

**Seleção e Identificação de compostos Anti fosfolipase A2 a partir da
avaliação *in silico* combinado com HPLC-MS e avaliação *in vitro e vivo***

Laila Lucyane Ferreira de Moraes

SÃO VICENTE - SP

2022

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“Júlio de Mesquita Filho”
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS
CÂMPUS DO LITORAL PAULISTA

**Seleção e Identificação de compostos Anti fosfolipase A2 a partir da avaliação *in silico*
combinado com HPLC-MS e avaliação *in vitro e vivo***

Laila Lucyane Ferreira de Moraes

Orientador: Prof. Dr. Marcos Hikari Toyama

Coorientador: Prof. Dr. Marcos Antônio de Oliveira

Dissertação apresentada ao Instituto de
Biociências, Campus do Litoral Paulista,
UNESP, para obtenção do título de
Mestre no Programa de Pós-Graduação
em Biodiversidade de Ambientes
Costeiros.

SÃO VICENTE - SP

2022

M827s

Moraes, Laila Lucyane Ferreira de

Seleção e identificação de compostos anti fosfolipase A2 a partir da avaliação in silico combinado com HPLC-MS e avaliação in vitro e vivo / Laila Lucyane Ferreira de Moraes. -- , 2022

110 p. : il., tabs., fotos

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Biociências, São Vicente,

Orientador: Marcos Hikari Toyama

Coorientador: Marcos Antônio de Oliveira

1. metabólitos secundários de plantas. 2. inflamação. 3. sPLA2. 4. PAF- AF. 5. dock molecular. I. Título.

Dedico essa dissertação à minha mãe, que esteve ao meu lado em todas as adversidades que surgiram no meio do caminho, pois é graças ao seu esforço que hoje posso concluir esse ciclo acadêmico, me incentivou com conselhos nos momentos mais difíceis dessa minha jornada.

Também dedico aos meus irmãos Vera e Ricardo que sempre me apoiam e auxiliam na minha formação acadêmica ao longo dos anos.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus, que me ajudou a superar os obstáculos, me dando forças para concluir essa dissertação de mestrado que tanto me ajudou a evoluir.

Ao PPG-BAC por me proporcionar realizar esse projeto e adquirir o título de Mestre. Agradeço toda a equipe acadêmica e principalmente a Supervisora Técnica de Seção da PPG-BAC Fabiana Cecchi Cerqueira, por sempre sanar minhas dúvidas sobre o programa e principalmente pela atenção durante a pandemia.

Agradeço ao meu orientador, o Professor Dr. Marcos Hikari Toyama por ter aceitado acompanhar-me neste projeto, por todos os ensinamentos compartilhados de forma admirável, e por me guiar nos primeiros passos da iniciação científica e agora na pós-graduação. Muito obrigada por tudo! O seu empenho e paciência foram essenciais para a minha formação acadêmica.

Ao meu Coorientador Professor Dr. Marcos Antônio de Oliveira por toda dedicação ao projeto especialmente na revisão dos programas e modelos na parte *in silico*.

Aos meus amigos do laboratório BIOMOLPEP – UNESP/CLP que são como uma segunda família, que me orientaram e auxiliaram com dúvidas e nas revisões do trabalho. Destaco a importância das meninas Airam Roggero e Vitoria Isabeli, pois sem o incentivo, apoio acadêmico e emocional delas não teria concluído esse projeto.

Por fim, a todos aqueles que contribuíram, direta ou indiretamente, para a realização desta dissertação, o meu sincero agradecimento.

*“O período de maior ganho em conhecimento e
experiência é o período mais difícil da vida de alguém”*
Dalai Lama

RESUMO

As fosfolipases A2 (PLA2, EC 3.1.1.4) são um grupo de enzimas que pertencem a fontes de recursos renováveis como da Mata Atlântica que é uma das mais importantes do Brasil, com moléculas bioativas para inibir enzimas relacionadas a determinadas patologias humanas. No atual contexto da pandemia a síndrome respiratória induzida pela COVID-19 pode ser considerada um processo inflamatório agudo induzido por duas classes de PLA2 secretória (sPLA2). Uma é similar sPLA2 de serpentes e a outra sPLA2 associada a lipoproteínas plasmáticas (LP-sPLA2), que gera em sua reação o principal agente da aterosclerose. Por isso a busca por compostos que inibem a PLA2 e auxilia em novas moléculas com potencial no controle do processo inflamatório e replicação de vírus cresceu ultimamente. No nosso trabalho investigamos plantas descritas com propriedade anti-inflamatória, como as do gênero gêneros *Bacchari* sp., *Moquiniastrum* sp. e *Phyllanthus* sp. Nossa pesquisa mostrou resultados obtidos através de técnicas in silico de mineração de dados, com docking molecular, testes in vitro e in vivo, onde foram selecionados três compostos (Miricitrina, ácido gálico e ácido cafeico), que tem potenciais inibidores de atividade fosfolipásica A2. Utilizamos o medicamento ácido acetilsalicílico in silico e in vitro para comparação de atividade fosfolipásica A2 com os compostos naturais e a AchE frente o ácido gálico, ASS e ácido cafeico também para avaliar a atividade de inibir a esterase. Usamos a PAF-AH com a mesma finalidade frente aos compostos. Os resultados obtidos foram que o ácido cafeico e o composto fenólico ácido gálico apresentaram o melhor resultado de interação no sítio ativo da sPLA2 de Cdt e da AchE demonstrando assim elevado potencial inibitório da enzima.

Palavras-chave: metabólitos secundários de plantas, inflamação, sPLA2, PAF- AF e dock molecular.

ABSTRACT

Phospholipases A2 (PLA2, EC 3.1.1.4) are a group of enzymes that belong to renewable resources such as the Atlantic Forest, which is one of the most important in Brazil, with bioactive molecules to inhibit enzymes related to certain human pathologies. In the current context of the pandemic, the respiratory syndrome induced by COVID-19 can be considered an acute inflammatory process induced by two classes of secretory PLA2 (sPLA2). One is like snake sPLA2, and the other is sPLA2 associated with plasma lipoproteins (LP-sPLA2), which generates in its reaction the main agent of atherosclerosis. Therefore, the search for compounds that inhibit PLA2 and help in new molecules with potential to control the inflammatory process and virus replication has grown lately. In our work, we investigated plants described with anti-inflammatory properties, such as those of the genus *Bacchari* sp., *Moquiniastrum* sp. and *Phyllanthus* sp. Our research showed results obtained through in silico data mining techniques, with molecular docking, in vitro and in vivo tests, where three compounds were selected (Myricitrin, gallic acid and caffeic acid), which have potential inhibitors of phospholipase A2 activity. We used the drug acetylsalicylic acid in silico and in vitro to compare phospholipase A2 activity with natural compounds and AchE against gallic acid, ASS and caffeic acid also to evaluate the activity of inhibiting esterase. We use the PAF-AH with the same purpose in front of the compounds. The results obtained were that caffeic acid and the phenolic compound gallic acid presented the best result of interaction in the active site of sPLA2 of Cdt and AchE, thus demonstrating a high inhibitory potential of the enzyme.

Keywords: plant secondary metabolites, inflammation, sPLA2, PAF- AF and molecular dock.

.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	9
1.1 FOSFOLIPASES A2	9
1.1.1 Classificação e funções das PLA2	10
1.1.2 Sítio Catalítico das PLA2	11
1.2 BUSCA POR INIBIDORES DE PLA2	12
1.3 RELAÇÃO NACIONAL DE PLANTAS MEDICINAIS DE INTERESSE AO SUS (RENISUS)	13
1.4 COMPOSTOS FENÓLICOS	13
1.5 FLAVONOIDES	13
1.6 FLAVONOIDES ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA	14
1.7 BIOINFORMÁTICA	15
1.8 TRIAGEM E SELEÇÃO DE COMPOSTOS	17
1.9 GÊNEROS SELECIONADOS	17
1.10 ÁCIDO ACETILSALICÍLICO	18
2 OBJETIVO	19
3 MATERIAIS E MÉTODOS	20
3.1 MINERAÇÃO DE DADOS	20
3.2 ANÁLISE IN SILICO	20
3.3 DOCK MOLECULAR	21
3.3.1 Avaliação dos resultados	22
3.4 PREPARAÇÃO DOS EXTRATOS VEGETAIS	22
3.5 PURIFICAÇÃO DA SPLA2	22
3.5.1 Cromatografia de exclusão molecular em HPLC	22
3.5.1.1 Análise do grau de pureza da toxina	23
3.6 ENSAIOS ENZIMÁTICOS	23
3.7 DICROISMO CIRCULAR	24
3.8 ENSAIOS FARMACOLÓGICOS	24
3.8.1 Avaliação do edema de pata protocolo incubado	25
3.8.2 Edema de pata	25
3.8.3 Atividade miotóxica	26
3.9. ANÁLISE ESTATÍSTICA	26
4 RESULTADOS	27
4.1 ÁCIDO CAFEICO	30
4.2 ÁCIDO ACETILSALICÍLICO (AAS)	37
4.3 ÁCIDO GÁLICO	43
4.4 MIRICITRINA	51
5 DISCUSSÃO	56
6 CONCLUSÃO	58
REFERÊNCIAS	60
ANEXO I	69
ANEXO II	73
ANEXO III	75
ANEXO IV	76
ANEXO V	77
ANEXO VI	79
ANEXO VII	80
ANEXO VIII	81
ANEXO IX	82
ANEXO X	83
ANEXO XI	84
ANEXO XII	95

1 INTRODUÇÃO

1.1 FOSFOLIPASES A2

As fosfolipases A2 são enzimas de lipases-esterease presentes em células de vários vertebrados, plantas, micro-organismos que catalisam hidrólise especificamente na posição sn-2 dos fosfolipídios que compõem as membranas celulares, liberando ácidos graxos e lisofosfolipídios (Kudo; Murakami, 2002) desempenham enzimaticamente a hidrólise da ligação éster em triglicerídeos e no caso das fosfolipase A (PLA), estas catalisam a hidrólise específica de gliceróis esterificados no carbono 1 e 2 (sn-1 e sn-2, com ácidos graxos) e no carbono 3 do glicerol, a presença de um grupo fosfodiéster (Figura 1) (Dennis *et al.*, 2011; Vulfius *et al.*, 2017).

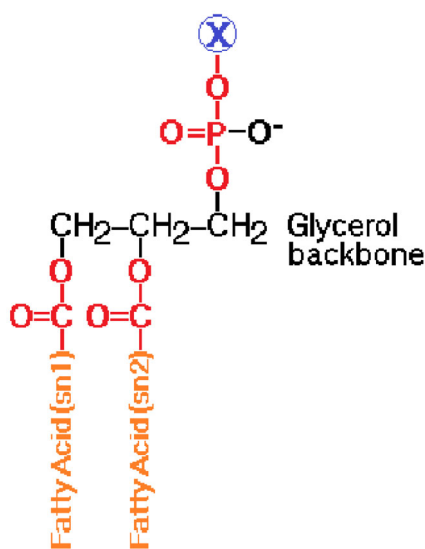


Figura 1. A figura mostra a estrutura básica dos fosfolipídios com seus grupos ésteres O-C=O e com sua região fosfodiéster O-P=O.

As fosfolipase podem ser classificadas em grupos ou classes, dependendo da estrutura química do fosfoglicerídeo, apresentado na figura 1. São enzimas importantes no metabolismo de lipídios, e estão associadas com a liberação de ácido araquidônico (AA), que tem a função de percussão de lipídios bioativos, como por exemplo, as leucotrienos, prostaglandinas e tromboxanos que estão envolvidos diretamente na resposta do sistema imune e inflamação (Murakami *et al.*, 2013, Lambeau *et al.*, 2008, Dennis, 2000; Tsuboi, Kini, 2005; Schaloske e Dennis; 2006).

Como as enzimas PLA2 (EC 3.1.1.4) que são enzimas pertencentes a uma família de esterase enzimática lipolítica que catalisa especificamente a hidrólise das ligações ésteres nos

glicerofosfolípidos na posição sn-2. Essa hidrólise libera ácido graxo livre, como o ácido araquidônico e a libertação do lisofosfolípidos, que são os mediadores em vários processos biológicos (Vulfius *et al.*, 2017).

1.1.1 Classificação e funções das PLA2

As fosfolipase A2 (PLA2) compõe atualmente uma família com 15 grupos e subgrupos de proteínas e nessa divisão incluir cinco tipos de enzimas diferentes. Para ocorrer a classificação das PLA2s nos grupos, são analisadas as sequências de aminoácidos, mecanismos catalíticos e outras características bioquímicas adicionais, tais como o peso molecular e o padrão de pontes dissulfeto (Dennis, 1994; Schaloske e Dennis, 2006).

O grupo das PLAS citosólicas (cPLA2) é composto por proteínas com grande massa molecular relativa, entorno de 61.000 e 114.000, essas proteínas utilizam um resíduo de serina catalítico, como por exemplo as enzimas independentes de Ca^{2+} (iPLA2) que também usam a serina para realizar a catalise e as acetilhidrolase que são ativadores de plaquetas (PAF-AH), e tem uma serina no sítio catalítico. Outro grupo são as PLA2s lisossomais que compõem o grupo XV, esse grupo apresentam uma tríade catalítica composta por três aminoácidos serina, histidina e Ácido aspártico (Schaloske e Dennis, 2006).

Outro grupo de fosfolipase A2 que possui inúmeros estudos são as secretoras (sPLA2), esse grupo apresenta uma massa molecular relativa bem variada entre 14.000 e 18.000 e geralmente em sua estrutura contêm 5 a 8 pontes dissulfeto. Esse grupo de enzimas usa uma histidina em seu sítio ativo e precisam de íon Ca^{2+} para a realização de catálise (Dennis, 1994; Schaloske e Dennis, 2006).

As PLA2 encontradas nas peçonhas de serpentes possuem dois grupos. As PLA2 do grupo I possuem como característica dois ou três aminoácidos na região 52-65, que tem denominação de “loop elapídico”, encontrado na família Elapidae. As PLA2 do grupo II possuem como principal característica é substituição de uma ligação Cys11-Cys77 por uma ponte dissulfeto entre os aminoácidos Cys51-Cys133, também ocorre uma extensão da região C- terminal por aproximadamente sete aminoácidos, na família Viperidae (Subfamília: Viperidae e Coralínea) (ARNI; WARD, 1996). No grupo II possui dois subgrupos, as PLA2s cataliticamente ativas que possui aspartato na posição 49 e as PLA2s cataliticamente inativas ou com baixa atividade, pois na posição 49 o aspartato é substituído por um resíduo de lisina (Maraganore *et al.*, 1984; Arni e Ward, 1996; Wang *et al.*, 1996; Ownby *et al.*, 1999; Soares, Fontes e Giglio, 2004).

1.1.2 Sítio Catalítico das PLA2

O mecanismo de catálise das lipases que inclui as PLA2 citosólicas é definido pela tríade catalítica dos aminoácidos, serina (Ser), histidina (His) e ácido aspártico (Asp) em que a serina ativada adiciona nucleofilicamente a função carbonila de um substrato éster ou lactona. A histidina durante a reação da PLA2 com um substrato, ela doa e recebe elétrons e com isso pode realizar uma auto oxidação, fazendo com que o substrato interaja com apenas uma cadeia da PLA2. No caso da PLA2 o primeiro produto a ser liberado seria o ácido graxo livre e o segundo o lisofosfolipídeos (Sharp *et al.*, 1994; Pickard *et al.*, 1996; Vasquez *et al.*, 2018).

Foi demonstrado em estudos que a PLA2 associada a lipoproteínas mostram bem conservados a tríade catalítica da alfa/beta hidrolises constituídos pela Ser, Asp e His. A hidrólise de grupos acila nas α/β hidrolases lipásicas é realizada por uma tríade catalítica (Ser-His-Asp/Glu) análoga a presente nas proteases de serina, onde o resíduo de histidina é posicionado espacialmente entre a serina e o aspartato (Dessen *et al.*, 1999; Dessen, 2000).

Por outro lado, as PLA2 citosólicas cálcio dependentes (GIVA cPLA) e independentes (GVIA iPLA2) a Histidina do ponto de vista funcional foi substituído pela presença de Arginina e isso decorre do fato que a arginina tem um grupo guanidina que poderia desempenhar uma função análoga a Histidina (Pickard *et al.*, 1996; Mouchlis *et al.*, 2012; Muller *et al.*, 2019).

O papel da Tirosina na atividade enzimática das PLA2 está fundamentado no fato que não somente a Tyr52 e a Tyr73 também são resíduos que ajudam da estabilizar o sítio ativo das PLA2 secretórias e mantem uma forte interação com a His48, Asp99 (Tomoo *et al.*, 1997). Trabalhos realizados por Salvador *et al.*, 2019 e 2021, mostram que o composto sintético Varespladib (LY315920) está acomodado em um local próximo a Lys48, Gly29, Gly 30.

Baseado nos trabalhos de Davidson e Dennis, 1990, Dupureur *et al.*, 1992, Moura-da-Silva *et al.*, 1995, Tomoo *et al.*, 1997, Janssen *et al.*, 1999, Edwards *et al.*, 2000, Corrêa *et al.*, 2008, Kim *et al.*, 2020 e usando dados das proteínas depositadas no PDB criamos um modelo teórico de catálise da PLA2 secretória do grupo II de *Crotalus durissus terrificus* (PDB 2QOG) onde os resíduos de Tirosina adjacentes ao Ácido Aspártico teriam o papel funcional do Ácido Aspártico da tríade clítica das estreases, a His central e o complexo Gly, Asp, Cálcio teriam o papel funcional da Serina (Figura 2) e todos estes resíduos localizados no sítio ativo da PLA2 secretórias.

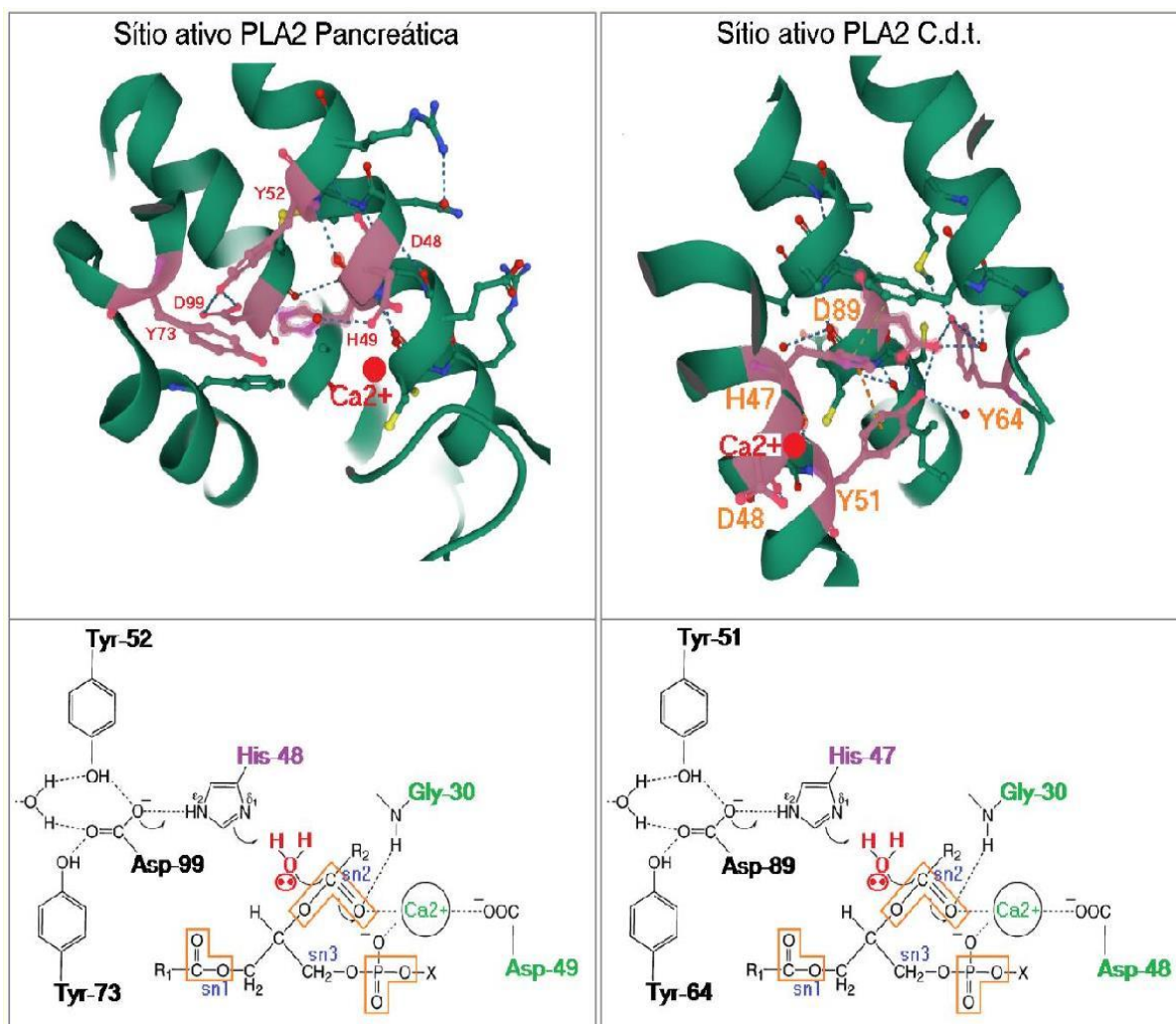


Figura 2. Modelo teórico de catálise da PLA2 secretória do grupo II de *Crotalus durissus terrificus*, depositada no RCSB.

1.2 BUSCA POR INIBIDORES DE PLA2

As peçonhas das serpentes são compostas por inúmeras proteínas, como as PLA2. E essas proteínas podem ser reconhecidas e inibidas por moléculas de várias origens como, por exemplo, agentes químicos, sintéticos e naturais de origem animal e vegetal (Borges et al., 2001; Lizano; Domont e Perales, 2003; Soares *et al.*, 2004; Oliveira *et al.*, 2005; Marcussi *et al.*, 2007).

Atualmente as pesquisas por compostos naturais com princípios ativos para inibir PLA2 estão crescendo, pois diversas plantas são estudadas pela ação antiofídica e estão demonstrando potencial de inibir toxinas das peçonhas de serpentes incluindo as PLA2 (Mors *et al.*, 2000, Soares *et al.*, 2005; Samy *et al.*, 2008).

1.3 RELAÇÃO NACIONAL DE PLANTAS MEDICINAIS DE INTERESSE AO SUS (RENISUS)

O sistema único de saúde (SUS) disponibiliza fitoterápicos derivados de plantas desde 2007 no Brasil (Brasil, 2013b) alguns desses fitoterápicos disponíveis no SUS é espinheira-santa, Guaco, Alcachofra, Aroeira, Cáscara-sagrada, Garrado-diabo, Isoflavona-de-soja, Unha-de-gato, Hortelã, Babosa, Salgueiro e Plantago (Brasil, 2013b).

O Ministério da Saúde divulgou, em fevereiro de 2009, a Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS (RENISUS) que reúnem informações botânicas, de controle de qualidade, eficácia e segurança, colocando à disposição da sociedade o conhecimento científico sistematizado. Além disso, tem o objetivo de subsidiar o aprimoramento de normativas sanitárias, a incorporação de fitoterápicos no SUS e de contribuir com a Assistência Farmacêutica em plantas medicinais e fitoterápicas, favorecendo o acesso seguro e o uso racional de plantas medicinal e fitoterápico pela população brasileira, conforme a Política e o Programa Nacional de Plantas Medicinal e Fitoterápico. Essa lista de plantas medicinais apresenta potencial alto para gerar produtos de interesse ao SUS e população (Brasil, 2009).

1.4 COMPOSTOS FENÓLICOS

Os compostos fenólicos são definidos como substâncias que possuem um anel aromático com um ou mais substituintes hidroxílicos, nas formas simples ou de polímeros, que os confere o poder antioxidante (Shahidi e Naczki., 1995).

Estão amplamente distribuídos no reino vegetal. Entre as frutas, a uva é uma das maiores fontes de compostos fenólicos. Esses compostos podem ser naturais ou sintéticos. Quando presentes em vegetais podem estar em formas livres ou complexadas a açúcares e proteínas. Dentre eles, destacam-se os flavonoides, os ácidos fenólicos, os taninos e os tocoferóis como os antioxidantes fenólicos mais comuns de fonte natural (Francis., 2000).

1.5 FLAVONOIDES

Os flavonoides compõem uma ampla classe de compostos polifenólicos de origem vegetal e são encontrados nas partes aéreas das plantas de diferentes ecossistemas, com ênfase

as angiospermas, e considerados compostos relativamente estáveis por resistirem à oxidação. Podem se apresentar como agliconas, glicosídeos ou fazem parte de outros compostos químicos (Kumar e Pandey 2014). Os flavonoides não podem ser considerados um medicamento ou um suplemento alimentar, com o objetivo de melhorar a saúde, pois na literatura temos vários estudos demonstrando que a utilização dos flavonoides não causa efeito significativo, sendo usado somente na dieta (Prior et al., 2007; Christen, K.Y *et al.*, 2007; Chun *et al.*, 2020).

Estes polifenólicos são biossintetizados pela via do ácido chiquímico, um importante intermediário na biossíntese de substâncias aromáticas em plantas, que tem por função originar o ácido cinâmico e seus derivados, como os ácidos cafeico, ferúlico e sináptico, com nove átomos de carbonos; pela via do acetato que origina um tricetídeo com seis átomos de carbonos (Wang *et al.*, 2018).

Desta forma, a estrutura química básica destes compostos, conhecida como flavonoide, consiste em 15 carbonos distribuídos em dois anéis aromáticos (anéis A e B), os benzenos, interligados a uma estrutura heterocíclica central, o pirano (anel C), onde o primeiro (Wang et al., 2018) benzeno é condensado com o sexto carbono do pirano, que na posição 2 carrega um grupo fenila (Dornas *et al.* 2010).

A grande diversidade estrutural encontrada nos flavonoides ocorre em função das pequenas modificações químicas ocorridas na estrutura básica destes compostos, que podem ser por meio de hidroxilada, metilação, acilação, glicosilada, hidrogenação e sulfatações (Wanget al., 2018) e de por conta desta grande diversidade química a relação da estrutura e função dos flavonoides ainda não está fechado (Kumar, Pandey, 2013; Jucá *et al.*, 2020).

De forma resumida os flavonoides através de reações de derivação relativamente brandas em pH ao redor de 5-9, a temperatura ambiente, em diferentes concentrações pode formar complexos covalentes com as cadeias laterais de aminoácidos sulfidrilas e do triptofano. Este tipo de interação covalente entre flavonoides com proteínas apesar de pouco conhecido na literatura, já foi descrito para várias proteínas como tripsina, lisozima e alfa-amilase (Kroll *et al.*, 2003; Brudzynki, Maldonado-Alvarez, 2015).

1.6 FLAVONOIDES ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA

Inflamação é um processo normal e biológico em resposta a lesão tecidual, microbiana, infecção patogénica, e irritação química, que é iniciado pela migração de células

imunitárias dos vasos sanguíneos e libertação de mediadores no local dos danos incluindo as PLA2 (Rodrigues, 2014; Toyama *et al.*, 2019).

Este processo é seguido pelo recrutamento de células inflamatórias, libertação de ROS, RNS, e citocinas pró-inflamatórias para eliminar agentes patogénicos estranhos, e reparação de tecidos feridos. Os flavonoides podem atuar em diversos pontos do processo inflamatório tanto em nível celular quanto em nível extracelular e isso inclui a ação de vários flavonoides sobre a atividade enzimática da fosfolipase A2 (Kumar, Pandey, 2013; Panche *et al.*, 2016; Toyama *et al.*, 2019).

Os estudos de forma geral indicam que os flavonoides apresentam diferentes mecanismos de ação: podem agir inibindo a síntese de TNF- α , bloquear as enzimas fosfolipase, COX 1 e 2 ou as lipoxigenase e outras enzimas envolvidas no processo inflamatório. Alguns destes flavonoides como a Apigenina e quercetina inibem a COX-2 e a NOS (Griffiths *et al.*, 2016; Ginwala *et al.*, 2019; Maleki *et al.*, 2019).

A quercetina também age reduzindo a adesão de células inflamatórias ao endotélio vascular, mesmo modo de ação da Luteolina. Já os estudos com Rutina, apigenina-7-O-glicosídeo e luteolina-7-O-glicosídeo, principais flavonoides presentes no extrato bruto de *Achillea millefolium* Linn., inibem a elastase neutrofilia humana (HNE) e as metaloproteinases da matriz, as quais estão associadas a processos anti-inflamatórios em estudos *in vitro*. O flavonoide caempferol-3-O- β -D-galactosídeo inibe a produção de TNF- α e a NOS, possuindo uma significativa atividade anti-inflamatória (Griffiths *et al.*, 2016; Ginwala *et al.*, 2019; Maleki *et al.*, 2019).

Os flavonoides são úteis no tratamento da inflamação, principalmente devido a sua capacidade de regular a atividade de enzimas e a síntese de substâncias envolvidas nesse processo (Griffiths *et al.*, 2016; Ginwala *et al.*, 2019; Maleki *et al.*, 2019).

A nossa experiência com flavonoides mostra que estas moléculas têm um grande potencial farmacêutico, nutracêutico e podem ajudar no uso funcional de determinados alimentos (Toyama *et al.*, 2019).

1.7 BIOINFORMATICA

A bioinformática parte da utilização da informática para pesquisas biológicas sendo assim, neste trabalho utilizaremos a triagem virtual uma técnica *in silico* para a busca de compostos contra determinadas doença ou enzimas. Geralmente nessa técnica são utilizados

grande bancos de compostos químicos virtuais derivados de fontes naturais ou de composição orgânica disponível em domínios como Pubchem, Nature e ChEMBL (Guedes *et al.*, 2014).

Existem duas abordagens que são usadas para a triagem de compostos a partir das bibliotecas virtuais que são I estrutura do receptor biológico 3D (SBVS – structure-based virtual screening e II estrutura de ligantes bioativos (LBVS - ligand-based virtual screening) e em ambos os casos é necessário ter tanto a estrutura molecular do ligante e do alvo conhecidos (Rodrigues *et al.*, 2012).

Na triagem virtual baseado em estruturas (SBVS) fundamenta-se em características físico-químicas (químicas, eletrônicas e estruturais) entre o ligante e o sítio ativo da proteína, utilizando-se de dados tridimensionais de alvos terapêuticos (Rodrigues, 2014).

A metodologia denominada “ancoragem molecular” (AM) (dock molecular), é um procedimento de simulação computacional amplamente utilizado que prevê os modos de ligação e afinidades de pequenas moléculas no sítio de ligação de um complexo receptor/ligante, onde o receptor é geralmente uma proteína ou uma molécula de ácido nucleico e o ligante uma pequena molécula ou outra proteína, detalhando o reconhecimento molecular envolvido nas ligações entre moléculas (Guedes *et al.*, 2014).

Protocolos de ancoragem podem ser compostos por dois componentes diferentes: algoritmos de busca e função score. Segundo Domingues *et al.* (2012) e Rodrigues *et al.* (2012).

O dock molecular vem se desenvolvendo e melhorado ao longo destes últimos anos, mas sua capacidade de gerar uma droga viável ainda é geralmente questionável. Apesar de controverso, hoje existem várias drogas que foram descobertas pela técnica de dock molecular (Lionta *et al.*, 2014; dos Santos, *et al.*, 2018).

Nestes trabalhos, iremos utilizar o dock e a modelagem molecular em cima dos compostos estudados que previamente triados por meio da técnica de bioguiados. Além disso, vamos priorizar a gratuidade dos bancos de dados e a presença de estruturas tridimensional definida, que serão ser empregados ao estudo (Junior, 2014; Ferreira *et al.*, 2015). No caso das fosfolipase A2: sPLA2 de Cdt e a LP-PLA2, serão selecionadas de acordo com sua resolução estrutural, uma estrutura molecular que acomode a maior parte dos sítios catalíticos.

1.8 TRIAGEM E SELEÇÃO DE COMPOSTOS

O método de triagem virtual viabiliza o processo de busca por compostos líderes e o planejamento racional de novos possíveis fármacos, pois dispensam a necessidade de síntese de cada composto a ser estudado (Li *et al.*, 2006).

Os métodos de triagem virtual são fundamentados em duas principais formas de abordagens. Na primeira se avalia a afinidade de interação ou a energia livre de interação entre ligante-alvo (structure-based drug discovery ou target-based drug discovery), um exemplo é a ancoragem molecular. Na segunda abordagens independem da estrutura do alvo, uma vez que utilizam as estruturas químicas dos compostos ativos como referência (ligand-based drug discovery) (Acharya, 2011).

Algumas destas ferramentas avaliam a similaridade na superposição das estruturas em representações bidimensionais e tridimensionais e avaliam a existência de grupos farmacológicos. Outras ferramentas fundamentadas decompõem as estruturas em descritores moleculares e comparam com perfis gerados a partir das estruturas e informações disponíveis das substâncias ativas já conhecidas (Acharya, 2011; Li *et al.*, 2006).

Os descritores são parâmetros utilizados para representar propriedades moleculares (exemplo: eletrônicas, geométricas, topológicas etc.) implícitas na estrutura química de cada composto (Acharya, 2011; Filimonov, 2014).

Neste projeto pretendemos usar quatro programas para avaliação e seleção molecular dos compostos que serão o PubChem, QSAR-Co, Molinspiration e SwissADME.

1.9 GÊNEROS SELECIONADOS

Os gêneros selecionados para a essa pesquisa foram baseadas na literatura com os seus princípios ativos confirmados cientificamente. O gênero *Bacchari* spp., é muito usado na medicina popular e na produção de fitoterápicos. A principal ação terapêutica relatada em pesquisas sobre esse gênero é no tratamento de doenças do trato gastrointestinal (Karam *et al.*, 2013).

O segundo gênero selecionado para trabalho foi *Moquiniastrum* spp. também baseadas na literatura esse gênero tem ações terapêuticas em doenças causada por bactérias gram-positivas e elevadas atividades antioxidantes (Strapasson, 2014 e Stefanello *et al.*, 2006).

