wound Healing. **Advances in Wound Care**, v. 2, n. 5, p. 215, jun. 2013.
- PATIL, K. R. et al. Animal Models of Inflammation for Screening of Anti-inflammatory Drugs: Implications for the Discovery and Development of Phytopharmaceuticals. **International journal of molecular sciences**, v. 20, n. 18, 1 set. 2019.
- PEÑALOZA, E. M. C. et al. CHEMICAL COMPOSITION VARIABILITY IN THE *Uncaria tomentosa* (cat's claw) WILD POPULATION. **Química Nova**, 2015.
- PEREIRA, R. DE C. A.; LOPES, J. V. M. **Aspectos botânicos, etnobotânicos, agrônômicos e fitoquímicos de unha-de-gato**. Fortaleza. Disponível em: <<https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/handle/doc/1092500>>. Acesso em: 23 fev. 2022.

PEREIRA, S. S. T. C. **Medicamentos fitoterápicos e drogas vegetais industrializados e oficializados pelo Ministério da Saúde no Brasil: regulamentação sanitária, abrangência e qualidade dos estudos pré-clínicos e clínicos**. Rio de Janeiro: 2013.

QIN, N. et al. Recent research progress of *Uncaria* spp. based on alkaloids: phytochemistry, pharmacology and structural chemistry. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 210, p. 112960, 15 jan. 2021.

REINHARD, K. H. *Uncaria tomentosa* (Willd.) D.C.: cat's claw, uña de gato, or savéntaro. **Journal of alternative and complementary medicine (New York, N.Y.)**, v. 5, n. 2, p. 143–151, 1999.

REZENDE, S. M. Distúrbios da hemostasia: doenças hemorrágicas. **Revista Médica de Minas Gerais**, v. 20, n. 4, p. 534–553, 10 ago. 2010.

RIBEIRO, A. F. et al. Characterization and in vitro antitumor activity of polymeric nanoparticles loaded with *Uncaria tomentosa* extract. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 92, n. 1, 2020.

RIBEIRO, V. P. et al. Brazilian medicinal plants with corroborated anti-inflammatory activities: a review. **Pharmaceutical biology**, v. 56, n. 1, p. 253–268, 1 jan. 2018.

RODRIGUES, E. S. et al. Novos conceitos sobre a fisiologia da hemostasia. **Revista da Universidade Vale do Rio Verde**, v. 10, n. 1, p. 218–233, 26 jul. 2012.

RORIZ, K. R. P. S. et al. Epidemiological study of snakebite cases in Brazilian Western Amazonia. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 51, n. 3, p. 338–346, 1 abr. 2018.

SAAVEDRA, S. L. et al. Natural Snake Venom Inhibitors and their Pharmaceutical Uses: Challenges and Possibilities. **Current pharmaceutical design**, v. 24, n. 16, p. 1737–1747, 16 mar. 2018.

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

SALAĞA, 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, p. 708–715, 1 ago. 2013.

SALES, T. et al. Can Inhibitors of Snake Venom Phospholipases A2 Lead to New Insights into Anti-Inflammatory Therapy in Humans? A Theoretical Study. **Toxins**, v. 9, n. 11, p. 341, 25 out. 2017.

SANDOVAL, M. et al. Cat's claw inhibits TNF $\alpha$  production and scavenges free radicals: role in cytoprotection. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 29, n. 1, p. 71–78, 1 jul. 2000.

SANDOVAL, M. et al. Anti-inflammatory and antioxidant activities of cat's claw (*Uncaria tomentosa* and *Uncaria guianensis*) are independent of their alkaloid content. **Phytomedicine: international journal of phytotherapy and phytopharmacology**, v. 9, n. 4, p. 325–337, 2002.

SANTORO, M. L. et al. Haematological evaluation of patients bitten by the jararaca, *Bothrops jararaca*, in Brazil. **Toxicon**, v. 51, n. 8, p. 1440–1448, 15 jun. 2008.

- SERRANO, A.; ROS, G.; NIETO, G. Bioactive Compounds and Extracts from Traditional Herbs and Their Potential Anti-Inflammatory Health Effects. **Medicines**, v. 5, n. 3, p. 76, 16 jul. 2018.
- SERRANO, S. M. T. The long road of research on snake venom serine proteinases. **Toxicon**, v. 62, p. 19–26, fev. 2013.
- SINGH, N. et al. Inflammation and cancer. **Annals of African medicine**, v. 18, n. 3, p. 121–126, 1 jul. 2019.
- SLAGBOOM, J. et al. Haemotoxic snake venoms: their functional activity, impact on snakebite victims and pharmaceutical promise. **British Journal of Haematology**, v. 6, n. 177, p. 947–959, 27 fev. 2017.
- SMITH, S. A.; TRAVERS, R. J.; MORRISSEY, J. H. How it all starts: Initiation of the clotting cascade. **Critical reviews in biochemistry and molecular biology**, v. 50, n. 4, p. 326–336, 4 jul. 2015.
- SNOW, A. D. et al. The Amazon rain forest plant *Uncaria tomentosa* (cat's claw) and its specific proanthocyanidin constituents are potent inhibitors and reducers of both brain plaques and tangles. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 561, 6 dez. 2019.
- SOARES-BEZERRA, R. J. et al. Natural Products as a Source for New Anti-Inflammatory and Analgesic Compounds through the Inhibition of Purinergic P2X Receptors. **Pharmaceuticals 2013, Vol. 6, Pages 650-658**, v. 6, n. 5, p. 650–658, 29 abr. 2013.
- TATIPAMULA, V. B.; KUKAVICA, B. Phenolic compounds as antidiabetic, anti-inflammatory, and anticancer agents and improvement of their bioavailability by liposomes. **Cell biochemistry and function**, v. 39, n. 8, p. 926–944, 1 dez. 2021.
- TEIXEIRA, C. F. P. et al. Inflammatory effects of snake venom myotoxic phospholipases A2. **Toxicon: official journal of the International Society on Toxinology**, v. 42, n. 8, p. 947–962, 2003.
- THOMAZINI, C. M. et al. Involvement of von Willebrand factor and botrocetin in the thrombocytopenia induced by *Bothrops jararaca* snake venom. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 15, n. 9, 2021.
- URDANIBIA, I. et al. Anti-inflammatory and antitumoural effects of *Uncaria guianensis* bark. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 150, n. 3, p. 1154–1162, dez. 2013.
- VALENTE, L. M. M. Unha-de-gato [*Uncaria tomentosa* (Willd.) DC. e (Willd.) DC. e *Uncaria guianensis* (Aubl.) Gmel.]: Um Panorama Sobre seus Aspectos mais Relevantes. **Revista Fitos**, v. 2, n. 1, p. 48–58, 2006.
- WANG, W. et al. Advances and challenges in medicinal plant breeding. **Plant science: an international journal of experimental plant biology**, v. 298, 1 set. 2020.
- WAWROSCHEK, C.; ZOTCHEV, S. B. Production of bioactive plant secondary metabolites through in vitro technologies—status and outlook. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 105, n. 18, p. 6649–6668, 1 set. 2021.
- WHO (WORLD HEALTH ORGANIZATION). **Medicinal Plants Monographs (red. Blumenthal M), Herbal Gram: Salerno Paestum**. Italy, v. 40, 1998.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Regulatory situation of herbal medicines: a worldwide review**. Disponível em: <<https://apps.who.int/iris/handle/10665/63801>>. Acesso em: 21 fev. 2022.

YAHFOUFI, N. et al. The Immunomodulatory and Anti-Inflammatory Role of Polyphenols. **Nutrients**, v. 10, n. 11, 2 nov. 2018.

YAMASHITA, K. M. **Patogênese dos distúrbios hemostáticos sistêmicos induzidos pelo veneno da serpente *Bothrops jararaca***. São Paulo, 2013.

YAMASHITA, K. M. et al. Bothrops jararaca Venom Metalloproteinases Are Essential for Coagulopathy and Increase Plasma Tissue Factor Levels during Envenomation. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 5, p. e2814, 15 maio 2014.

YARLA, N. S. et al. Phospholipase A2: A Potential Therapeutic Target in Inflammation and Cancer (In silico, In vitro, In vivo and Clinical Approach). **Journal of Cancer Science & Therapy**, v. 07, n. 08, 2015.

YEPES-PÉREZ, A. F.; HERRERA-CALDERON, O.; QUINTERO-SAUMETH, J. Uncaria tomentosa (cat's claw): a promising herbal medicine against SARS-CoV-2/ACE-2 junction and SARS-CoV-2 spike protein based on molecular modeling. **Journal of Biomolecular Structure and Dynamics**, p. 1–17, 29 out. 2020.

YEUNG, Y. T. et al. Signaling Pathways in Inflammation and Anti-inflammatory Therapies. **Current pharmaceutical design**, v. 24, n. 14, p. 1449–1484, 28 mar. 2018.

ZARI, A. et al. Treatment with Uncaria tomentosa Promotes Apoptosis in B16-BL6 Mouse Melanoma Cells and Inhibits the Growth of B16-BL6 Tumours. **Molecules**, v. 26, n. 4, p. 1066, 18 fev. 2021.

ZHANG, Q. et al. Medicinal uses, phytochemistry and pharmacology of the genus *Uncaria*. **Journal of ethnopharmacology**, v. 173, p. 48–80, 27 jul. 2015.

## ANEXO

## I – Parecer do Comitê de Ética para Pesquisas com Seres Humanos

UNIVERSIDADE FEDERAL DE  
LAVRAS

## PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

## DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** FITOTERÁPICOS A BASE DE Uncaria tomentosa E Uncaria guianensis: prospecção de inibidores enzimáticos

**Pesquisador:** Silvana Marcussi

**Área Temática:**

**Versão:** 1

**CAAE:** 41967420.0.0000.5148

**Instituição Proponente:** Universidade Federal de Lavras

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

## DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 4.516.289

## Apresentação do Projeto:

Resumo:

Os fitoterápicos são medicamentos elaborados a partir de plantas medicinais, ou de seus derivados, sendo estes uma alternativa viável, eficaz e segura de terapia. As doenças inflamatórias têm afetado de forma crescente a população mundial, destacando a necessidade de desenvolvimento e aplicação de tratamentos alternativos ou adjuvantes. As espécies *Uncaria tomentosa* e *U. guianensis*, popularmente conhecidas como unha-de-gato, são plantas medicinais ricas em compostos bioativos como alcalóides, flavonóides e taninos. Possuem atividade anti-inflamatória e são amplamente utilizadas para o tratamento de dores articulares e musculares. Atualmente, a unha-de-gato é reconhecida como um fitoterápico pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), e este é distribuído pelo Sistema Único de Saúde (SUS) para a população. Com base em conhecimentos populares e informações científicas, espécies do gênero *Uncaria* possuem grande potencial farmacológico configurando alternativas para a substituição de alguns medicamentos anti-inflamatórios convencionais. Desta maneira, objetiva-se neste trabalho avaliar os efeitos *in vitro* dos fitoterápicos de *U. tomentosa* e *U. guianensis* sobre a atividade enzimática de fosfolipases A2, colagenases, hialuronidases e proteases com foco em processos inflamatórios e hemostáticos. Assim, almeja-se ampla caracterização dos efeitos dos fitoterápicos a base de unha-de-gato, visando a comprovação terapêutica do uso e os benefícios à saúde humana, atribuídos a eles.