O gênero *Phyllanthus* spp. foi o terceiro gênero escolhido para pesquisa, pois segundo estudos esse gênero está associado ao aumento da filtração glomerular e excreção urinária de ácido úrico e é usado na prevenção das calculoses (Cruces *et al.*, 2013).

1.10 ÁCIDO ACETILSALICÍLICO

A classe de medicamentos que possui maior variedade no Brasil é dos anti-inflamatórios, devido ao grande número de usuários crônicos. Estudos mostram que cerca de 30 milhões de pessoas consome algum anti-inflamatório não esteroidais (AINES). Possui 66 substâncias comercializadas no Brasil, sendo que 21 dessas substâncias anti-inflamatórios esteroidais e os demais são da classe AINES. Os mais usados são Aspirina (ácido acetilsalicílico), ácido salicílico e ibuprofeno (Marin *et al.*, 2005, Filho *et al.*, 2018 e Nunes *et al.*, 2006).

Ácido acetilsalicílico é um AINES com indicação para algumas patologias como anti-inflamatório, antipiréticas é usado como analgésico e antiplaquetário. Por ser um inibidor inespecífico da enzima Cicloxigenase (COX) o AAS inibe de forma irreversível a COX-1 e COX-2, por meio da reação de acetilação com resíduos da serina, que consta no canal que liga a enzima com ácido araquidônico (Samuelsson., 1972 e Range *et al.*, 2003).

2 OBJETIVO

1. Triagem e Seleção de flavonoides com potencial contra a fosfolipásica A2 usando a mineração de dados com base nas características dos compostos presentes em plantas utilizadas no SUS, principalmente entre os gêneros do gênero *Bacchari sp.*, *Moquiniastrum sp.* e *Phyllanthus sp.*;
2. Após a seleção com programas de mineração de dados e análise de estrutura químicas que incluem Bancos de dados gratuitos, em conjunto com as plataformas Molinspiration em conjunto com o Molinspiration, SwissADME e Cocoonut;
3. Estudos de dock molecular e seleção dos melhores ligantes flavonoides contra a sPLA2 de *Crotalus durissus terrificus* e da LpPLA2 de seres humanos;
4. Preparação dos extratos etanólico de amostras foliares das plantas do gênero *Bacchari sp.*, *Moquiniastrum sp.* e *Phyllanthus spp.*;
5. Identificação e Isolamento dos compostos a partir dos extratos;
6. Avaliação *in vitro*, (enzimática, cromatográfica, espectroscópica, dicroísmo circular) dos compostos em presença da sPLA2 de *Crotalus durissus terrificus (Cdt.)*;
7. Avaliação farmacológica *in vivo* (edematogênicos, miotóxica, citotóxica).

3 MATERIAIS E MÉTODOS.

3.1 MINERAÇÃO DE DADOS

As estruturas químicas dos flavonoides de plantas com potencial propriedade para inibição da atividade fosfolipásica A2 teve como base as moléculas que nosso grupo trabalhou ao longo destes últimos anos e que tiveram sua atividade inibitória tanto da atividade enzimática por si só, mas também pela diminuição ou neutralização dos efeitos inflamatórios, citotóxico e com atividade antioxidante. As moléculas desse trabalho foram selecionadas por mineração de dados por características de QSAR que são características físico-química baseado no ligante e no alvo e esses parâmetros foram importantes na mineração principalmente nas plataformas PubChem, Cocoonut, National Center for Biotechnology Information (NCBI) além das plataformas abertas.

3.2 ANÁLISE IN SILICO

Determinação da sequência de aminoácidos a sequência parcial de aminoácidos depositadas nas bases de dados PDB (Protein Data Bank - <https://www.rcsb.org/>) e no (NCBI - <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). A sequência parcial então será alinhada às sequências de outras PLA2s, os compostos foram retirados da plataforma PubChem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>) pertencente ao banco de dados do NCBI.

O modelo cristalográfico, escolhido como o melhor modelo para a construção do modelo estrutural teórico de CDT - sPLA2 (PDB 2qog), Acetilcolinesterase (PDB 4m0e) e a Lp-PLA2 (PDB 3Del), usando a plataforma SWISS-MODEL (<https://swissmodel.expasy.org/>), também utilizamos o programa Chimera 1.14 (Ucsf Chimera, 2004) para a montagem de um modelo molecular estrutural da proteína.

As análises dos modelos obtidos foram realizadas por três diferentes metodologias, selecionamos o melhor modelo com base em testes de atividade biológica, estruturas e inibição, realizada durante a pesquisa. Todas as figuras resultantes desses estudos foram construídas pelo programa PYMOL v2.4 (Seeliger, De Groot, 2010), plataforma Molinspiration será utilizada para melhor visualização da estrutura dos compostos. (Tetko, 2005) e pelo software de Discovery Studio 4.0 (Biovia Foundation, 2007).

3.3 DOCK MOLECULAR

O Dock molecular é um método *in silico* amplamente aplicado em programas de descoberta de novas drogas, o qual prevê a ligação de uma determinada molécula interagindo com um alvo biológico específico. Neste estudo, os experimentos de ancoragem molecular foram realizados pela plataforma SwissDock (Grosdidier; Zoete; Michielin, 2011), posteriormente utilizamos a plataforma CavityPlus (Xu *et al.*, 2018), onde observamos as melhores cavidades de interação para gerar uma Grid Box pelo software Autodock Vina (Goodseell; Morris; Olson, 1996; Seeliger; de Groot, 2010). Foram gerados diversos resultados de várias execuções de encaixe, resumidos em uma tabela para posterior análise (Pettersen *et al.*, 2004; Trott *et al.*, 2010).

As análises dos modelos obtidos foram realizadas por diferentes metodologias, com base em dados bibliográficos. Selecionamos os melhores modelos com base em seus RSMD com a menor Kcal. Todas as figuras resultantes desses estudos serão construídas pelo programa PYMOL v2.4 (Seeliger; de Groot, 2010) e pelo software de Discovery Studio 4.0 (Biovia Foundation, 2007).

Os resultados foram avaliados com base nas ferramentas Discovery Studio (Biovia Foundation, 2007), LigPlot (Wallace *et al.*, 1995) e Pymol (Seeliger; de Groot, 2010), avaliando as energias de ligação, distâncias e orientações das moléculas no microambiente do sítio ativo de PLA2.

Preparação dos arquivos para ancoragem:

Os ligantes foram obtidos na plataforma PubChem em formato 3D com a extensão .SDF. Após o download, os arquivos dos ligantes foram convertidos para o formato. Mol2. A preparação das coordenadas do modelo para os procedimentos de ancoragem foi efetuada utilizando a ferramenta Chimera 1.15 (Pettersen *et al.*, 2004). Em seguida, o aplicativo AutoDock Vina foi empregado para adicionar átomos de hidrogênio polares e agregar as cargas Kollman. Por fim, após todas as modificações, os arquivos foram convertidos com a extensão. PDBQT (Teske, 2019).

Para a ancoragem foi necessário executar os cálculos dos mapas de grade de energia (Grid Box) através do programa AutoDock Tools. O tamanho escolhido será suficiente para envolver todos os aminoácidos do microambiente do sítio catalítico. As informações das coordenadas x, y e z serão salvas para uso posterior (Picanço, 2015).

3.3.1 Avaliação dos resultados

Os resultados foram avaliados levando utilizando as ferramentas Discovery Studio (Biovita Fundation, 2007), LigPlot (Wallace *et al.*, 1995) e Pymol (Seeliger, De Groot, 2010) avaliando as energias de ligação, distâncias e orientações das moléculas no microambiente do sítio ativo de PLA2.

3.4 PREPARAÇÃO DOS EXTRATOS VEGETAIS.

Os extratos de 3 espécies de plantas da Mata Atlântica e que são encontradas na lista de plantas medicinais do SUS segundo o RENISUS (Relação Nacional de Plantas Medicinais de interesse ao SUS), serão preparados em etanol 70% conforme procedimento descrito na Farmacopeia Brasileira. As espécies serão selecionadas a partir de dados existentes em literatura ou em andamento em termos da presença de compostos polifenólicos, que seja uma espécie abundante, arbustiva ou arbórea.

O material botânico será processado através do processo de liofilização para a secagem do material e preservando a integridade de todos os compostos que podem ser metabolizados ou degradados pelo calor. Os extratos obtidos foram concentrados sob pressão reduzida (em temperatura igual ou inferior à 40°C), obtendo-se assim o extrato bruto etanólico. (Brasil, 2009; Dos Santos Junior *et al.*, 2020).

3.5 PURIFICAÇÃO DA SPLA2.

3.5.1 Cromatografia de exclusão molecular em HPLC

20 mg do veneno total será homogeneizado em tampão bicarbonato de amônio 0,1M, pH 7,9 até a sua completa dissolução. Esta solução de veneno será então centrifugada a 2500xg por 5 minutos para clarificação da solução. O sobrenadante obtido será então aplicado à coluna pré-empacotada de exclusão molecular em coluna Superdex 75. O sistema cromatográfico será previamente equilibrado com o tampão bicarbonato de amônio, pH 7,9, 0,1M, 60 minutos antes da aplicação da amostra. A eluição do material será realizada a um fluxo constante de 0,2ml/min e monitorada a uma absorbância de 280 nm. O pool de fosfolipase será agrupado e posteriormente liofilizado.

3.5.1.1 *Análise do grau de pureza da toxina*

O grau de homogeneidade molecular será realizado por dois métodos, uma em HPLC de fase reversa, usando uma coluna C18 analítica (0.39 x 30 cm, Phenomenex). A coluna cromatográfica será equilibrada durante 10 minutos, usando uma solução de ácido tricloroacético a 0,1% (TFA, 0,1%) previamente filtrado em filtro 0,22mm. As amostras liofilizadas serão dissolvidas em 250ml de TFA 0,1%, que será então centrifugada a 4500xg por 5 minutos, o sobrenadante obtido será então aplicado na coluna cromatográfica. Para eluição da fração será usado um gradiente linear contínuo do solvente B (Acetonitrila 66% em solvente A). O registro da corrida cromatográfica será realizado a 214nm.

3.6 *ENSAIOS ENZIMÁTICOS.*

A fim de avaliar o comportamento da enzima frente à diferentes concentrações de substrato cromogênio derivado do p-nitroanilida, 4-nitro-3-octanoyloxy-benzoic acid (NOB), a sPLA2 (previamente purificada) foi solubilizada com solução salina NaCl a 0,9% na concentração de 1 mg/mL e o substrato solubilizado em Acetonitrila PA em concentrações que variaram de 0,25 até 2 mg/mL (n=5).

Para avaliar o potencial inibitório dos compostos, a enzima foi solubilizada da mesma maneira e na mesma concentração e foi incubada com os compostos por 30 minutos. Neste segundo teste, o substrato (NOB) foi solubilizado com Acetonitrila à uma concentração de 1mg/mL. Ambos foram adicionados ao tampão Tris-HCl 0,02M, NaCl 0,15M e CaCl₂ 1mM (pH 8) para serem analisados com leitura em espectrofotômetro UV-VIS SPECTRA MAX (Molecular Devices, CA), com comprimento de onda a 405 nm. As leituras ocorreram ao longo do tempo de incubação (90 minutos), com intervalos de 5 minutos entre as leituras. Para calcular a porcentagem de inibição, utilizou-se a velocidade de consumo do substrato (inclinação da reta) sob a fórmula descrita abaixo:

$$\frac{(V_{O_{PLA2}} - V_{O_{incubados}})}{V_{O_{PLA2}}} \cdot 100$$

Os dados então foram expressos em porcentagem e seu erro em pontos de porcentagem.

3.7 DICROISMO CIRCULAR

A espectroscopia de dicroísmo circular (CD) é um método experimental de análise adequado para avaliar a estrutura secundária de proteínas (hélices alfas, folhas beta, voltas e estruturas secundárias aleatórias) em solução. É caracterizado como um método rápido e econômico devido às pequenas quantidades de amostras necessárias. Nesta técnica, a luz polarizada é utilizada na faixa distal ultravioleta (UV) (de 180 a 260 nm).

Esta técnica permite a avaliação da integridade estrutural das proteínas, alterações conformidade e processos de desnaturação (desdobramento) e re-naturação (dobradura), permitindo estimar a composição dos elementos na estrutura secundária desta macromolécula.

A análise de dicroísmo circular foi realizada com 0,1 mg /ml de sPLA2 e os compostos foram incubados na mesma concentração do teste enzimático (4:1). Os compostos isolados também foram utilizados para avaliar a possível interferência nos testes. Foram realizadas 8 convoluções, e os dados foram tratados no Spectra Manager.

3.8 ENSAIOS FARMACOLÓGICOS.

Foram utilizados animais da espécie *Mus musculus* de 23 a 30 g, provenientes do Biotério Central da UNICAMP (CEMBIB). Os experimentos foram realizados no laboratório BIOMOLPEP da UNESP Campus do Litoral Paulista onde foram mantidos até o momento do teste em um gabinete biotério, climatizado com umidade e temperatura controlada. Os animais serão tratados com água e ração “ad libidum” e controle do ciclo claro/escuro e serão mantidos de acordo com as normas do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal-COBEA sendo todos os procedimentos para os experimentos apresentados ao Comitê de Ética da UNESP– CEUA/UNESP para aprovação.

Devido a Pandemia do COVID-19, foram reutilizados resultados de antigos experimentos animais que tiveram seus comitês de ética devidamente aprovados. Todos os experimentos foram finalizados por meio de anestesia e eutanásia dos animais utilizados e seguirão as normas do CONCEA. Os animais serão anestesiados em câmara de CO₂ e posteriormente ocorre a eutanásia por deslocamento cervical.

3.8.1 Avaliação do edema de pata protocolo incubado

Foram realizados dois modelos experimentais *in vivo* para avaliação da inibição da inflamação aguda causada por sPLA2 purificada, ambos utilizando camundongos fêmeas Swiss (~25g, n=5). Comitês de ética utilizados foram: 14/2016; 19/2016; 18/2016; 15/2016; 009/2015; 008/2015; 010/2015; 03/2019; 04/2019. CEUA.

Os testes *in vivo* foram efetuados somente após a averiguação *in vitro* da inibição ou interação com compostos com as enzimas utilizadas no estudo. Os animais foram separados em oito grupos: controle (salina), sPLA2, Miricitrina, Ácido gálico, sPLA2: Miricitrina incubada com a sPLA2) e sPLA2: Ácido gálico incubada com a sPLA2.

Neste primeiro experimento foram inoculados 20 µL através de injeção subplantar posterior direita, das moléculas isoladas e/ou incubadas 30 min com PLA2. No grupo controle negativo foi injetado 20 µL de solução salina (NaCl 0,9%); no controle positivo, 10 µg de sPLA2; no grupo das Miricitrina isoladas foi injetado 5 µg de cada composto e no grupo das Miricitrina incubadas 10 µg de sPLA2 foram incubadas previamente com 5 µg de cada Miricitrina. O monitoramento do volume do edema foi realizado através de hidropletismômetro durante 4h ou até a diminuição da inflamação do controle chegar a 20% da inicial. Após os testes, os camundongos foram anestesiados e sacrificados via deslocamento cervical.

3.8.2 Edema de pata.

Serão realizados modelos experimentais *in vivo* para avaliação da inflamação aguda causada pelo veneno, enzimas e compostos naturais que serão aplicados na região subplantar da pata direita 5µg/50ul com solução salina estéril de camundongos fêmea (n = 5). O monitoramento volume do edema será através de hidropletismômetro nos tempos 0, 30, 60, 120, 240 minutos de observação até a diminuição da inflamação do controle chegar a 20% da inicial. Após os testes, os camundongos serão anestesiados e eutanasiados.

Para a análise bioquímica e de biologia molecular, o sangue será coletado com heparina, centrifugado e o plasma separado e estocado a -80°C. Além disso, ao final do experimento amostras de 100 a 200 mg de tecido das patas serão coletados e congelados em nitrogênio líquido e posteriormente guardadas em um biofreezer a -80 °C até o momento do ensaio. Os tecidos provenientes das patas serão homogeneizados em um sistema

polytrondheimogenizer durante 15 segundos com 1mL de HTAB para cada 50mg de amostra. Após esta etapa os homogêneos serão agitados em vórtex e centrifugados em centrífuga de eppendorf a 4500xg por 5 minutos e os sobrenadantes obtido será então submetido a várias análises.

3.8.3 Atividade miotóxica.

Para avaliar a atividade miotóxicas serão inoculados no músculo gastrocnêmico direito numa concentração de 1 mg/mL o veneno, as proteínas e os compostos a serem escolhidas para os ensaios, tendo o sangue coletado da calda 30 minutos após a aplicação de 20 uL da proteína e/ou composto. O sangue será coletado com heparina, centrifugado e o plasma separado e estocado a -80°C para quantificação bioquímica e de biologia molecular. Além disso, ao final do experimento amostras de 100 a 200 mg de tecido das patas serão coletados e congelados em nitrogênio líquido e posteriormente guardadas em um biofreezer a -80°C até o momento do ensaio.

Os tecidos provenientes das patas serão homogeneizados em um sistema polytrondheimogenizer durante 15 segundos com 1mL de HTAB para cada 50mg de amostra. Após esta etapa os homogenatos serão agitados em vórtex e centrifugados em centrífuga de eppendorf a 4500xg por 5 minutos e os sobrenadantes obtido será então submetido a análises bioquímicas.

A atividade miotóxica propriamente dita será feita pela medida da atividade da enzima creatina quinase (CK) que será determinada utilizando-se 4 microlitros de plasma com 1.0 mL do reativo do kit CK-UV K010 (Bioclin) cinético incubado por 3 minutos a 37 °C e realizando-se leituras a 340nm após 3 minutos e a atividade creatina quinase será expressa em unidades/ litro.

3.9 . ANÁLISE ESTATÍSTICA.

Os dados serão expressos como média $\pm$ desvio padrão da média. Os resultados serão analisados por análise da variância (ANOVA) de uma ou duas vias seguida pelo teste a posteriori Dunnet ou Bonferroni. Valores de $p < 0,01$ iram ser considerados significativos. Para o ensaio enzimático, onde será realizada uma regressão linear, cuja angulação da reta será utilizada para encontrar a porcentagem de inibição, e seu erro os pontos de porcentagem.

4 RESULTADOS

Foi realizada a triagem sistematizada e tabelada, dos compostos das espécies *Bacchari spp.*, *Moquiniastrum spp.* e *Phyllanthus spp.*, com base na técnica de estudo das relações quantitativas entre a estrutura química e a atividade biológica ou alguma propriedade físico-química (QSAR/QSPR).

A modelação quantitativa das relações estrutura-atividade (QSAR) é uma técnica bem conhecida que se tem revelado extremamente útil em vários campos de investigação, incluindo o farmacêutico, a ecotoxicidade dos produtos químicos industriais, a ciência dos materiais. Esta técnica não só ajuda na triagem de produtos químicos, mas também fornece pistas para melhorar as propriedades físicas e (Bio) químicas de interesse.

A triagem foi realizada com preferência de artigos com acesso aberto, para consulta de dados concentrados nos indexadores NCBI; Google Acadêmico; Elsevier, gerando uma Tabela com a apresentação por Espécie vegetal e seus Flavonoides principais isolados, descritos e referenciados (ANEXO I).

Após a primeira triagem, realizamos a Tabela II, onde os mesmos compostos foram separados por compor o bioma Mata Atlântica e constar no RENISUS (Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS), com o respectivo potencial farmacológico (Brasil, 2009) (ANEXO II).

Por uma questão de nosso grupo de pesquisa BIOMOLPEP ter feito um extensivo uso de compostos como moléculas capazes de inibir a atividade farmacológica induzida pela sPLA2 de *Crotalus durissus terrificus* e tomando os dados das tabelas I e II, selecionamos para a Tabela III os compostos que constam em comum em pelo menos duas espécies dos gêneros selecionados e tenha espécies pesquisadas pelo RENISUS, presentes na Tabela II, continuando com a sistemática de base da metodologia QSAR (ANEXO III).

Com a triagem dos compostos, análise de suas estruturas e aplicações, selecionamos o fármaco ácido acetilsalicílico (AAS), que usamos para comparação da atividade anti-inflamatória com os compostos que selecionamos para os testes *in silico* e *in vivo*. A estrutura 2D foi retirada do banco de dados PubChem (ANEXO IV).

Nosso trabalho de triagem de compostos seguiu a regra dos cinco de Lipinski, realizamos uma visualização do perfil químico dos compostos. A plataforma SwissADME (Anexo V), apresentando características importantes na análise para que os compostos se enquadrem para um bom fármaco e relacionadas com as plantas medicinais usada no SUS.

Após esta etapa de triagem, continuamos os estudos de ancoragem molecular dos compostos selecionados (ácido cafeico, ácido salicílico, ácido gálico e miricitrina), frente a Cdt. sPLA2 (2qog) e para melhor compreender os resultados obtidos realizamos um dock molecular com o composto ácido gálico frente a Acetilcolinesterase de *Homo sapiens*, (Figura 3), onde as estruturas foram retiradas das plataformas PubChem e NCBI.

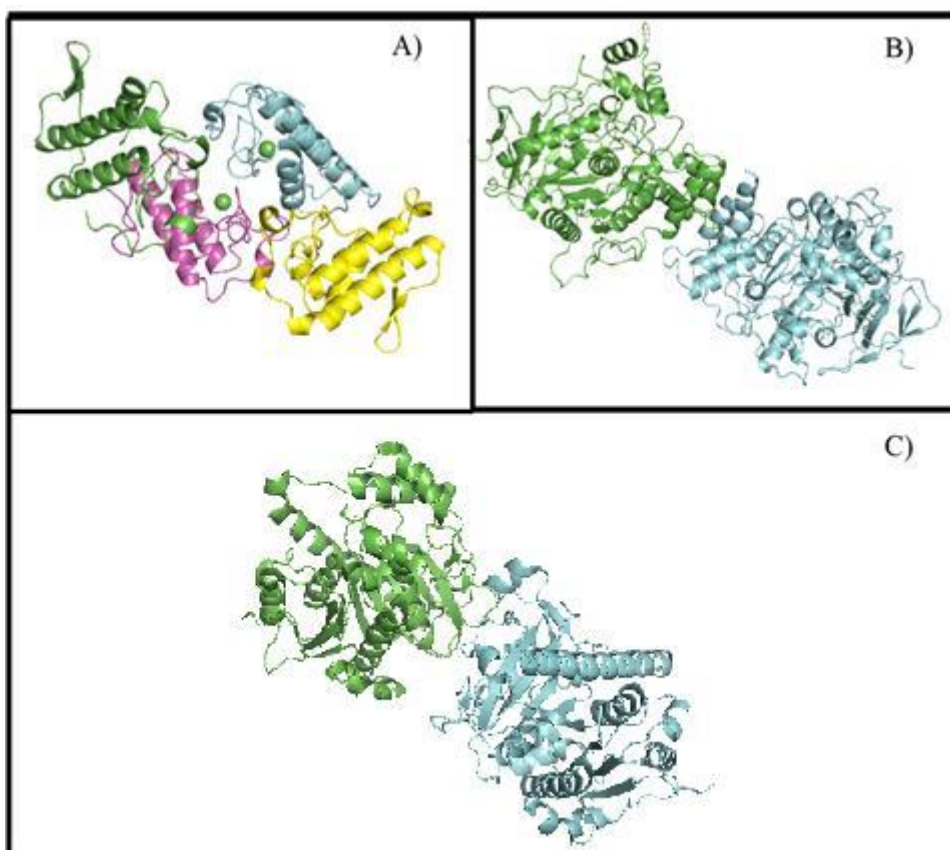


Figura 3. Estruturas Tridimensionais das proteínas utilizadas(3D). Figura 3 A – Fosfolipase A2 de *Crotalus durissus terrificus*, as esferas verdes representam o Cálcio; Figura 3 B – Acetilcolinesterase de *Homo sapiens*; Figura 3 C – Lp PLA2 de *Homo sapiens* (PDB 5i9i). A ordem de cor segue a ordem de cor do software Pymol sendo cadeias A (verdes) B (azuis) C (rosas) D (amarelas).

Após esta triagem, prosseguimos o estudo com as estruturas moleculares dos compostos em 3D, onde já se inicia a preparação para o docking molecular. Com o auxílio da plataforma Molinspiration, inserindo a nuvem eletrônica, evidenciando as propriedades de hidrofobicidade e hidrofobicidade de cada composto e suas relações a estrutura atividade, como podemos observar na Tabela V em (ANEXO VI). E temos na tabela VI mostrando o fármaco AAS em 3D também com as propriedades de hidrofobicidade e hidrofobicidade (ANEXO VII).

O processo de dock molecular teve duas etapas de refino de dados o primeiro refino foi pela plataforma SwissDock com 250 possíveis locais de ancoragem. Após essa etapa realizamos uma segunda ancoragem, com as coordenadas geradas pelo programa Autodock Tools para criação da Grid Box, nos locais onde a primeira ancoragem com SwissDock sinalizou possíveis interações.

Para conseguirmos localizar a melhor área para a Grid box, fizemos um estudo avaliando o encaixe e a sobreposição de PLA2 similares provenientes de venenos de cobras, os modelos cristalográficos já conhecidos e depositados no banco de dados RCSB-PDB. Também usamos uma análise de cavidades de interação para uma melhor comparação, utilizando assim a plataforma Cavity Plus, que nos gerou múltiplas cavidades de interação, seguindo o método de XU *et al.*, 2018, selecionamos os modelos que apresentaram interação mais forte com o composto, como podemos observar na (Figura 4).

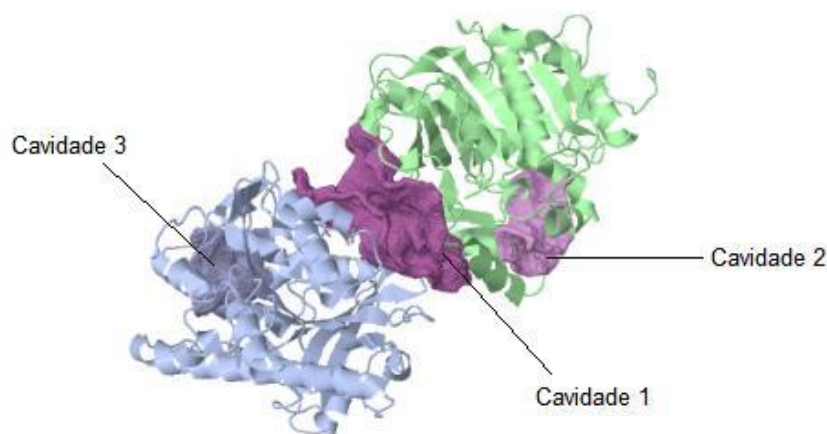


Figura 4. Representação do dímero da proteína PAF-AH de *Homo sapiens* interagindo com o composto. Ilustra as cavidades de interação do composto com a proteína. A cor segue a ordem de cor da plataforma CavityPlus, sendo a cadeia A (verdes) e B (azuis).

Seguindo o docking com o programa Autodock, geramos 10 modelos seguindo as coordenadas refinadas da Grid box que foram de acordo com o local de maior interação de compostos. Selecionamos entre os modelos o que apresentou melhor índice RMSD, pois para um modelo ser considerado relevante deve ter um valor de 0 - 6Å, sendo o melhor valor abaixo de 1,5Å (Bell; Zhang, 2019).

Seguindo esse parâmetro selecionamos um modelo de cada composto que estamos trabalhando, onde foi possível avaliar suas interações com a proteína. As interações que foram avaliadas foram os tipos de ligação, locais e a distância do composto com a proteína. E as imagens foram geradas no Discovery.

Definimos um padrão para analisar as interações entre os modelos de dock selecionados, para essa análise usamos os softwares, Discovery e o LigPlot Plus. Conseguimos analisar quais tipos de interação, locais de interação e suas respectivas forças.

Para uma melhor interpretação dos resultados dos compostos frente às proteínas, montamos uma tabela geral que mostra as ligações, os tipos de ligação, forças e distância média entre o composto e a respectivas proteínas (Anexo VIII, Anexo IX e Anexo X).

4.1 ÁCIDO CAFEICO

No nosso trabalho *in silico* o ácido cafeico como observamos na (Figura 5) interage no tetrâmero da sPLA2 de Cdt. com o Ácido Aspártico da cadeia C 49 de forma covalente em ponte de hidrogênio no principal aminoácido do sítio catalítico da proteína e com isso altera sua conformação. O composto mostrou interação com as tirosinas 28 e 52 da cadeia C por ligação de van der Waals que são aminoácidos de esteirases importantes. Além dessas ligações o composto interagiu com as glicinas do loop de cálcio. Ao todo o ácido cafeico apresentou 6 ligações no sítio ativo de proteína.

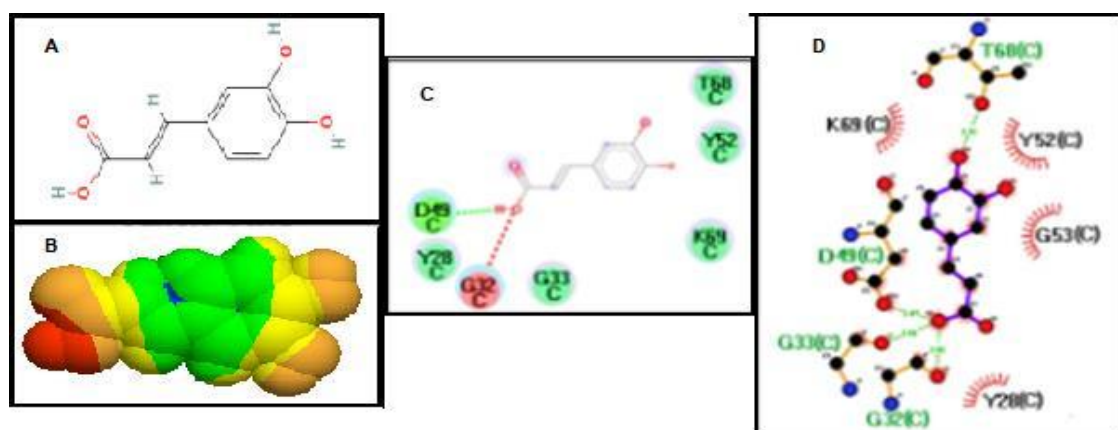


Figura 5. Representação *in silico* da proteína sPLA2 de Cdt com composto Ácido cafeico. Figura 7A está presente a estrutura química do composto ácido cafeico, na figura B mostra a superfície eletroestática representada em esferas do composto, imagem gerada pelo Molinspiration, na figura C está sua interação do composto com a proteína, imagem gerada pelo software Discovery. Figura D estão representadas as interações pelo software Lig Plot.

A atividade miotóxica do composto inibindo a PLA2 de Cdt foi determinada pela dosagem da enzima creatina quinase (CK) presente no plasma sanguíneo dos camundongos injetados, foi realizado também um comparativo com a PLA2 da Cdt pura, A concentração de

CK no plasma dos animais demonstrou que o composto conseguiu inibir a atividade máxima que a proteína atua como podemos ver no (Gráfico 1A).

No ensaio de edema de pata, foi possível observar um edema imediato após a administração da PLA2 na pata direita traseira do camundongo, onde a atividade edematogênica obteve seu máximo com volumes de edema de aproximadamente de 90 μ L (n=3 e p<0,001) como observamos no (Gráfico 1B). Porém quando realizado com a PLA2 incubada com o composto notamos uma diferença o pico do edema foi de aproximadamente de 70 μ L como mostra o (Gráfico 1B).

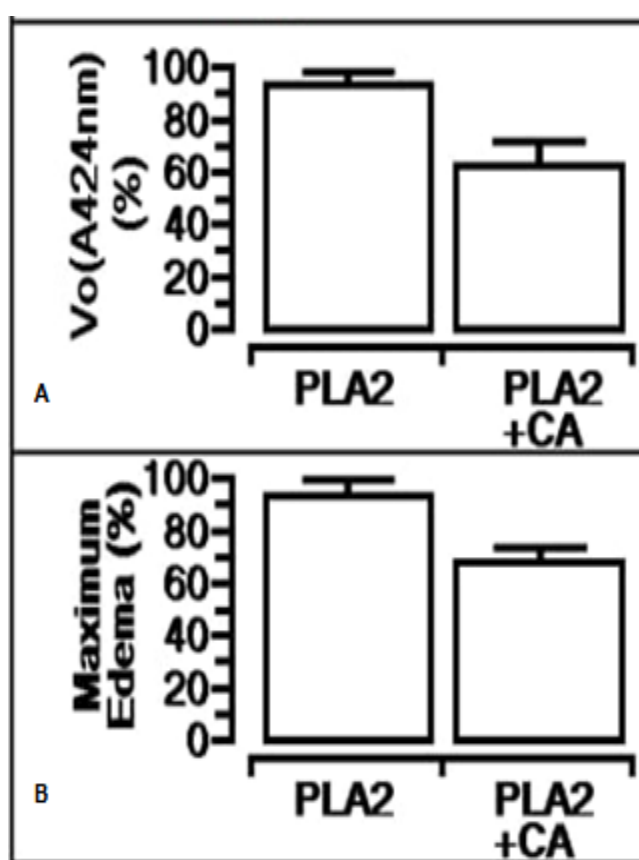


Gráfico 1. Ensaios in vivo do composto ácido cafeico. Gráfico A, ensaio de quebra da creatina quinase. Os dados foram expressos em média e desvio padrão (n=3) e a ANOVA foi utilizada como teste estatístico, com Dunnet como teste a posteriori. A proteína PLA2 foi administrada isoladamente, mostrando diferenças estatísticas em relação à PLA2 com o composto, que apresentou uma menor ação miotóxica. Gráfico B, Ensaio de volume de edema de pata quando a PLA2 é injetada via subplantar. Análise estatística ANOVA seguida de Bonferroni a posterior p <0,05.

Continuamos com nossas pesquisas com o composto ácido cafeico em testes *in silico* com o Fator de Agregação plaquetária acetilhidrolase (PAF-AH), que é caracterizada como uma enzima esteárica pertencente à inflação e coagulação, também realizamos testes *in silico*

com a AchE, caracterizada como uma enzima esteárica pertencente à comunicação muscular, para um melhor entendimento da atuação do composto em via sistêmica.