**Endereço:** Campus Universitário Cx Postal 3037

**Bairro:** PRP/COEP

**CEP:** 37.200-900

**UF:** MG

**Município:** LAVRAS

**Telefone:** (35)3829-5182

**E-mail:** coep.nintec@ufla.br



UNIVERSIDADE FEDERAL DE  
LAVRAS



Continuação do Parecer: 4.516.289

**Hipótese:**

Os fitoterápicos poderão apresentar potencial anti-inflamatório e/ou efeitos moduladores sobre enzimas que atuam em processos inflamatórios, coagulação sanguínea, fibrinólise, regeneração tecidual e cicatrização.

**Metodologia Proposta:**

Preparo dos fitoterápicos a base de *Uncaria tomentosa* e *Uncaria guianensis* Os fitoterápicos a base de extrato seco de *Uncaria tomentosa* e *U. guianensis* serão obtidos em farmácias de manipulação do município de Lavras – MG. Os extratos aquosos serão preparados conforme metodologia de rotina do laboratório de bioquímica. Determinação da composição química dos extratos por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência - CLAE As análises cromatográficas serão realizadas em um equipamento de CLAE Shimadzu (MARQUES et al., 2016). Obtenção de sangue humano O sangue será obtido de 3 voluntários saudáveis, de ambos os sexos e com faixa etária entre 20 e 40 anos, sem sintomas de doenças e que declararem não ter feito uso de medicação durante um período de 30 dias antes da coleta de sangue. O sangue será coletado, uma só vez de cada voluntário (10mL), por punção venosa em tubos de vácuo contendo heparina para os ensaios de atividade hemolítica em meio sólido e líquido. Para o teste trombolítico o sangue será coletado em seringa, sem anticoagulante, e imediatamente distribuído em placa de 96 poços. Todos os experimentos serão realizados apenas após avaliação dos protocolos de pesquisa e aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa Humana (COEP) da Universidade Federal de Lavras (UFLA). Atividade anti-inflamatória avaliada pela estabilidade da membrana de eritrócitos frente à diferentes temperaturas A atividade anti-inflamatória dos extratos aquosos de *U. Tomentosa* e *U. Guianensis* será avaliada pela estabilidade da membrana de eritrócitos nas temperaturas de 37 °C e 54 °C (NKEH-CHUNGAG et al., 2015; TATIYA et al., 2011). Efeitos sobre a atividade fosfolipásica em meio sólido A atividade fosfolipásica será avaliada conforme descrito por Gutiérrez (1988). Atividade trombolítica A atividade trombolítica será avaliada sobre coágulos sanguíneos humanos formados in vitro de acordo com a metodologia descrita por Cintra et al. (2012). Efeitos sobre a atividade de hialuronidases Para avaliar os efeitos dos extratos obtidos dos fitoterápicos a base de *U. tomentosa* e *U. guianensis* sobre a atividade de hialuronidases, será utilizado o método descrito por Marchesan et al. (2006). Efeitos sobre a atividade de collagenases Os ensaios de inibição da collagenase serão realizados utilizando enzimas (obtidas comercialmente), sendo estas previamente incubadas com os extratos dos fitoterápicos de *U. tomentosa* e *U. guianensis* nas

**Endereço:** Campus Universitário Cx Postal 3037

**Bairro:** PRP/COEP

**CEP:** 37.200-900

**UF:** MG

**Município:** LAVRAS

**Telefone:** (35)3829-5182

**E-mail:** coep.nintec@ufla.br

Continuação do Parecer: 4.516.289

proporções de 1:0; 1:0,5; 1:1; 1:5; 1:10; 1:20 (colagenase: extrato, p/p) por 30 minutos à 37 oC. O gel será preparado em ágar bacteriológico 1% dissolvido em PBS (pH 7,4), azida de sódio 0,005% e colágeno não hidrolisado tipo II (obtido comercialmente), distribuindo o meio a temperatura de 45-50 oC, 100 L por poço, em microplacas de 96 poços. Após a solidificação do gel, os tratamentos e o controle negativo (PBS) serão aplicados em cada poço, em triplicata, em volume final de 30 L. As microplacas serão mantidas em câmara de cultura de células por 12h à 30 oC. A avaliação será realizada visualmente utilizando o corante coomassie blue R-250, seguido de descoloração em solução de ácido acético a 10%.

**Critério de Inclusão:**

Discentes de pós-graduação de ambos os sexos e com faixa etária entre 20 e 40 anos, sem sintomas de doenças e que declararem não ter feito uso de medicação durante um período de 30 dias antes da coleta de sangue.

**Critério de Exclusão:**

Discentes de pós-graduação que se voluntariem porém relatem ter feito uso de medicamentos nos últimos 30 dias, que sejam gestantes, tenham passado por alguma cirurgia ou relatem algum sintoma de doença.

**Objetivo da Pesquisa:**

**Objetivo Primário:**

O objetivo neste trabalho é avaliar o potencial in vitro dos medicamentos fitoterápicos elaborados com *Uncaria tomentosa* e *Uncaria guianensis*, como inibidores enzimáticos de fosfolipases A2, colagenases, hialuronidases e proteases hemorrágicas, com foco em processos inflamatórios e hemostáticos.

**Objetivo Secundário:**

- Caracterização química dos extratos por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência.- Investigar o potencial anti-inflamatório dos extratos pelo ensaio de estabilidade da membrana de eritrócitos, avaliado em diferentes temperaturas.
- Avaliar os efeitos dos extratos sobre a atividade de fosfolipases A2.

**Endereço:** Campus Universitário Cx Postal 3037

**Bairro:** PRP/COEP

**CEP:** 37.200-900

**UF:** MG

**Município:** LAVRAS

**Telefone:** (35)3829-5182

**E-mail:** coep.nintec@ufla.br

Continuação do Parecer: 4.516.289

- Avaliar os efeitos dos extratos sobre a atividade de proteases hemorrágicas, usando o teste trombolítico.
- Avaliar os efeitos dos extratos sobre a atividade de hialuronidases (substrato: ácido hialurônico) e colagenases (substrato: colágeno tipo II não hidrolisado) humanas.

#### **Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

##### **Riscos:**

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

##### **Benefícios:**

Não haverá qualquer benefício direto ao voluntário nesta pesquisa. No entanto, ele estará contribuindo com a conclusão dos estudos referentes ao projeto da pesquisadora Camila Luiz Sena, discente de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Agroquímica, pretende-se obter informações sobre os efeitos dos extratos aquosos, obtidos de fitoterápicos a base de *Uncaria tomentosa* e *Uncaria guianensis*, sobre enzimas que atuam em processos fisiopatológicos humanos, relacionados à inflamação, hemostasia, regeneração celular e cicatrização. Os resultados poderão trazer informações que ampliem as possibilidades de uso dos referidos fitoterápicos na prevenção e tratamento de diversas doenças de origem inflamatória e associadas a alterações hemostáticas, quanto como adjuvante em terapias. Em adição, almeja-se reafirmar os benefícios do consumo de plantas medicinais e fitoterápicos para a saúde humana com segurança e eficácia.

#### **Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

Estudo nacional e unicêntrico. Caráter acadêmico realizado para a obtenção do título de Mestre em Química e Bioquímica de produtos naturais. Patrocinador próprio. País de origem: Brasil. Número de participantes: 3  
Previsão de início e encerramento da pesquisa: 05/04/2021 a 05/04/2021

**Endereço:** Campus Universitário Cx Postal 3037

**Bairro:** PRP/COEP

**CEP:** 37.200-900

**UF:** MG

**Município:** LAVRAS

**Telefone:** (35)3829-5182

**E-mail:** coep.nintec@ufla.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DE  
LAVRAS



Continuação do Parecer: 4.516.289

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

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

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

**Recomendações:**

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

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

Projeto Aprovado.

**Considerações Finais a critério do CEP:**

Comitê considera o protocolo aprovado.

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

**Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:**

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1679768.pdf	16/12/2020 09:27:20		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	PROJETOFINALCAMILACOEP.docx	16/12/2020 09:23:14	Silvana Marcussi	Aceito
Outros	ComentarioseticosCamila.docx	16/12/2020 09:19:10	Silvana Marcussi	Aceito
Declaração de Pesquisadores	DeclaracaopesquisadoraCamila.docx	16/12/2020 09:18:15	Silvana Marcussi	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	AutorizacaoPRPGCamila.pdf	16/12/2020 09:17:37	Silvana Marcussi	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLECamila.docx	16/12/2020 09:16:17	Silvana Marcussi	Aceito
Folha de Rosto	folhaderostocamila.docx	16/12/2020 09:15:04	Silvana Marcussi	Aceito

**Endereço:** Campus Universitário Cx Postal 3037

**Bairro:** PRP/COEP

**CEP:** 37.200-900

**UF:** MG

**Município:** LAVRAS

**Telefone:** (35)3829-5182

**E-mail:** coep.nintec@ufla.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DE  
LAVRAS



Continuação do Parecer: 4.516.289

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

LAVRAS, 29 de Janeiro de 2021

---

**Assinado por:**

**ALCINÉIA DE LEMOS SOUZA RAMOS**  
(Coordenador(a))

**Endereço:** Campus Universitário Cx Postal 3037

**Bairro:** PRP/COEP

**CEP:** 37.200-900

**UF:** MG

**Município:** LAVRAS

**Telefone:** (35)3829-5182

**E-mail:** coep.nintec@ufla.br

**SEGUNDA PARTE – ARTIGO**

O artigo está redigido conforme a norma para a publicação periódica científica NBR 6022.

## ARTIGO

**Prospecção dos efeitos de *Uncaria tomentosa* e *Uncaria guianensis* sobre a atividade de enzimas e a modulação da hemostasia**

Camila Luiz Sena<sup>1</sup>, Matheus Henrique da Silva<sup>1</sup>, Mateus Santos Carapiá<sup>1</sup>, Isaac Filipe Moreira Konig<sup>1</sup>, Mariana Aparecida Braga<sup>1</sup>, Silvana Marcussi<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Chemistry, Biochemistry Laboratory, Universidade Federal de Lavras (UFLA), Campus Universitário, Lavras, Minas Gerais, 37200-000, Brazil.

Corresponding Author: Dra. Silvana Marcussi, Biochemistry Laboratory, Department of Chemistry, Universidade Federal de Lavras, Campus Universitário, 37200-900, Lavras, Brazil (phone number: +55 (35) 3829-1271, e-mail: [marcussi@ufla.br](mailto:marcussi@ufla.br)).



## RESUMO

Os medicamentos fitoterápicos são uma alternativa viável, segura e eficaz de terapia. As espécies *Uncaria tomentosa* e *Uncaria guianensis*, são plantas medicinais ricas em compostos bioativos com propriedades anti-inflamatórias. Neste estudo, extratos aquosos de fitoterápicos a base de *U. tomentosa* e *U. guianensis* foram caracterizados quanto à sua composição fenólica e ação moduladora sobre fosfolipases A<sub>2</sub> e proteases (envolvidas na hemostasia e inflamação), utilizando peçonha de *Bothrops moojeni* como ferramenta laboratorial. A atividade fosfolipásica induzida pela peçonha de *B. moojeni* foi inibida significativamente por ambos os extratos, variando de 10 a 18% e 10 a 46% para os extratos aquosos *U. tomentosa* e *U. guianensis*, respectivamente. A maior ação inibitória da hemólise foi observada para o extrato aquoso de *U. guianensis*, quando incubado com peçonha de *B. moojeni*, com resultados entre 14 a 60%. No ensaio de hemólise térmica, as maiores doses testadas exerceram maior efeito protetor nas membranas eritrocitárias. A atividade proteolítica foi inibida significativamente de 10 a 27% para o extrato aquoso de *U. tomentosa* e de 10 a 40% para *U. guianensis*. Para a atividade trombolítica observou-se inibição significativa apenas na maior dose de extrato aquoso de *U. guianensis* (53%) e os controles contendo apenas os extratos apresentaram ação trombolítica. Ambos os extratos foram capazes de prolongar o tempo de coagulação, induzido pela peçonha de *B. moojeni*. Os resultados demonstram que os extratos atuam como moduladores sobre fosfolipases A<sub>2</sub> e proteases, sendo assim, esses fitoterápicos podem configurar uma alternativa promissora no tratamento de doenças inflamatórias e distúrbios hemostáticos.

**Palavras-chave:** Fitoterápicos. Anti-inflamatórios. Modulação da Hemostasia. Inibidores enzimáticos.



## 1 INTRODUÇÃO

Os fitoterápicos são medicamentos elaborados a partir de plantas medicinais e representam uma alternativa viável no tratamento de diversas patologias (FALZON; BALABANOVA, 2017). Atualmente, são foco de estudos, por serem uma fonte promissora de compostos com atividade biológica. O seu uso possui vantagens como baixo custo, acessibilidade e geralmente menos efeitos colaterais. A busca por agentes terapêuticos com menos efeitos adversos tem chamado a atenção para as plantas medicinais com propriedades anti-inflamatórias (PATIL et al., 2019; RIBEIRO et al., 2018).

As espécies *Uncaria tomentosa* (Willd.) DC. e *Uncaria guianensis* (Aubl.) Gmel. da família botânica Rubiaceae, popularmente conhecidas como unha-de-gato, ocorrem naturalmente em florestas tropicais da América do Sul e Central. Essas plantas são utilizadas na medicina tradicional indígena há mais de 2.000 anos (HONÓRIO; BERTONI, 2016). Estas espécies são indicadas na medicina popular como anti-inflamatórios, auxiliando no tratamento sintomático de dores articulares e musculares agudas (SANDOVAL et al., 2002), como imunoestimulantes, antivirais e antitumorais (HEITZMAN et al., 2005; KEPLINGER et al., 1999; REINHARD, 1999).

As espécies de *U. tomentosa* e *U. guianensis* apresentam diversos compostos bioativos, sendo estes os responsáveis por suas propriedades farmacológicas, destacando-se os alcaloides pentacíclicos e alcaloides tetracíclicos, polifenólicos, flavonóides, triterpenos e saponinas (NAVARRO-HOYOS et al., 2017). Diversos testes *in vitro* e *in vivo* com extratos de *U. tomentosa* e *U. guianensis* confirmaram seus efeitos antioxidante, anticancerígeno, anti-inflamatórios, antidiabéticos, antimicrobianos, imunoestimulantes e anti-Parkinson (ZHANG et al., 2015). Embora algumas das aplicações dessas espécies estejam relacionadas com a fisiologia do sangue, há poucas evidências científicas que abordam o seu efeito modulador sobre os processos relacionados à hemostasia.

Nesse sentido, o presente estudo teve como objetivo avaliar os efeitos dos extratos aquosos de fitoterápicos a base de *U. tomentosa* e *U. guianensis* na hemostasia e atividade enzimática exercida pelas fosfolipases A<sub>2</sub> e proteases, utilizando peçonha de serpente da espécie *Bothrops moojeni* para prospecção dos efeitos dos extratos no organismo humano.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Obtenção das amostras e preparo dos fitoterápicos a base de *Uncaria tomentosa* e *Uncaria guianensis*

Os fitoterápicos a base de *Uncaria tomentosa* e *Uncaria guianensis* foram obtidos em farmácias de manipulação do município de Lavras, Minas Gerais (21° 14'S, 44° 59'O e 919 m de altitude). Especificações: o fitoterápico de *U. tomentosa* é da marca Florian, lote interno 19G15-FL00-000011, lote fabricante NPT.0219/147, data de fabricação 01/02/2019, data de validade 28/02/2022, parte utilizada casca do cipó, teor ativo 3% de alcaloides; o fitoterápico de *U. guianensis* é da marca Purifarma, lote interno PURI013952, lote fabricante 23/5, data de fabricação 23/07/2019, data de validade 23/07/2024, parte utilizada casca do cipó, doseamento 5,7% de taninos totais.

Os fitoterápicos foram preparados de acordo com Simão et al. (2015) modificado. Foram solubilizados em água ultrapura, na proporção de 1:25 (m/v), em seguida foram incubados em banho termostático à temperatura de 36 °C sob 60 rpm por 24 horas. O extrato aquoso foi centrifugado a 2000 rpm por 30 minutos, o sobrenadante foi coletado e armazenado à -20°C. O extrato consistia em uma concentração final de 40 µg/µL.

### 2.2 Identificação e quantificação de compostos fenólicos por CLAE

As análises cromatográficas foram realizadas no laboratório Central de Análise e Prospecção Química da Universidade Federal de Lavras. Foi utilizado um equipamento de CLAE Shimadzu, equipado com duas bombas de alta pressão LC-20AT, um detector UV-visível modelo SPD-M20A, forno CTO-20AC, uma interface CBM-20A e um injetor automático com amostrador SIL-20A. As separações foram realizadas utilizando-se uma coluna Shim-pack VP-ODS-C18 (250 mm x 4,6 mm) conectada a uma pré-coluna Shim-pack Column Holder (10 mm x 4,6 mm). Os extratos aquosos de *U. tomentosa* e *U. guianensis*, e os padrões fenólicos foram filtrados em membrana de 0,45 µm (Millipore®) e injetados no cromatógrafo. Os compostos foram identificados por comparação com os tempos de retenção dos padrões. Os padrões utilizados foram: ácido gálico, catequina, ácido clorogênico, ácido cafeico, ácido vanílico, ácido *p*-cumárico, ácido ferúlico, ácido *m*-cumárico, ácido *o*-cumárico, resveratrol e ácido trans-cinâmico. A quantificação foi realizada por meio da construção de curvas analíticas obtidas por regressão linear, considerando o coeficiente de determinação ( $R^2$ ) de 0,99 (MARQUES et al., 2016).

### 2.3 Obtenção de sangue humano

O sangue utilizado para os testes foi obtido de voluntários, de ambos os sexos e com faixa etária entre 20 e 40 anos, que declararam não ter feito uso de medicação durante um período de 30 dias antes da coleta. O sangue foi coletado por punção venosa em tubos contendo citrato para a atividade coagulante, heparina para atividade anti-inflamatória e hemolítica, e em tubos sem anticoagulante para a atividade trombolítica. Todos os experimentos que requerem o uso de material biológico humano foram previamente aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos (COEP) da Universidade Federal de Lavras, sob o número de registro (Nº CAAE/41967420.0.0000.5148).

### 2.4 Obtenção da peçonha de serpente

Os ensaios foram realizados utilizando peçonha bruta cristalizada de *Bothrops moojeni* obtida comercialmente do serpentário Bioagentes localizado em Batatais, São Paulo. A peçonha foi pesada (10 mg) e dissolvida em 1 mL de solução salina tamponada com fosfato (PBS, pH 7,4). Todas as concentrações de peçonha foram previamente estabelecidas para cada atividade testada. O uso de peçonha de serpente como ferramenta de pesquisa laboratorial foi registrado no SisGen sob o número ADF95EA.

### 2.5 Atividade fosfolipásica e hemolítica

A atividade fosfolipásica e hemolítica foram avaliadas em um meio sólido, conforme descrito por Gutiérrez et al. (1988). O gel para avaliação da atividade fosfolipásica foi preparado com  $\text{CaCl}_2$  0,01 mol L<sup>-1</sup>, fosfolipídios de gema de ovo 1:3 (v/v), PBS (pH 7,4), ágar bacteriológico 1% e azida de sódio 0,005%, vertendo o meio em placas de Petri na temperatura de 50 °C. Após a solidificação do gel, os tratamentos foram aplicados em orifícios de 0,4 cm de diâmetro feitos no gel, em um volume final de 30 µL. As placas foram mantidas em câmara de cultura de células por 24 horas à 37 °C. Os ensaios de fosfolipases foram realizados utilizando peçonha de *B. moojeni*, em que a dose mínima (10 µg) de peçonha foi previamente incubada com os extratos aquosos dos fitoterápicos de *U. tomentosa* e *U. guianensis* nas doses de 5; 10; 25; 50; 100; 200; 500 µg.

Para a atividade hemolítica, o gel foi preparado substituindo os fosfolipídios por um concentrado de eritrócitos. Para obter as células, o sangue recém coletado foi centrifugado a 2000 rpm durante 5 minutos. O plasma foi removido e as hemácias foram suspensas em PBS (pH 7,4) e centrifugadas nas mesmas condições, sendo esta etapa de lavagem repetida duas vezes. A inibição da atividade hemolítica foi avaliada utilizando peçonha de *B. moojeni* (30 µg), nas mesmas condições previamente mencionadas, em diferentes doses.

Ambas as atividades foram avaliadas medindo-se, em milímetros, o diâmetro do halo translúcido formado ao redor dos orifícios nos géis e os resultados foram convertidos em porcentagem de atividade. Também foram realizados controles com anti-inflamatórios esteroidal (AIE; prednisolona) e não-esteroidal (AINE; diclofenaco resinato) nas doses de 5 e 10 µg. Os controles contendo apenas peçonha foram considerados como 100% de atividade.

## **2.6 Ensaio de estabilização da membrana de eritrócitos por meio da inibição da hemólise térmica**

O ensaio de estabilização da membrana de eritrócitos por meio da inibição da hemólise induzida pelo calor, foi realizado de acordo com o protocolo descrito por Nkeh-Chungag et al. (2014).

O sangue foi coletado e centrifugado a 3600 rpm por 5 minutos. O plasma foi descartado e as hemácias foram suspensas em PBS (pH 7,4) e centrifugadas nas mesmas condições, sendo esta etapa de lavagem repetida duas vezes. Foi preparada uma suspensão de eritrócitos a 2% (v/v, mL. mL<sup>-1</sup>) em PBS (pH 7,4). Os tratamentos (200 µL) em diferentes doses (8000; 4000; 2000 µg), foram adicionados a 1200 µL da suspensão de eritrócitos e incubados em banho termostático durante 30 minutos à 37 °C. Os incubados foram centrifugados a 1200 g por 10 minutos, o sobrenadante foi coletado e avaliado em espectrofotômetro a 540 nm. Em seguida, os tratamentos foram incubados por mais 20 minutos à 54 °C, centrifugados e o produto quantificado em espectrofotômetro à 540 nm. Os controles positivo e negativo consistiam em água destilada e PBS, respectivamente. Também foram avaliados anti-inflamatórios esteroidal (AIE; prednisolona) e não-esteroidal (AINE; diclofenaco resinato) na concentração de 50 µL. mL<sup>-1</sup>. O controle positivo foi considerado como 100% de hemólise térmica.

## **2.7 Atividade proteolítica sobre a caseína**

Para a avaliação desta atividade foi utilizado a metodologia descrita por (Gutiérrez et al. (1988), com a substituição dos fosfolipídios por solução de caseína na mesma concentração descrita por Wang, Shih e Huang (2004). Para o preparo do gel foi utilizada a solução de caseína na concentração de 5 mg. mL<sup>-1</sup>, em tampão Tris-HCl 50 mmol. L<sup>-1</sup> (pH 8,0).