Nossos estudos *in silico* mostraram que o composto pode interagir com duas cavidades da PAF-AH, por serem as cavidades do sítio realizamos a grid box diretamente na cavidade 2 pois conta o sítio ativo da subunidade A do dímero, a proteína tem subunidades simétrica como podemos observar na (Figura 6).

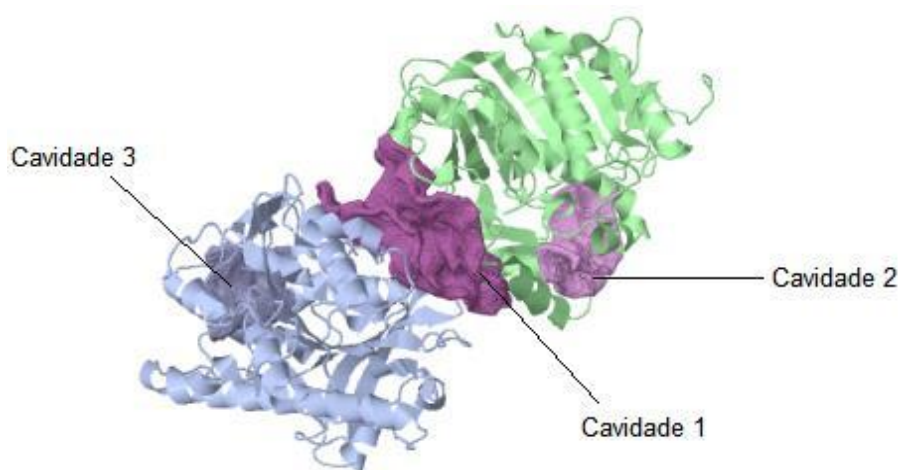


Figura 6. ilustra as cavidades de interação do composto com a proteína. A cor segue a ordem de cor da plataforma CavityPlus, sendo a cadeia A (verdes) e B (azuis).

O composto interage com o bolsão de aminoácidos que estão em torno do sítio ativo da proteína podendo assim alterar sua conformação, como podemos observar na (Figura 8), frente a PAF-AH.

O composto tem uma ligação de ponte de hidrogênio com o aminoácido lisina 109 e com aminoácido triptofano 105 por ligação Pi-pi *stacked* que se refere a uma atração, não covalente entre anéis aromáticos ambos da cadeia A.

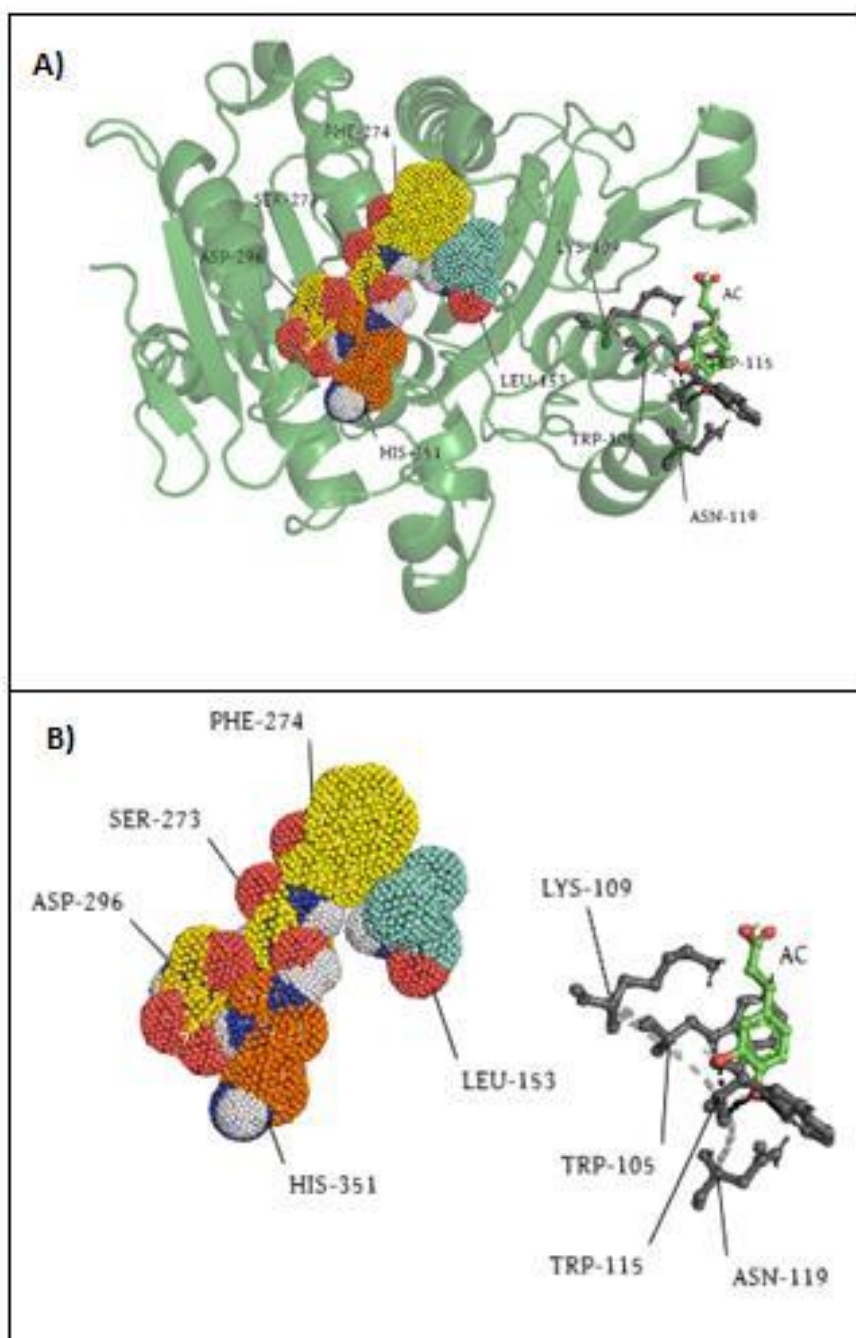


Figura 7. Representação do monômero de PAF- AH de *Homo sapiens* (PDB 3D59), em sua forma tridimensional, com os aminoácidos de onde o composto interage. Imagens geradas pelo software Pymol. A Figura 6A, ilustra a interação do composto com a proteína. Na Figura 6B, ilustra a interação do composto com a proteína, mostrando a nuvem eletrônica destacada da interação com os aminoácidos.

Nossos resultados em *in silico* com a AchE, mostraram que o composto ácido cafeico, pode interagir em duas cavidades da AchE por serem as cavidades do sítio, como podemos observar na (Figura 8), realizamos a grid box diretamente na cavidade 3 que abrange o sítio ativo da subunidade A do dímero, pois a proteína tem subunidades simétrica.

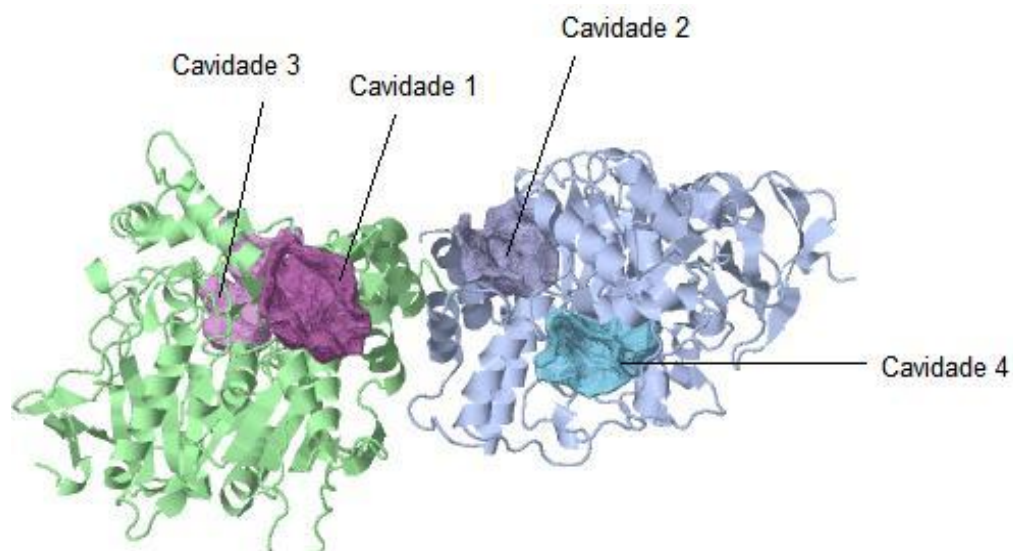


Figura 8. ilustra as cavidades de interação do composto com a proteína. A cor segue a ordem de cor da plataforma CavityPlus, sendo a cadeia A (verdes) e B (azuis).

Na (figura 9) podemos observar as interações do composto com a proteína, pois foi realizado o dock molecular na cavidade 3, onde o composto interage com dois aminoácidos do sítio ativo, Ser 203 e His 447 por ligação de van der Waals, podemos ver figura que o composto interage com outros aminoácidos que estão entorno no sítio.

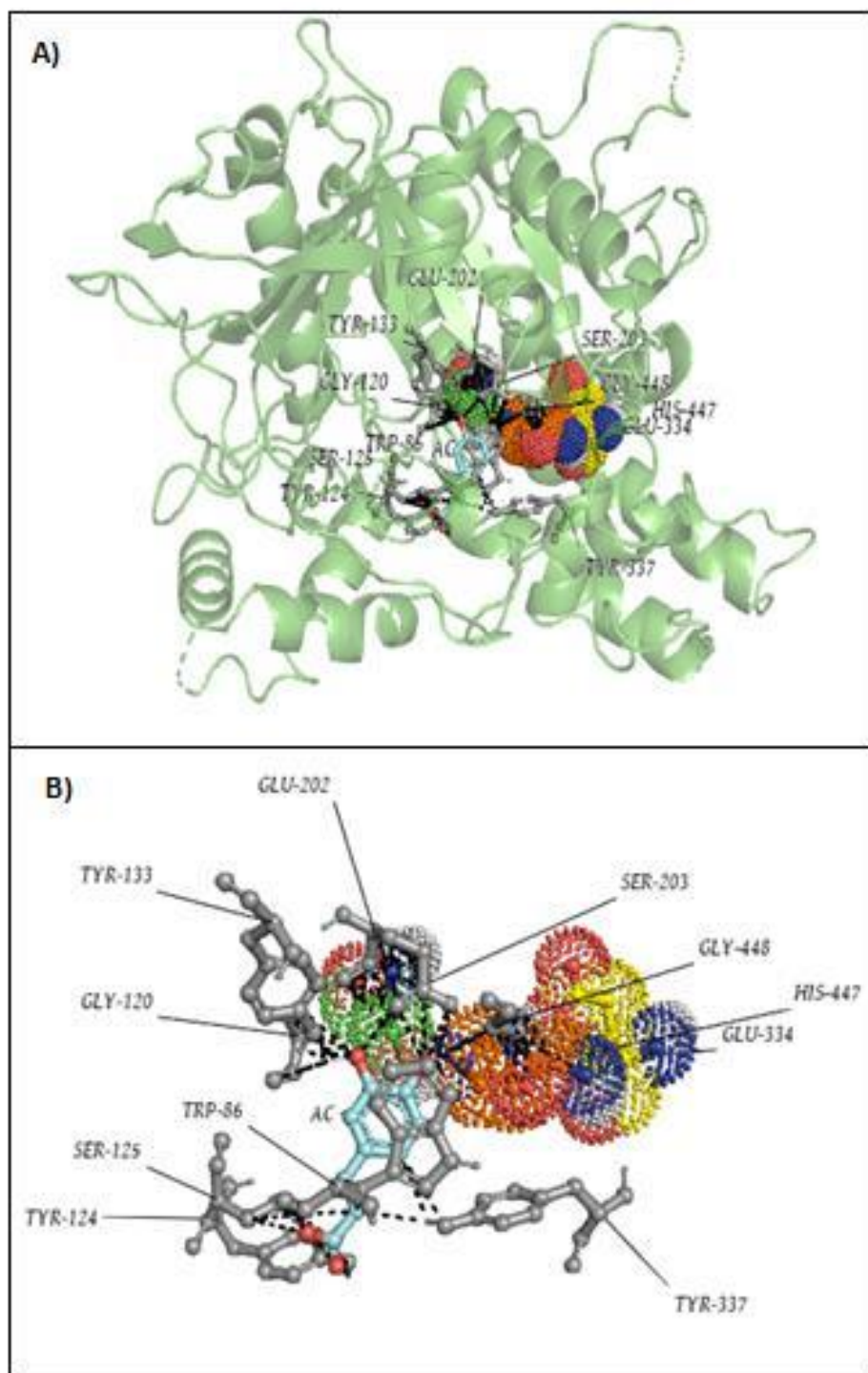


Figura 9. Representação do monômero de AchE de *Homo sapiens* (4M0E), em sua forma tridimensional, com os aminoácidos de onde o composto interage. Imagens geradas pelo software Pymol. Na Figura 9A, ilustra a interação do composto com a proteína. A Figura 9B, ilustra a interação do composto com a proteína, com os aminoácidos essenciais do sítio catalítico com a nuvem eletrônica destacada.

No diagrama em 2D (Figura 10) podemos observar as interações com sitio ativo e com outros aminoácidos, como a tirosina 124 e 133 que realiza ligação por ponte de hidrogênio, triptofano 86 por ligação Pi-pi *stacked*, todas ligações na cadeia A. Também realiza ligação com a serina 125 e com as glicinas 126 e 448.

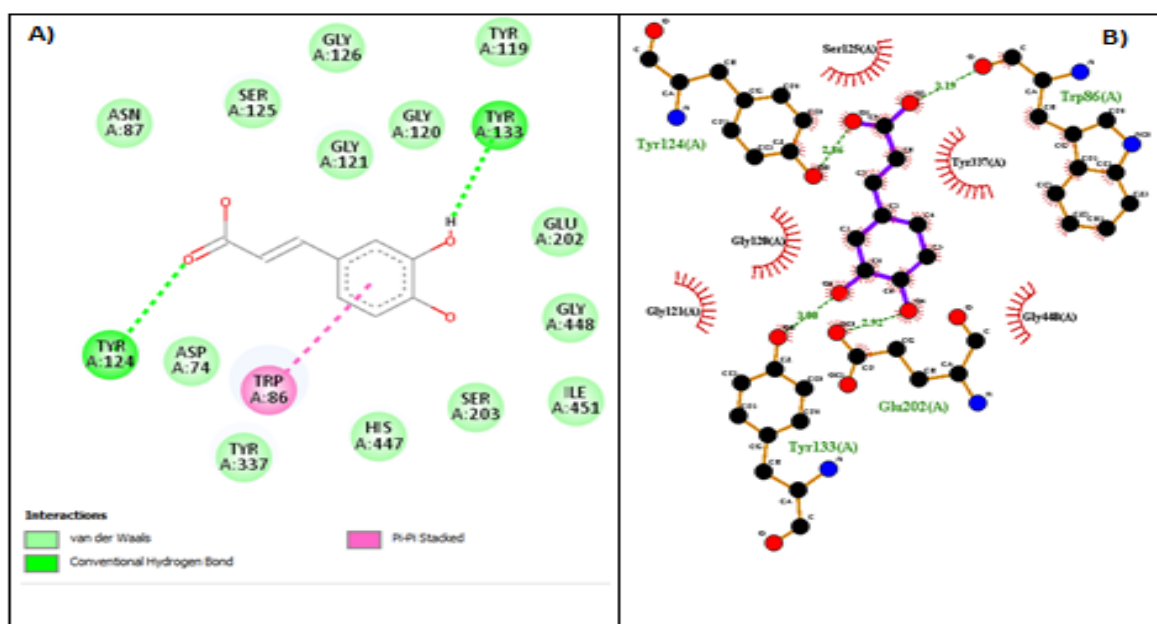


Figura 10. Representação das interações do composto com a proteína. Na Figura 11A, ilustra a interação do composto com a proteína, imagem obtida pelo software Discovery; na Figura 11B, estão representadas as interações pelo software Lig Plot.

4.2 ÁCIDO ACETILSALICÍLICO (AAS)

No nosso resultado de docking molecular o fármaco ASS interage com as três cadeias da sPLA2 de Cdt, apresentando apenas duas ligações não sendo de van der Waals, uma é com a leucina 3 da cadeia B e com a lisina 7 também da cadeia B ambas por ligação de π -Alkyl, como podemos observar na (Figura 11)

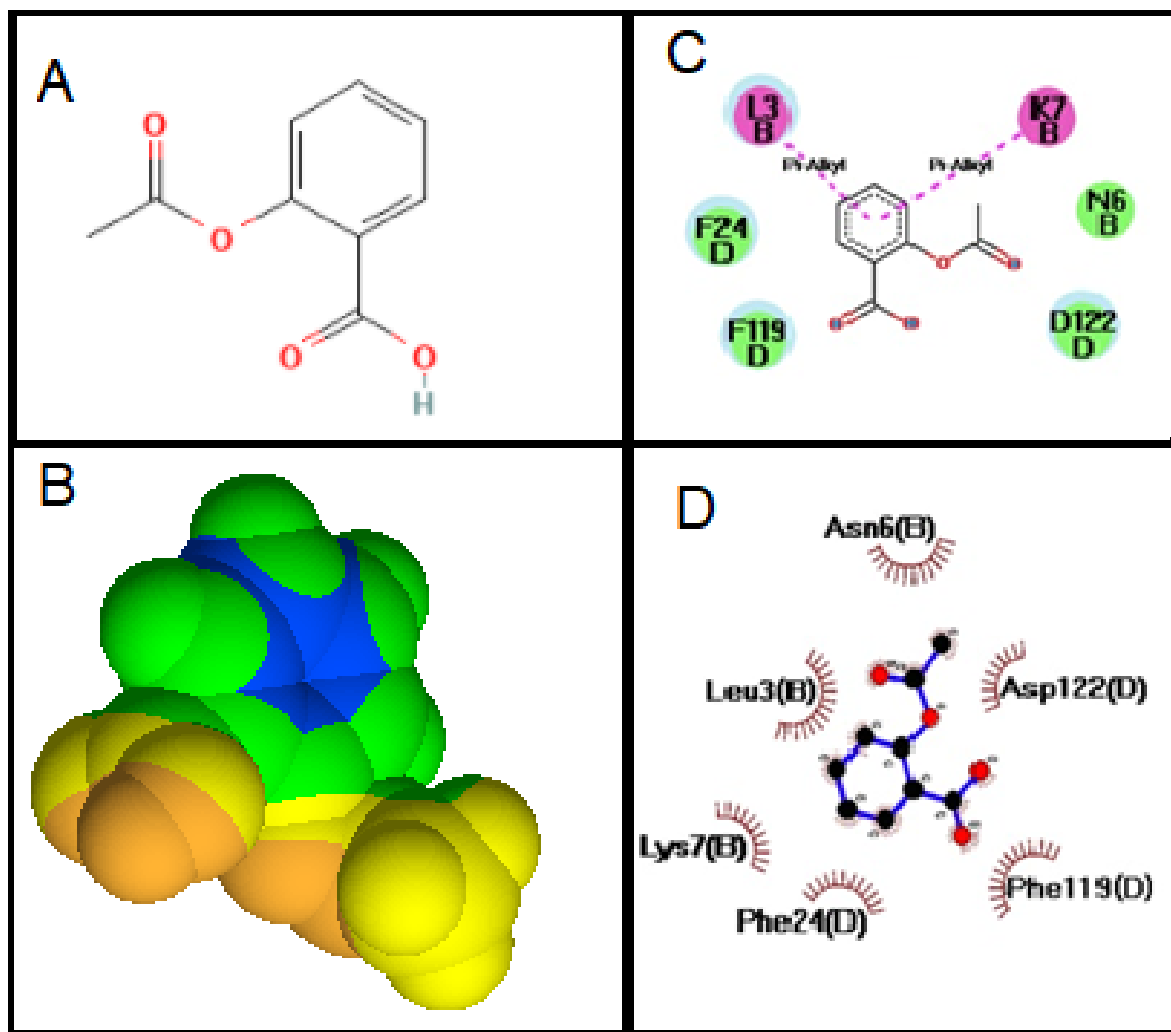


Figura 11. Representação *in silico* da proteína sPLA2 de Cdt com fármaco Ácido Acetil Salicílico (AAS). Figura 11A está presente sua estrutura química, na figura 11B mostra a superfície eletroestática representada em esferas do composto, imagem gerada pelo Molinspiration, na figura 11 C está sua interação do composto com a proteína, imagem gerada pelo software Discovery. Figura 11D estão representadas as interações pelo software Lig Plot.

A atividade miotóxica do fármaco ácido acetilsalicílico (AAS), inibindo a PLA2 de Cdt foi determinada pela dosagem da enzima creatina quinase (CK) presente no plasma sanguíneo dos camundongos injetados, foi realizado também um comparativo com a PLA2 da Cdt pura, A concentração de CK no plasma dos animais demonstrou que o fármaco diminuiu levemente a atividade máxima que a PLA2 atua como podemos ver no (Gráfico 2A).

Podemos observar no ensaio de edema de pata o edema imediato após a administração da PLA2 na pata direita traseira do camundongo, onde a atividade edematogênica obteve seu máximo com volumes de edema de aproximadamente de 90 μ L (n=3 e p<0,001) como observamos no (Gráfico 1B). Quando realizamos a PLA2 incubada com o composto notamos uma diferença do pico máximo do edema de 10 μ L como mostra o (Gráfico 2B).

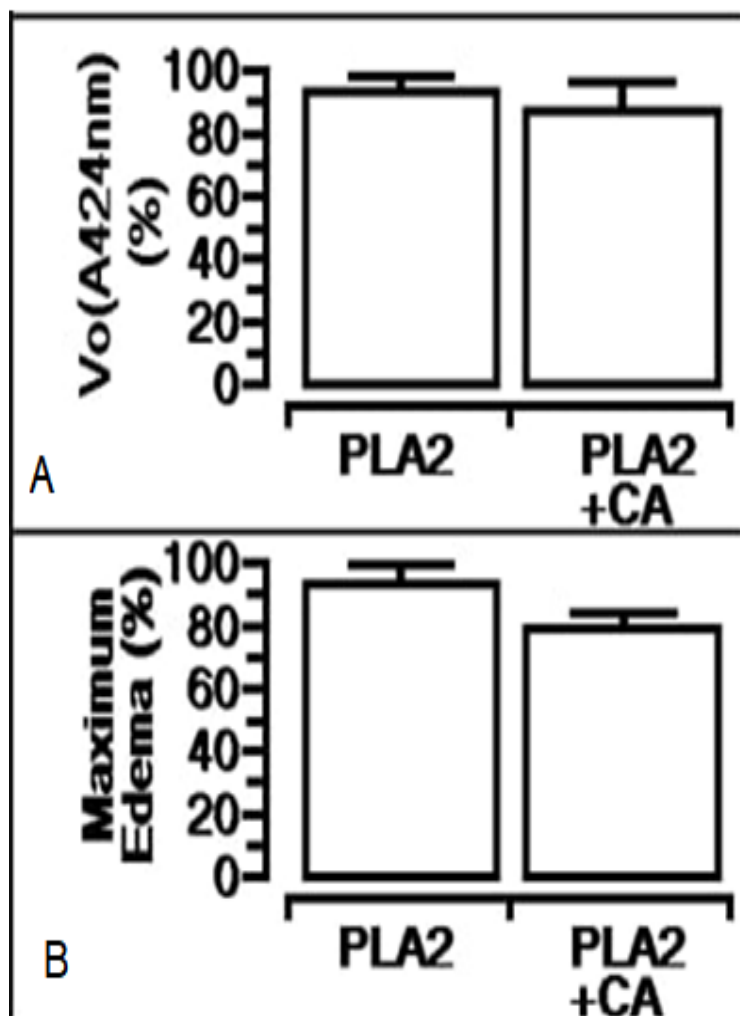


Gráfico 2. Ensaios in vivo do fármaco ácido acetilsalicílico (AAS). Gráfico A, ensaio de quebra da creatina quinase. Os dados foram expressos em média e desvio padrão (n=3) e a ANOVA foi utilizada como teste estatístico, com Dunnet como teste a posteriori. A proteína PLA2 foi administrada isoladamente, mostrando diferenças estatísticas em relação à PLA2 com o composto, que apresentou uma leve diminuição ação miotóxica. Gráfico B, Ensaio de volume de edema de pata quando a PLA2 é injetada via subplantar. Análise estatística ANOVA seguida de Bonferroni a posterior p <0,05.

Continuamos com nossas pesquisas com o composto AAS em testes *in silico* com o Fator de Agregação plaquetária acetilhidrolase (PAF-AH), que é caracterizada como uma enzima esteárica pertencente à inflação e coagulação, também realizamos testes *in silico* com

a AchE, caracterizada como uma enzima esteárica pertencente à comunicação muscular, para um melhor entendimento da atuação do composto em via sistêmica.

Nossos estudos *in silico* mostraram que o composto AAS pode interagir em duas cavidades da PAF-AH, por serem as cavidades do sítio realizamos a grid box diretamente na cavidade 2 pois conta o sítio ativo da subunidade A do dímero, a proteína tem subunidades simétrica como podemos observar na (Figura 12).

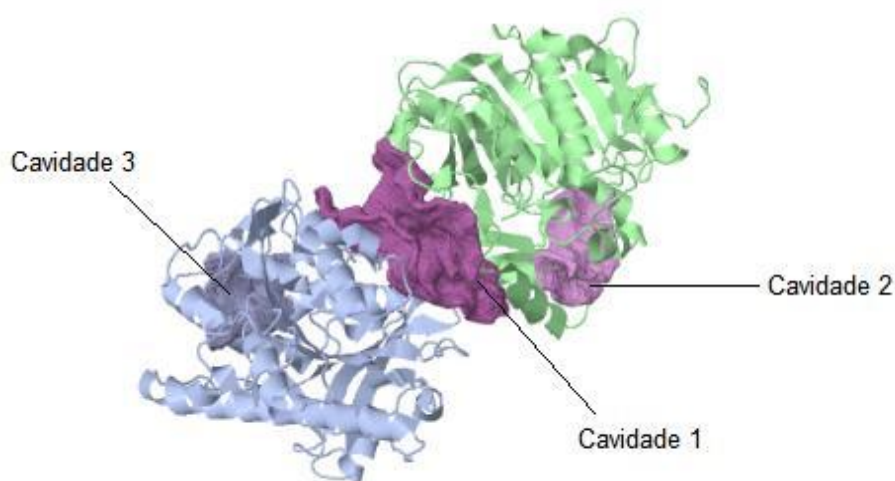


Figura 12. Ilustra as cavidades de interação do composto com a proteína. A cor segue a ordem de cor da plataforma CavityPlus, sendo a cadeia A (verdes) e B (azuis).

Na (figura 13) podemos observar as interações do composto com a proteína, pois foi realizado o dock molecular na cavidade 2 seguindo os parâmetros de escolher o melhor dock molecular conforme a interação com as cavidades. O composto interage com aminoácidos que estão perto sítio do ativo e fazem ligação por van der Waals com a glicina 118 e lisina109 e ligações por ponte de hidrogênio com triptofano 105 e com a asparagina 119, todos esses aminoácidos sendo da cadeia A.

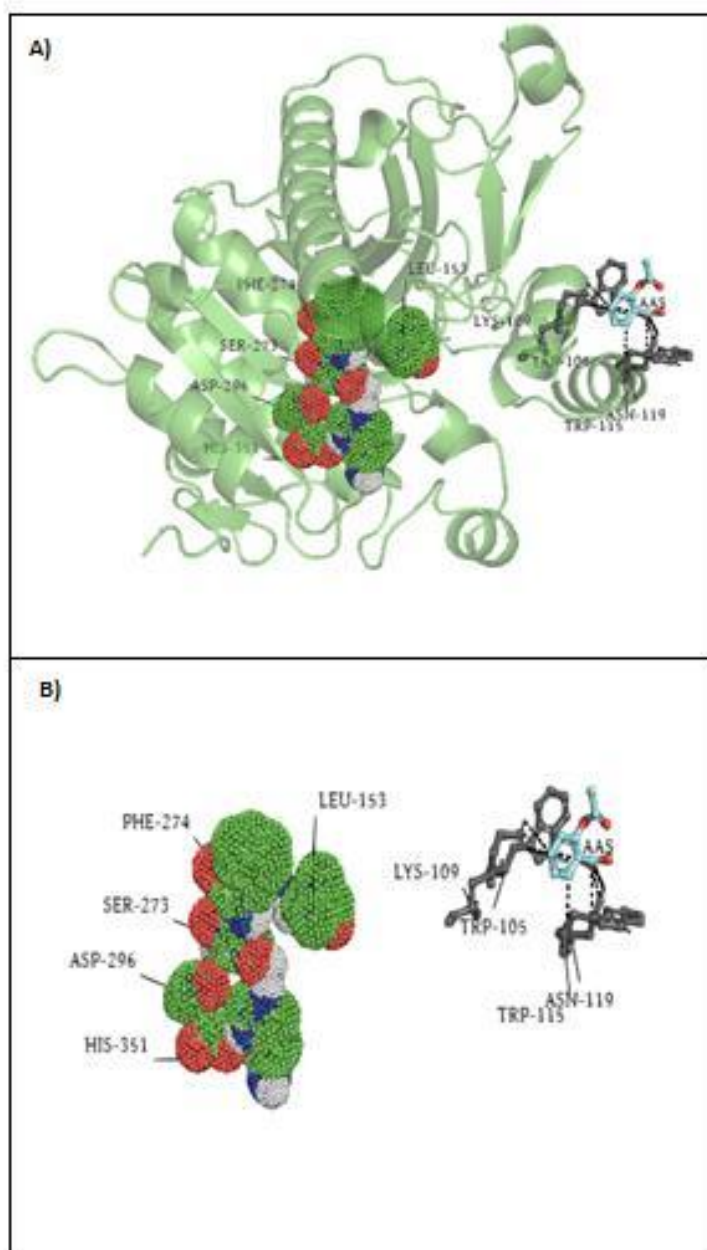


Figura 13. Representação do monômero de PAF- AH de *Homo sapiens* (PDB 3D59), em sua forma tridimensional, com os aminoácidos de onde o composto interage. Imagens geradas pelo software Pymol. A Figura 13A, ilustra a interação do composto com a proteína. Na Figura 13B, ilustra a interação do composto com a proteína, mostrando a nuvem eletrônica destacada da interação com os aminoácidos.

Nossos resultados em *in silico* com a AchE, mostraram que o composto AAS pode interagir em quatro cavidades da AchE por serem as cavidades do sítio, como podemos observar na (Figura 14), realizamos a grid box diretamente na cavidade 3 que abrange o sítio ativo da subunidade A do dímero, pois a proteína tem subunidades simétrica.

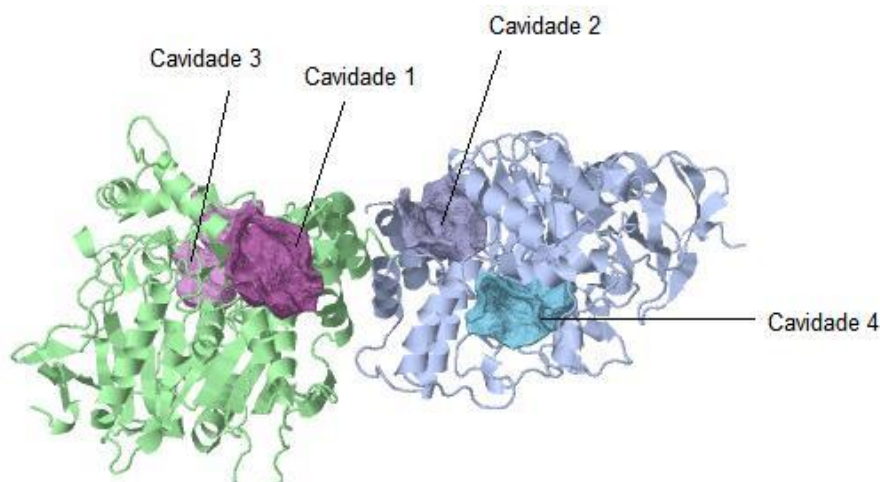


Figura 14. Ilustra as cavidades de interação do composto com a proteína. A cor segue a ordem de cor da plataforma CavityPlus, sendo a cadeia A (verdes) e B (azuis).

Na (figura 15) podemos observar as interações do composto AAS com a proteína, pois foi realizado o dock molecular na cavidade 3, onde o composto apresentou melhor interação com aminoácidos. Porém podemos observar pelo dock que a interação ocorre com aminoácidos que estão entorno no sítio. Mas essas ligações podem realizar alteração na conformidade da proteína por serem ligações fortes e próximas do sítio ativo.