A peçonha de *B. moojeni* (10 µg) e os extratos aquosos dos fitoterápicos de *U. tomentosa* e *U. guianensis* foram incubados nas doses de 5; 10; 25; 50; 100; 200; 500 µg por 30 minutos a 37 °C. Também foram realizados controles com anti-inflamatórios esteroidal (AIE; prednisolona) e não-esteroidal (AINE; diclofenaco resinato) nas doses de 5 e 10 µg. Em seguida, as amostras foram aplicadas aos orifícios feitos no gel, em um volume final de 30 µL. As placas foram mantidas em câmara de cultura de células por 18 horas à 37 °C. Após este período, o gel foi submetido à coloração com solução de amido black a 1%, seguido por uma

descoloração com ácido acético a 10%, possibilitando a medição do diâmetro dos halos translúcidos formados. Os resultados foram expressos em porcentagem, onde os controles contendo apenas peçonha foram considerados como 100% de atividade proteolítica.

## 2.8 Atividade trombolítica

A atividade trombolítica foi avaliada em coágulos sanguíneos humanos formados *in vitro* de acordo com a metodologia descrita por Cintra et al. (2012). O sangue coletado sem a presença de anticoagulante foi imediatamente distribuído (100 µL) em poços de uma microplaca de 96 poços e deixados para coagular durante 20 minutos. Sobre os coágulos, foram adicionados os tratamentos (volume final de 30 µL por amostra/poço) correspondentes a PBS (controle negativo), controles contendo apenas os extratos aquosos dos fitoterápicos de *U. tomentosa* e *U. guianensis* (dose 1200 µg) e também peçonha previamente incubada com os extratos aquosos dos fitoterápicos nas doses finais de 15; 30; 75; 150; 300; 600; 1500 µg durante 30 minutos a 37 °C. As microplacas foram mantidas em câmara de cultura de células por 24 horas à 37 °C.

A atividade trombolítica foi estimada pela medida do volume de líquido liberado por cada trombo. A média dos volumes obtidos no controle negativo (PBS) foi subtraída dos demais tratamentos. O volume total de cada reação, sangue + amostra, equivalente a 130 µL, foi considerado como 100% de atividade.

## 2.9 Atividade coagulante

A avaliação do tempo de coagulação de plasma humano citratado foi realizada conforme descrito por Rodrigues et al. (2000). Os extratos aquosos foram previamente incubados, por 10 minutos a 37 °C, com a peçonha de *B. moojeni* (10 µg), nas doses finais de reação de 50, 100, 200, 500 µg. Os tubos contendo plasma citratado (200 µL) foram mantidos em banho termostático a 37 °C. As amostras incubadas foram adicionadas ao plasma e o tempo foi registrado até a formação de um coágulo rígido. Controles contendo apenas peçonha também foram realizados. A dose coagulante mínima foi estabelecida anteriormente, sendo correspondente a menor quantidade de peçonha capaz de induzir a coagulação em um período entre 50 a 120 segundos (SELISTRE et al., 1990).

## 2.10 Análise estatística

Os resultados foram apresentados como média ± desvio padrão de três replicatas. Em seguida, a normalidade dos dados foi avaliada pelo teste de Shapiro-wilk. Os dados foram comparados por Análise de Variância (ANOVA), seguido de teste post-hoc de Tukey ( $p < 0,05$ ) por meio do software Graph Pad Prism (versão 7.00).

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 Compostos fenólicos

O teor de compostos fenólicos nos extratos aquosos dos fitoterápicos de *U. tomentosa* e *U. guianensis*, obtidos por CLAE, estão apresentados na Tabela 1. O extrato aquoso de *U. guianensis* apresentou teor de compostos fenólicos superior ao obtido para o de *U. tomentosa*. Os extratos também apresentaram diferentes constituintes entre as duas espécies.

Tabela 1 – Teor de compostos fenólicos dos extratos aquosos dos fitoterápicos de *Uncaria tomentosa* e *Uncaria guianensis*.

Compostos fenólicos (mg 100g <sup>-1</sup> )	Fitoterápico <i>U. tomentosa</i>	Fitoterápico <i>U. guianensis</i>
Ácido gálico	4,88 ± 0,11	-
Catequina	5,33 ± 0,02	91,10 ± 0,51
Ácido clorogênico	5,24 ± 0,05	237,04 ± 2,11
Ácido cafeico	39,02 ± 0,80	11,02 ± 0,17
Ácido vanílico	2,37 ± 0,05	9,02 ± 0,21
Ácido <i>p</i> -cumárico	10,33 ± 0,03	144,77 ± 0,46
Ácido ferúlico	nq	130,93 ± 0,34
Ácido <i>m</i> -cumárico	-	134,33 ± 0,22
Ácido <i>o</i> -cumárico	-	86,51 ± 0,37
Ácido Trans-cinâmico	0,73 ± 0,00	-
<b>Σ Compostos fenólicos</b>	<b>67,9</b>	<b>844,72</b>

Compostos fenólicos expressos como miligramas equivalentes de cada composto por 100g de fitoterápico (mg 100g<sup>-1</sup>). Os dados correspondem às médias das triplicatas e ao desvio padrão calculado. nq= não quantificado (o composto foi identificado, porém está abaixo do limite de quantificação).

O extrato aquoso de *U. tomentosa* apresentou maior teor de ácido cafeico, seguido de ácido *p*-cumárico e catequina. No entanto, o extrato aquoso de *U. guianensis* apresentou maior teor de ácido clorogênico, seguido de ácido *p*-cumárico e ácido *m*-cumárico. Kaiser et al. (2020) investigaram as diferenças químicas da casca do caule de ambas as espécies de *U. tomentosa* e *U. guianensis*, os resultados indicaram maior teor de compostos fenólicos (flavonoides) em *U. guianensis* em comparação com a *U. tomentosa*. O mesmo foi observado no presente estudo.

Navarro et al. (2019) avaliaram a composição fenólica de fitoterápicos de *U. tomentosa* e identificaram 25 compostos, incluindo ácidos hidroxibenzóico (ácido benzoico, salicílico, 4-hidroxibenzóico, protocatecuico, gálico, siríngico e vanílico) e hidroxicinâmico (*p*-cumárico, cafeico, ferúlico e isoferúlico), monômeros de flavan-3-ol (catequina e epicatequina), dímeros de procianidina, trímeros de procianidina, bem como dímeros de propelargodina. Também

foram descritos em extratos de *U. tomentosa* a presença principalmente de ácidos hidroxicinâmicos, como os ácidos cafeico e clorogênico (PAVEI et al., 2010).

Os compostos fenólicos têm sido associados a uma série de benefícios para a saúde humana devido às suas propriedades antialérgicas, antiestrogênicas, anti-inflamatórias, antimicrobiana, antioxidantes, antitrombóticas, cardioprotetoras e vasodilatadora (DIAS et al., 2021; PEREZ-GREGORIO; SIMAL-GANDARA, 2017). Possuem efeitos protetores contra doenças degenerativas, como inflamação, diabetes e câncer, em razão de suas propriedades antioxidantes e pró-oxidativas (TATIPAMULA; KUKAVICA, 2021). Tais compostos também têm sido cientificamente avaliados na busca de inibidores enzimáticos, inibidores de efeitos tóxicos e/ou farmacológicos utilizando peçonhas de serpentes como ferramentas de pesquisas (CESAR et al., 2019, 2020).

Os compostos fenólicos derivados de plantas têm demonstrado atividade anti-inflamatória *in vitro* e *in vivo*, destacando seu potencial terapêutico. Esses compostos atuam modificando a expressão de vários genes pró-inflamatórios, e assim, contribuem para a regulação da sinalização inflamatória. Sua ação está relacionada principalmente, a capacidade de inibir enzimas como fosfolipase A<sub>2</sub>, ciclooxigenase e lipoxigenase. Além disso, certos compostos apresentam estruturas semelhantes aos anti-inflamatórios convencionais (YAHFOUFI et al., 2018).

Estudos indicam que os compostos fenólicos presentes nas espécies de *Uncaria* são os possíveis responsáveis pelo seu potencial farmacológico e apontam para as interações sinérgicas entre os diferentes compostos (ZHANG et al., 2015). Gonçalves, Dinis e Batista (2005) apresentaram evidências sobre a atividade anti-inflamatória do extrato aquoso de *U. tomentosa* estar possivelmente correlacionada ao mecanismo antioxidante exercido pelos compostos fenólicos presentes no extrato.

### **3.2 Atividade fosfolipásica e hemolítica**

A Figura 1 mostra a atividade fosfolipásica (%) induzida por peçonha de serpente da espécie *Bothrops moojeni* previamente incubada com os extratos aquosos dos fitoterápicos de *U. tomentosa* e *U. guianensis*. Os dois extratos inibiram significativamente a atividade fosfolipásica da peçonha de *B. moojeni* em todas as doses avaliadas.

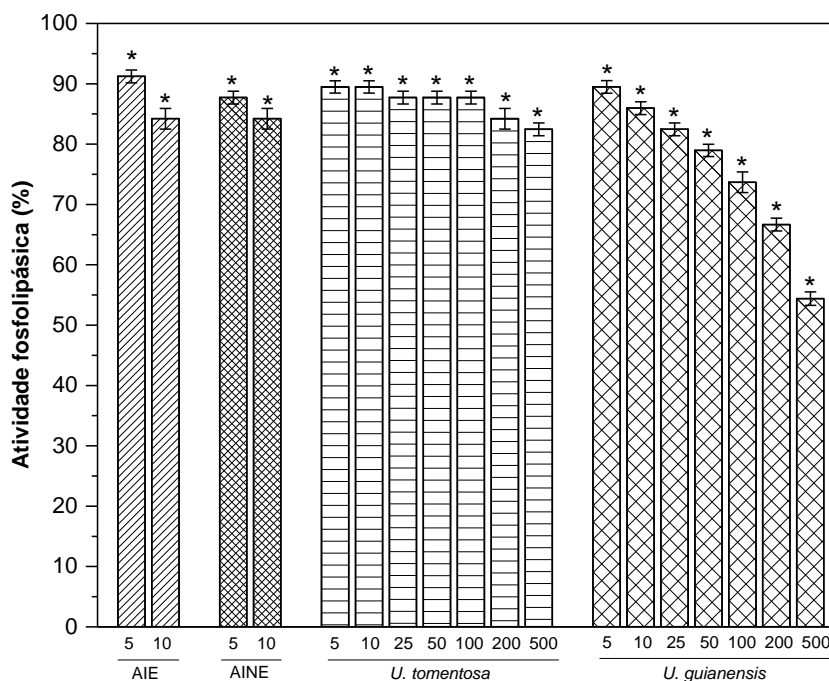


Figura 1 – Atividade fosfolipásica (%) induzida pela peçonha de *Bothrops moojeni*, previamente incubada com os anti-inflamatórios (AIE: anti-inflamatório esteroidal - prednisolona; AINE: anti-inflamatório não-esteroidal - diclofenaco resinato) e com os extratos aquosos dos fitoterápicos de *Uncaria tomentosa* e *Uncaria guianensis*. O controle (+) contendo apenas peçonha (10 µg) foi considerado como 100% de atividade. Os resultados correspondem às médias das triplicatas e o desvio padrão calculado obtido em cada dose (µg). \*Difere estatisticamente do controle positivo pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

O extrato aquoso do fitoterápico de *U. tomentosa* incubado com a peçonha exerceu inibições estatisticamente significativas sobre a atividade fosfolipásica, entre 10 a 18%, enquanto o de *U. guianensis* exerceu inibições entre 10 a 46%. As maiores porcentagens de inibição foram observadas para as maiores doses de ambos os extratos.

Embora apenas os anti-inflamatórios esteroidais sejam descritos como inibidores de fosfolipases  $A_2$ , ambos os medicamentos avaliados exerceram inibições entre 8 e 15%. As baixas inibições eram esperadas, visto que inibições elevadas destas enzimas estão associadas a várias reações adversas, contudo, a barreira física imposta pelo meio sólido no qual o substrato está inserido também pode configurar um fator de redução da atividade, uma vez que moléculas com estruturas diferentes terão taxas de difusão no gel diferentes.

As fosfolipases  $A_2$  (PLA<sub>2s</sub>) são enzimas estáveis, relativamente pequenas (~14 kDa), dependentes de  $Ca^{2+}$  e ricas em interações dissulfeto; são fundamentais na regulação da via do ácido araquidônico por meio do qual são liberados mediadores pro-inflamatórios tais como prostaglandinas, leucotrienos e tromboxanos, e também na regulação do metabolismo lipídico. Esses mediadores são responsáveis por alterações na hemostasia e sua produção desordenada pode dar origem a várias doenças inflamatórias (YARLA et al., 2015).



Diversos extratos vegetais já foram descritos com atividade inibitória sobre as fosfolipases A<sub>2</sub> (BRAGA et al., 2022; MARQUES et al., 2021; OLIVEIRA et al., 2021). Compostos fenólicos isolados como ácido p-cumárico, catequina e epicatequina também mostraram inibições significativas sobre a atividade de fosfolipases (CESAR et al., 2019, 2020).

Alguns mecanismos de interação entre os compostos fenólicos e as PLA<sub>2S</sub> já foram cientificamente descritos. De Moura et al. (2016) destacaram que os taninos podem formar complexos com o Ca<sup>2+</sup>, cofator enzimático de PLA<sub>2S</sub>, e modular a atividade dessas enzimas. Outro mecanismo que foi descrito é a capacidade de ligação dos flavonoides a grupos amida de proteínas por meio de ligações de hidrogênio, formando complexos que precipitam (MORS et al., 2000). Os compostos fenólicos também podem inibir a atividade de PLA<sub>2S</sub> através de ligações de hidrogênio com o sítio ativo dessa enzima, as hidroxilas fenólicas interagem com os resíduos de aminoácidos, impedindo ou dificultando a ligação da enzima com o substrato (ALAM et al., 2016).

As inibições da atividade fosfolipásica observadas neste estudo possivelmente estão relacionadas a presença de compostos fenólicos nos extratos dos fitoterápicos de *Uncaria tomentosa* e *Uncaria guianensis*. Nesse contexto, o estudo da modulação da atividade de fosfolipases A<sub>2</sub> por compostos naturais é ferramenta importante para elucidar os mecanismos de ação, e prospectar potenciais agentes anti-inflamatórios e moduladores da hemostasia.

A atividade hemolítica em meio sólido (Figura 2) foi realizada para avaliar os efeitos diretos dos extratos sobre os eritrócitos humanos, bem como o seu potencial em inibir a citotoxicidade induzida por peçonha de *B. moojeni*. Esses testes são de extrema importância no estudo de plantas medicinais/fármacos, uma vez que, muitas moléculas podem induzir a lise de eritrócitos e, assim, diminuem seu nível no sangue. Os extratos puros na dose máxima de 500 µg (sem incubação com a peçonha) não induziram hemólise nas condições avaliadas (dados não apresentados), confirmando a ausência de citotoxicidade no referido ensaio.

Os extratos aquosos dos fitoterápicos de *U. tomentosa* e *U. guianensis* inibiram significativamente a atividade hemolítica induzida pela peçonha de *B. moojeni* em todas as doses avaliadas. O extrato aquoso de *U. tomentosa* inibiu a atividade hemolítica entre 14 a 41%, enquanto o extrato de *U. guianensis* exerceu inibições entre 14 e 60%. A lise de eritrócitos foi diminuída com o aumento das doses de ambos os extratos. Também foi observado que o extrato aquoso de *U. guianensis* foi mais eficiente em inibir a atividade hemolítica induzida pela peçonha, com inibições de 60% para as doses de 100, 200 e 500 µg.

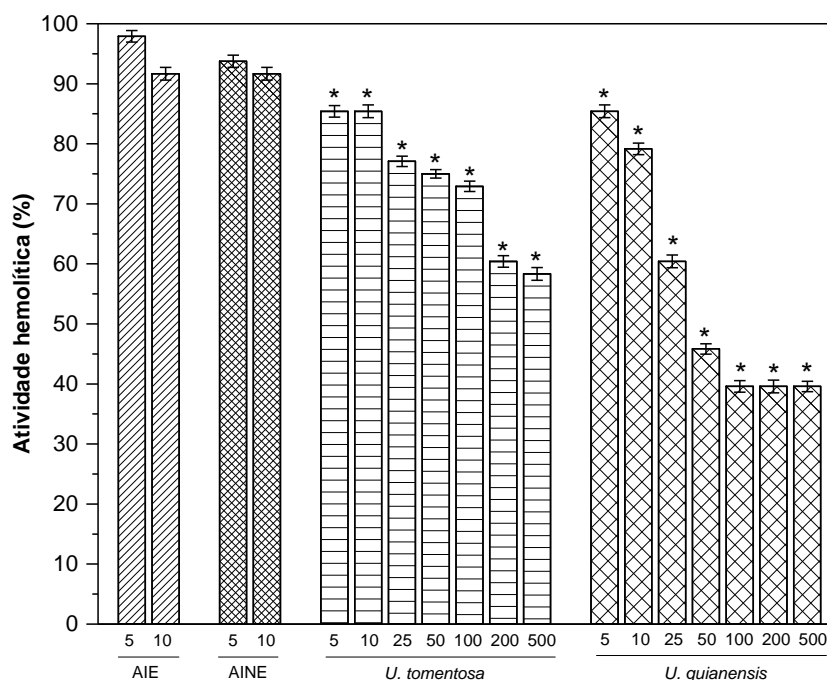


Figura 2 – Atividade hemolítica (%) induzida pela peçonha de *Bothrops moojeni*, previamente incubada com os anti-inflamatórios (AIE: anti-inflamatório esteroidal - prednisolona; AINE: anti-inflamatório não-esteroidal - diclofenaco resinato) e com os extratos aquosos dos fitoterápicos de *Uncaria tomentosa* e *Uncaria guianensis*. O controle (+) contendo apenas peçonha (10 µg) foi considerado como 100% de atividade. Os resultados correspondem às médias das triplicatas e o desvio padrão calculado obtido em cada dose (µg). \*Difere estatisticamente do controle positivo pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

Bors et al. (2011) descreveram que os extratos etanólicos e aquosos das folhas e cascas de *U. tomentosa*, mesmo em concentrações altas de 500 µg. mL<sup>-1</sup> não eram tóxicos para os eritrócitos humanos, além disso, esses extratos foram capazes de diminuir a hemólise induzida pelo 2,4-diclorofenol. Outro estudo demonstrou o efeito protetor dos extratos de *U. tomentosa* sobre a atividade da catalase em eritrócitos humanos incubados com 2,4-diclorofenol, os pesquisadores sugeriram que provavelmente os compostos fenólicos presentes nos extratos sequestram os radicais livres e, portanto, protegeram o centro ativo (contendo grupos -SH) da catalase (BUKOWSKA et al., 2012). Os resultados corroboram com os relatos citados acima.

A peçonha de serpente utilizada no presente estudo induz a atividade hemolítica principalmente pela ação de serinoproteases e metaloproteases, que degradam proteínas de membrana, e as fosfolipases A<sub>2</sub> que atuam na quebra dos fosfolipídios das membranas celulares. A ação combinada dessas enzimas desestabiliza a estrutura da membrana, modificando o fluxo de íons e o metabolismo intracelular, resultando na lise das hemácias (GARCIA DENEGRÍ et al., 2010).

As inibições observadas neste estudo sobre as fosfolipases A<sub>2</sub> e proteases podem ser explicadas pela presença de compostos fenólicos nos extratos aquosos dos fitoterápicos de *Uncaria tomentosa* e *Uncaria guianensis*. Desta forma, a inibição da atividade hemolítica evidencia o potencial anti-inflamatório e anticoagulante dos extratos avaliados sobre a resposta inflamatória e a cascata de coagulação sanguínea.

### **3.3 Ensaio de estabilização da membrana de eritrócitos por meio da inibição da hemólise térmica**

As membranas de eritrócitos são utilizadas como ferramentas úteis para estudar potenciais agentes anti-inflamatórios, devido a semelhança entre as membranas dos lisossomos e dos eritrócitos. Durante as reações inflamatórias, os lisossomos são mobilizados e seu conteúdo é liberado resultando em uma série de alterações fisiológicas (KLESZCZYŃSKA et al., 2005). Os anti-inflamatórios não-esteroidais (AINE) agem inibindo a liberação de enzimas lisossômicas ou estabilizando as membranas (CARRILLO et al., 2016). A exposição dos eritrócitos ao calor ou substâncias lesivas resulta na lise das membranas, acompanhada de hemólise e oxidação da hemoglobina (FERRALI et al., 1992). Neste sentido, a inibição da hemólise induzida pelo calor foi relacionada com o potencial anti-inflamatório dos extratos avaliados.

Os extratos aquosos dos fitoterápicos de *U. tomentosa* e *U. guianensis* foram avaliados a fim de verificar o potencial em minimizar a hemólise térmica. Também foram avaliados anti-inflamatórios comerciais (AIE: anti-inflamatório esteroidal - prednisolona; AINE: anti-inflamatório não-esteroidal - diclofenaco resinato) na concentração de 50 µg. mL<sup>-1</sup>. O controle contendo apenas água foi considerado como 100% de hemólise. E os controles de hemólise mecânica, foram realizados apenas com PBS.

Os dados na Tabela 2 mostram que ambos os extratos aquosos de *U. tomentosa* e *U. guianensis* em todas as doses (2000-8000 µg) promoveram significativamente a estabilização da membrana eritrocitária humana contra a lise induzida pelo calor.

Após a incubação das amostras com a solução de hematócrito a 2% (v/v) à 37 °C foram observadas porcentagens de hemólise para os anti-inflamatórios AIE e AINE de 5,23 e 3,76%, respectivamente. Na presença do extrato aquoso de *U. tomentosa* as porcentagens de hemólise variaram entre 8,12 e 4,32%, enquanto para o extrato de *U. guianensis* as porcentagens foram de 12,90 a 5,51%.

Quando as amostras incubadas foram submetidas à temperatura de 54 °C, as amostras dos anti-inflamatórios AIE e AINE resultaram em porcentagens de hemólise de 21,79 e 21,62%. As amostras contendo os extratos aquosos dos fitoterápicos de unha-de-gato foram capazes de

reduzir a hemólise térmica, em comparação ao controle positivo (água pura foi considerado 100% de hemólise). As porcentagens de hemólise ficaram entre 51,03 a 17,72% para ambos os extratos.