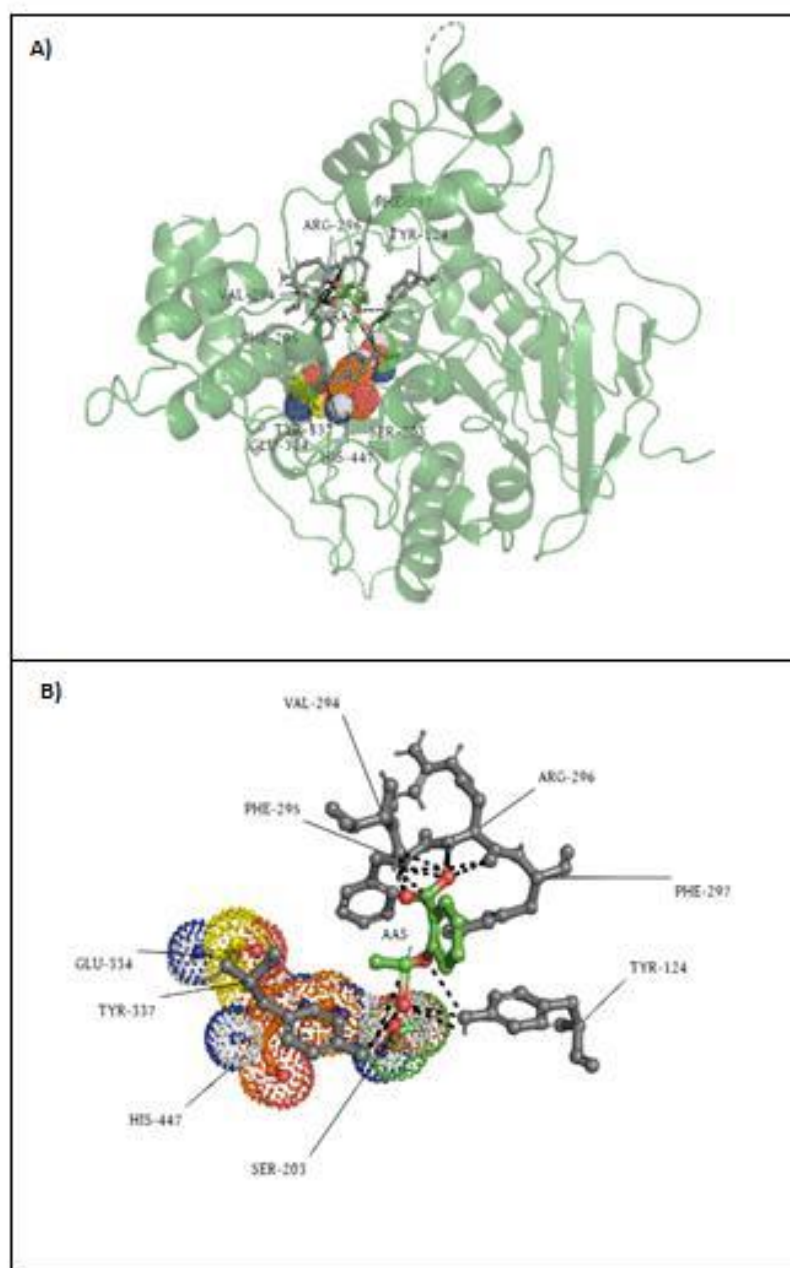


Figura 15. Representação do monômero de AchE de *Homo sapiens* (4M0E), em sua forma tridimensional, com os aminoácidos de onde o composto interage. Imagens geradas pelo software Pymol. Na Figura 15A, ilustra a interação do composto com a proteína. A Figura 15B, ilustra a interação do composto com a proteína, com os aminoácidos essenciais do sítio catalítico com a nuvem eletrônica destacada.

No diagrama em 2D (Figura 16) podemos observar as interações que composto realiza com os aminoácidos, sendo possível ver que ele faz 26 ligações sendo dessas 17 são ligações fortes como covalentes e ponte de hidrogênio. O composto se interage com a fenilalanina 295, tirosina 124 e 337 e arginina 296 por ponte de hidrogênio.

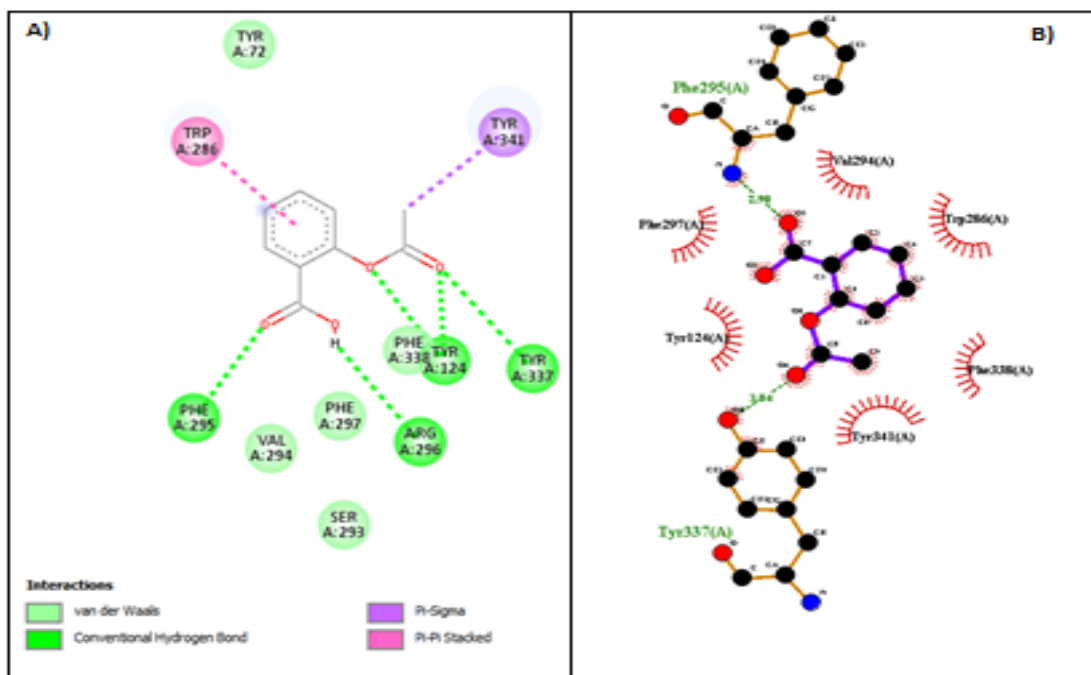


Figura 16. Representação das interações do composto com a proteína. Na Figura 16A, ilustra a interação do composto com a proteína, imagem obtida pelo software Discovery; na Figura 16B, estão representadas as interações pelo software Lig Plot.

4.3 ÁCIDO GÁLICO

O composto ácido gálico foi que obteve melhor resultado no docking molecular entre os compostos selecionados como observamos na (Figura 17). Com a cisterna da cadeia B o composto possui 5 ligações sendo uma de Pi sulfúrio e 4 ligações de ponte de hidrogênio. Ainda apresentou ligações com histidina da cadeia B 48, ácido aspártico da cadeia B 49 e com cálcio da cadeia B também 134, ligações importantes para conformação e estabilidade da proteína. A média de distância nas interações foi de 3,33, mostrando 9 ligações com sítio ativo da proteína.

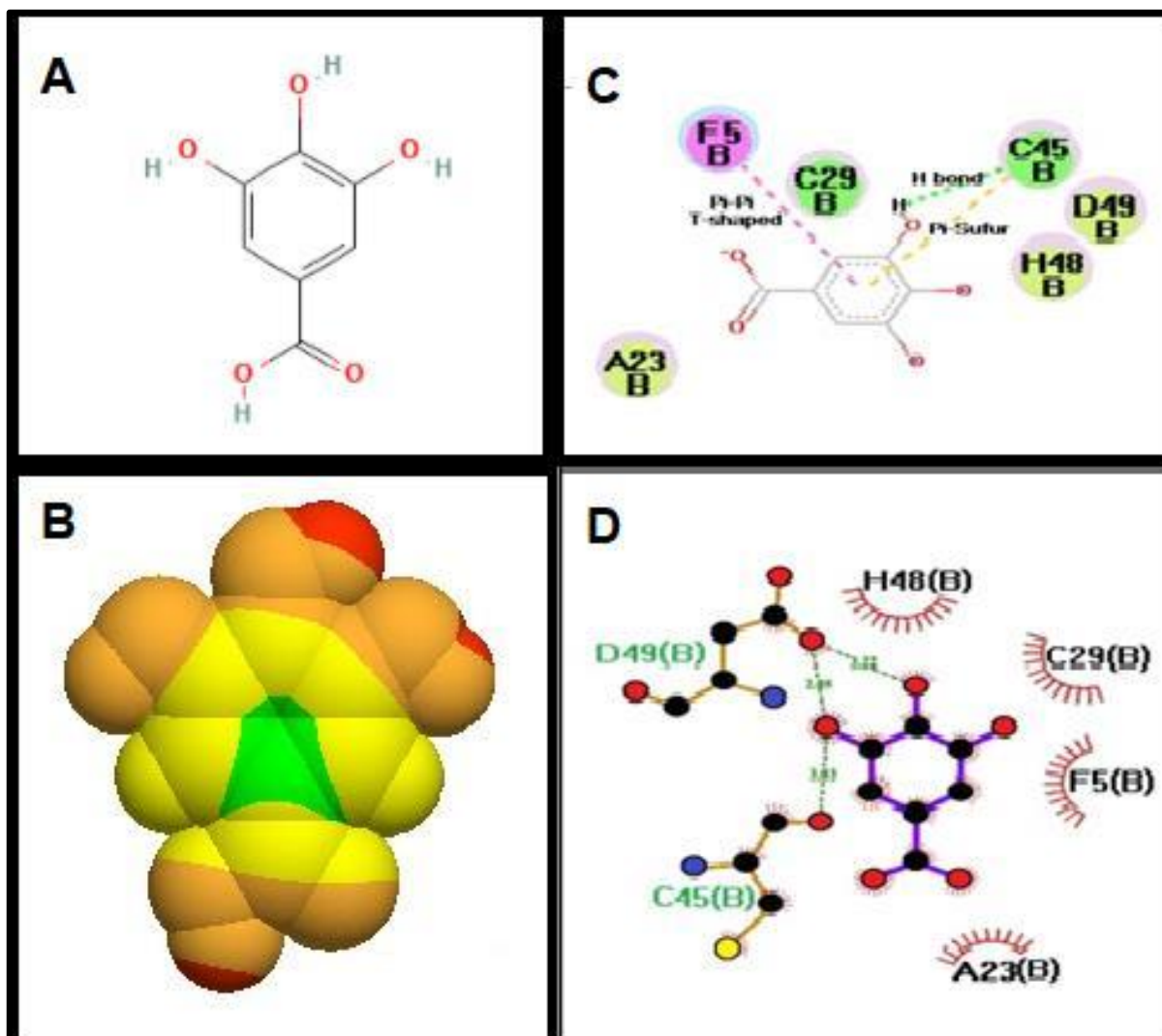


Figura 17. Representação in silico da proteína sPLA2 de Cdt com Ácido gálico. Figura 17A estrutura química do composto, na figura 17B mostra a superfície eletroestática representada em esferas do composto, imagem gerada pelo Molinspiration, na figura 17C está sua interação do composto com a proteína, imagem gerada pelo software Discovery. Figura 17D está representada pelas interações apresentada pelo software Lig Plot.

A atividade miotóxica do composto ácido gálico inibindo a PLA2 de Cdt foi determinada pela dosagem da enzima creatina quinase (CK) presente no plasma sanguíneo dos camundongos injetados, foi realizado também um comparativo com a PLA2 da Cdt pura, A concentração de CK no plasma dos animais demonstrou que o composto reduziu a atividade máxima de miotóxica da PLA2 de 90 μ L para 20 μ L como podemos ver no (Gráfico 3A).

Observamos no ensaio de edema de pata, que o edema causado pela administração da PLA2 na pata direita traseira do camundongo, onde a atividade edematogênica obteve seu máximo com volumes de edema de aproximadamente acima de 90 μ L ($n=3$ e $p<0,001$) como observamos no (Gráfico 3B). Quando analisado com a PLA2 incubada com o composto notamos uma diferença do pico máximo do edema para 40 μ L como mostra o (Gráfico 3B), sendo que o pico máximo da PLA2 sem o composto foi de um pouco mais de 90 μ L.

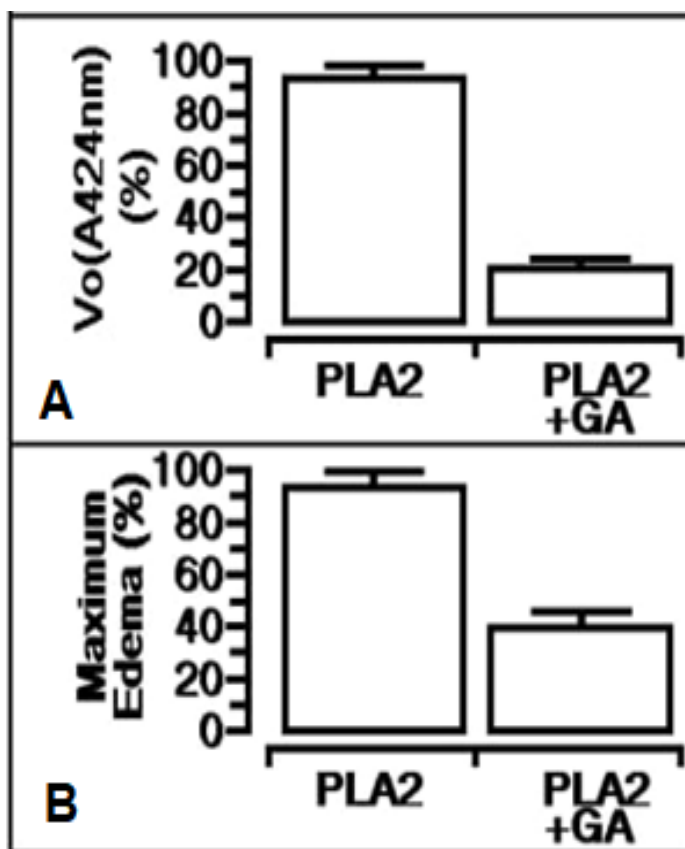


Gráfico 3. Ensaios in vivo do composto ácido gálico. Gráfico A, ensaio de quebra da creatina quinase. Os dados foram expressos em média e desvio padrão (n=3) e a ANOVA foi utilizada como teste estatístico, com Dunnet como teste a posteriori. A proteína PLA2 foi administrada isoladamente, mostrando diferenças estatísticas em relação à PLA2 com o composto, que apresentou uma significativa redução da atividade miotóxica. Gráfico B, Ensaio de volume de edema de pata quando a PLA2 é injetada via subplantar. Análise estatística ANOVA seguida de Bonferroni a posteriori $p < 0,05$.

Podemos observamos (Figura 18A) em destaque na cor rosa os aminoácidos que interage com sitio ativo da proteína, a histidina 48, alanina 23, cisteína 29, fenilalanina 5 e com o ácido aspértico 49. Na (Figura 18B) observamos uma imagem do centro catalitico da proteína, imagem gerada pela plataforma RCSB. A imagem mostra a superfície da proteína com as quatro subunidades destacadas por cores diferentes e o sítio da proteína e de ligação consta respectivamente destacados por setas. No teste de dicróismo circular (CD) como podemos ver na (Figura 18C) apresenta as diferenças estruturais do composto com da sPLA2, em verde temos o composto e em vermelho a sPLA2.

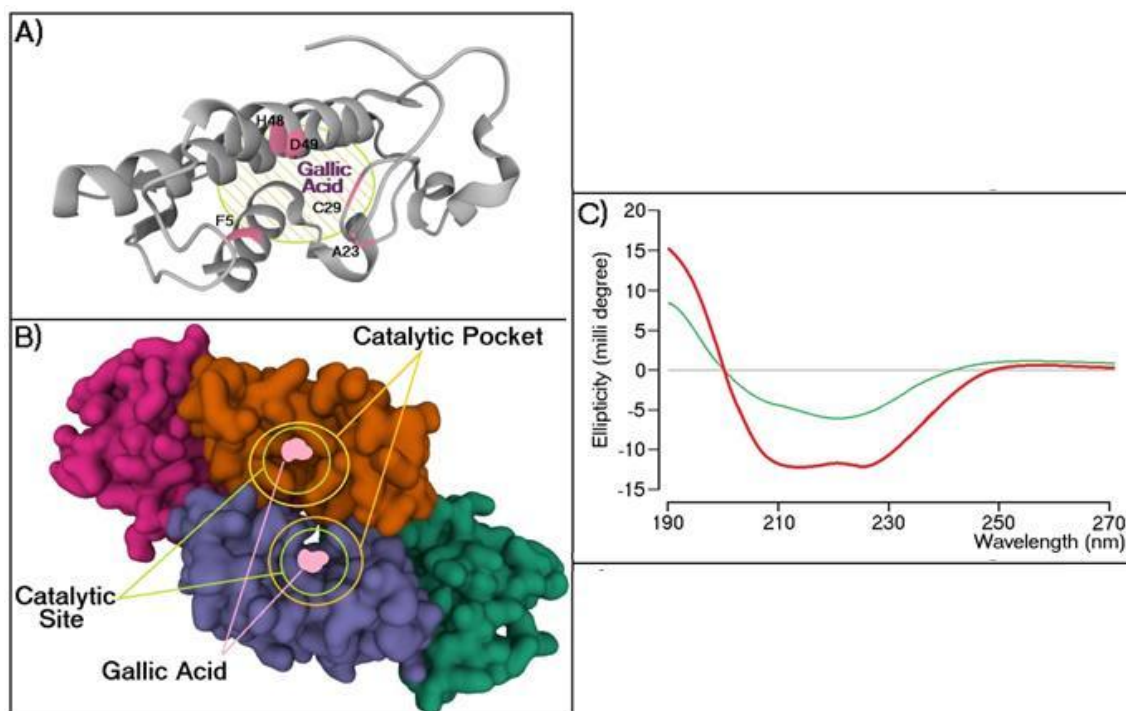


Figura 18. Representação tetrâmero da proteína sPLA2 de Cdt. Imagens retiradas da plataforma RCSB, Figura 18A, feita pela plataforma RCSB, onde vemos apenas o monômero de interação com seu sítio destacado na cor rosa, na figura 18B, foi feita pela plataforma RCSB, onde observamos superfície da proteína com as quatro subunidades destacadas por cor, com centro catalítico da proteína e de ligação estão respectivamente destacados por setas, na figura 18C. Dicroísmo circular analisado em 190 a 260nm, amostras com concentração de 0,01mg/ml. A análise do perfil (registro da absorção diferenciada da luz polarizada) foi dada pelo programa Spectra manager®. Representado pela cor vermelha a sPLA2 e em verde o composto.

Seguimos com nossos testes *in silico* com o composto ácido gálico frente ao Fator de Agregação plaquetária acetilhidrolase (PAF-AH), que é caracterizada como uma enzima esteárica pertencente à inflação e coagulação, também realizamos testes *in silico* com a AchE, caracterizada como uma enzima esteárica pertencente à comunicação muscular, para um melhor entendimento da atuação do composto em via sistêmica, visto que esse composto apresenta boa interação com as proteínas já testadas anteriormente.

Nossos estudos *in silico* mostraram que o composto pode interagir em duas cavidades da PAF-AH, por serem as cavidades do sítio realizamos a grid box diretamente na cavidade 2 pois conta o sítio ativo da subunidade A do dímero, a proteína tem subunidades simétrica como podemos observar na (Figura 19).

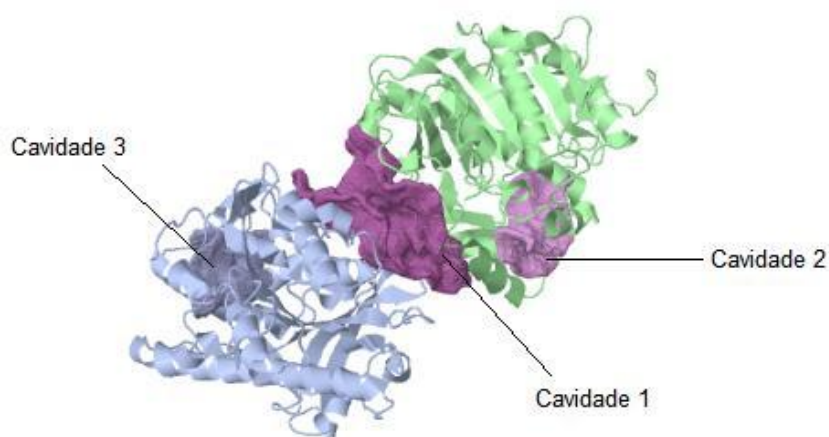


Figura 19. Ilustra as cavidades de interação do composto com a proteína. A cor segue a ordem de cor da plataforma CavityPlus, sendo a cadeia A (verdes) e B (azuis).

Na (figura 20) podemos observar as interações do composto com a proteína, pois foi realizado o dock molecular na cavidade 2 seguindo os parâmetros de escolher o melhor dock conforme a interação com as cavidades. O composto não interage com os aminoácidos do sítio ativo, porém faz ligação com as glicinas que estão associadas ao loop de cálcio da proteína. Essas ligações são por ponte de hidrogênio e por van der Waals.

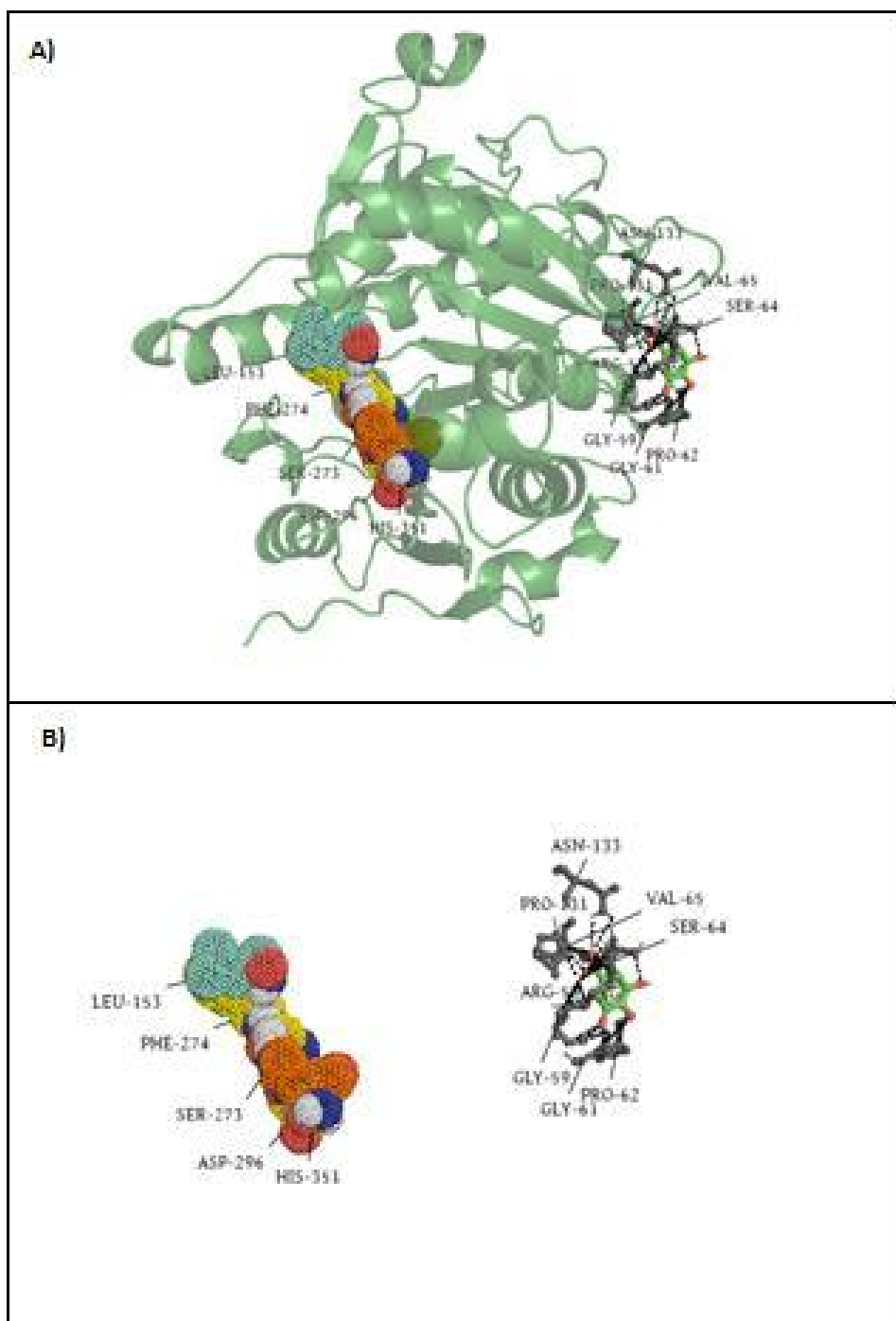


Figura 20. Representação do monômero de PAF- AH de *Homo sapiens* (PDB 3D59), em sua forma tridimensional, com os aminoácidos de onde o composto interage. Imagens geradas pelo software Pymol. A Figura 20A, ilustra a interação do composto com a proteína. Na Figura 20B, ilustra a interação do composto com a proteína, mostrando a nuvem eletrônica destacada da interação com os aminoácidos.

Nossos resultados em *in silico* com a AchE, mostraram que o composto pode interagir em duas cavidades da AchE, como podemos observar na (Figura 21), realizamos a grid box diretamente na cavidade 3 que abrange o sítio ativo da subunidade A do dímero, pois a proteína tem subunidades simétrica.

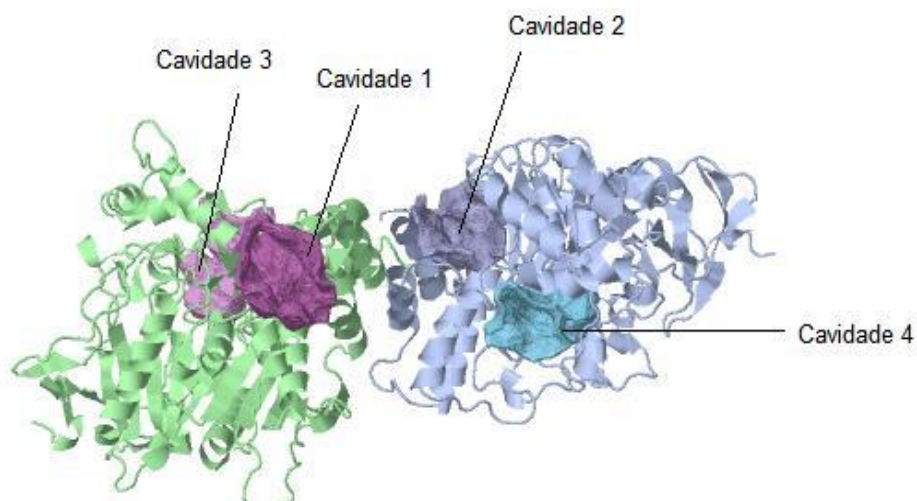


Figura 21. Ilustra as cavidades de interação do composto com a proteína. A cor segue a ordem de cor da plataforma CavityPlus, sendo a cadeia A (verdes) e B (azuis).

Na (figura 22) podemos observar as interações do composto com a proteína, pois foi realizado o dock molecular na cavidade 3, onde o composto apresentou melhor interação com aminoácidos. Pelo dock podemos ver que o composto interage com aminoácidos do sítio ativo da proteína e com as glicinas que atuam no loop de cálcio.

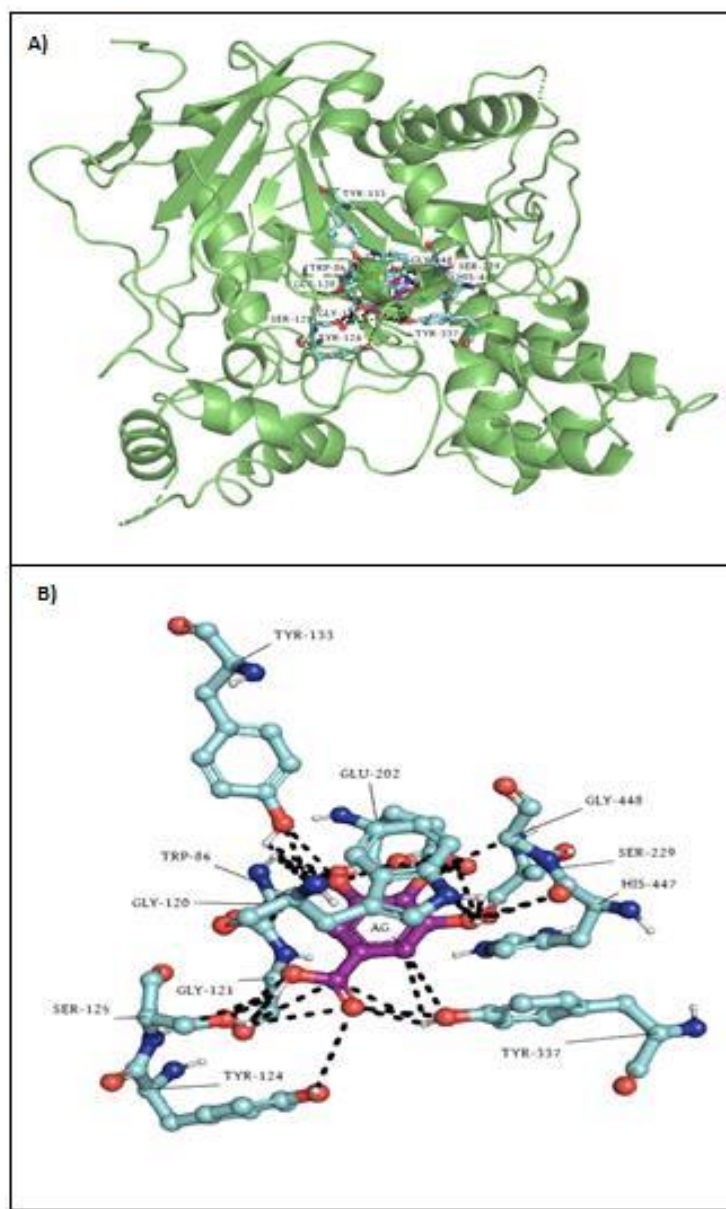


Figura 22. Representação do monômero de AchE de *Homo sapiens* (4M0E), em sua forma tridimensional, com os aminoácidos de onde o composto interage. Imagens geradas pelo software Pymol. Na Figura 22A, ilustra a interação do composto com a proteína. A Figura 22B, ilustra a interação do composto com a proteína, com os aminoácidos essenciais do sítio catalítico com a nuvem eletrônica destacada.

Seguindo os testes *in silico* com composto ácido gálico frente à Acetilcolinesterase (AchE), para título de comparação com os outros compostos que foram trabalhados no projeto, abrindo a ideia de interação de flavonoides e compostos fenólicos não interagem somente com Fosfolipase, porém também como outras proteínas que tenham seu sítio catalítico ativo. Na (Figura 23) podemos observar o composto interagindo com a AchE, ele interagiu com as tirosinas 133, 337 da cadeia A pôr ponte de hidrogênio, que são aminoácidos

importante na esteirases. Também interagiu com as glicinas 120, 121 e 448. A média de distância nas interações foi de 3,02, mostrando 3 ligações com sítio ativo da proteína.

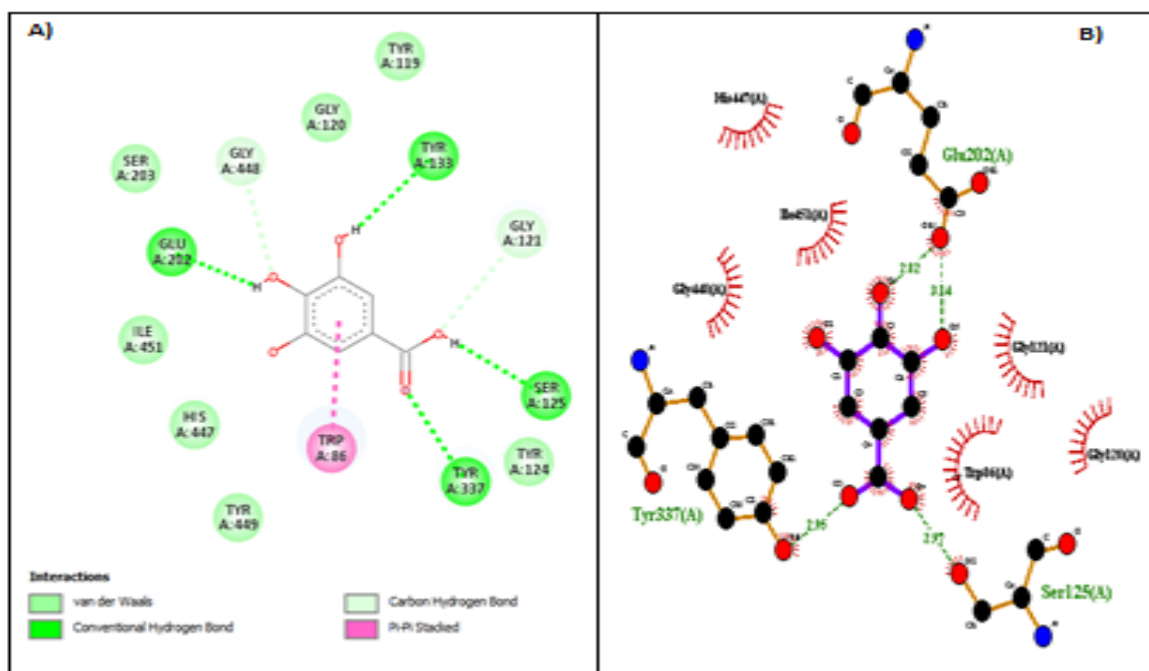


Figura 23. Representação das interações do composto com a proteína. Na Figura 23A, ilustra a interação do composto com a proteína, imagem obtida pelo software Discovery; na Figura 23B, estão representadas as interações pelo software Lig Plot.

4.4 MIRICITRINA

Utilizamos o flavonoide miricitrina apenas em testes *in silico*, para título de comparação com os outros compostos fenólicos que trabalhamos. Como podemos observar na (Figura 24), o composto teve 37 ligações com a proteína, sendo que 16 foram por van der Walls, porém nenhuma ligação com o sítio ativo.