Tabela 2 – Avaliação da hemólise térmica na presença de anti-inflamatórios e dos extratos aquosos dos fitoterápicos de *Uncaria tomentosa* e *Uncaria guianensis*.

	Dose	% Hemólise à 37 °C	% Hemólise à 54 °C
<b>PBS</b>	-	1,08 ± 0,12*	19,00 ± 0,03*
<b>AIE</b>	50 µg. mL <sup>-1</sup>	5,23 ± 0,10*	21,79 ± 0,02*
<b>AINE</b>	50 µg. mL <sup>-1</sup>	3,76 ± 0,12*	21,62 ± 0,04*
<b><i>Uncaria tomentosa</i></b>	2000 µg	8,12 ± 0,09*	28,14 ± 0,16*
	4000 µg	4,78 ± 0,17*	18,59 ± 0,21*
	8000 µg	4,32 ± 0,01*	17,72 ± 0,08*
<b><i>Uncaria guianensis</i></b>	2000 µg	12,90 ± 0,02*	51,03 ± 0,05*
	4000 µg	8,51 ± 0,15*	35,33 ± 0,10*
	8000 µg	5,51 ± 0,03*	19,42 ± 0,14*

Os dados correspondem às médias das triplicatas e o desvio padrão calculado. As doses (µg) dos extratos aquosos dos fitoterápicos de *U. tomentosa* e *U. guianensis* correspondem à dose total da reação. A concentração dos anti-inflamatórios (AIE: anti-inflamatório esteroide - prednisolona; AINE: anti-inflamatório não-esteroide - diclofenaco resinato) foi de 50 µg. mL<sup>-1</sup>. Os ensaios foram avaliados em solução de hematócrito à 2% (v/v). O controle contendo apenas água foi considerado como 100% de hemólise. \*Difere estatisticamente do controle positivo pelo teste de Tukey (p < 0,05).

A estabilização da membrana leva à prevenção do vazamento de proteínas e fluidos séricos para os tecidos durante um período de permeabilidade aumentada causada por mediadores inflamatórios (ANOSIKE; OBIDOA; EZEANYIKA, 2012), ou no caso deste estudo, pela alta temperatura. Assim, a proteção à membrana possivelmente promovida por compostos fenólicos presentes nos extratos, reduziriam a lise dos eritrócitos.

Duchnowicz et al. (2021) investigaram como os compostos contidos nos extratos de *U. tomentosa* se comportam na membrana eritrocitária humana. Os extratos causaram diminuição da fluidez da membrana eritrocitária e aumento da sensibilidade osmótica, e também aumentaram a viscosidade dos eritrócitos. Os pesquisadores concluíram que os compostos de extratos de *U. tomentosa* se acumulam principalmente na monocamada hidrofílica externa da membrana, protegendo os eritrócitos das espécies reativas que causam o estresse oxidativo.

Nessa perspectiva, podemos inferir que os extratos aquosos dos fitoterápicos de *U. tomentosa* e *U. guianensis* foram capazes de estabilizar a membrana dos eritrócitos frente ao

calor, impedindo a liberação dos conteúdos celulares, devido a presença de compostos fenólicos. Esses compostos agem na superfície eritrocitária e podem ser responsáveis por suas propriedades protetoras, além de atuarem como sequestradores de radicais livres e inibidores da peroxidação lipídica, aumentando a resistência celular ao dano oxidativo (KOREN; KOHEN; GINSBURG, 2010).

### 3.4 Atividade proteolítica sobre a caseína

As proteases são enzimas que clivam sequências de aminoácidos das proteínas, possuem diferentes mecanismos de ação e regulam a maioria dos processos biológicos. Podem atuar seletivamente em diferentes substratos proteicos exercendo efeitos na ativação de zimogênios, na lise de coágulos e nos fatores da cascata de coagulação (SHEN; CHOU, 2009).

Os extratos aquosos dos fitoterápicos de *U. tomentosa* e *U. guianensis* inibiram significativamente a atividade proteolítica sobre a caseína induzida pela peçonha de *B. moojeni*, em todas as doses avaliadas, com o aumento das inibições sendo diretamente proporcional ao aumento da dose (Figura 3). O extrato aquoso do fitoterápico de *U. tomentosa* incubado com a peçonha exerceu inibições entre 10 a 27%, enquanto o extrato de *U. guianensis* apresentou inibições entre 10 a 40%. As maiores inibições foram observadas nas maiores doses avaliadas para ambos os extratos.

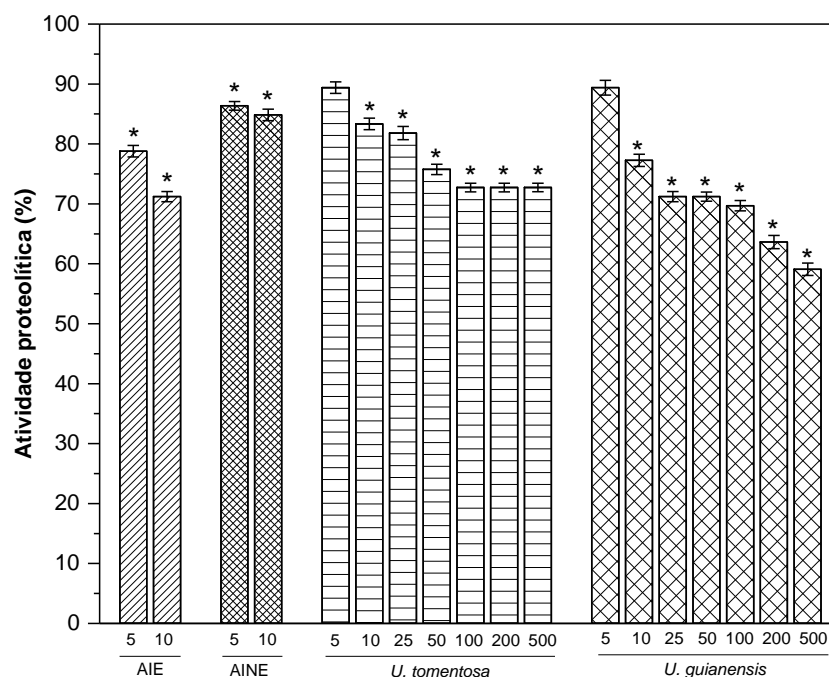


Figura 3 – Atividade proteolítica (%) induzida pela peçonha de *Bothrops moojeni*, previamente incubada com os anti-inflamatórios (AIE: anti-inflamatório esteroidal - prednisolona; AINE:

anti-inflamatório não-esteroidal - diclofenaco resinato) e com os extratos aquosos dos fitoterápicos de *Uncaria tomentosa* e *Uncaria guianensis*. O controle (+) contendo apenas peçonha (10 µg) foi considerado como 100% de atividade. Os resultados correspondem às médias das triplicatas e o desvio padrão calculado obtido em cada dose (µg). \*Difere estatisticamente do controle positivo pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

As proteases presentes em peçonhas de serpentes possuem alta homologia com enzimas humanas, desse modo são úteis como ferramentas de pesquisas na busca por diagnóstico e tratamento de várias condições trombóticas e distúrbios hemostáticos (DE QUEIROZ et al., 2017; KINI; KOH, 2016). As metaloproteases apresentam atividades fibrin(ogen)olíticas e de degradação da matriz extra celular (hemorrágicas). As serinoproteases podem atuar como pró-coagulantes ou anticoagulantes, possuem atividade fibrinogenolítica (semelhantes à trombina), atuam seletivamente sobre os fatores da cascata de coagulação, afetando a agregação plaquetária, fibrinólise e coagulação (LARRÉCHÉ et al., 2021; MATSUI; FUJIMURA; TITANI, 2000).

Diversas plantas medicinais e fitocompostos foram descritos como inibidores de toxinas de serpentes (JORGE et al., 2019). Esses compostos bioativos presentes em extratos vegetais podem interagir com as proteases através de interações hidrofóbicas com resíduos aromáticos presentes na estrutura da enzima e complexação com íons metálicos, resultando em redução ou até mesmo aumento da atividade enzimática (SAAVEDRA et al., 2018).

### **3.5 Atividade trombolítica**

A Figura 4 mostra a atividade trombolítica (%) induzida por peçonha de serpente da espécie *Bothrops moojeni* previamente incubada com os extratos aquosos dos fitoterápicos de *U. tomentosa* e *U. guianensis*. Os dois extratos inibiram e/ou potencializaram a atividade trombolítica da peçonha de *B. moojeni* em todas as doses avaliadas. Os controles contendo apenas extratos (sem incubação com peçonha) induziram a lise dos trombos.

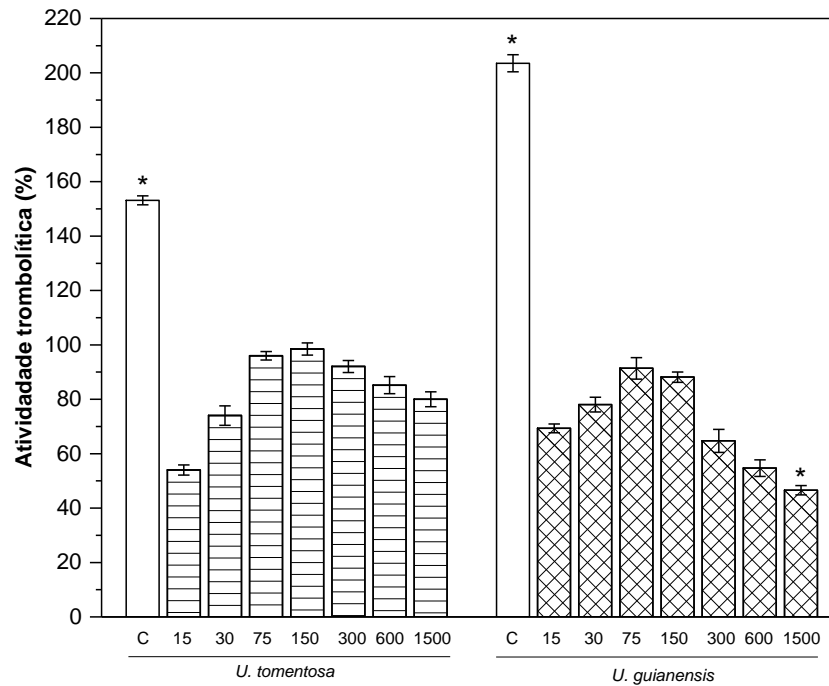


Figura 4 – Atividade trombolítica (%) induzida pela peçonha de *Bothrops moojeni*, previamente incubada com os extratos aquosos dos fitoterápicos de *Uncaria tomentosa* e *Uncaria guianensis*. O controle (+) contendo apenas peçonha (30 µg). O controle (-) contendo PBS. C correspondem aos controles realizados apenas com os extratos, sem peçonha, na dose de 1200 µg. O volume final de reação correspondente ao volume de sangue mais o volume de tratamento foi considerado como 100% de lise (130 µL) e todas as médias dos volumes obtidos nos poços tratados foram convertidas em porcentagem. Os resultados correspondem às médias das triplicatas e o desvio padrão calculado obtido em cada dose (µg). \*Difere estatisticamente do controle positivo pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

O extrato aquoso de *U. tomentosa*, nas diferentes doses avaliadas, promoveu inibições entre 46 a 20%, sobre a atividade induzida pela peçonha de *B. moojeni*. No entanto, a atividade trombolítica em todas as doses avaliadas, não diferiu estatisticamente do controle positivo, contendo apenas peçonha. O extrato aquoso de *U. guianensis* promoveu inibições variando de 31 a 53 %, sobre a atividade induzida pela peçonha de *B. moojeni*. Foi observada inibição significativa apenas na maior dose, de 1500 µg, com redução de 53% na lise dos trombos. Esse resultado pode refletir a presença de proporções fenólicas: enzimas proteolíticas-hemorrágicas mais ideais para as interações ocorram. Outra hipótese, seria que concentrações mais altas de compostos fenólicos favoreceriam as interações deles com as enzimas e menos interações com moléculas presentes no ambiente reacional (componentes do sangue), reduzindo assim a ação trombolítica exercida pelos extratos, observada nos controles contendo apenas os extratos.

A trombose, ou a formação de um coágulo sanguíneo, está associada a diversas doenças inflamatórias, sendo uma das principais causas de morte humana. A formação do trombo resulta

em condições hemostáticas anormais devido à ação descontrolada da trombina sobre o fibrinogênio ou excesso de produção de trombina (MAJUMDAR et al., 2014; SU et al., 2020).

Desse modo, é importante avaliar compostos naturais capazes de inibir enzimas que atuam na cascata de coagulação sanguínea, como a trombina, e na agregação plaquetária, como fosfolipases A<sub>2</sub> e proteases. A compreensão desses fatores tornou-se um dos alvos de estudos no desenvolvimento de novos anticoagulantes e antitrombóticos. Diversos extratos vegetais e princípios ativos isolados têm demonstrado tanto atividades trombolíticas quanto antitrombótica, os pesquisadores sugerem que os compostos fenólicos podem estar relacionados à dissolução de trombos (BRAGA et al., 2019; CESAR et al., 2020; MARQUES et al., 2018).

Neste contexto, os compostos identificados nos extratos aquosos de fitoterápicos de *Uncaria tomentosa* e *Uncaria guianensis* (Tabela 1), podem atuar em diferentes alvos como inibidores de metaloproteases hemorrágicas ou interagindo com componentes do próprio trombo sanguíneo. Assim, podem ser uma alternativa no tratamento de doenças trombóticas, atuando no aumento do fluxo sanguíneo e evitando a formação de trombos, ou até mesmo na redução de processos inflamatórios associados a doenças trombóticas, visto que também atuam na inibição de proteases pró-inflamatórias.

### 3.6 Atividade coagulante

O teste de coagulação do plasma citratado foi realizado utilizando a dose coagulante mínima de 10 µg para a peçonha de *B. moojeni*. A incubação previa da peçonha com os extratos aquosos dos fitoterápicos de *U. tomentosa* e *U. guianensis* nas doses de 50, 100, 200 e 500 µg, aumentaram significativamente o tempo de coagulação entre 27 a 57 segundos e entre 74 a 384 segundos, respectivamente, em relação ao controle. Assim, sugere-se que os extratos de *Uncaria* possam estar atuando como inibidores de proteases coagulantes, como também podem estar interagindo com componentes da cascata de coagulação impedindo a ação das enzimas proteolíticas presentes na peçonha, sobretudo serinoproteases semelhantes à trombina. As maiores doses dos extratos dos fitoterápicos foram responsáveis pelos maiores tempos observados, sendo as maiores inibições da coagulação obtidas com o fitoterápico de *U. guianensis*.



Tabela 3 – Efeito dos extratos aquosos dos fitoterápicos de *Uncaria tomentosa* e *Uncaria guianensis* sobre a atividade coagulante induzida pela peçonha de *Bothrops moojeni* em plasma humano citratado.

	Dose ( $\mu\text{g}$ )	Tempo de coagulação (s)
<b>Controle</b> ( <i>B. moojeni</i> 10 $\mu\text{g}$ )	-	56,12 $\pm$ 2,80
<b><i>Uncaria tomentosa</i></b>	50	84,08 $\pm$ 1,95*
	100	87,84 $\pm$ 2,75*
	200	93,66 $\pm$ 4,74*
	500	113,35 $\pm$ 1,18*
<b><i>Uncaria guianensis</i></b>	50	130,93 $\pm$ 13,18*
	100	245,03 $\pm$ 5,18*
	200	410,50 $\pm$ 19,42*
	500	440,34 $\pm$ 13,17*

Os dados correspondem às médias das triplicatas e o desvio padrão calculado. Amostras: extratos aquosos dos fitoterápicos de *U. tomentosa* e *U. guianensis* previamente incubados com a peçonha por 10 minutos a 37 °C. O controle foi realizado com 10  $\mu\text{g}$  de peçonha. \*Difere estatisticamente do controle positivo pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

A coagulação sanguínea é um processo fisiológico protetor para prevenir a perda excessiva de sangue após lesão. Consiste em uma cascata de eventos de ativação enzimática em que as serinoproteases ativam as proteínas, como a trombina, resultando na conversão de fibrinogênio em várias moléculas de fibrina (formando um polímero insolúvel), ativação das plaquetas e fatores de coagulação (JIN; GOPINATH, 2016).

Distúrbios no processo da coagulação interferem na hemostasia podendo resultar em coágulos sanguíneos indesejáveis dentro dos vasos (trombose patológica), que é uma das principais causas de incapacidade e morte no mundo (SMITH; TRAVERS; MORRISSEY, 2015). Dessa forma, a inibição de enzimas envolvidas na cascata da coagulação, como a trombina, representa uma alternativa no desenvolvimento de novos anticoagulantes e antitrombóticos

O efeito dos extratos aquosos dos fitoterápicos de *U. tomentosa* e *U. guianensis*, em prolongar o tempo de coagulação induzido por proteases sugere a presença de inibidores na composição do extrato. Os dados de inibição de enzimas coagulantes corroboram com os dados de inibição de trombólise (Figura 4), uma vez que, as proteases da peçonha possuem vários substratos alvo e são responsáveis pela coagulação e hemorragia (BERLING; ISBISTER, 2015). Em adição, os próprios extratos possuem componentes com ação trombolítica,

favorecendo a fluidez sanguínea. Assim, os extratos avaliados podem ter um potencial de uso significativo para o tratamento e prevenção de doenças trombóticas.

Kolodziejczyk-Czepas et al. (2021) realizaram um estudo pioneiro sobre os efeitos de *U. tomentosa* no sistema hemostático. Os extratos demonstraram potencial anticoagulante, efeitos antiplaquetários, atividade trombolítica e fibrinolítica. No estudo *in silico* os pesquisadores demonstraram as interações da trombina com os principais componentes dos extratos. Esses compostos interagiram com a trombina dentro e fora do sítio ativo, dependendo do composto. A maior afinidade de ligação foi encontrada para procianidinas B2 e C1 (flavonoides).

Nesse contexto, considerando a presença de compostos fenólicos na composição dos extratos aquosos dos fitoterápicos de *Uncaria tomentosa* e *Uncaria guianensis*, podemos inferir que as inibições enzimáticas observadas resultam de mecanismos de interação molecular entre compostos fenólicos e as enzimas fosfolipases A<sub>2</sub> e proteases (especificamente serinoproteases similares à trombina e metaloproteases hemorrágicas), que já foram descritos na literatura. Dessa forma, o uso de fitoterápicos de *U. tomentosa* e *U. guianensis* atuam na modulação de mecanismos relacionados a hemostasia e processos inflamatórios.

## CONCLUSÃO

Os fitoterápicos a base de *Uncaria tomentosa* e *Uncaria guianensis* apresentam diversas substâncias bioativas que conferem potencial para o tratamento e prevenção de doenças inflamatórias e distúrbios na hemostasia. No presente trabalho, o extrato aquoso de *U. guianensis* apresentou maior teor de compostos fenólicos em relação ao de *U. tomentosa*. Esses compostos provavelmente estão relacionados aos efeitos moduladores sobre a atividade de enzimas, como fosfolipases A<sub>2</sub> e proteases. Estas enzimas atuam em processos fisiológicos como a coagulação sanguínea, formação de trombos, fibrinogénólise, resposta inflamatória e agregação plaquetária. No entanto, estudos complementares são necessários para ampliar o conhecimento sobre os mecanismos de interações entre os compostos bioativos e as enzimas, possibilitando diferentes usos para os fitoterápicos de *U. tomentosa* e *U. guianensis*, já difundidos popularmente como anti-inflamatórios, de forma eficaz e segura.

## REFERÊNCIAS

- ALAM, MD. I. et al. Molecular modeling and snake venom phospholipase A 2 inhibition by phenolic compounds: Structure–activity relationship. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 114, p. 209–219, maio 2016.
- ANOSIKE, C. A.; OBIDOA, O.; EZEANYIKA, L. U. Membrane stabilization as a mechanism of the anti-inflammatory activity of methanol extract of garden egg (*Solanum aethiopicum*). **DARU Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 20, n. 1, p. 76, 2012.
- APARECIDA BRAGA, M. et al. Prospection of Enzyme Modulators in Aqueous and Ethanolic Extracts of *Lippia sidoides* Leaves: Genotoxicity, Digestion, Inflammation, and Hemostasis. **Chemistry & biodiversity**, v. 16, n. 3, 1 mar. 2019.
- BERLING, I.; ISBISTER, G. K. Hematologic effects and complications of snake envenoming. **Transfusion medicine reviews**, v. 29, n. 2, p. 82–89, 1 abr. 2015.
- BORS, M. et al. Protective activity of the *Uncaria tomentosa* extracts on human erythrocytes in oxidative stress induced by 2,4-dichlorophenol (2,4-DCP) and catechol. **Food and Chemical Toxicology**, v. 49, n. 9, p. 2202–2211, set. 2011.
- BRAGA, M. A. et al. *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC extracts acting as enzyme modulators: digestion, inflammation, and hemostasis. **Semina: Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 43, n. 1, p. 101, 13 jan. 2022.
- BUKOWSKA, B. et al. *Uncaria tomentosa* extracts protect human erythrocyte catalase against damage induced by 2,4-D-Na and its metabolites. **Food and Chemical Toxicology**, v. 50, n. 6, p. 2123–2127, jun. 2012.
- CARRILLO, W. et al. Anti-Inflammatory and Anti-Nociceptive Activities of Native and Modified Hen Egg White Lysozyme. **Journal of Medicinal Food**, v. 19, n. 10, p. 978–982, out. 2016.
- CESAR, P. H. S. et al. Molecular interactions between p-coumaric acid and snake venom toxins. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 120, n. 9, p. 14594–14603, 1 set. 2019.
- CESAR, P. H. S. et al. Catechin and epicatechin as an adjuvant in the therapy of hemostasis disorders induced by snake venoms. **Journal of biochemical and molecular toxicology**, v. 34, n. 12, 1 dez. 2020.
- CINTRA, A. C. O. et al. Batroxase, a new metalloproteinase from *B. atrox* snake venom with strong fibrinolytic activity. **Toxicon: official journal of the International Society on Toxinology**, v. 60, n. 1, p. 70–82, jul. 2012.
- DE MOURA, V. M. et al. The inhibitory potential of the condensed-tannin-rich fraction of *Plathymentia reticulata* Benth. (Fabaceae) against *Bothrops atrox* envenomation. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 183, p. 136–142, maio 2016.
- DE QUEIROZ, M. R. et al. The role of platelets in hemostasis and the effects of snake venom toxins on platelet function. **Toxicon: official journal of the International Society on Toxinology**, v. 133, p. 33–47, 1 jul. 2017.