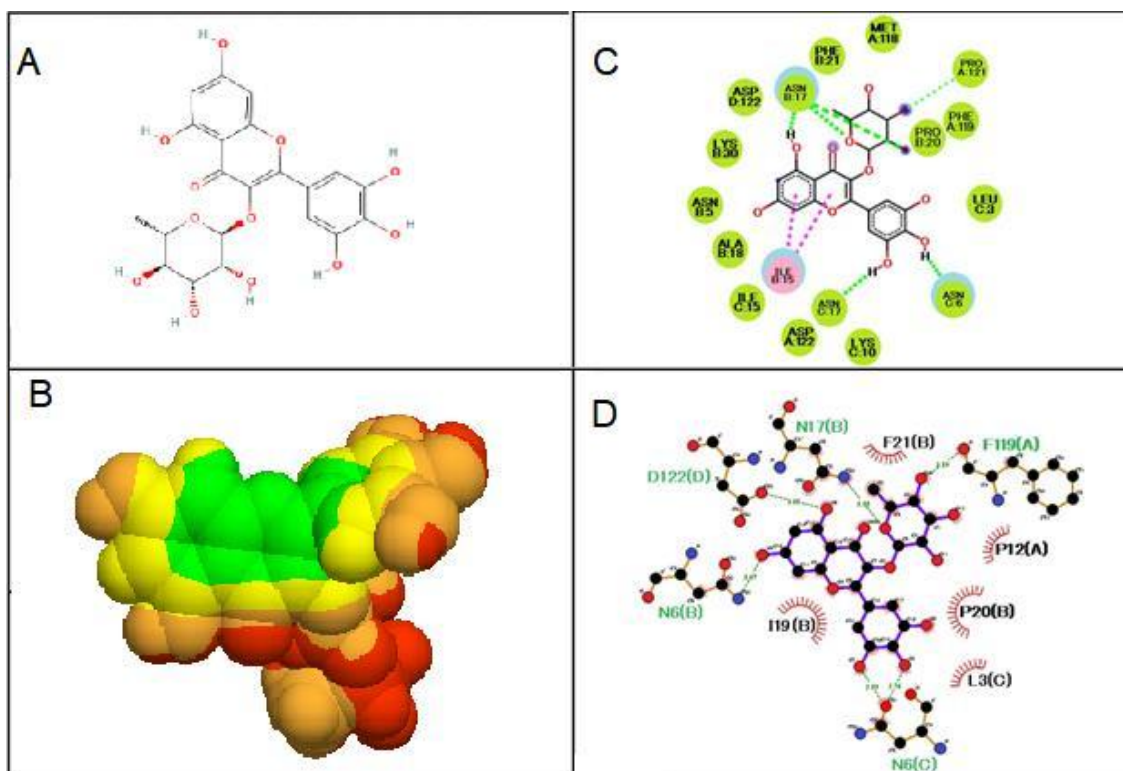


Figura 24. Representação *in silico* da proteína sPLA2 de Cdt com a miricitrina. Figura 24A está presente sua estrutura química, na figura 24B mostra a superfície eletroestática representada em esferas do composto, imagem gerada pelo Molinspiration, na figura 24C está sua interação do composto com a proteína, imagem gerada pelo software Discovery. Figura 24D estão representadas as interações pelo software Lig Plot.

Utilizamos o extrato *Eugenia uniflora*, devido à concentração de compostos ser maior e também pelo fato dela possui os mesmos três compostos que usamos no trabalho e com isso realizamos uma comparação, como podemos observar na (Figura 25A). Assim confirmamos os dois compostos no extrato o ácido gálico e a miricitrina que parece como presença majoritária na análise.

Podemos analisar nas (Figuras 25B e D) as estruturas em 3D dos compostos com sua respectiva nuvem eletrônica. Essa nuvem eletrônica é sinalizada com a cor de acordo com suas características de hidrofobicidade (violeta e azul) e hidrofilicidade (laranja e vermelho), imagens geradas pela plataforma Molinspiration.

Nos testes de enzimático podemos observar que o composto ácido gálico inibiu significativamente a atividade inflamatória da sPLA2, como pode analisar na (Figura 25C). Porém o composto miricitrina não demonstrou um desempenho na atividade de inibição da sPLA2, como observamos na (Figura 25E).

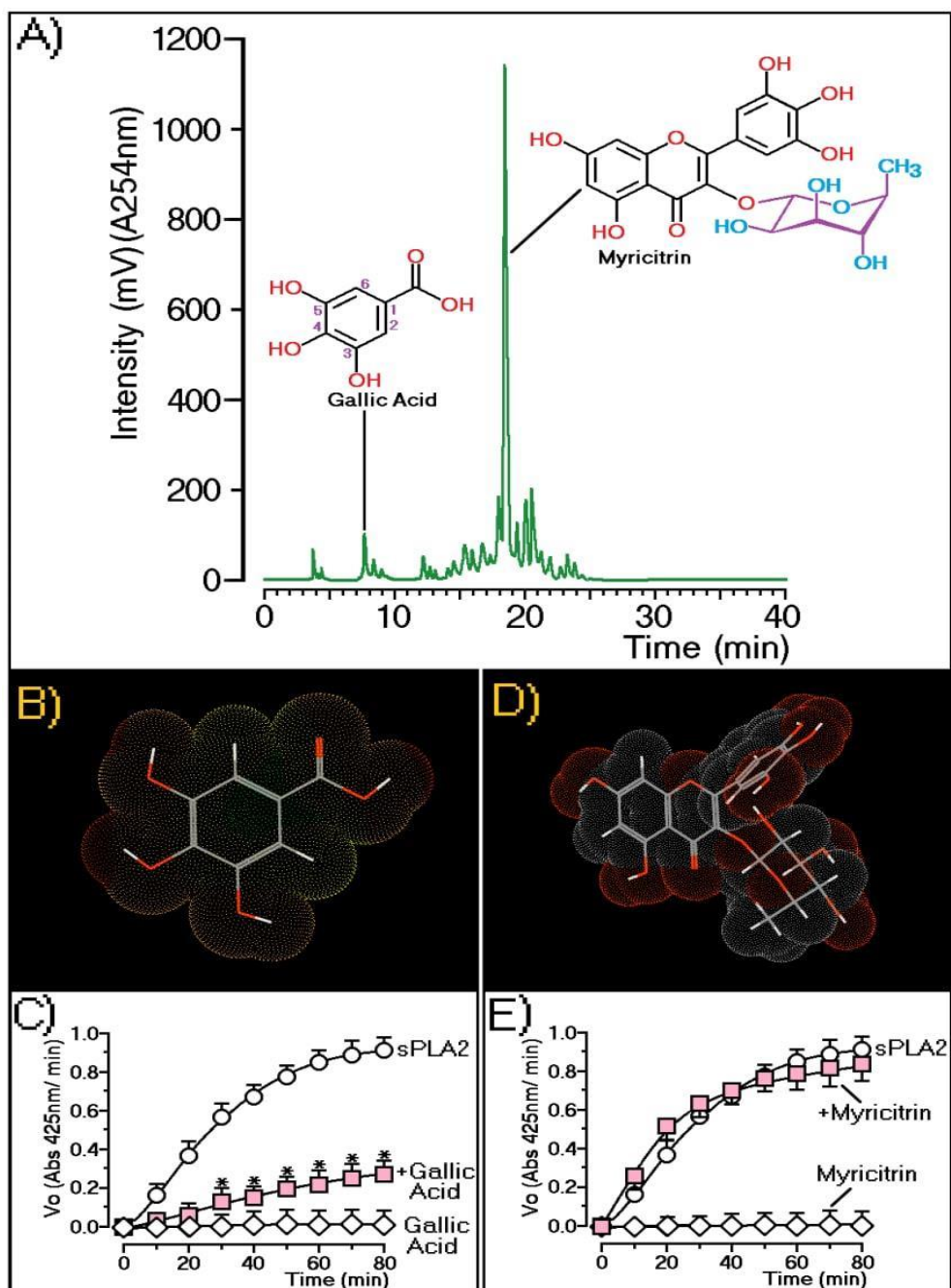


Figura 25. Perfil cromatográfico do extrato hidroalcóolico *Eugenia uniflora*. Figura 25A, mostrando as duas frações dos compostos, ácido gálico e miricitrina, na figura 25B, estrutura em 3D do ácido gálico, imagem gerada pelo Molinspiration, na figura 25C ensaio de atividade enzimática utilizando substrato cromogênio sintético 4N3OBA, teste com a sPLA2 e o composto ácido gálico, na Figura 26D estrutura em 3D do miricitrina, imagem gerada pelo Molinspiration, na Figura E ensaio de atividade enzimática utilizando substrato cromogênio sintético 4N3OBA, teste com a sPLA2 e o composto miricitrina.

Analisando nossos resultados *in silico*, *in vitro* e *in vivo* podemos observar na (Figura 26A) um modelo do mecanismo de ação das fosfolipase. A sPLA2 é ativada pelos fosfolipídios da membrana, ocorre quando a membrana rompe e os fosfolipídios são liberados e com isso a sPLA2 cliva os fosfolipídios e como reação ela libera os ácidos graxos, que

darão início a cascada de inflamação, ativando a peróxido hidrogênio e principalmente as prostaglandinas. E com isso a sPLA2 convencional, ativar indiretamente a cPLA2 que é a PLA2 citossólica para estimular o IP3.

Atuando juntas a cPLA2 e a sPLA2 convencional vão estimular a PAF-acetilhidrolase, que é a LP -PLA2 uma fosfolipase secretória. E fora da célula as duas PLA2 aumentam o processo de inflamação e estimular a AchE que atua na placa motora, que também é estimulada pelo IP3 no receptor interno e com isso aumenta o cálcio dentro da célula e com resultado do processo ocorre as contrações musculares e sinapse nervosas.

Sempre em um processo de inflamação ocorre primeiro uma vasoconstrição e depois uma vasodilatação para que aumente a estimulação eicosanoides e a circulação sanguínea, que é um processo que tem ligação com a Ache e com acetilcolina que realizam essa contração muscular e tem a participação do cálcio que também é utilizado pelas fosfolipase.

No teste de edema 30 minutos depois o composto interage com a PLA2 e com outras proteínas do processo inflamatório como Ache, que atua na placa motora, realizando um aumentando do edema, como podemos ver na (Figura 26B). E podemos observar que o composto aumentou a atividade miotóxica da sPLA2, devido a interação com a cPLA2, interferindo na infusão de cálcio nas células e aumentando os radicais livres e com isso gerando um aumento da proteína quinase (CK) como observado na (Figura 26C).

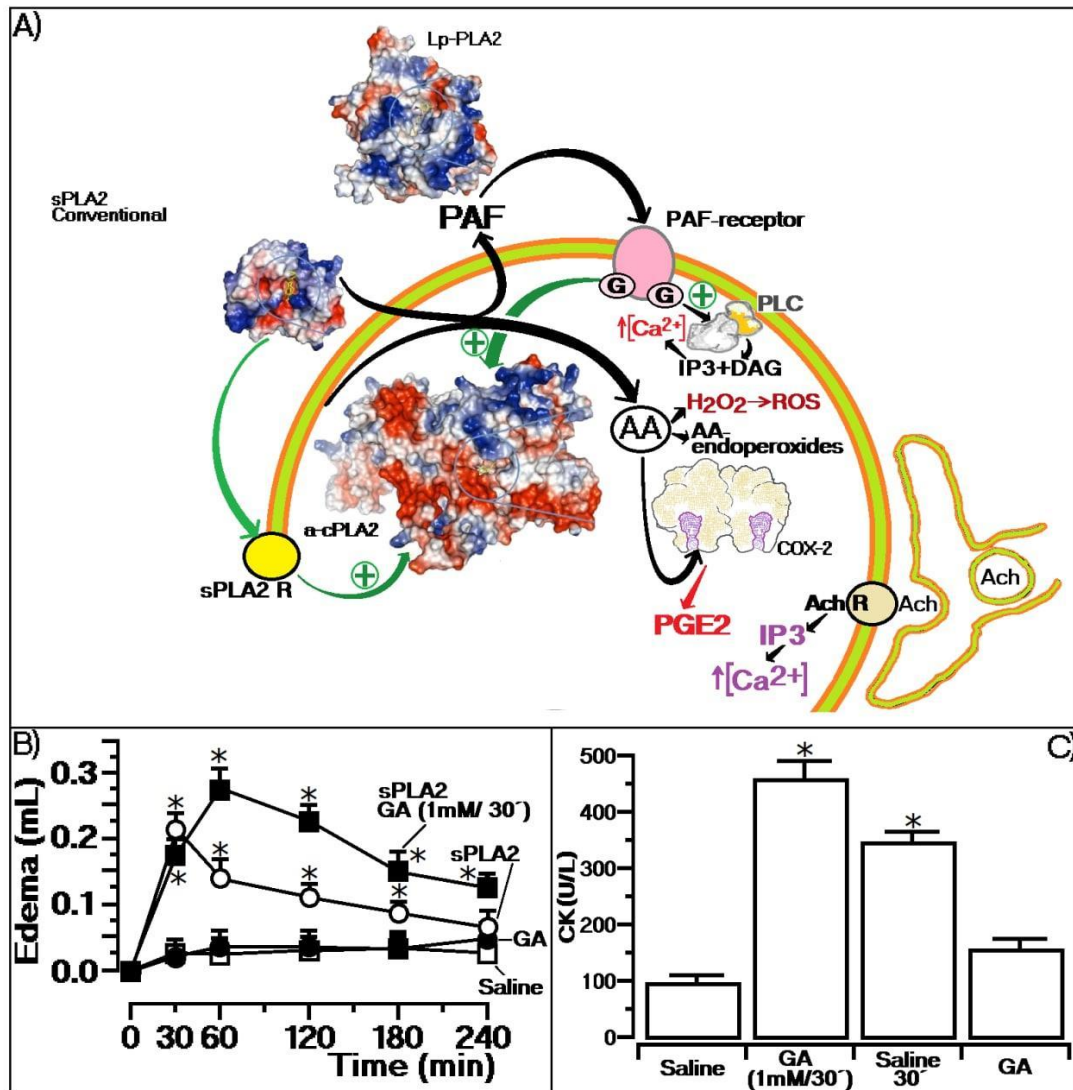


Figura 26. Modelo do mecanismo de ação das fosfolipase no organismo e ensaios *in vivo* do composto ácido gálico com a sPLA2 de Cdt. Figura A, modelo das etapas do processo de inflamação decorrente a sPLA2, na Figura B, Ensaio de volume de edema de pata com a sPLA2 e o composto injetada 30 minutos depois. Análise estatística ANOVA seguida de Bonferroni a posteriori $p < 0,05$. Figura C, ensaio de quebra da creatina quinase. Os dados foram expressos em média e desvio padrão ($n=3$) e a ANOVA foi utilizada como teste estatístico, com Dunnet como teste a posteriori.

5 DISCUSSÃO

A triagem virtual é uma técnica *in silico*, usada para buscar compostos contra algumas enzimas que causam doenças. Pois com o dock molecular criamos modelos do ligante com a proteína, por meio desses resultados baseados na literatura conseguimos analisar quais compostos apresentaram melhor resultado nos testes *in vitro* e *in vivo* (Lionta *et al.*, 2014; dos Santos *et al.*, 2018; Domingues *et al.*, 2012 e Rodrigues *et al.*, 2012).

Dentro do gênero *Bacchari spp.* e *Phyllanthus spp* selecionamos para o trabalho os ácidos fenólicos, ácido gálico e ácido cafeico. O gênero *Moquiniastrum spp.* não teve compostos selecionados pois não consta na lista de plantas interesse do SUS, sendo um dos critérios de triagem dos compostos para o trabalho (Lee *et al.*, 2013).

Com o trabalho conseguimos analisar os compostos, ácido cafeico, ácido gálico e miricitrina como inibidores de fosfolipase A2 da sPLA2 de Cdt., PAF-AH e da atividade enzima acetilcolinesterase (AChE). Verificamos que o composto fenólico ácido gálico apresentou melhor resultado de interação no sítio ativo da sPLA2 de Cdt. A AChE é uma enzima pertencente à família das colinesterases, com principal função a hidrólise do neurotransmissor acetilcolina (ACh) (Range., 2001).

O composto fenólico ácido gálico possui estudos na literatura com testes *in vivo* demonstrando potencial de atividade anti-inflamatória e antioxidante. Com o nosso trabalho *in silico* podemos confirmar essa atividade, pois o composto apresentou um grande potencial para inibir fosfolipase e estreasse e com os nossos testes de *in vivo* e *in vitro* observemos um ótimo resultado confirmando a ação inibitória do composto (Moraes *et al.*, 2020).

Muitos componentes naturais são isolados de plantas e soro de animais há muito anos, com o objetivo comprovar que as atividades enzimáticas derivadas das proteínas como elas podem ser alteradas por extratos naturais, devido a capacidade que esses extratos captarem moléculas de zinco e cálcio no sítio catalítico da proteína, e com isso pode inativar ou potencializar sua ação (Ferreira *et al.*, 1992, Pérez; Sánchez, 1999 e Badhani *et al.*, 2015). O nosso trabalho corrobora principalmente com a PAF-AH, o composto ASS, ácido gálico e o ácido cafeico não interagiram *in silico* com o sítio ativo, porém com aminoácidos entorno dele, realizando ligações importantes que podem interferir o loop de cálcio.

Em estudos recentes mostra que o ácido gálico consegue inibir a inflamação por meio da medição dos mediadores astrócitos de ratos em um modelo de neuro inflamação induzido por lipopolissacarídeo (LPS). A capacidade de interação mitocondrial interferindo com a morte

celular e doenças como Parkinson é comprovada pela literatura (SIDDIQUI *et al.* 2019 e CHANDRASEKHAR *et al.* 2018)

O medicamento ácido acetilsalicílico é considerado um Anti-inflamatório, atuando na inibição da COX-1 e com isso diminui a formação de tromboxanos A₂, que é extremamente importante para a vasoconstrição, com isso ele estimular a agregação plaquetária e vários estudos mostram que tem capacidade de gerar uma redução do risco de Acidentes vasculares encefálicos (AVE) e Infarto Agudo do Miocárdio (IAM). Porém nos nossos testes *in silico* e *in vivo* o fármaco não teve um bom desempenho como inibidor de fosfolipase, no dock molecular não interagiu com aminoácidos do sítio ativo da proteína e com os testes *in vivo* confirmamos esse desempenho. No teste de edema o AAS não inibiu a atividade da sPLA₂ (Range & Dale., 2012, Goodman & Gilman., 2012, Schellack., 2006 e Cucchiara *et al.*, 2019).

O composto fenólico ácido cafeico é considerado na literatura um composto com ações anti-inflamatórias e antioxidantes (Orban *et al.*, 1999; Maffia *et al.*, 2002; Hsiao *et al.*, 2003 e Borrelli *et al.*, 2002). Na literatura inúmeros trabalhos confirmam que o ácido cafeico são potentes inibidores da atividade das enzimas lipoxigenase e COX-1 que são responsáveis pelos eicosanoides (Koshihara *et al.*, 1984; Sud'ina *et al.*, 1993 e Rossi *et al.*, 2003), Como podemos verificar a atividade anti-inflamatória do composto, devido aos testes *in vivo* que realizamos, demonstrou uma inibição da fosfolipase, com os testes *in silico* que teve uma interação com a proteína atuando no seu sítio catalítico.

O composto miricitrina também sua atividade anti-inflamatórias e antioxidantes confirmada na literatura. No entanto em nosso teste *in silico* com flavonoide observamos que o composto não realizou ligações com sítio ativo da sPLA₂ de Cdt, não apresentando assim ser forte inibidor de fosfolipase, provavelmente por sua estrutura possui uma glicose. Em testes *in vitro* na literatura foi confirmado que a miricitrina possui uma boa absorção pelo trato gastrointestinal após 30 minutos, tendo o maior pico de absorção 2h após o início do teste. Porém nos nossos testes *in vitro* que realizamos, como no caso do enzimático o composto não inibiu a atividade enzimática da sPLA₂, provavelmente devido o açúcar da estrutura não deixar ele interfere na interação com a proteína (Yokomizo e Moriwaki 2005a).

6 CONCLUSÃO

A busca por novas moléculas bioativas vem crescendo ultimamente por pesquisadores, com intuito de descobrir novos fármacos e produtos com ação terapêutica. Atualmente com o avanço tecnológico o processo de busca por moléculas bioativas melhora muito com a utilização da bioinformática, que possibilita observar as interações de composto em uma proteína e analisar suas possíveis capacidades farmacológicas (LOGING *et al.*, 2011; ANDRONIS *et al.*, 2011to).

Para os resultados obtidos pelo trabalho foram selecionados compostos por meio de uma triagem de gêneros de plantas que o SUS possui interesse e os compostos selecionados têm atividade anti-inflamatória e antioxidante. Para essa seleção, buscamos os compostos que atendem aos critérios estipulados e que o nosso grupo já teria realizado trabalhos *in vitro* e *in vivo* com mesmos.

Para realizar o dock molecular e ter o melhor resultado desses compostos fenólicos selecionados, usamos cálculos matemáticos observando todas as características do alvo e dos compostos. Avaliamos a capacidade de interações deles com a proteína sPLA2 de Cdt e avaliamos os compostos que tiveram melhor resultado de inibição de fosfolipase tanto em *in silico* como em testes *in vivo* frente AchE a PAF-AH que foi o caso do ácido gálico, ASS e ácido cafeico, que obtemos um resultado favorável de inibição de esterase.

Utilizamos as enzimas PLA2 como base de enzima inflamatória, pois elas atuam na ligação 2ns de fosfolipídios gerando precursores de eicosanoides que desencadeiam toda a cascata inflamatória. Por isso pessoas com doenças crônicas como, arteriosclerose e diabetes que tem inflamação possuem níveis de PLA2 no organismo elevadas, devido ao sistema imunológico sempre gerar precursores inflamatórios.

Podemos concluir que o ácido gálico, AAS e ácido cafeico, são compostos que interagiram com as proteínas que testamos *in silico* e *in vivo*, mesmo não interagindo com o sítio catalítico em alguns casos como o ácido gálico frente a PAF-AH, ele realizou ligações com aminoácidos que podem mudar a sua conformidade da estrutura.

Com nossos resultados e as comparações de estudos mais aprofundados que os compostos selecionados mediante a triagem das espécies vegetais catalogadas pelo Renisus-Sus, Brasil (2009), observou-se que os gêneros estudados, possuem certo potencial para atividade de inibir esterase.

Para ser considerado um composto inibitório de esterase são necessários estudos mais aprofundados, para que possa ser usado em tratamento de inflamação crônica e com isso diminuir os efeitos colaterais causados por doenças virais.

REFERÊNCIAS

- ACHARYA, Chayan et al. Recent advances in ligand-based drug design: relevance and utility of the conformationally sampled pharmacophore approach. *Current computer-aided drug design*, v. 7, n. 1, p. 10-22, 2011.
- ALONSO, H; BLIZNYUK, A. A.; GREASY, E. JILL., 2006. Combining Docking and Molecular Dynamic Simulations in Drug Design. *Medicinal Research Reviews*, v. 26, n. 5, p. 531-568.
- ANDRONIS, Christos; et al. Literature mining, ontologies and information visualization for drug Repurposing. *Briefings in Bioinformatics*, 2011, V. 12, Nº 4, p. 357-68.
- Araújo et al., 2018. Concentração de ácido acetilsalicílico presente nos comprimidos comercializados nas drogarias de Floriano – PI. *Revista da FAESF*, vol. 2, n. 3, p 9- 20. ISSN 2594 – 7125.
- ARNI, R.K.; WARD, R.J. Phospholipase A₂--a structural review. *Toxicon*, v. 34, p. 827-41, 1996.
- ASAD, S.F.; SINGH, S.; AHMAD, A; HADI, S.M. Flavonoids: antioxidants in diet and potential anticancer agents. *Med. Sci. Res.*, 26(11), p. 723-728, 1998.
- BAGALKOTKAR, G.; SAGINEEDU, S. R.; SAAD, M. S.; STANSLAS, J. Phytochemicals from *Phyllanthus niruri* Linn. and their pharmacological properties: A review. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, v. 58, p. 1559-1570, 2006.
- BELL, Eric W.; ZHANG, Yang. DockRMSD: an open-source tool for atom mapping and RMSD calculation of symmetric molecules through graph isomorphism. *Journal of Cheminformatics*, v. 11, n. 1, p. 1-9, 2019.
- Biovita Foundation. *Discovery Studio – Accelrys. Versão 4.0*. San Diego, 2007
- BOHLMANN, F.; AHMED, M.; JAKUPOVIC, J.; KING, R. M.; ROBINSON, H. Dimeric sesquiterpene lactones and kolavane derivatives from *Gochnatia paniculata*. *Phytochemistry*, 22, 191-195, 1983.
- BORRELLI, F.; MAFFIA, P.; PINTO, L.; IANARO, A.; RUSSO, A.; CAPASSO, F.; IALENTI, A. Phytochemical compounds involved in the anti-inflammatory effect of propolis extract. *Fitoterapia*, 73 (Suppl. 1): S53-S63, 2002.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Portal da Saúde: Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos. 2009. Disponível em: <<http://portalsaude.saude.gov.br/images/pdf/2015/janeiro/05/programa-nacional-plantas-medicinais-fitoter-picos-pnpmf.pdf>>. Acesso em: Fev de 2021.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Portal da Saúde: Relação Nacional de Medicamentos Essenciais (RENAME). 2013b. Disponível em: <http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2012/prt0533_28_03_2012.html>. Acesso em: Fev de 2021.
- BRASIL; MINISTÉRIO DA SAÚDE. RENISUS–Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS. Espécies vegetais. 2009.
- Brudzynski, K. and Maldonado-Alvarez, L. 2015. Polyphenol-Protein Complexes and Their Consequences for the Redox Activity, Structure and Function of Honey. A Current View and New Hypothesis – a Review. *Pol. J. Food Nutr. Sci.* 65(2), 71–80.
- Cao, J., et al., 2013. Using hydrogen/deuterium exchange mass spectrometry to define the specific interactions of the phospholipase A₂ superfamily with lipid substrates, inhibitors, and membranes. *J. Biol. Chem.* 288(3), 1806-1813.

- CASAIS-E-SILVA, Luciana L. et al. Lemnitoxin, the major component of *Micrurus lemniscatus* coral snake venom, is a myotoxic and pro-inflammatory phospholipase A₂. *Toxicology letters*, v. 257, p. 60-71, 2016.
- CHEN, Xinde et al. Discovery of potent and orally active lipoprotein-associated phospholipase A₂ (Lp-PLA₂) inhibitors as a potential therapy for diabetic macular edema. *Journal of medicinal chemistry*, v. 59, n. 6, p. 2674-2687, 2016.
- Christen, K. Y. et al. Accumulation of trans-piceid in sorghum seedlings infected with *Colletotrichum sublineolum*. *Phytochemistry*, v. 69, n. 3, p. 700-706, 2008.
- Chu, Hin., et al., 2020. Comparative tropism, replication kinetics, and cell damage profiling of SARS-CoV-2 and SARS-CoV with implications for clinical manifestations, transmissibility, and laboratory studies of COVID-19: an observational study. *The Lancet Microbe*. 1. 10.1016/S2666-5247(20)30004-5.
- CORCIOVĂ. et al. Phenolic and sterolic profile of a *PHYLLANTHUS AMARUS* extract and characterization of newly synthesized silver nanoparticles. ORIGINAL ARTICLE. v.66, n.5, 2018.
- Corrêa LC, Marchi-Salvador DP, Cintra AC, Sampaio SV, Soares AM, Fontes MR. Crystal structure of a myotoxic Asp49-phospholipase A₂ with low catalytic activity: Insights into Ca²⁺-independent catalytic mechanism. *Biochim Biophys Acta*. 2008 Apr;1784(4):591-9.
- CRUCES, I.L et al. Plantas medicinais no controle de urolitíase. *Rev. bras. plantas med.*, Botucatu, v. 15, n. 4, supl. 1, p. 780-788, 2013. Available from <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-05722013000500020&lng=en&nrm=iso>. access on 12 Apr. 2021. <https://doi.org/10.1590/S1516-05722013000500020>.
- Cucchiara BL, Messé SR. Antiplatelet therapy for secondary prevention of stroke. UpToDate [database]. jan. 2019 Disponível em: <https://www.uptodate.com/contents/antiplatelet-therapy-for-secondary-prevention-of-stroke>
- Davidson FF, Dennis EA. Evolutionary relationships and implications for the regulation of phospholipase A₂ from snake venom to human secreted forms. *J Mol Evol*. 1990 Sep;31(3):228-38.
- DENNIS, E.A. Diversity of group types, regulation, and function of phospholipase A₂. *J. Biol. Chem.*, v. 269, p. 13057-60, 1994.
- DENNIS, E.A. Phospholipase A₂ in Eicosanoid Generation. *Am. J. Respir. Crit.Care Med*, v. 161, p. 32-35, 2000.
- Dennis, Edward A., et al. "Phospholipase A₂ enzymes: physical structure, biological function, disease implication, chemical inhibition, and therapeutic intervention." *Chemical reviews* 111.10 (2011): 6130-6185.
- Dessen A. Structure and mechanism of human cytosolic phospholipase A(2). *Biochim Biophys Acta*. 2000 Oct 31;1488(1-2):40-7.
- DOMINGUES, Bernardo Figuerêdo. 3D-Pharma: uma ferramenta para triagem virtual baseada em fingerprints de farmacóforos. 2012.
- DOS SANTOS JUNIOR, Adeilso Bispo et al. Bioaffinity fishing procedure using secretory phospholipase A₂ for screening for bioactive components: Modulation of pharmacological effect induced by sPLA₂ from *Crotalus durissus terrificus* by hispidulin from *Moquiniastrum floribundum*. *Molecules*, v. 25, n. 2, p. 282, 2020.
- DOS SANTOS, Ricardo N.; FERREIRA, Leonardo G.; ANDRICOPULO, Adriano D. Practices in molecular docking and structure-based virtual screening. In: *Computational drug discovery and design*. Humana Press, New York, NY, 2018. p. 31-50.

Dupureur CM, Yu BZ, Jain MK, Noel JP, Deng T, Li Y, Byeon IJ, Tsai MD. Phospholipase A2 engineering. Structural and functional roles of highly conserved active site residues tyrosine-52 and tyrosine-73. *Biochemistry*. 1992 Jul 21;31(28):6402-13.

Dupureur CM, Yu BZ, Jain MK, Noel JP, Deng T, Li Y, Byeon IJ, Tsai MD. Phospholipase A2 engineering. Structural and functional roles of highly conserved active site residues tyrosine-52 and tyrosine-73. *Biochemistry*. 1992 Jul 21;31(28):6402-13.

FATHI, Behrooz; ROWAN, Edward G.; HARVEY, Alan L. The facilitatory actions of snake venom phospholipase A2 neurotoxins at the neuromuscular junction are not mediated through voltage-gated K⁺ channels. *Toxicon*, v. 39, n. 12, p. 1871-1882, 2001.

FERNANDA DE MOURA LEÃO, M.; OLIVEIRA DE SOUZA, R.; APOLLO DUARTE, J.; NAVARRO SOUZA, M.; FLÁVIO DE OLIVEIRA, L.; MANSUR MACHADO, M. Análise fitoquímica da folha de Quebra Pedra (*Phyllanthus niruri* L.) com ênfase em compostos antioxidantes. *Anais do Salão Internacional de Ensino, Pesquisa e Extensão*, v. 4, n. 2, 15 mar. 2013.

Ferreira, L.G., Dos Santos, R.N., Oliva, G. and Andricopulo, A.D. 2015. Molecular docking and structure-based drug design strategies. *Molecules* 20(7), 13384-13421.

Filho AIL, Uchoa E, Guerra HL, Firmo JOA, Costa MFL, Prevalência e fatores associados a automedicação: resultados do projeto Bambuí. *Revista Saúde Pública*. 2002; V 36 (1): 55:62. Lima AS, Alvim HGO *Rev Inic Cient e Ext*. 2018;1(Esp):169-74 174.

FILIMONOV, D. A. et al. Prediction of the biological activity spectra of organic compounds using the PASS online web resource. *Chemistry of Heterocyclic Compounds*, v. 50, n. 3, p. 444-457, 2014.

FRANCIS, F.J. Anthocyanins and betalains: composition and applications. *Cereal Foods World*, v. 45, p. 208-213, 2000.

GARCIA, E. E.; GUERREIRO, E. Sesquiterpene lactones from *Gochnatia palosanto* and coumarins from *G. argentina*. *Phytochemistry*, 27, 288-290, 1988.

GIANELLO, J.C.; GIORDANO, O.S. Chemical examination of six species of *Baccharis*. *Revista Latinoamericana de Química*, v.15, n.2, p.84-86, 1984.

GINWALA, R., Bhavsar, R., Chigbu, D.I., Jain, P. and Khan, Z.K. 2019. Potential Role of Flavonoids in Treating Chronic Inflammatory Diseases with a Special Focus on the Anti- Inflammatory Activity of Apigenin. *Antioxidants (Basel)*. 8(2), 35.

Goodman & Gilman. *As bases farmacológicas da terapêutica*. 12ª edição. Rio de Janeiro, McGraw-Hill, 2012.

GRIFFITHS, K., Aggarwal, B.B., Singh, R.B., Buttar, H.S., Wilson, D. and De Meester, F. 2016. Food Antioxidants and Their Anti-Inflammatory Properties: A Potential Role in Cardiovascular Diseases and Cancer Prevention. *Diseases*. 4(3), 28.

GUEDES, Rafael Lucas Muniz et al. A comparative in silico linear B-cell epitope prediction and characterization for South American and African *Trypanosoma vivax* strains. *Genomics*, v. 111, n. 3, p. 407-417, 2019.

HOSSEN, Monjur; HERNANDEZ, Ernesto. Enzyme-catalyzed synthesis of structured phospholipids with conjugated linoleic acid. *European Journal of Lipid Science and Technology*, v. 107, n. 10, p. 730-736, 2005.

HSIAO G.; SHEN, M-Y.; CHANG, W-C.; CHENG, Y-W.; PAN, S-L.; KUO, Y-H.; CHEN, T-F.; SHEU, J-R. A novel antioxidant, octyl caffeate, suppresses LPS/IFN- γ -induced inducible nitric oxide synthase gene expression in rat aortic smooth muscle cells. *Biochem. Pharmacol.*, 7598: 1-10, 2003.

Janssen MJ, van de Wiel WA, Beiboer SH, van Kampen MD, Verheij HM, Slotboom AJ, Egmond MR. Catalytic role of the active site histidine of porcine pancreatic phospholipase A2 probed by the variants H48Q, H48N and H48K. *Protein Eng.* 1999 Jun;12(6):497-503.

JIANG, P.; BURCZYNSKI, F.; CAMPBELL, C.; PIERCE, G.; AUSTRIA, J. A.; BRIGGS, C. J. Rutin and flavonoid contents in three buckwheat species *Fagopyrum esculentum*, *F. tataricum*, and *F. homotropicum* and their protective effects against lipid peroxidation. *Food Research International*, v. 40, p. 356–364, 2007.

JUCÁ, Mércia Marques et al. Flavonóides: atividades biológicas e potencial terapêutico. *Pesquisa de produtos naturais* v. 34, n. 5, pág. 692-705, 2020.

JUNIOR, Carlos Esteves Teixeira. Sobre a teoria da difração de raios-X em estruturas tridimensionais. 2014.
KARAM, T.K. et al. Carqueja (*Bacchari trimera*): utilização terapêutica e biossíntese. *Rev. bras. plantas med., Botucatu* v. 15, n. 2, p. 280-286, 2013. Available from <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-05722013000200017&lng=en&nrm=iso>. access on 08 May 2021. <https://doi.org/10.1590/S1516-05722013000200017>.

Kim RR, Chen Z, Mann TJ, Bastard K, F Scott K, Church WB. Structural and Functional Aspects of Targeting the Secreted Human Group IIA Phospholipase A2. *Molecules*. 2020 Sep 28;25(19):4459.

KINI, R.M. Structure-function relationships and mechanism of anticoagulant phospholipase A₂ enzymes from snake venoms. *Toxicon*, v. 45, p. 1147-61, 2005.

KOSHIHARA, Y.; NEICHI, T.; MUROTA, S-I.; LAO, A-N.; FUJIMOTO, Y.; TATSUNO, T. Caffeic acid is a selective inhibitor for leukotriene biosynthesis. *Biochim. Biophys. Acta*, 792: 92-7, 1984.

KROLL, J., Harshadrai, M., Rawel, M. and Rohn, S. 2003. Reactions of Plant Phenolics with Food Proteins and Enzymes under Special Consideration of Covalent Bonds. *Food Science and Technology Research* 9(3), 205-218.

KUDO, I.; MURAKAMI, M. Phospholipase A₂ enzymes. *Prostag. Lipid. Mediat.*, v.68-69, p. 3-58, 2002.

KUMAR, S.; CHANDRA, P.; BAJPAI, V.; SINGH, A.; SRIVASTAVA, M.; MISHRA, D. K.; KUMAR, B. Rapid qualitative and quantitative analysis of bioactive compounds from *Phyllanthus amarus* using LC/MS/MS techniques. *Industrial Crops and Products*, v. 69, p. 143-152, 2015.

KUMAR, Shashank; PANDEY, Abhay K. Chemistry and biological activities of flavonoids: an overview. *The scientific world journal*, v. 2013, 2013.

KUMAR, Shashank; PANDEY, Abhay K. Medicinal attributes of *Solanum xanthocarpum* fruit consumed by several tribal communities as food: an in vitro antioxidant, anticancer and anti-HIV perspective. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, v. 14, n. 1, p. 1-8, 2014.

LA CASA, C.; VILLEGAS, I.; DE LA LASTRA, C.; MOTILVA, V.; CALERO, M. J. Evidence for protective and antioxidant properties of rutin, a natural flavone, against ethanol induced gastric lesions. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 71, p. 45–53, 2000.

Lambeau, G.; Gelb, M. H. Biochemistry and physiology of mammalian secreted phospholipases A2. *Annu. Rev. Biochem.* 2008, 77, 495–520. doi: 10.1146/annurev.biochem.76.062405.154007.

LI, Honglin et al. TarFisDock: um servidor web para identificar alvos de drogas com abordagem docking. Pesquisa de ácidos nucleicos, v. 34, n. suppl_2, pág. W219-W224, 2006.

LIMA, M. C. L.; LEMOS, T. L. G.; FILHO, R. B.; PESSOA, O. D. L. Chemical constituents from the flowers of *Gochnatia blanchetiana* (DC) Cabrera. Rev. Latinoamer. Quim., 31, 85-88, 2003.

Lionta, E., Spyrou, G., Vassilatis, D.K. and Cournia, Z. 2014. Structure-based virtual screening for drug discovery: principles, applications, and recent advances. Curr Top Med Chem. 14(16), 1923-1938.

LIONTA, Evanthia et al. Structure-based virtual screening for drug discovery: principles, applications and recent advances. Current topics in medicinal chemistry, v. 14, n. 16, p. 1923-1938, 2014.

LOGING, William; et al. Cheminformatic/bioinformatic analysis of large corporate databases: Application to drug repurposing. Drug Discovery Today: Therapeutic Strategies, 2011, Vol. 8, Nº 3–4.

MAFFIA, P.; IANARO, A.; PISANO, B.; BORRELLI, F.; CAPASSO, F.; PINTO, A.; IALENTI, A. Beneficial effects of caffeic acid phenethyl ester in a rat model of vascular injury. Br. J. Pharmacol., 136: 353-60, 2002.

MALEKI, Soheila J.; CRESPO, Jesus F.; CABANILLAS, Beatriz. Anti-inflammatory effects of flavonoids. Food chemistry, v. 299, p. 125124, 2019.

MARAGANORE, J.M.; MERUTKA, G.; CHO, W.; WELCHES, W. KEZDY, F.J.; HEINRIKSON, R.L. A new class of phospholipase A₂ with lysine in place of aspartate⁴⁹. J. Biol. Chem., v. 259, p. 13839-43, 1984.

Marin E, Laporta LV, Escarrone AL, Friedrich M, Bittencourt CF. Avaliação da Automedicação com Antiinflamatórios Não-Esteroides em Farmácias Comerciais de Santa Maria-RS. Ciências da Saúde. 2005; V 06 (1): 1-11.

MARQUES, M. F.; MARQUES, M. M.; XAVIER, E. R. Fortificação de alimentos: uma alternativa para suprir as necessidades de micronutrientes no mundo contemporâneo. HU Revista, [S. l.], v. 38, n. 1 e 2, 2013. Disponível em: <https://periodicos.ufjf.br/index.php/hurevista/article/view/1739>. Acesso em: 5 dez. 2021.

MARQUES, M. F.; MARQUES, M. M.; XAVIER, E. R. Fortificação de alimentos: uma alternativa para suprir as necessidades de micronutrientes no mundo contemporâneo. HU Revista, [S. l.], v. 38, n. 1 e 2, 2013. Disponível em: <https://periodicos.ufjf.br/index.php/hurevista/article/view/1739>. Acesso em: 5 dez. 2021.

MARQUES, O.C.P. Desenvolvimento de formas farmacêuticas sólidas orais de *Uncaria tomentosa* com atividade antioxidante. 2008. 210p. Dissertação (Mestrado - Área de Concentração em Farmácia) - Departamento de Farmácia, Universidade de Coimbra, Coimbra, Portugal.

Martins ER, Castro DM, Castellani DC, Dias JE 1994. *Plantas medicinais* Viçosa: UFV.

Miguel, Maria G. 2020. "Editorial para Edição Especial - Atividade Antiinflamatória de Produtos Naturais" *Molecules* 25, no. 8: 1926. <https://doi.org/10.3390/molecules25081926>.

MOREIRA, A. S.; SPITZER, V.; SCHAPOVAL, E. E. S.; SCHENKEL, E. P. Antiinflammatory activity of extracts and fractions from the leaves of *Gochnatia polymorpha*. Phytother. Res., 14, 638-640, 2000.

MOUCHLIS, Varnavas D. et al. Binding conformation of 2-oxoamide inhibitors to group IVA cytosolic phospholipase A2 determined by molecular docking combined with molecular dynamics. Journal of chemical information and modeling, v. 52, n. 1, p. 243-254, 2012.

Moura-da-Silva AM, Paine MJ, Diniz MR, Theakston RD, Crampton JM. The molecular cloning of a phospholipase A2 from *Bothrops jararacussu* snake venom: evolution of venom group II phospholipase A2's may imply gene duplications. *J Mol Evol*. 1995 Aug;41(2):174-9.

Müller, C., et al., 2018. Inhibition of Cytosolic Phospholipase A2 α Impairs an Early Step of Coronavirus Replication in Cell Culture. *J. Virol*. 92(4), pii: e01463-17.

Murakami, M.; Taketomi, Y.; Miki, Y.; Sato, H.; Yamamoto, K.; Lambeau, G. Emerging roles of secreted phospholipase A2 enzymes: The 3rd edition. *Biochimie* 2014, 107, 105–113. doi: 10.1016/j.biochi.2014.09.003.

Murakami, Makoto; Taketomi, Yoshitaka. Secreted Phospholipase A 2 And Mast Cells. *Allergology International*, [S.L.], V. 64, N. 1, P.4-10, Jan. 2015. Elsevier Bv. [Http://Dx.Doi.Org/10.1016/J.Alit.2014.07.005](http://dx.doi.org/10.1016/j.alit.2014.07.005).

NAGEM, T.J.; ALBUQUERQUE, T.T.O.; MIRANDA, L.C.G.; SILVA, M.C. Flavonoids in cultivators of soybean: antioxidant action. *South Braz. J. Chem.*, 1 (1), p. 11-22, 1993.

Nunes ER, Nascimento JWL, Antonialli MMS, Menezes FG. Estudo do uso de medicamentos antiinflamatórios em drogaria da região central de Guarulhos (SP). *ConSciential saúde*. 2006; V 5: 83-89.

OMS (Brasil). Dengue no Brasil: informe epidemiológico. Informe epidemiológico. 2009. MINISTÉRIO DA SAÚDE SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE.

ORBAN, Z.; MITSIADES, N.; BURKE Jr., T.R.; TSOKOS, M.; CHROUSOS, G.P. Caffeic acid phenethyl ester induces leukocyte apoptosis, modulates nuclear factor-kappa B and suppresses acute inflammation. *Neuroimmunomodul.*, 7: 99-105, 2000.

OWNBY, C.L.; SELISTRE-DE-ARAÚJO, H.S.; WHITE, S.P.; FLETCHER, J.E. Lysine 49 phospholipase A₂ proteins. *Toxicon*, v. 37, p. 411-45, 1999.

PÁDUA, B. C.; ROSSONI-JUNIOR, J. V.; DE BRITO MAGALHÃES, C.L.; CHAVES, M.M.; SILVA, M.E.; PEDROSA, M.L.; DE SOUZA, G.H.; BRANDÃO, G.C.; RODRIGUES, I.V.; LIMA, W.G.; COSTA, D.C. Protective Effect of *Baccharis trimera* Extract on Acute Hepatic Injury in a Model of Inflammation Induced by Acetaminophen. *Mediators of Inflammation*. 2014: ID 196598, 2014

PANCHE, A. N.; DIWAN, A. D.; CHANDRA, S. R. Flavonoids: an overview. *Journal of nutritional science*, v. 5, 2016.

Pereira, Rita & Canuto, Kirley & Brito, Edy & Rodrigues, Tigressa & Sousa, Adriana & Silva, Dijalma & Vieira, Roberto. (2018). Produção de Biomassa e de Compostos Bioativos em *Phyllanthus amarus* (Schumach. & Thonning) e *Phyllanthus niruri* L. no Estado do Ceará, Brasil.

Pettersen, E. F. Goddard T. D.; Huang C. C.; Couch G. S.; Greenblatt D. M.; Meng E. C.; Ferrin T. E., 2004. UCSF Chimera – a visualization system for exploratory research and analysis. *Journal of computational chemistry*, v. 25, n. 13, p. 1605-1612.

PICANÇO, Leide CS et al. Study of molecular docking, physicochemical and pharmacokinetic properties of GSK-3 β inhibitors. *Journal of Pharmaceutical Research International*, p. 152-175, 2015.

Pickard RT, Chiou XG, Striffler BA, DeFelippis MR, Hyslop PA, Tebbe AL, Yee YK, Reynolds LJ, Dennis EA, Kramer RM, Sharp JD. Identification of essential residues for the catalytic function of 85-kDa cytosolic phospholipase A2. Probing the role of histidine, aspartic acid, cysteine, and arginine. *J Biol Chem*. 1996 Aug 9;271(32):19225-31.

PIERONI, A.; HEIMLER, D.; PIETERS, L.; VAN POEL, B.; VLIETINCK, A.J. In vitro anti-complementary activity of flavonoids from clive (*Olea europaea*) leaves. *Pharmazie*, v.51, n.10, p. 765-68, 1996.

PIERONI, A.; HEIMLER, D.; PIETERS, L.; VAN POEL, B.; VLIETINCK, A.J. In vitro anti-complementary activity of flavonoids from clive (*Olea europaea*) leaves. *Pharmazie*, v.51, n.10, p. 765-68, 1996.

PRIOR, Ronald L. et al. Plasma antioxidant capacity changes following a meal as a measure of the ability of a food to alter in vivo antioxidant status. *Journal of the American College of Nutrition*, v. 26, n. 2, p. 170-181, 2007.

QI, W; HUA, L; GAO, K. Chemical constituents of the plants from the genus *Phyllanthus*. *Chemistry Biodiversity*, v. 11, p. 364-395, 2014.

Range & Dale. *Farmacologia*. 7ª edição. Rio de Janeiro, Elsevier, 2012

Rang HP, Dale MM, Pitter JM, Moore PK. *Farmacologia. Eicosanóides*. 5 ed. Elsevier Odont. Scand. Mar./Apr. 1947; 7: 115-44.

Rang HP, Dale MM, Pitter JM, Moore PK. *Farmacologia. Eicosanóides*. 5 ed. Elsevier Odont. Scand. Mar./Apr. 1947; 7: 115-44.

René, R. M.; Cartaña, C.; Adzet, T.; Marín, E.; Parella, T.; Cañigueral, S.; *Planta Med.* 1996, 62, 232.

RODRIGUES, João PGLM; BONVIN, Alexandre MJJ. Modelagem computacional integrativa de interações de proteínas. *A revista FEBS*, v. 281, n. 8, pág. 1988-2003, 2014.

RODRIGUES, Ricardo P. et al. Estratégias de triagem virtual no planejamento de fármacos. *Revista Virtual de QUÍMICA*, v. 4, n. 6, pág. 739-776, 2012.

ROSSI, A.; CUZZOCREA, S.; MAZZON, E.; SERRAINO, I.; De SARRO, A.; DUGO, L.; FELICE, M.R.; VAN DE LOO, F.A.J.; Di ROSA, M.; MUSCI, G.; CAPUTI, A.P.; SAUTEBIN, L. Regulation of prostaglandin generation in carrageenan-induced pleurisy by inducible nitric oxide synthase in knockout mice. *Life Sci.*, 72: 1199-1208, 2003.

SACILOTTO, A. C. B.; VICHNEWSKI, W.; HERZ, W. Ent-kaurene diterpenes from *Gochnatia polymorpha* var. *polymorpha*. *Phytochemistry*, 44, 659-661, 1997.

Samuelsson B. Biosynthesis of prostaglandins. *Fed. Proc.* 1972; 1442-1450.

Santa Maria, v. 43, n.1, p. 13-21, jan./abr. 2017. VIVÊNCIAS DE RESIDENTES ENFERMEIROS NO PROGRAMA. DE RESIDÊNCIA MULTIPROFISSIONAL EM SAÚDE.

SCHALOSKE, R.H.; DENNIS, E.A. The phospholipase A₂ superfamily and its group numbering system. *Biochim. Biophys. Acta*, v. 1761, p. 1246-59, 2006.

SCHALOSKE, R.H.; DENNIS, E.A. The phospholipase A₂ superfamily and its group numbering system. *Biochim. Biophys. Acta*, v. 1761, p. 1246-59, 2006.

Schellack G. *Pharmacology in clinical practice*. Editora Fundamento. 2006.

Seeliger, Daniel; De Groot, Bert L. Ligand docking and binding site analysis with PyMOL and Autodock/Vina. *Journal of computer-aided molecular design*, v. 24, n. 5, p. 417-422, 2010.

SHAHIDI, F.; NACZK, M. Food Phenolics: sources, chemistry, effects and applications. Lancaster: Technomic, 1995, 331 p

Sharp JD, Pickard RT, Chiou XG, Manetta JV, Kovacevic S, Miller JR, Varshavsky AD, Roberts EF, Strifler BA, Brems DN, et al. Serine 228 is essential for catalytic activities of 85-kDa cytosolic phospholipase A₂. J Biol Chem. 1994 Sep 16;269(37):23250-4.

Simões-Pires CA, Queiroz EF, Henriques AT, Hostettmann K. Isolation and on-line identification of antioxidant compounds from three *Baccharis* species by HPLC-UV-MS/MS with post-column derivatisation. Phytochem Anal. 2005 Sep-Oct;16(5):307-14. doi: 10.1002/pca.826. PMID: 16223086.

SOARES A.M.; FONTES, M.R.M.; GIGLIO J.R. Phospholipase A₂ myotoxins from *Bothrops* snake venoms: structure-function relationship. Curr. Org. Chem., v. 8, p. 1-14, 2004.

SOICKE, H.; LENG-PESCHLOW, E. Characterization of flavonoids from *Baccharis trimera* and their antihepatotoxic properties. Planta Med, v. 53, p. 37-39, 1987.

SOICKE, H.; LENG-PESCHLOW, E. Characterization of flavonoids from *Baccharis trimera* and their antihepatotoxic properties. Planta Med, v. 53, p. 37-39, 1987.

SPRENGER, R. F. & CASS, Q. B. Characterization of four *Phyllanthus* species using liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. Journal of Chromatography A, v. 1291, p. 97-103, 2013.

ŠRIBAR, Jernej; KRIŽAJ, Igor. Secreted Phospholipases A₂-not just Enzymes. Acta Chimica Slovenica, v. 58, n. 4, 2011.

STEFANELLO, M.E.A.; SALVADOR, M.J.; ITO, I.Y.; MACARI, P.A.T. Avaliação da atividade antimicrobiana e citotóxica de extratos de *Gochnatia polymorpha* ssp *floccosa*. Rev. Bras. Farmacogn. 16(4): out/dez. 2006.

STRAPASSON, R.L.B. Constituintes químicos e avaliação das atividades citotóxica e 64 Visão Acadêmica, Curitiba, v.18, n.4, Out. - Dez./2017 - ISSN 1518-8361 antioxidante de *Moquiniastrium polymorphum* subsp. *floccosum* (Asteraceae). Tese. Curitiba, Paraná: Universidade Federal do Paraná. 2014.

SUD'INA, G.F.; MIRZOEVA, O.K.; PUSHKAREVA, M.A.; KORSHUNOVA, G.A.; SUMBATYAN, N.V.; VARFOLOMEEV, S.D. Caffeic acid phenethyl ester as a lipoxygenase inhibitor with antioxidant properties. FEBS Letters, 329 (1,2): 21-4, 1993.

TAKADA, Yoshikazu; FUJITA, Masaaki. Secreted phospholipase A₂ type IIA (sPLA₂-IIA) activates integrins in an allosteric manner. Protein Reviews, p. 103-115, 2016.

TESKE, Sven. Achieving the Paris climate agreement goals: global and regional 100% Renewable energy scenarios with non-energy GHG pathways for+ 1.5 C and+ 2 C. Springer Nature, 2019.

TETKO, Igor V. Computing chemistry on the web. Drug discovery today, v. 10, n. 22, p. 1497- 1499, 2005.

Tomoo K, Yamane A, Ishida T, Fujii S, Ikeda K, Iwama S, Katsumura S, Sumiya S, Miyagawa H, Kitamura K. X-ray crystal structure determination and molecular dynamics simulation of phospholipase A₂ inhibited by amide-type substrate analogues. Biochim Biophys Acta. 1997 Jul 18;1340(2):178-86.

Toyama, Marcos H. et al. Edema Induced by sPLA₂ from *Crotalus durissus terrificus* involves PLC and PKC signaling, activation of cPLA₂, and Oxidative Stress. In: Edema-Diagnosis and Treatment. IntechOpen, 2019.

Trott, O.; Olson, A. J., 2010. AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. Journal of computational chemistry, v. 31, n. 2, p. 455-461.

TSUBOI, K.; SUGIMOTO, Y.; ICHIKAWA, A. Prostanoid receptor subtypes, Prostaglandins Other Lipid Mediat., v. 68-69, p. 535-556, 2002.

UCSF Chimera--a visualization system for exploratory research and analysis. Pettersen EF, Goddard TD, Huang CC, Couch GS, Greenblatt DM, Meng EC, Ferrin TE. J Comput Chem. 2004 T. E., 2004. UCSF Chimera – a visualization system for exploratory research and analysis. Journal of computational chemistry, v. 25, n. 13, p. 1605-1612. Oct;25(13):1605-12.

Vasquez AM, Mouchlis VD, Dennis EA. Review of four major distinct types of human phospholipase A2. Adv Biol Regul. 2018 Jan; 67:212-218.

VERDI, Luiz Gonzaga; BRIGHENTE, Inês Maria Costa; PIZZOLATTI, Moacir Geraldo. Gênero Bacchari (Asteraceae): aspectos químicos, econômicos e biológicos. Quím. Nova, São Paulo, v. 28, n. 1, p. 85-94, Feb. 2005. Available from <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S010040422005000100017&lng=en&nrm=iso>. access on 07 May 2021. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422005000100017>.

VULFIUS, Catherine A. et al. Pancreatic and snake venom presynaptically active phospholipases A2 inhibit nicotinic acetylcholine receptors. PLoS One, v. 12, n. 10, p. e0186206, 2017.

WALLACE, Andrew C.; LASKOWSKI, Roman A.; THORNTON, Janet M. LIGPLOT: a program to generate schematic diagrams of protein-ligand interactions. Protein engineering, design and selection, v. 8, n. 2, p. 127-134, 1995.

WANG, Tian-yang; LI, Qing; BI, Kai-shun. Bioactive flavonoids in medicinal plants: Structure, activity and biological fate. Asian Journal of Pharmaceutical Sciences, v. 13, n. 1, p. 12-23, 2018.

WANG, Y.M.; WANG, J.H.; PAN, F.M.; TSAI, I.H. Lys-49 phospholipase A₂ homologs from venoms of *Deinagkistrodon acutus* and *Trimeresurus mucrosquamatus* have identical protein sequence. Toxicon, v. 34, p. 485-489, 1996.

YOKOMIZO A, MORIWAKI M. Transepithelial permeability of Myricitrin and its degradation by simulated digestion in human intestinal Caco-2 cell monolayer. Biosci. Biothecnol. Biochem. 69(9);1774-6, 2005a.

Zampieri PRF, Tamayose CI, Fávero OA, Romoff P, Ferreira MJP. Two New Flavonoids from the Leaves of *Baccharis oblongifolia* (Ruiz and Pav.) Pers. (Asteraceae). *Molecules*. 2019; 24(17):3198. <https://doi.org/10.3390/molecules24173198>.

ANEXO I

Espécie	Flavonoide	Referência
<i>Bacchari articulata</i>	Santonina	Gianello; Giordano, 1984
<i>B. articulata</i>	Apigenina	Gianello; Giordano, 1984
<i>B. articulata</i>	Luteolina	Gianello; Giordano, 1984
<i>B. articulata</i>	Quercetina	Gianello; Giordano, 1984
<i>B. articulata</i>	Genkwanina	Gianello; Giordano, 1984
<i>B. articulata</i>	Jaceidina	Gianello; Giordano, 1984
<i>B. articulata</i>	Jaceosidina	Gianello; Giordano, 1984
<i>Bacchari conferta</i>	Apigenina-4',7-dimetil éter	Verdi Et Al., 2005
<i>B. conferta</i>	Naringenina-4',7-dimetil éter	Verdi Et Al., 2005
<i>B. conferta</i>	Pectolinarigenina	Verdi Et Al., 2005
<i>B. conferta</i>	Cirsimaritina	Verdi Et Al., 2005
<i>Bacchari crispa</i>	Genkwanina	Verdi Et Al., 2005
<i>B. crispa</i>	Apigenina	Verdi Et Al., 2005
<i>B. crispa</i>	3-O-[E]- cafeoilquínico	Simões- Pires Et Al., 2005
<i>B. crispa</i>	5-O- [E]- cafeoilquínico	Simões- Pires Et Al., 2005
<i>B. crispa</i>	3,4-O- [E]- dicafeoilquínico	Simões- Pires Et Al., 2005
<i>B. crispa</i>	3,5-O- [E]- dicafeoilquínico	Simões- Pires Et Al., 2005
<i>Bacchari genistelloides.</i>	Ácido cafeico	Marques, M. F.; Marques, M. M.; Xavier, E. R., 2013
<i>Bacchari notoserghila</i>	Genkwanina	Verdi Et Al., 2005
<i>B. notoserghila</i>	Apigenina	Verdi Et Al., 2005
<i>Bacchari Oblongifolia</i>	Oblongifoliosídeo A	Zampieri Et Al., 2019
<i>B. Oblongifolia</i>	Oblongifoliosídeo B	Zampieri Et Al., 2019
<i>B. Oblongifolia</i>	Rutina	Zampieri Et Al., 2019
<i>B. Oblongifolia</i>	Quercetina-3- O- rutinósido	Zampieri Et Al., 2019
<i>B. Oblongifolia</i>	Ácido 4,5-di- O - (E) – cafeoilquínico	Zampieri Et Al., 2019
<i>B. Oblongifolia</i>	Kaempferol-3- O- rutinósido	Zampieri Et Al., 2019
<i>B. Oblongifolia</i>	3,5-di- O - (Ácido E) – cafeoilquínico	Zampieri Et Al., 2019
<i>B. Oblongifolia</i>	Ácido 3,4,5-tri- O - (E) –	Zampieri Et Al., 2019

	cafeoilquínico	
<i>Bacchari. Pedunculata</i>	Pectolinarigenina	Verdi Et Al., 2005
<i>B. pedunculata</i>	Penduletina	Verdi Et Al., 2005
<i>Bacchari sarothroides</i>	Tamarixetina-3,4'-dimetil éter	Verdi Et Al., 2005
<i>B. sarothroides</i>	Centaureidina	Verdi Et Al., 2005
<i>Bacchari trimera</i>	Quercetina	Pádua Et Al., 2014
<i>B. trimera</i>	Luteolina	Soicke E Leng-Peschlow, 1987;
<i>B. trimera</i>	Ácido gálico	Marques, M. F.; Marques, M. M.; Xavier, E. R., 2013
<i>B. trimera</i>	Ácido cafeico	Marques, M. F.; Marques, M. M.; Xavier, E. R., 2013
<i>B. trimera</i>	3-O-[E]- cafeoilquínico	Simões- Pires Et Al., 2005
<i>B. trimera</i>	5-O- [E]- cafeoilquínico	Simões- Pires Et Al., 2005
<i>B. trimera</i>	3,4-O- [E]- dicafeoilquínico	Simões- Pires Et Al., 2005
<i>B. trimera</i>	3,5-O- [E]- dicafeoilquínico	Simões- Pires Et Al., 2005
<i>B. trimera</i>	Jaceosidina	René Et Al.,1996
<i>B. trimera</i>	Eupatorina	René Et Al.,1996
<i>B. trimera</i>	Nepetina	Soicke E Leng-Peschlow, 1987
<i>B. trimera</i>	Apigenina	Soicke E Leng-Peschlow, 1987
<i>B. trimera</i>	Hispidulina	Soicke E Leng-Peschlow, 1987
<i>B. trimera</i>	Rutina	Verdi Et Al., 2005
<i>B. trimera</i>	5,7,3',4'-OH-3-O-ramnosil- B. Trimeria 55 (1→6) –glucosil	René Et Al.,1996
<i>B. trimera</i>	Cirsimaritina	Verdi Et Al., 2005
<i>B. trimera</i>	Genkwanina	Verdi Et Al., 2005
<i>B. trimera</i>	Naringenina	Marques, 2008
<i>B. trimera</i>	Genisteína	Marques, 2008
<i>B. trimera</i>	Kaempferol	Alonso, 2006
<i>B. trimera</i>	Cirsiliol	Alonso, 2006
<i>B. usterii</i>	3-O-[E]- cafeoilquínico	Simões- Pires Et Al., 2005
<i>B. usterii</i>	5-O- [E]- cafeoilquínico	Simões- Pires Et Al., 2005
<i>B. usterii</i>	3,4-O- [E]- dicafeoilquínico	Simões- Pires Et Al., 2005

<i>B. ustarii</i>	3,5-O- [E]- dicafeoilquínico	Simões- Pires Et Al., 2005
<i>Moquiniastrium argentinum</i>	7-O-metil-luteolina	Garcia & Guerreiro, 1988
<i>M. argentinum</i>	Hispidulina	Garcia & Guerreiro, 1988
<i>Moquiniastrium blanchetianum</i>	3-β-O-β-D-glicosil-canfero	Lima Et Al., 2003
<i>M. blanchetianum</i>	Tilirosídeo	Lima Et Al., 2003
<i>Moquiniastrium floribundum</i>	Hispidulina	Miguel., 2020
<i>Moquiniastrium paniculatum</i>	7[(3-metil-2-buten-1-il)oxi]- 3β,4',5- triidroxi-flavanona	Bohlmann Et Al., 1983
<i>M. polymorphum</i>	Genkwanina	Sacilotto Et Al., 1997
<i>M. polymorphum</i>	Desmetoxicentaureidina	Sacilotto Et Al., 1997
<i>M. polymorphum</i>	3-O-metilquercetina	Moreira Et Al., 2000
<i>M. polymorphum</i>	Rutina	Moreira Et Al., 2000
<i>M. polymorphum</i>	Hyperoside	Moreira Et Al., 2000
<i>Phyllanthus amarus</i>	Luteolina	Kumar Et Al.,2015
<i>P. amarus</i>	Kaempferol	Kumar Et Al.,2015
<i>P. amarus</i>	Kaempferol-3-O-rutinosídeo	Kumar Et Al.,2015
<i>P. amarus</i>	Luteolina	Kumar Et Al.,2015
<i>P. amarus</i>	Miricetrina	Kumar Et Al.,2015
<i>P. amarus</i>	Quercetina	Kumar Et Al.,2015
<i>P. amarus</i>	Quercitrina	Kumar Et Al.,2015
<i>P. amarus</i>	Quercetina-3-O-glucosídeo	Kumar Et Al.,2015
<i>P. amarus</i>	Rutina	Kumar Et Al.,2015
<i>P. amarus</i>	Kaempferol-O-hexoside	Kumar Et Al.,2015
<i>P. amarus</i>	Fisetin-O-hexoside	Kumar Et Al.,2015
<i>P. amarus</i>	Luteolin-O-hexoside	Kumar Et Al.,2015
<i>P. amarus</i>	Luteolin-O-dihexoside	Kumar Et Al.,2015
<i>P. amarus</i>	Hispidulina	Corciová Et Al.,2018
<i>P. amarus</i>	Ácido gálico	Pereira Et Al., 2018
<i>Phyllanthus niruri</i>	Vitexina-2'' -O-ramnosídeo	Sprenger & Cass (2013)
<i>P. niruri</i>	Quercetina-3-O-glucosídeo	Sprenger & Cass (2013)
<i>P. niruri</i>	Quercetin-3-O-glucuronide Quercetrin	Sprenger & Cass (2013)
<i>P. niruri</i>	Quercetina	Bagalkotkar Et Al., (2006)

<i>P. niruri</i>	Rutina	Bagalkotkar Et Al., (2006)
<i>P. niruri</i>	Galocatechin	Bagalkotkar Et Al., (2006)
<i>P. niruri</i>	Niruriflavone	Bagalkotkar Et Al., (2006)
<i>P. niruri</i>	Astragalina	Bagalkotkar Et Al., (2006)
<i>P. niruri</i>	Quercitrin	Bagalkotkar Et Al., (2006)
<i>P. niruri</i>	Quercetin 3-O- β -D-glucopyranosyl- (2-1) -O- β -D-xylopyranoside	Bagalkotkar Et Al., (2006)
<i>P. niruri</i>	Nirurin	Bagalkotkar Et Al., (2006)
<i>P. niruri</i>	Quercetin	Bagalkotkar Et Al., (2006)
<i>P. niruri</i>	Orientina-2'' -O-ramnosídeo	Sprenger & Cass (2013)
<i>P. niruri</i>	Orientina	Sprenger & Cass (2013)
<i>P. niruri</i>	Miricetrina	Sprenger & Cass (2013)
<i>P. niruri</i>	Kaempferol 4'-O- α -l-rhamnopyranoside	Qi Et Al. (2014)
<i>P. niruri</i>	Quercetol	Bagalkotkar Et Al., (2006)
<i>P. niruri</i>	Ácido salicílico	Martins, 1994
<i>P. niruri</i>	Isoquercitrina	Calixto Et Al., 1998
<i>P. niruri</i>	Fisetina-4-O-glucosídeo	Calixto Et Al., 1998
<i>P. niruri</i>	Ácido gálico	Fernanda Et Al.,2013 Marques., 2013
<i>P. niruri</i>	Quercetina	Fernanda Et Al.,2013
<i>P. niruri</i>	Kaempferol	Fernanda Et Al.,2013
<i>P. niruri</i>	Ácido clorogênico	Fernanda Et Al.,2013
<i>P. niruri</i>	Rutina	Fernanda Et Al.,2013
<i>P. niruri</i>	Ácido cafeico	Santa Maria.,2017

Tabela I. Catalogação por Espécie vegetal e seus compostos presentes. A catalogação da tabela foi organizada por cores, sendo organizada por variações de tons das seguintes cores verde, azul e vermelho e para as espécies *Bacchari spp.*, *Moquiniastrum spp.* e *Phyllanthus spp.*, respectivamente.