- DIAS, R. et al. Recent advances in extracting phenolic compounds from food and their use in disease prevention and as cosmetics. **Critical reviews in food science and nutrition**, v. 61, n. 7, p. 1130–1151, 2021.
- DUCHNOWICZ, P. et al. Changes in Human Erythrocyte Membrane Exposed to Aqueous and Ethanolic Extracts from *Uncaria tomentosa*. **Molecules** **2021**, Vol. **26**, Page **3189**, v. 26, n. 11, p. 3189, 26 maio 2021.
- FALZON, C. C.; BALABANOVA, A. Phytotherapy: An Introduction to Herbal Medicine. **Primary care**, v. 44, n. 2, p. 217–227, 1 jun. 2017.
- FERRALI, M. et al. Iron release and membrane damage in erythrocytes exposed to oxidizing agents, phenylhydrazine, divicine and isouramil. **Biochemical Journal**, v. 285, n. 1, p. 295–301, 1 jul. 1992.
- GARCIA DENEGRI, M. E. et al. Isolation and functional characterization of a new acidic PLA2 Ba SpII RP4 of the *Bothrops alternatus* snake venom from Argentina. **Toxicon**, v. 56, n. 1, p. 64–74, ago. 2010.
- GONÇALVES, C.; DINIS, T.; BATISTA, M. T. Antioxidant properties of proanthocyanidins of *Uncaria tomentosa* bark decoction: a mechanism for anti-inflammatory activity. **Phytochemistry**, v. 66, n. 1, p. 89–98, jan. 2005.
- GUTIÉRREZ, J. et al. An alternative in vitro method for testing the potency of the polyvalent antivenom produced in Costa Rica. **Toxicon**, v. 26, n. 4, p. 411–413, 1 jan. 1988.
- HEITZMAN, M. E. et al. Ethnobotany, phytochemistry and pharmacology of *Uncaria* (Rubiaceae). **Phytochemistry**, v. 66, n. 1, p. 5–29, jan. 2005.
- HONÓRIO, I. C. G.; BERTONI, B. W. *Uncaria tomentosa* e *Uncaria guianensis* uma história agrônômica a ser escrita. **Ciência Rural**, v. 46, n. 8, p. 1401–1410, 1 ago. 2016.
- JIN, N. Z.; GOPINATH, S. C. B. Potential blood clotting factors and anticoagulants. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 84, p. 356–365, dez. 2016.
- JORGE, R. J. B. et al. Plants and Phytocompounds Active Against *Bothrops* Venoms. **Current topics in medicinal chemistry**, v. 19, n. 22, p. 2003–2031, 25 jul. 2019.
- KAISER, S. et al. Chemical differentiation between *Uncaria tomentosa* and *Uncaria guianensis* by LC-PDA, FT-IR and UV methods coupled to multivariate analysis: A reliable tool for adulteration recognition. **Microchemical Journal**, v. 152, 1 jan. 2020.
- KEPLINGER, K. et al. *Uncaria tomentosa* (Willd.) DC.--ethnomedicinal use and new pharmacological, toxicological and botanical results. **Journal of ethnopharmacology**, v. 64, n. 1, p. 23–34, 1 jan. 1999.
- KINI, R. M.; KOH, C. Y. Metalloproteases Affecting Blood Coagulation, Fibrinolysis and Platelet Aggregation from Snake Venoms: Definition and Nomenclature of Interaction Sites. **Toxins**, v. 8, n. 10, 1 out. 2016.
- KLESZCZYŃSKA, H. et al. Hemolysis of Erythrocytes and Erythrocyte Membrane Fluidity Changes by New Lysosomotropic Compounds. **Journal of Fluorescence**, v. 15, n. 2, p. 137–141, mar. 2005.

- KOŁODZIEJCZYK-CZEPAS, J. et al. Extracts from *Uncaria tomentosa* as antiplatelet agents and thrombin inhibitors – The in vitro and in silico study. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 267, p. 113494, mar. 2021.
- KOREN, E.; KOHEN, R.; GINSBURG, I. Polyphenols enhance total oxidant-scavenging capacities of human blood by binding to red blood cells. **Experimental Biology and Medicine**, v. 235, n. 6, p. 689–699, 1 jun. 2010.
- LARRÉCHÉ, S. et al. Bleeding and Thrombosis: Insights into Pathophysiology of *Bothrops* Venom-Related Hemostasis Disorders. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 17, p. 9643, 1 set. 2021.
- MAJUMDAR, S. et al. Characterization, mechanism of anticoagulant action, and assessment of therapeutic potential of a fibrinolytic serine protease (Brevithrombolase) purified from *Brevibacillus brevis* strain FF02B. **Biochimie**, v. 103, n. 1, p. 50–60, 2014.
- MARQUES, T. R. et al. Metanolic extract of *Malpighia emarginata* bagasse: phenolic compounds and inhibitory potential on digestive enzymes. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 26, n. 2, p. 191–196, 1 mar. 2016.
- MARQUES, T. R. et al. Fruit Bagasse Phytochemicals from *Malpighia Emarginata* Rich in Enzymatic Inhibitor with Modulatory Action on Hemostatic Processes. **Journal of food science**, v. 83, n. 11, p. 2840–2849, 1 nov. 2018.
- MARQUES, T. R. et al. Evaluation of the Brazilian functional fruit *Morinda citrifolia* as phospholipases A2 and proteases modulator: *Morinda citrifolia*: enzymatic modulation. **Phytomedicine Plus**, v. 1, n. 4, p. 100071, 1 nov. 2021.
- MATSUI, T.; FUJIMURA, Y.; TITANI, K. Snake venom proteases affecting hemostasis and thrombosis. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1477, n. 1–2, p. 146–156, 7 mar. 2000.
- MORS, W. et al. Plant natural products active against snake bite — the molecular approach. **Phytochemistry**, v. 55, n. 6, p. 627–642, nov. 2000.
- NAVARRO, M. et al. Polyphenolic Composition and Antioxidant Activity of *Uncaria tomentosa* Commercial Bark Products. **Antioxidants (Basel, Switzerland)**, v. 8, n. 9, 1 set. 2019.
- NAVARRO-HOYOS, M. et al. Proanthocyanidin Characterization and Bioactivity of Extracts from Different Parts of *Uncaria tomentosa* L. (Cat's Claw). **Antioxidants (Basel, Switzerland)**, v. 6, n. 1, 1 mar. 2017.
- NKEH-CHUNGAG, B. N. et al. Anti-Inflammatory and Membrane-Stabilizing Properties of Two Semisynthetic Derivatives of Oleanolic Acid. **Inflammation 2014 38:1**, v. 38, n. 1, p. 61–69, 31 ago. 2014.
- OLIVEIRA, D. A. et al. Lipases and proteases inhibition by *Averrhoa carambola* L. fruit extracts. **Phytomedicine Plus**, v. 1, n. 4, p. 100119, 1 nov. 2021.
- PATIL, K. R. et al. Animal Models of Inflammation for Screening of Anti-inflammatory Drugs: Implications for the Discovery and Development of Phytopharmaceuticals. **International journal of molecular sciences**, v. 20, n. 18, 1 set. 2019.

- PAVEI, C. et al. VALIDATION OF A LC METHOD FOR POLYPHENOLS ASSAY IN CAT'S CLAW (*Uncaria tomentosa*). <http://dx.doi.org/10.1080/10826076.2010.503753>, v. 33, n. 17, p. 1551–1561, jan. 2010.
- PEREZ-GREGORIO, R.; SIMAL-GANDARA, J. A Critical Review of Bioactive Food Components, and of their Functional Mechanisms, Biological Effects and Health Outcomes. **Current pharmaceutical design**, v. 23, n. 19, p. 2731–2741, 29 mar. 2017.
- REINHARD, K. H. *Uncaria tomentosa* (Willd.) D.C.: cat's claw, uña de gato, or savéntaro. **Journal of alternative and complementary medicine (New York, N.Y.)**, v. 5, n. 2, p. 143–151, 1999.
- RIBEIRO, V. P. et al. Brazilian medicinal plants with corroborated anti-inflammatory activities: a review. **Pharmaceutical biology**, v. 56, n. 1, p. 253–268, 1 jan. 2018.
- RODRIGUES, V. M. et al. Structural and Functional Characterization of Neuwiedase, a Nonhemorrhagic Fibrin(ogen)olytic Metalloprotease from *Bothrops neuwiedi* Snake Venom. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 381, n. 2, p. 213–224, 15 set. 2000.
- SAAVEDRA, S. L. et al. Natural Snake Venom Inhibitors and their Pharmaceutical Uses: Challenges and Possibilities. **Current pharmaceutical design**, v. 24, n. 16, p. 1737–1747, 16 mar. 2018.
- SANDOVAL, M. et al. Anti-inflammatory and antioxidant activities of cat's claw (*Uncaria tomentosa* and *Uncaria guianensis*) are independent of their alkaloid content. **Phytomedicine: international journal of phytotherapy and phytopharmacology**, v. 9, n. 4, p. 325–337, 2002.
- SELISTRE, H. S. et al. Isolation and characterization of hemorrhagic, myonecrotic and edema-inducing toxins from *Bothrops insularis* (jararaca ilhoa) snake venom. **Toxicon: official journal of the International Society on Toxinology**, v. 28, n. 3, p. 261–273, 1990.
- SHEN, H. BIN; CHOU, K. C. Identification of proteases and their types. **Analytical Biochemistry**, v. 385, n. 1, p. 153–160, 1 fev. 2009.
- SIMÃO, A. A. et al. Pharmaco-toxic characterization of the aqueous extract from *Pereskia grandifolia* leaves. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 9, n. 7, p. 216–222, 17 fev. 2015.
- SMITH, S. A.; TRAVERS, R. J.; MORRISSEY, J. H. How it all starts: Initiation of the clotting cascade. **Critical reviews in biochemistry and molecular biology**, v. 50, n. 4, p. 326–336, 4 jul. 2015.
- SU, M. et al. Nano-Medicine for Thrombosis: A Precise Diagnosis and Treatment Strategy. **Nano-micro letters**, v. 12, n. 1, 1 abr. 2020.
- TATIPAMULA, V. B.; KUKAVICA, B. Phenolic compounds as antidiabetic, anti-inflammatory, and anticancer agents and improvement of their bioavailability by liposomes. **Cell biochemistry and function**, v. 39, n. 8, p. 926–944, 1 dez. 2021.
- WANG, W. J.; SHIH, C. H.; HUANG, T. F. A novel P-I class metalloproteinase with broad substrate-cleaving activity, agkislysin, from *Agkistrodon acutus* venom. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 324, n. 1, p. 224–230, 5 nov. 2004.
- YAHFOUFI, N. et al. The Immunomodulatory and Anti-Inflammatory Role of Polyphenols. **Nutrients**, v. 10, n. 11, 2 nov. 2018.

YARLA, N. S. et al. Phospholipase A2: A Potential Therapeutic Target in Inflammation and Cancer (In silico, In vitro, In vivo and Clinical Approach). **Journal of Cancer Science & Therapy**, v. 07, n. 08, 2015.

ZHANG, Q. et al. Medicinal uses, phytochemistry and pharmacology of the genus *Uncaria*. **Journal of ethnopharmacology**, v. 173, p. 48–80, 27 jul. 2015.