ANEXO II

Espécie	Composto	Pertencem a Mata Atlântica e ao RNISUS	Propriedade	Referências
<i>B. trimera</i>	Quercetina	X	Antioxidante/anti- inflamatórias	Karam et al., 2013 Barnaulov et al., 1983
<i>B. trimera</i>	Luteolina	X	Antioxidante/anti- inflamatórias	Pieroni et al., 1996 Pádua et al., 2010
<i>B. trimera</i>	Rutina	X	Antioxidante/anti- inflamatórias	La casa et al., 2000; jiang et al., 2007
<i>B. trimera</i>	Genisteína	X	Antioxidante/anti- inflamatórias	Nagem et al., 1993; asad et al., 1998
<i>B. trimera</i>	Apigenina	X	Antioxidante/anti- inflamatórias	soicke e leng- peschlow, 1987
<i>B. trimera</i>	Hispidulina	X	Antioxidante/anti- inflamatórias	Soicke e leng- peschlow, 1987. Corciovă et al.,2018
<i>B. Trimera</i>	Ácido gálico	X	Antioxidante/anti- inflamatórias	Marques, m. F.; marques, m. M.; xavier, e. R., 2013
<i>B. Trimera</i>	Ácido cafeico	X	Antioxidante/anti- inflamatórias	Marques, m. F.; marques, m. M.; xavier, e. R., 2013
<i>B. Trimera</i>	3-o-[e]- cafeoilquínico	X	Antioxidante/anti- inflamatórias	Simões- pires et al., 2005
<i>B. Trimera</i>	5-o- [e]- cafeoilquínico	X	Antioxidante/anti- inflamatórias	Simões- pires et al., 2005
<i>B. Trimera</i>	3,4-o- [e]- dicafeoilquínico	X	Antioxidante/anti- inflamatórias	Simões- pires et al., 2005
<i>B.</i>	3,5-o- [e]-	X	Antioxidante/anti-	Simões- pires et al.,

<i>Trimera</i>	dicafeoilquínico		inflamatórias	2005
<i>B. trimera</i>	Cirsimaritina	X	Antioxidante/anti-inflamatórias	Verdi et al., 2005
<i>B. trimera</i>	Genkwanina	X	Antioxidante/anti-inflamatórias	Verdi et al., 2005
<i>P. Amarus</i>	Kaempferol	X	Antioxidante/anti-inflamatórias	Kumar et al., 2015
<i>P. Amarus</i>	Quercetina	X	Antioxidante/anti-inflamatórias	Pieroni et al., 1996
<i>P. Amarus</i>	Ácido gálico	X	Antioxidante/anti-inflamatórias	Pereira et al., 2018
<i>P. niruri</i>	Isoquercitrina	X	Antioxidante/anti-inflamatórias	Calixto et al., 1998
<i>P. niruri</i>	Ácido gálico	X	Antioxidante/anti-inflamatórias	Fernanda et al., 2013 Marques., 2013
<i>P. niruri</i>	Quercetina	X	Antioxidante/anti-inflamatórias	Fernanda et al., 2013
<i>P. niruri</i>	Kaempferol	X	Antioxidante/anti-inflamatórias	Fernanda et al., 2013
<i>P. niruri</i>	Ácido clorogênico	X	Antioxidante/anti-inflamatórias	Fernanda et al., 2013
<i>P. niruri</i>	Rutina	X	Antioxidante/anti-inflamatórias	Fernanda et al., 2013
<i>P. niruri</i>	Astragalina	X	Antioxidante/anti-inflamatórias	Bagalkotkar et al., (2006)

Tabela II. Catalogação de atividade biológica dos compostos que pertencem ao Renisus e são do bioma da Mata Atlântica

ANEXO III

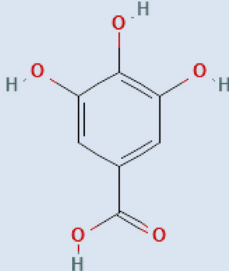
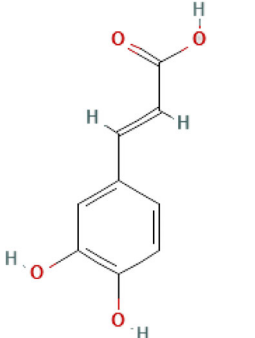
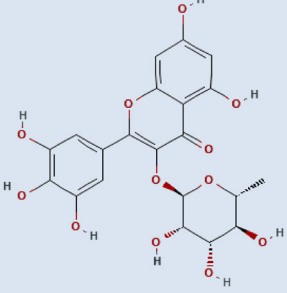
Indicados pelo SUS	Composto	Estrutura	Aplicações	Referência
<i>B. trimera</i> <i>P. amarus</i> <i>P. niruri</i>	Ácido Gálico		Antioxidante/anti-inflamatórias	Marques, M. F.; Marques, M. M.; Xavier, E. R., 2013 Pereira Et Al., 2018 Fernanda Et Al., 2013 Marques., 2013
<i>B. trimera</i> <i>P. niruri</i>	Ácido cafeico		Antioxidante/anti-inflamatórias	Marques, M. F.; Marques, M. M.; Xavier, E. R., 2013 Santa Maria., 2017
<i>P. amarus</i> <i>P. niruri</i>	Myricetin		Antioxidante/anti-inflamatórias	Kumar Et Al., 2015 SPRENGER & CASS (2013)

Tabela III: Estruturas de flavonoides encontrado em comum nas espécies selecionadas presentes no SUS, mantendo o padrão de cores das Tabelas anteriores.

ANEXO IV

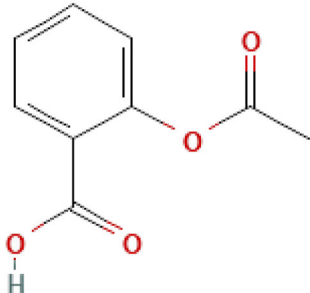
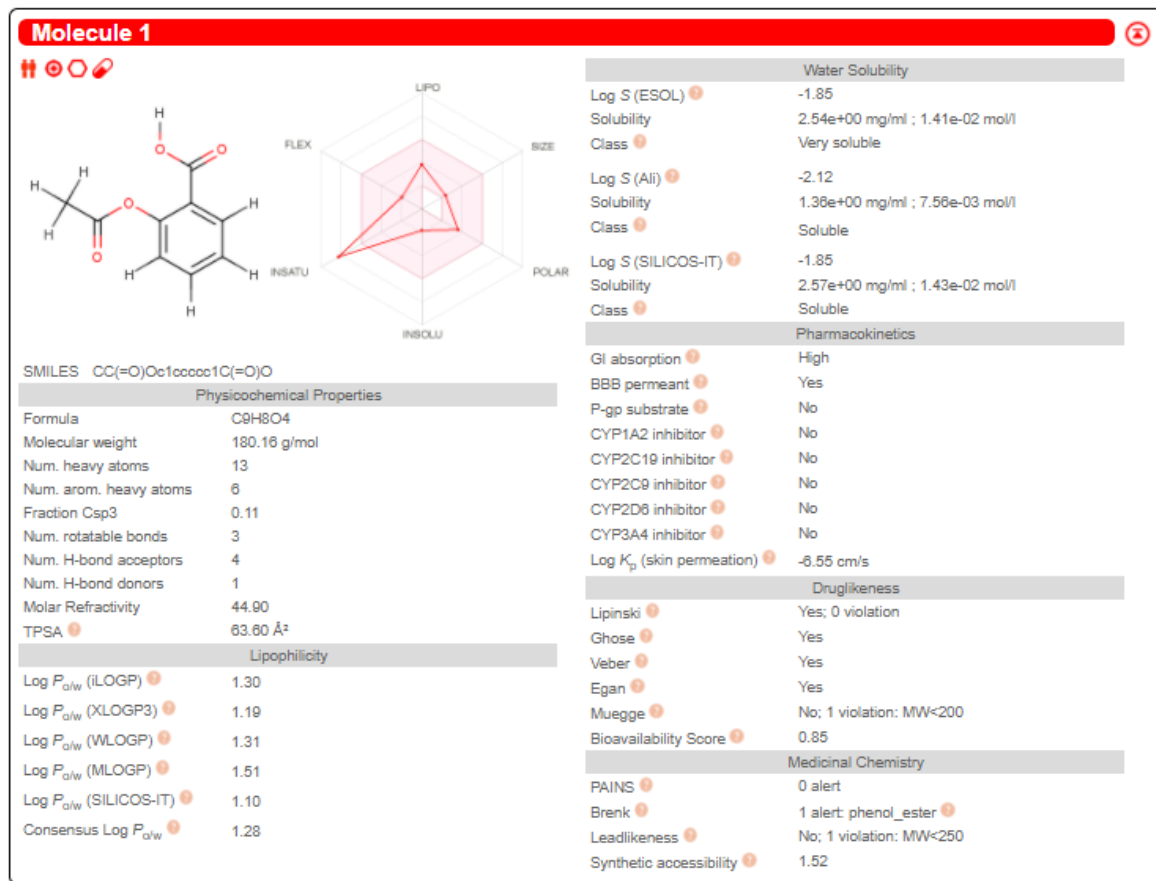
Medicamento	Aplicações	Estrutura 2 D	Referência
Ácido acetilsalicílico	analgésico, anti-inflamatório não esteroide, antitêrmico e antiagregante plaquetário.		Araújo et al., 2018

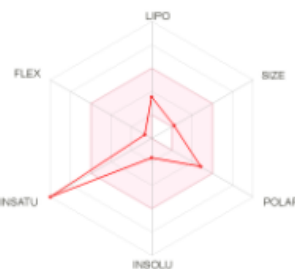
Tabela IV. Estrutura 2D do medicamento ácido acetilsalicílico que usado para comparação da atividade anti-inflamatória com os compostos encontrados em comum nas espécies selecionadas presentes no SUS e no bioma Mata Atlântica. A estrutura foi retirada do banco de dados PubChem.

ANEXO V

Dados obtidos na plataforma SwissADME



Molecule 2

SMILES OC(=O)c1cc(O)c(c(O)O)c1O

Physicochemical Properties

Formula	C ₇ H ₆ O ₅
Molecular weight	170.12 g/mol
Num. heavy atoms	12
Num. arom. heavy atoms	6
Fraction Csp ³	0.00
Num. rotatable bonds	1
Num. H-bond acceptors	5
Num. H-bond donors	4
Molar Refractivity	39.47
TPSA	97.99 Å ²

Lipophilicity

Log <i>P</i> _{o/w} (iLOGP)	0.21
Log <i>P</i> _{o/w} (XLOGP3)	0.70
Log <i>P</i> _{o/w} (WLOGP)	0.50
Log <i>P</i> _{o/w} (MLOGP)	-0.16
Log <i>P</i> _{o/w} (SILICOS-IT)	-0.20
Consensus Log <i>P</i> _{o/w}	0.21

Water Solubility	
Log <i>S</i> (ESOL)	-1.64
Solubility	3.90e+00 mg/ml ; 2.29e-02 mol/l
Class	Very soluble
Log <i>S</i> (Ali)	-2.34
Solubility	7.86e-01 mg/ml ; 4.62e-03 mol/l
Class	Soluble
Log <i>S</i> (SILICOS-IT)	-0.04
Solubility	1.55e+02 mg/ml ; 9.10e-01 mol/l
Class	Soluble

Pharmacokinetics

GI absorption	High
BBB permeant	No
P-gp substrate	No
CYP1A2 inhibitor	No
CYP2C19 inhibitor	No
CYP2C9 inhibitor	No
CYP2D6 inhibitor	No
CYP3A4 inhibitor	Yes
Log <i>K</i> _p (skin permeation)	-6.84 cm/s

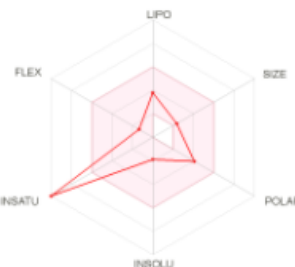
Druglikeness

Lipinski	Yes; 0 violation
Ghose	No; 2 violations: MR<40, #atoms<20
Veber	Yes
Egan	Yes
Muegge	No; 1 violation: MW<200
Bioavailability Score	0.56

Medicinal Chemistry

PAINS	1 alert: catechol_A
Brenk	1 alert: catechol
Leadlikeness	No; 1 violation: MW<250
Synthetic accessibility	1.22

Molecule 3

SMILES OC(=O)C=C/c1cc(O)c(c(O)O)c1O

Physicochemical Properties

Formula	C ₉ H ₈ O ₄
Molecular weight	180.16 g/mol
Num. heavy atoms	13
Num. arom. heavy atoms	6
Fraction Csp ³	0.00
Num. rotatable bonds	2
Num. H-bond acceptors	4
Num. H-bond donors	3
Molar Refractivity	47.16
TPSA	77.78 Å ²

Lipophilicity

Log <i>P</i> _{o/w} (iLOGP)	0.97
Log <i>P</i> _{o/w} (XLOGP3)	1.15
Log <i>P</i> _{o/w} (WLOGP)	1.09
Log <i>P</i> _{o/w} (MLOGP)	0.70
Log <i>P</i> _{o/w} (SILICOS-IT)	0.75
Consensus Log <i>P</i> _{o/w}	0.93

Water Solubility	
Log <i>S</i> (ESOL)	-1.89
Solubility	2.32e+00 mg/ml ; 1.29e-02 mol/l
Class	Very soluble
Log <i>S</i> (Ali)	-2.38
Solubility	7.55e-01 mg/ml ; 4.19e-03 mol/l
Class	Soluble
Log <i>S</i> (SILICOS-IT)	-0.71
Solubility	3.51e+01 mg/ml ; 1.95e-01 mol/l
Class	Soluble

Pharmacokinetics

GI absorption	High
BBB permeant	No
P-gp substrate	No
CYP1A2 inhibitor	No
CYP2C19 inhibitor	No
CYP2C9 inhibitor	No
CYP2D6 inhibitor	No
CYP3A4 inhibitor	No
Log <i>K</i> _p (skin permeation)	-6.58 cm/s

Druglikeness

Lipinski	Yes; 0 violation
Ghose	Yes
Veber	Yes
Egan	Yes
Muegge	No; 1 violation: MW<200
Bioavailability Score	0.56

Medicinal Chemistry

PAINS	1 alert: catechol_A
Brenk	2 alerts: catechol, michael_acceptor_1
Leadlikeness	No; 1 violation: MW<250
Synthetic accessibility	1.81

ANEXO VI

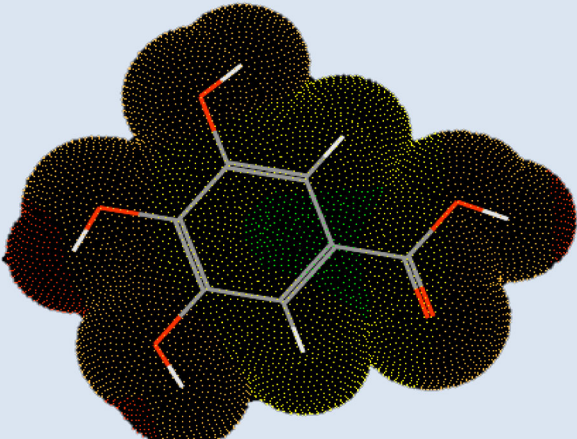
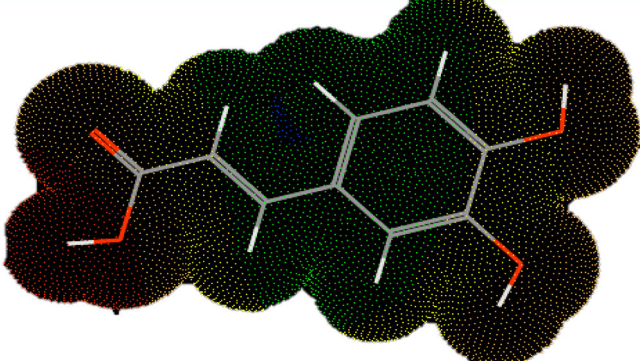
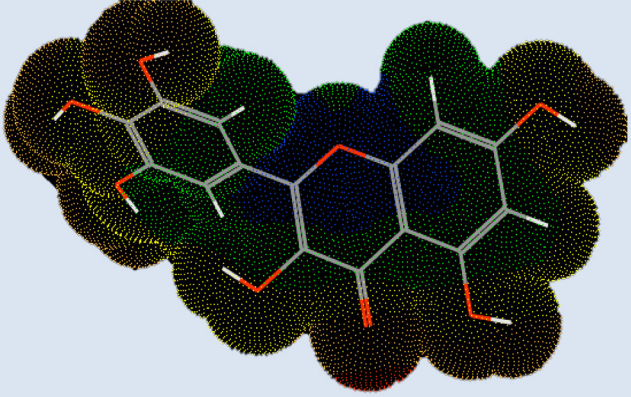
Compostos	Estrutura 3D
Ácido Gálico	
Ácido cafeico	
Miricitrina	

Tabela VI. Estrutura 3D dos compostos com sua respectiva nuvem eletrônica. As imagens 3D com a nuvem eletrônica com a cor de acordo com suas características de hidrofobicidade (violeta e azul) e hidrofiliicidade (laranja e vermelho), imagens geradas pela plataforma Molinspiration.

ANEXO VII

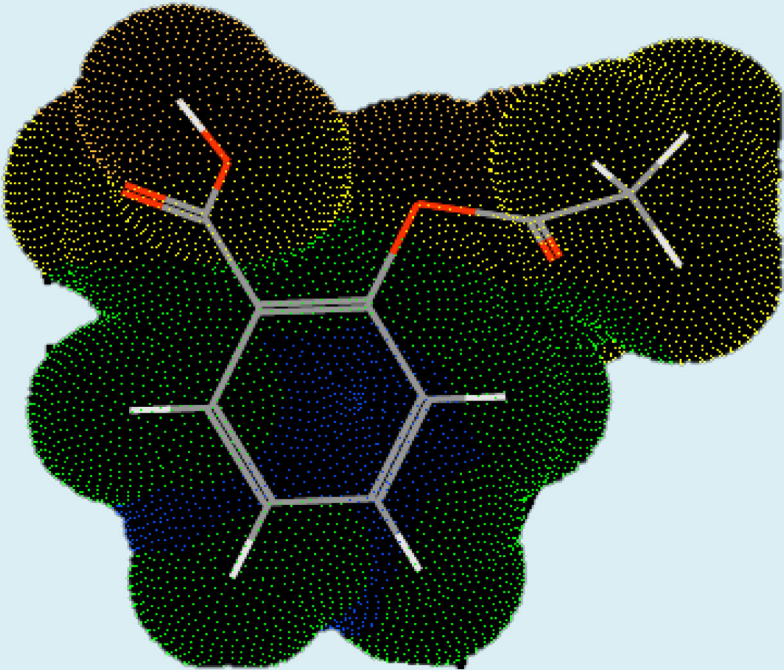
Medicamento	Estrutura 3D
AAS	

Tabela VII. Estrutura 3D do medicamento AAS com sua respectiva nuvem eletrônica. As imagens 3D com a nuvem eletrônica com a cor de acordo com suas características de hidrofobicidade (violeta e azul) e hidrofiliicidade (laranja e vermelho), imagens geradas pela plataforma Molinspiration.

ANEXO VIII

PLA2 ->		CDT - sPLA2		
Composto ->	A. Gálico	A. Cafeico	AA S	Myrcetrina
Ligações com Asp.	3	6	2	2
Tipo de Ligações com Asp.	Van der Walls	ponte de hidrogênio	van der Walls	van der Walls
Distância Ligações com Asp. (A)	3,1	3,05	3,3	3,2
Ligações com his	5	0	0	0
Tipo de Ligações com his	Van der Walls	-----	-----	-----
Distância Ligações com his (A)	3,92	0	0	0
Ligações com Glicinas	1	3	0	0
Tipo de Ligações com Glicinas	van der Walls	van der Walls	-----	-----
Distância Ligações com Glicinas (A)	4	2,64	0	0
número de interações com o sítio ativo	9	6	0	0
proximidade das interações. (A)	3,33	3,125	3,61	3,16
hidrofóbica VS Hidrofílica	18::09	9::10	13::00	9::16
Força das ligações, tipos covalentes e pontes de hidrogênio.	6	6	2	21
Ligações Infavoráveis	0	1	0	0
Van de Walls	21	12	11	16
Total de Ligações	27	19	13	37

Tabela VIII. Tabela resumida sobre as interações dos compostos frente a sPLA2, onde podemos notar que quanto a maior quantidade de interações com o sítio ativo das proteínas o composto tem maior chance matemática de ser um bom inibidor em testes in vitro.

ANEXO IX

PLA2 ->	Lp-PLA2		
Composto ->	A. Gálico	A. Cafeico	AAS
Ligações com Asp.	-----	-----	-----
Tipo de Ligações com Asp.	-----	-----	-----
Distância Ligações com Asp. (A)	-----	-----	-----
Ligações com his	-----	-----	-----
Tipo de Ligações com his	-----	-----	-----
Distância Ligações com his (A)	-----	-----	-----
Ligações com Glicinas	12	-----	1
Tipo de Ligações com Glicinas	Ponte de hidrogênio / van der Walls	-----	van der Walls
Distância Ligações com Glicinas (A)	2,9	-----	4
número de interações com o sítio ativo	0	0	0
proximidade das interações. (A)	3,12	3,09	3,15
hidrofóbica VS Hidrofilica	11::25	8::15	6::5
Força das ligações, tipos covalentes e pontes de hidrogênio.	17	17	7
Ligações Infavoráveis	0	0	0
Van de Walls	19	6	4
Total de Ligações	36	23	11

Tabela IX: Tabela resumida sobre as interações dos compostos frente a LP-PLA2, onde podemos notar que quanto a maior quantidade de interações com o sítio ativo das proteínas o composto tem maior chance matemática de ser um bom inibidor em testes in vitro.

ANEXO X

PLA2 ->	AchE		
Composto ->	A. Gálico	A. Cafeico	AA S
Ligações com Asp.	-----	1	-----
Tipo de Ligações com Asp.	-----	van der Walls	-----
Distância Ligações com Asp. (A)	-----	4	-----
Ligações com his	2	1	-----
Tipo de Ligações com his	van der Walls	van der Walls	-----
Distância Ligações com his (A)	3	3,8	-----
Ligações com Glicinas	6	10	-----
Tipo de Ligações com Glicinas	ponte de carbono	van der Walls	-----
Distância Ligações com Glicinas (A)	3	3,38	-----
número de interações com o sítio ativo	3	2	0
proximidade das interações. (A)	3,02	3,13	3,24
hidrofóbica VS Hidrofilica	16::21	23::19	18:: 8
Força das ligações, tipos covalentes e pontes de hidrogênio.	27	13	17
Ligações Infavoraveis	0	0	0
Van de Walls	10	29	9
Total de Ligações	37	42	26

Tabela X. Tabela resumida sobre as interações dos compostos frente a AchE, onde podemos notar que quanto a maior quantidade de interações com o sítio ativo das proteínas o composto tem maior chance matemática de ser um bom inibidor em testes in vitro.

Communication

Gallic Acid as a Non-Selective Inhibitor of α/β -Hydrolase Fold Enzymes Involved in the Inflammatory Process: The Two Sides of the Same Coin

Marcos Hikari Toyama ^{1,*}, Aíram Rogers ¹, Laila Lucyane Ferreira de Moraes ¹, Gustavo Antônio Fernandes ¹, Caroline Ramos da Cruz Costa ^{1,2}, Mariana Novo Belchor ^{1,2,3}, Agatha Manzi De Carli ¹ and Marcos Antônio de Oliveira ^{1,3}

- ¹ BIOCOLPIT Group, Biosciences Institute, São Paulo State University (UNESP), São Vicente 13300-900, São Paulo, Brazil; aairam.rogers@hotmail.com (A.R.); laila_luciane@hotmail.com (L.L.F.d.M.); gustavofernandes2014@gmail.com (G.A.F.); carolbertil@gmail.com (C.R.d.C.C.); belchor.mariana@gmail.com (M.N.B.); agatha.manzi@yahoo.com.br (A.M.D.C.); scaffell@gmail.com (M.A.d.O.)
² Postgraduate Program in Biotechnosciences, Federal University of ABC, Santo André 09210-580, São Paulo, Brazil
³ Correspondence: marcos@hikari Toyama@gmail.com



Citation: Toyama, M.H.; Rogers, A.; de Moraes, L.L.F.; Fernandes, G.A.; da Cruz Costa, C.R.; Belchor, M.N.; De Carli, A.M.; de Oliveira, M.A. Gallic Acid as a Non-Selective Inhibitor of α/β -Hydrolase Fold Enzymes Involved in the Inflammatory Process: The Two Sides of the Same Coin. *Pharmaceutics* **2022**, *14*, 368. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14020368>

Academic Editor: António Leite-Rosa

Received: 22 December 2021

Accepted: 29 January 2022

Published: 6 February 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: (1) Background: Gallic acid (GA) has been characterized as an effective anti-inflammatory, antivenom, and promising drug for therapeutic use. (2/3) Methods and Results: GA was identified from ethanolic extract of fresh pitanga (*Eugenia uniflora*) leaves, which was identified using commercial GA. Commercial GA neutralized the enzymatic activity of secretory PLA2 (sPLA2) by inhibiting the active site and inducing changes in the secondary structure of the enzyme. Pharmacological edema assays showed that GA strongly decreased edema when the compound was previously incubated with sPLA2. However, prior treatment of GA (30 min before) significantly increased the edema and myotoxicity induced by sPLA2. The molecular docking results of GA with platelet-activating factor (PAF-AH) and acetylcholinesterase reveal that this compound was able to interact with the active site of both molecules, inhibiting the hydrolysis of platelet-activating factor (PAF) and acetylcholine (ACh). (4) Conclusion: GA has a great potential application; however, our results show that this compound can also induce adverse effects in previously treated animals. Additionally, the increased edema and myotoxicity observed experimentally in GA-treated animals may be due to the inhibition of PAF-AH and Acetylcholinesterase.

Keywords: gallic acid; edema; myotoxic effect; snake venom; phospholipase A2

1. Introduction

Gallic acid (GA) is widely present in the plant kingdom and can be found in its free form in vegetal tissues, in the esters form, or as conjugated esterified molecules. The amount of this compound can vary depending on external stimuli, such as chemical and microbiological stressors, and is strongly associated with defense against predation by insects. In addition, some studies show that GA inhibits a range of esterases/lipases [1–5]. α/β -Hydrolase fold proteins are a major superfamily of enzymes that catalyze a wide range of reactions, featuring a conserved Ser-His-Acid catalytic triad. This family encompasses a variety of enzymes, including esterases, proteases, lipases, dehalogenases, peroxidases, and epoxide hydrolases. They all contain a catalytic triad composed of a nucleophile (typically serine, occasionally aspartate or cysteine), an anionic side chain, and an intervening histidine from the catalytic triad, located between the core and cap domains. This enzymatic fold is found throughout all domains of organisms, ranging from humans to plants, bacteria, and even viruses [6,7]. Moreover, this characteristic has been found in several important enzymes involved in inflammation, such as intracellular and extracellular Platelet-Activating

Factor-Acetylhydrolase (PAF-AH). These enzymes are designated as PLA2 associated with lipoprotein (Lp-PLA2) and play a role in the special regulation of extracellular PAF concentration produced during inflammation, which is induced by the phospholipase A2 cascade that includes Arachidonic Acid (AA) production [8–10]. Other important enzymes that exhibit a similar protein α/β hydrolase fold are the Cholinesterase-like enzymes [11] and both types of cytosolic (cPLA2) and secretory phospholipase A2 (sPLA2) found in cells and snake venom, respectively [12]. sPLA2 is a type of α/β hydrolase folding enzyme, and this structural motif is also found in several enzymes which are involved in the inflammatory process resolution, such as PAF-AH and acetylcholinesterase [11,12].

Studies with natural compounds are a very seductive area that aims to find potential drugs that can be used to synthesize new molecules. Several articles in the literature suggest the beneficial effects of GA against phospholipase A2 activity. Costa et al., 2021 [13] showed that GA was able to inhibit and neutralize the pharmacological activity of BthTx-I (catalytically inactive PLA2). Furthermore, in all these models, the compounds were always preincubated with PLA2 isolated from venom [14–17], and, as we have confirmed, the preincubation leads to the complete neutralization of the enzymatic and pharmacological effects of this enzyme. Due to these beneficial properties and the apparent lack of toxicity of GA, this compound has been extensively marketed as a food supplement for daily use [13,18]. However, there is no study regarding the effect of GA inoculation on animals prior to sPLA2 administration and its effects on the animal body. Thus, the big question in this study was: when animals are previously treated with GA, could this compound neutralize the inflammatory and myotoxic action induced by sPLA2 from rattlesnake venom? Hence, in this short communication, we show that GA, when previously applied, increased the pharmacological effects induced by PLA2, and we reveal essential interactions of this compound with these crucial enzymes through molecular docking studies, an essential tool to understand *in vitro* and *in vivo* studies. Thus, we presented the other side of the coin: the experimental side effects of GA and the need for the compound to be used as a drug and not sold without a prescription or indication.

2. Materials and Methods

2.1. Venoms, Animals, and Reagents

Crotalus durissus terrificus (Cdt) venom was purchased from Bio-Agents Serpentarium (Botatins, São Paulo, Brazil). Analytical HPLC and sequencing-grade solutes and solvents were purchased from various suppliers (Bio-Rad, Hercules, CA, USA; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA; Boehringer Mannheim, São Paulo, SP, Brazil and Applied Biosystems, San Francisco, CA, USA). Female Swiss mice (~25 g) used in the pharmacological assays were obtained from the Multidisciplinary Center of Biological Investigations (CEMIB-UNICAMP). All animal experiments were approved by the Ethics Committee of State University of São Paulo/LB./São Vicente under Protocol number: 11/2018-CEUA, and Protocol n° 10/2018-CEUA, both approved in 19 March 2019.

2.2. GA Identification

In this work, we used commercial GA to identify the prepared pitanga leaf samples based on the methods described by [15], including sample preparation using ultrasound-assisted extraction followed by a concentration. The material was cleaned using solid-phase extraction cartridges prior to fractionation on reversed-phase HPLC using an analytical C18 column (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) (250 × 4.6 mm, 5 μ m) and mobile phase water (A)/acetonitrile (B). GA identification was confirmed by commercial gallic acid marker (Gallic acid monohydrate, ACS 98%, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) and the respective UV scanning of both compounds from sample and standard.

2.3. sPLA2 Purification, GA Incubation, and Circular Dichroism Spectroscopy

sPLA2 purification and its incubation with GA were performed using the method described by Cotrim et al., 2011 [16]. PLA2 purity was confirmed through HPLC and its

enzymatic activity. Then, this enzyme was used for the pharmacological and biochemical assays. In the first step, sPLA2 was incubated with the protein, and the product of the sPLA2: GA incubation was purified to clear the unbound gallic acid complex. Samples of sPLA2: GA were also subjected to circular dichroism assays.

2.4. Enzymatic and Pharmacological Activity (Edema and Myonecrosis)

Enzymatic and pharmacological activities were performed following the method described by Toyama et al., 2014 [17]. sPLA2 activity and the GA potential to inhibit this enzyme were measured using a 96-well plate assay using 4-nitro-3-octanoyloxy-benzoic acid (NOBA or NOB, manufactured by BIOMOL, Plymouth Meeting, PA, USA) as the substrate. Enzyme activity, which was expressed as the initial velocity of the reaction (V_0), was calculated based on the increase in absorbance after 20 min. All assays were performed with a SpectraMax 340 multiwell plate reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA) using the absorbance at 425 nm.

To confirm the GA potential to inhibit sPLA2 enzymatically, the paw edema assay was performed through the samples administration via right posterior sub plantar injection using randomly-chosen Swiss female mice (~25 g, $n = 5$). The first experiment included a previous incubation of sPLA2 with GA, a positive control, which was the protein with a saline solution, and the negative control (saline solution). Paw volumes were measured immediately before the injection and at selected time intervals (data not shown). In the second assay, we investigated the effect of the previous inoculation by intraperitoneal rout (i.p.) of GA dissolved in saline in a single dose of 50 μ L per animal 30 min before sPLA2 injection in the paw. All volumes administered on animals' paws were 20 μ L, always following the same concentrations of the samples: 10 μ g/per animal of sPLA2, 1 mM of GA and NaCl at 0.9%.

Myonecrosis was measured by liberation of creatine kinase (CK) from damaged muscle cells using the same animal model and treatments explained above. Hence, in the first myonecrosis assay, GA was previously incubated for 30 min with sPLA2, and then the samples were injected into the gastrocnemius muscle (data not shown). The second treatment was made through the previous GA administration in the peritoneum (50 μ L) 30 min before the sPLA2 injection into the gastrocnemius muscle. Control groups ($n = 5$) were submitted to the same procedure; however, the negative control was inoculated with 20 μ L of 0.9% NaCl, and 20 μ L (1 mM μ g) of the purified compound, and in the positive control, 20 μ L (10 μ g) of isolated sPLA2 was administered. The volumes applied into the muscle were 20 μ L, and the concentrations of each sample were described in the previous paragraph. After 60 min, the animals' blood was harvested from the tail in a heparinized tube, which was centrifuged and frozen. Serum creatine kinase (CK) levels were determined according to the manufacturer of the kit (Bioliquid, Pinhais, Brazil), and the data were expressed in units per liter (U/L).

2.5. Molecular Modeling (Docking) and Enzymatic Inhibition

The PDB (Protein Data Bank-<https://www.rcsb.org> accessed on 21 December 2021) and NCBI (NCBI-<https://www.ncbi.nlm.nih.gov> accessed on 21 December 2021) databases were used in this analysis to find the amino acid sequence of all proteins. Information on the structure of GA was taken from the PubChem platform (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov> accessed on 21 December 2021). The crystallographic model chosen as the best model for the construction of the theoretical structural model to PLA2 from Cdt was 2qpg and Acetylcholinesterase (4m0e) and PAF-AH (3D59) from human models. The SWISS-MODEL platform (<https://swissmodel.expasy.org> accessed on 21 December 2021) and the Chimera 1.14 program (Ucsf Chimera, 2004) were used to assemble the structural molecular model of the protein and to evaluate the general possibilities of the proteins binding with GA. After a previous study of the mechanisms and the essential residues of these proteins, molecular anchoring experiments were performed by Autodock Vina. All molecules were prepared previously, adding polar hydrogen atoms and aggregating the Kollman

charges. Then, the files were converted in PDBQT to perform the calculations of the energy maps (Grid Box). The size was chosen to enclose all amino acids from the catalytic site's microenvironment. The results were taken using the tools Discovery Studio 4.0, LICPLOT+, and PyMol v 2.4 to evaluate the binding energies, distances, and orientations of molecules in the microenvironment of the active site of PLA2. The Molinspiration platform was used to better visualize the structure of the compounds.

2.6. Statistical Analyses

Results were reported as means $\pm$ SD of replicate experiments. The significance of differences between means was assessed by an analysis of variance, followed by a Dunnett's test when several experimental groups were compared to the control group. The confidence limit for significance was 5%.

3. Results

Previous Injection of GA and Its Effects

Native sPLA₂ exhibited a maximum edema value at 30 min, with a swelling value of 0.22 ± 0.013 mL ($n = 5$, and $p < 0.05$ *). GA treatment inoculated 30 min before sPLA₂ administration, a condition called sPLA₂:GA (1 mM/30'), showed edema of 0.26 ± 0.012 mL ($n = 5$, and $p < 0.05$ *) at 60 min of the edema experiment. Hence, the single dose of 50 microliters (1 mM) administered previously did not decrease edema in this treatment and revealed a similar profile of edema induced by sPLA₂ with saline. However, in Figure 1A, it is possible to notice that the maximum edema peak induced by native sPLA₂ was reached at 30 min, whereas in the animals with GA previously injected, edema reached a maximum at 60 min. Additionally, this compound promoted more persistent edema until the time of 240 min, besides being two times higher. Using the PAF kit (Mouse PAF ELISA Kit, EM 1261 Wuhan Fine Biotech Co., Ltd., Wuhan, Hubei, China), PAF concentration was evaluated in the plasma. The animals treated with saline and GA showed values of 0.13 ± 0.04 ng/mL ($n = 5$, and $p < 0.05$ *) and 0.15 ± 0.02 ng/mL ($n = 5$, and $p < 0.05$ *), respectively. Samples from animals treated with native PLA₂ showed values of 0.21 ± 0.07 ng/mL ($n = 5$, and $p < 0.05$ *) and in animals previously treated with the compound after sPLA₂ injection presented edema values of 0.78 ng/mL ($n = 5$, and $p < 0.05$ *).

Figure 1B reveals the myotoxic activity induced by native sPLA₂ and sPLA₂ injected in the muscle after GA previous treatment. The extent of damage caused by sPLA₂ to skeletal muscles was obtained by quantifying the CK levels, which are widely used as an indirect marker of muscle damage. A total of 60 min after the native sPLA₂ injection in the muscle, the CK value in animals previously treated with the compound (GA, 1 mM/30') was 456 ± 46 U/L ($n = 5$, and $p < 0.05$ *), whereas for animals not exposed to any treatment (saline 30'), CK level found in plasma was 362 ± 27 U/L ($n = 5$, and $p < 0.05$ *). GA showed the same level found in animals under saline treatment. Thus, GA previously administered potentializes the myotoxic effect induced by sPLA₂.

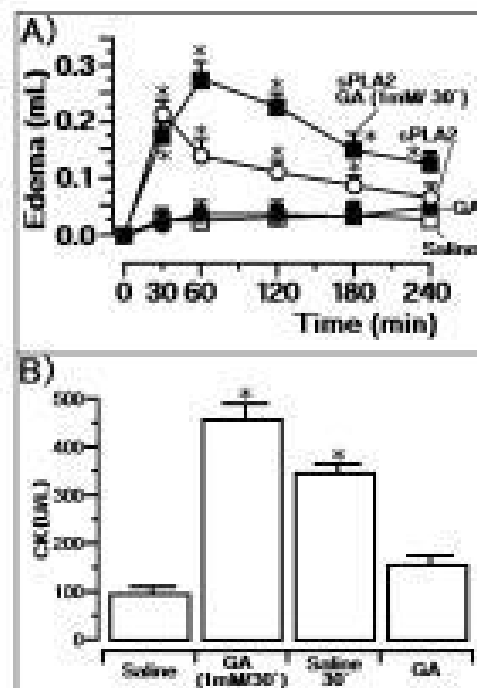


Figure 1. Evaluation of the GA previous treatment on the edema and myotoxicity triggered by sPLA2 from Cdt. In (A), the effect of the previous injection of GA, revealing an edema peak at 60 min, which is higher than the positive control (sPLA2) ($n = 5$, and $p < 0.05$). In (B), myotoxic effect results of the animal treated previously with GA (GA (1 mM/30')) reveals a raise in the CK values when compared with the positive and negative controls ($n = 5$, and $p < 0.05$).

The sPLA2 incubated with GA previous to the administration on mice show an enzymatic, edematogenic, and myotoxic inhibition by the compound (data not shown), since edema reveals a volume of 0.09 ± 0.03 mL ($n = 5$, and $p < 0.05$ *) at the peak, and CK levels reached values of 167 ± 32 U/L ($n = 5$, and $p < 0.05$ *). Docking results reveal a strong molecular interaction of the compound with the enzyme active site, interacting with crucial amino acid residues located in the N-terminal region (F5), with Histidine (H48), Aspartic acid (D49). In Figure 2A, simulations performed with the Discovery program also suggest an interaction with the calcium ion. Also, results from the LigProt+ program suggest that GA hydroxyl groups (OH) interact with the side chain of Aspartic Acid (D49) and with the side chain of Cystein 45 (Cys45) besides the presence of several other interactions with Histidine 48 (H48) and with N-terminal Phenylalanine (F5) (Figure 2B). Thus, in Figure 2C, we present a possible interaction site of GA with sPLA2, exhibiting the involved residues that are crucial for the enzymatic activity of sPLA2 from Cdt. The interaction with the calcium-binding loop, as shown in Figure 2A, could explain the enzyme inhibition induced by gallic acid. sPLA2 without GA incubation showed a V_{max} of $A_{425} \text{ nm/min} = 0.18/\text{min}$ in Absorbance units ($A_{425} \text{ nm}$) and a K_m of 2.45 mM relative to the NOBA substrate ($n = 16$, and $p < 0.05$ *) and after incubation, the purified sPLA2-GA complex showed a higher value of both in V_{max} and K_m , which were, respectively, $A_{425} \text{ nm/min} = 0.36/\text{min}$ in Absorbance units ($A_{425} \text{ nm}$) and a K_m value of 5.73 mM ($n = 16$, and $p < 0.05$ *). These results emphasize the raise in K_m value for GA incubated with PLA2, which suggests that the compound decreases the enzyme affinity with the substrate. In addition, the change in V_{max} values suggests that the inhibition of GA does not happen in a specific way. Since sPLA2 activity also depends on the N-terminal or short N-terminal segment of the alpha helix, this change in the alpha helix is confirmed by circular dichroism data (Figure 2E).

and the docking results reveal that GA exhibits an irreversible inhibition activity against this protein. The sPLA2 purified from *Cdt* venom (Figure 2G) was used to induce the inflammatory process in all experiments stated above, and the interaction between the protein and GA can be observed in Figure 2F.

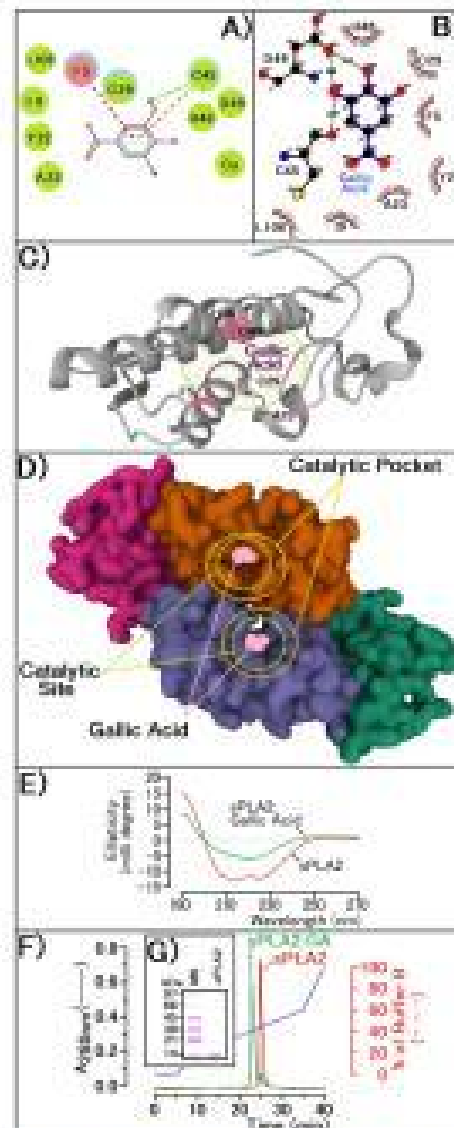


Figure 2. (A,B) show the molecular interaction models of GA with the active site of PLA2 using Discovery and LigProT programs, respectively. The figures exhibit the main groups of the ligand and proteins responsible for the interaction with the active site of sPLA2 from *Crotalus durissus terrificus*. In (C,D), it is possible to notice the interaction sites of the compound with the active site of sPLA2 in monomeric and tetrameric form. (E) reveals the sPLA2 conformational changes of the secondary structures before and after treatment with GA, using circular dichroism. (F) exhibits the reverse phase HPLC profile of sPLA2 before and after modification with GA. (G) shows the tricine SDS-PAGE of sPLA2 from *Crotalus durissus terrificus*. Both protocols of the reverse phase HPLC analysis and PAGE: SDS Cotrim et al., 2011 [16].

4. Discussion

There is a consensus that gallic acid could have several beneficial effects. It is a promising candidate for the development of new drugs for experimental use, and there is a call for its use as a nutritional supplement. Other literature data show that GA is a powerful inhibitor of the pharmacological activity of PLA2 from venoms [13,18]. Thus, the major question was what effects of GA would be observed when the compound was previously administered in animals on the development of edema and myotoxicity induced by sPLA2. Our data confirmed the findings revealing that GA, when incubated with the venom PLA2, was able to neutralize the effect of the protein. On the other hand, we also observed that the application of GA before the PLA2 injection neither inhibited the edema nor the myotoxicity induced by the enzyme. Additionally, the experimental data show that the animals treated with GA before and after the injection of PLA2 also showed an increase in the levels of PAF when compared with the control group.

PAF presents a wide range of actions and may strongly contribute to the course of pathophysiologic effects observed during acute inflammation, including the increase of oxidative burst and eicosanoid production [19–21]. Previous work showed that Cdt sPLA2 induces a moderate acute edema that involves a rapid mobilization of AA, including the phospholipase C (PLC) protein kinase C (PKC) signaling and the activation of cPLA2, plus a massive production of PAF, which is a biologically active phospholipid provided from the enzymatic action of sPLA2 and cPLA2 [20,21]. Thus, PAF and AA are crucial for the edema and the pathological damage induced by sPLA2 from Cdt [20,22]. PAF degradation requires the acetyl group removal at the sn-2 position of the glycerol backbone, an action catalyzed by PAF-AH, and this is a crucial first step for neutralization of PAF binding to PAF-receptor to inhibit the capacity of the acute inflammatory process by PAF [19,21]. These PAF-AH enzymes are Ca^{2+} -independent which belong to group VII of phospholipase A2. This group of enzymes exists in both extracellular and intracellular forms in various organisms, and the enzyme extracellular PAF-AH is the most important way to control plasma extracellular PAF levels [23–26]. Thus, the experimental data from GA-treated animals could suggest that the increased plasma level of PAF could be due to inhibition of the extracellular PAF-AH enzyme. The results regarding the interaction between GA and PAF-AH were performed using *in silico* analysis with modeling tools. Figure 3 reveals that GA strongly interacts with certain crucial amino acid residues found in the extracellular PAF-AH enzyme, residues S248, D271, and H326, which are crucial for its enzymatic activity [24,25]. Furthermore, using the kit (PAF Acetylhydrolase Inhibitor Screening Assay Kit (ab133091), (Abcam Discovery Drives, Cambridge Biomedical Campus, Cambridge, CB2 0AX, UK)) and following the method described by the user manual of the kit, we were able to show that the standard inhibitor (Methyl Arachidonyl Fluorophosphonate, MAFF) showed an IC_{50} of 250 nM and GA showed an IC_{50} value of 125 nM; thus GA was twice as effective in inhibiting the standard inhibitor itself. Furthermore, the compound exhibits a high ability to interact at the active site of acetylcholinesterase, binding with S125, H447, and E202 that form the catalytic unit of these enzymes [25]. The sPLA2 from CDT can induce edema through peripheral nerve activation, a process that involves acetylcholine participation. This fact contributes to the neurotoxic, edematogenic, myotoxic, and insulinotropic activities of sPLA2 in an indirect manner [26–29].

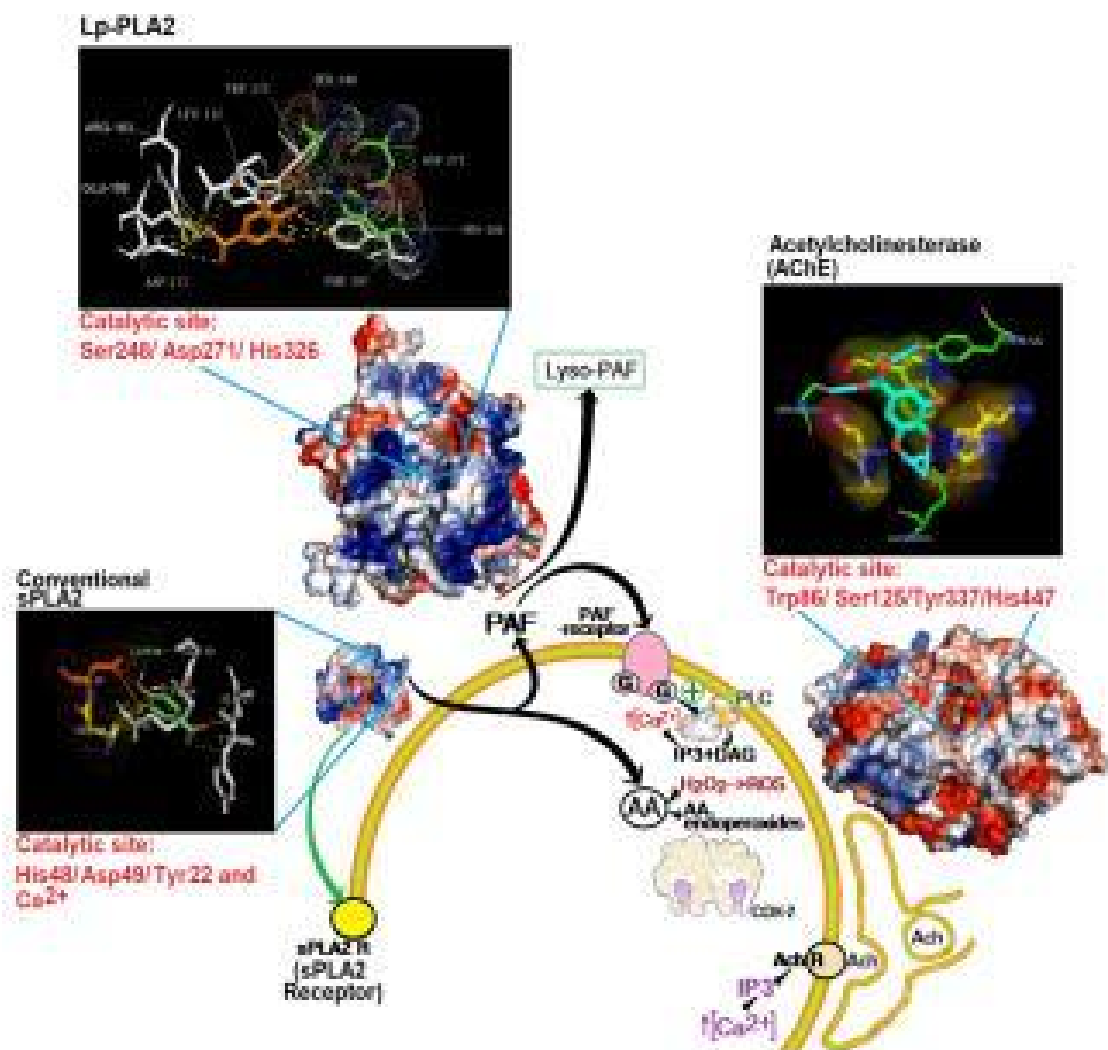


Figure 3. Possible actions of GA that led to increased levels of PAF and AA. The compound interacts with sPLA2 at the active site, binding with essential amino acid residues located in the N-terminal region (IP3) and with Histidine (H48) and Aspartic acid (D49). The compound was able to bind with the catalytic site of PLA2 associated with lipoprotein (PAF Acetylhydrolase extracellular), including Ser248 and His 326 and Ser 125 and Tyr337 of the catalytic site of Acetylcholinesterase.

In this article, we observed a significantly increased myotoxicity in animals pre-treated with CA, and this result was somewhat unexpected since the literature strongly suggests that natural compounds would be able to neutralize the myotoxic effect induced by secretory venom PLA2. This property could involve the antioxidant capacity of the compounds as well as their ability to neutralize proteins involved in the inflammatory process, and venom PLA2 itself is also affected by natural compounds [13,20–23]. Besides that, considering some studies [27], we performed other molecular modeling studies that suggested that GA could inhibit the acetylcholinesterase from peripheral nerve endings, which would be stimulated by sPLA2 from CDT, a potent neurotoxin [29–31]. To confirm the inhibitory effect of GA, we used an Acetylcholinesterase Inhibitor Screening Kit Colorimetric (ab283363, Abcam Discovery Drive, Cambridge Biomedical Campus, Cambridge, CB2 0AX, UK). Following the method described by the kit user manual, we were able to show that the

standard inhibitor (Donepezil), which comes with the kit, showed an IC50 of 31 nM and GA showed an IC50 value of 125 nM). GA showed a higher value of inhibition than the Donepezil control provided by the kit, but this compound is still a potential inhibitor that can contribute strongly to increased myotoxicity. In addition, these results suggest that PAF could also be an important factor in the establishment of myotoxicity [22,23]. Hence, our experimental data with the support of the *in silico* data suggest that GA would inhibit, in diverse degrees, the PAF-AH and Acetylcholinesterase. The pharmacological action of PLA2 and other venom toxins also involve the enzymatic mobilization of cPLA2 and increased expression of COX-2. Additionally, more recent data show that the action of COX-2 seems to be crucial for the edema course [20,32–36]. Other studies [34] suggest that GA may also potentially inhibit the COX-2 activity and increase AA levels. This fact may be an important factor for increased oxidative stress, raising the H2O2 and ROS, which can lead to AA peroxidation, membrane destruction, and increased edema, for example [20,21,36].

In addition, PAF can induce edema by other pathways that do not depend on the mobilization of cytosolic PLA2, and that includes, for example, PLC [36,37]. On the other hand, the model usually used for anti-inflammatory assays is based on the lipopolysaccharide (LPS) use as an inflammatory agent, which acts directly on COX-2 and is accompanied by the production and release of pro-inflammatory cytokines, such as interleukins (IL-1 β , IL-6 and Tumor necrosis factor-alpha (TNF- α)) [38,39] and which is not the same pathway of inflammation induced by sPLA2 from *Crotalus durissus terrificus*. Thus, the two models are different and produce complementary rather than mutually excluding anti-inflammatory results.

5. Conclusions

Gallic acid can be a valuable compound in terms of raw material and it has the ability to act as an anti-inflammatory molecule inhibiting the sPLA2, as an antioxidant agent, and as a COX2 inhibitor [1,13,34,35]. In addition, GA also exhibits other activities such as antimicrobial, anticancer, cardio-protective, gastro-protective, neuroprotective effects [2]. The purpose of this article was not to dispute the studies applied so far; however, GA in experimental conditions injected 30 min before the application of sPLA2 potentiated the inflammatory and myotoxic effects of the PLA2 of rattlesnake. The use of molecular docking tools was crucial to reveal that GA was also able to inhibit PAF-AH and that it induced an increase in PAF concentration that may have played a key role in the inflammatory and myotoxic action of sPLA2. On the other hand, the inhibition of Acetylcholinesterase may have also contributed to the increase in myotoxicity (Figure 3). Thus, another important conclusion of the work is that GA does not inhibit only one enzyme, such as sPLA2, but also several other alpha-beta hydrolases like cholinesterases, PAF-AH, and probably other esterases/lipases. Finally, as stated in the title, GA has two sides or aspects that complement each other, one confirming that GA is a compound with great therapeutic application mainly for inflammation, and the other revealing that the use of this natural compound as a drug without side effects or in a concentrated way should be avoided. More research is necessary for the safe use of GA or other compounds, including the use of sPLA2 as an inflammation-inducing agent next to LPS, for example.

Author Contributions: M.H.T.: Conceptualization, Supervision, project administration, funding acquisition, writing—original draft preparation, formal analysis; A.R., L.L.F.d.M., A.M.D.C. responsible for Software use, *in silico* modeling, and gallic acid docking experiment, validation and formal analysis; C.R.d.C.C., M.N.B., G.A.F. biological, biochemical and pharmacological assay; M.A.d.O.: Conceptualization, Supervision, funding acquisition and *in silico* supervision. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This work had the financial support from FAPESP PROC. No. 2017/20291-0/AUXILIO PISQ; FAPESP PROC. No. 2017/19642-7/AUXILIO PISQ and FAPESP PROC. No. 2020/03297-8 and Marcos H. Toyama is a researcher PQ2 CNPq (CNPQ 304153/2019-2).

Institutional Review Board Statement: The study was conducted according to the guidelines and validated studies. In vivo experiments were performed according to institutional rules and were approved by the ethics committee of UNESP. All animal experiments were approved by the Ethics Committee of Paulista State University (UNESP)/São Vicente under Protocol number 11/2018-CEUA and Protocol n° 10/2018-CEUA.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: All data in the paper followed all current analyses and are original.

Acknowledgments: We thank Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico of the government of the Federative Republic of Brazil for its support of the productivity fellows and our university (UNESP—State University of São Paulo) for the institutional support to our research efforts.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Gao, J.; Hu, J.; Hu, D.; Yang, X. A Role of Gallic Acid in Oxidative Damage Diseases: A Comprehensive Review. *Nat. Prod. Commun.* **2019**, *14*, 2019. [\[CrossRef\]](#)
2. Kakhkhani, N.; Farzaei, F.; Fotouhi, M.; Alavi, S.S.; Bahramioltani, R.; Nasiri, R.; Morneau, S.; Abbaszadeh, Z.; Rahimi, R.; Farzaei, M.H.; et al. Pharmacological effects of gallic acid in health and diseases: A mechanistic review. *Iran. J. Basic Med. Sci.* **2019**, *22*, 225–237. [\[PubMed\]](#)
3. Badhani, B.; Sharma, N.; Kakkar, R. Gallic acid: A versatile antioxidant with promising therapeutic and industrial applications. *ESV Adv.* **2015**, *3*, 27940. [\[CrossRef\]](#)
4. McArthur, C.; Orlando, P.; Banks, P.B.; Brown, J.S. The foraging tightrope between predation risk and plant toxins: A matter of concentration. *Funct. Ecol.* **2011**, *26*, 74–83. [\[CrossRef\]](#)
5. Punia, A.; Chaudhary, N.S.; Singh, D.; Koushan, A.K.; Kaur, S.; Sehgal, S.K. Effect of gallic acid on the larvae of *Spodoptera litura* and its parasitoid *Brachymeria hebetor*. *Sci. Rep.* **2021**, *11*, 531. [\[CrossRef\]](#)
6. Lorfant, N.; Hostelier, T.; Bouarna, Y.; Manchot, P.; Chabonnet, A. Proteins with an alpha/beta hydrolase fold: Relationships between subfamilies in an ever-growing superfamily. *Chem. Biol. Interact.* **2013**, *203*, 266–268. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
7. Bauer, T.L.; Buchholz, P.C.F.; Plais, J. The modular structure of α/β -hydrolases. *FEBS J.* **2020**, *287*, 5. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
8. Samaras, U.; Robinson, B.J. Crystal Structure of Human Plasma Platelet-activating Factor Acetylhydrolase. *J. Biol. Chem.* **2008**, *283*, 31817–31824. [\[CrossRef\]](#)
9. Khan, M.I.; Hariprasad, G. Structural Modeling of Wild and Mutant Forms of Human Plasma Platelet Activating Factor-Acetyl Hydrolase Enzyme. *J. Inflamm. Res.* **2020**, *13*, 1125–1139. [\[CrossRef\]](#)
10. Cousin, X.; Hostelier, T.; Giles, K.; Llovin, P.; Toussaint, J.P.; Chabonnet, A. The alpha/beta fold family of proteins database and the cholinesterase gene server ESTHER. *Nucleic Acids Res.* **1997**, *25*, 1125–1129. [\[CrossRef\]](#)
11. Bouarna, Y.; Manchot, P. Hot Spots for Protein Partnerships at the Surface of Cholinesterases and Related α/β Hydrolase Fold Proteins or Domains—A Structural Perspective. *Molecules* **2017**, *21*, 35. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
12. Dessin, A. Phospholipase A2 enzymes: Structural diversity in lipid messenger metabolism. *Structure* **2001**, *9*, R115–R122. [\[CrossRef\]](#)
13. Costa, T.R.; Francisco, A.F.; Cardoso, F.F.; Moreira-Dell, L.S.; Ferradas, C.A.H.; Gomes, A.A.S.; Guimarães, C.L.S.; Marcussi, S.; Pereira, P.S.; Oliveira, H.C.; et al. Gallic acid anti-myotoxic activity and mechanism of action, a snake venom phospholipase A2 toxin inhibitor; isolated from the medicinal plant *Asarum canadense* L. *Int. J. Biol. Macromol.* **2021**, *185*, 494–512. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
14. Kankara, L.A.; Abdullatif, I.; Paulina, G.A. Ethnomedicinal plants: A source of phytochemical compounds against snake venom PLA2s activity. *J. Pharmacogn. Phytochem.* **2020**, *9*, 1270–1273.
15. Assunção, F.D.; Conceição, E.C.; Borges, L.L.; de Paula, J.A.M. Development and Validation of a HPLC-UV Method for the Evaluation of Ellagic Acid in Liquid Extracts of *Eugenia uniflora* L. (Myrtaceae) Leaves and Its Ultrasound-Assisted Extraction Optimization. *Evid.-Based Complement. Altern. Med.* **2017**, *2017*, 1–9. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
16. Cotrim, C.A.; de Oliveira, S.C.B.; Ditz Filho, E.B.S.; Fonseca, F.V.; Baldasser, L.; Arturios, E.; Kimenes, R.M.; Monteiro, H.S.A.; Rabella, M.M.; Hernades, M.Z.; et al. Quercetin as an inhibitor of snake venom secretory phospholipase A2. *Chem.-Biol. Interact.* **2011**, *189*, 9–16. [\[CrossRef\]](#)
17. Toyama, M.H.; Gaeta, H.H.; Pinho, M.V.T.; Ferreira, M.J.P.; Romão, P.; Mattoli, F.P.; Magos, A.J.; Fontes, M.R.M.; Toyama, M.H. An Evaluation of 3-Rhamnosylquercetin, a Glycosylated Form of Quercetin, against the Myotoxic and Edematogenic Effects of sPLA2 from *Crotalus durissus terrificus*. *Biol. Res.* **2014**, *2014*, 341270. [\[CrossRef\]](#)
18. Samad, N.; Javed, A. Therapeutic Effects of Gallic Acid: Current Scenario. *J. Phytochem. Biotech.* **2019**, *2*, 113.
19. Simmons, M.A. Platelet Activating Factor. In *Alpha: The Comprehensive Pharmacology Reference*; NIOS/CCTM; Kioseloven, OH, USA, 2007; pp. 1–3.

20. Marathe, G.R.; Chaitra, V.H.; Ka, L.Y.; Chen, C.H. Effect of acyl and alkyl analogs of platelet-activating factor on inflammatory signaling. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* **2020**, *151*, 108478. [\[CrossRef\]](#)
21. Toyama, M.H.; Costa, C.R.C.; Belchor, M.N.; Novais, D.P.; Oliveira, M.A.; In, R.; Gaeta, H.H.; Toyama, D.O. *Lekoni* Induced by sPLA2 from *Crotalus Durissus Terribilis* Involves PLC and PKC Signaling, Activation of sPLA2 and Oxidative Stress. *IntechOpen* London, UK, 2019. [\[CrossRef\]](#)
22. Toyama, M.H.; Costa, C.R.C.; Belchor, M.N.; Junior, A.B.D.S.; Moraes, L.L.F.D.; Silva, A.R.D.S.; Oliveira, M.A.D. Evaluation of Thiol-dependent Enzymes on the Pharmacological Effects Induced by the Catalytically Active PLA2 from *Echispyrus jamaicensis*. *Preprints* **2021**, 6012. [\[CrossRef\]](#)
23. Teixeira, C.; Fernandes, C.M.; Leiguer, E.; Chudzinski-Tavassi, A.M. Inflammation Induced by Platelet-Activating Viperid Snake Venoms: Perspectives on Thromboinflammation. *Front. Immunol.* **2019**, *10*, 2082. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
24. Silva Junior, L.A.; Andrade, L.N.S.; Jarciz, S.; Chammaz, E. Platelet activating factor receptor antagonists improve the efficacy of experimental chemo- and radiotherapy. *Clinica* **2018**, *73*, e792a. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
25. Liu, G.; Baird, A.W.; Parsons, M.J.; Fan, K.; Skerrett-Byrne, D.A.; Nair, P.M.; Makanyanga, S.; Chen, J.; Nool, R.; Giggins, B.; et al. Platelet activating factor receptor acts to limit colitis-induced liver inflammation. *FASEB J.* **2020**, *34*, 7718–7732. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
26. Huang, P.; Wang, K.; Shen, J. Lipoprotein-associated phospholipase A2: The story continues. *Med. Res. Rev.* **2020**, *40*, 79–134. [\[CrossRef\]](#)
27. Fang, L.; Pan, Y.; Mureyka, J.L.; Zhan, C.G. Active site gating and substrate specificity of butyrylcholinesterase and acetylcholinesterase: Insights from molecular dynamics simulations. *J. Phys. Chem. B* **2011**, *115*, 8797–8805. [\[CrossRef\]](#)
28. Camara, B.R.S.; Esposito, L.C.M.; Camargo, E.A.; Toyama, M.H.; Marangoni, S.; Ribela, M.T.C.; De Nucci, G.; Antunes, E. Inflammatory oedema induced by phospholipase A2 isolated from *Crotalus durissus* sp. in rat dorsal skin: A role for mast cells and sensory C-fibers. *Toxicon* **2003**, *41*, 823–829. [\[CrossRef\]](#)
29. Sarim, M.A.; Souza, C.O.S.; Diniz, C.R.A.F.; da Fonseca, V.M.B.; Sousa, L.O.; Petti, A.P.F.; Costa, T.R.; Lourenço, A.G.; Borges, M.C.; Sorgi, C.A.; et al. Crotosin-Induced Mice Lung Impairment: Role of Nicotinic Acetylcholine Receptors and COX-Derived Prostanoids. *Biomolecules* **2020**, *10*, 794. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
30. Ranawaka, U.K.; Lalico, D.G.; de Silva, H.J. Neurotoxicity in Snakebite—The Limits of Our Knowledge. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2013**, *7*, e2302. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
31. Kuehner, M.S. Secretory Phospholipase A2s in Insulin Resistance and Metabolism. *Front. Endocrinol.* **2021**, *12*, 732726. [\[CrossRef\]](#)
32. Ponce-Soto, L.A.; Toyama, M.H.; Hyslop, S.; Novello, J.C.; Marangoni, S. Isolation and preliminary enzymatic characterization of a novel PLA2 from *Crotalus durissus collilineatus* venom. *J. Protein Chem.* **2002**, *21*, 131–136. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
33. Leslie, C.L. Cytosolic phospholipase A2: Physiological function and role in disease. *J. Lipid Res.* **2015**, *56*, 1386–1402. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
34. Paloschi, M.V.; Lopes, J.A.; Eseno, C.N.; Silva, M.D.S.; Evangelista, J.R.; Pontes, A.S.; da Silva Setibal, S.; Rago, C.M.A.; Nery, N.M.; Ferreira, A.A.; et al. Cytosolic phospholipase A2- α participates in lipid body formation and PGE2 release in human neutrophils stimulated with an L-amino acid oxidase from *Calloselasma rhodostoma* venom. *Sci. Rep.* **2020**, *10*, 10976. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
35. Amuravani, M.; Prasad, N.K.; Ramakrishna, V. COX-2 structural analysis and docking studies with gallic acid structural analogues. *SpringerPlus* **2012**, *1*, 38. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
36. Bai, J.; Zhang, Y.; Tang, C.; Hou, Y.; Ai, X.; Chen, X.; Zhang, Y.; Wang, X.; Meng, X. Gallic acid: Pharmacological activities and molecular mechanisms involved in inflammation-related diseases. *Biomol. Pharmacol.* **2021**, *153*, 110985. [\[CrossRef\]](#)
37. Chung, K.F. Platelet-Activating Factor. *Encycl. Respir. Med.* **2022**, *22*, 462–473.
38. Almq, A.; Jalil, J.; Hussain, K.; Ahmad, W. Raging the War Against Inflammation with Natural Products. *Front. Pharmacol.* **2018**, *8*, 978. [\[CrossRef\]](#)
39. Britt, R.D., Jr.; Lory, M.L.; Tipple, T.B.; Nolin, L.D.; Rogers, L.K. Lipopolysaccharide-induced cyclooxygenase-2 expression in mouse transformed China cells. *Cell Physiol. Biochem.* **2012**, *29*, 213–222. [\[CrossRef\]](#)

ANEXO XII



Evaluation of kaempferol against rattlesnake sPLA2 Edema and myotoxicity.

Marcos Toyama^{1, 2}, Aíram Roggero^{1, 2}, Laíla L. Ferreira De Moraes^{1, 2}, Gustavo A. Fernandes², Caroline R. Costa^{2, 3}, Mariana N. Belchior^{2, 3}, Igor Nicodemo^{2, 3}, Marcos Antônio De Oliveira¹

¹Instituto de Biociências do Litoral Paulista (UNESP), Brazil, ²BIONOLPEP group, Biosciences Institute, São Paulo State University (UNESP), Brazil, ³Federal University of ABC, Brazil

Submitted to Journal:
Frontiers in Drug Discovery

Specialty Section:
Anti-inflammatory and Immunomodulating Agents

Article type:
Original Research Article

Manuscript ID:
954856

Received on:
02 Jul 2022

Journal website link:
www.frontiersin.org

Conflict of interest statement

The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Author contribution statement

Marcos Hikari Toyama: Conceptualization, Supervision, project administration, funding acquisition writing—original draft preparation, formal analysis; Aíram Roggero; Laís L. F. de Moraes; Agatha Manzi De Carli responsible for Software use, in silico modelling, and gallic acid docking experiment, validation and formal analysis; Caroline R. C. Costa; Mariana N. Belchior; Gustavo A. Fernandes biological, biochemical and pharmacological assay; Marcos A. de Oliveira: Conceptualization, Supervision, funding acquisition and in silico supervision. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Keywords

Kaempferol, secretory phospholipase A2, *Crotalus durissus terrificus*, Edema, Myotoxic, PAF-AH and Acetylcholinesterase

Abstract

Word count: 247

Kaempferol (KPF) a known antioxidant and anti-inflammatory agent was not able to counteract the Edema and myotoxicity induced by secretory PLA2 from *Crotalus durissus terrificus* (Cdt.). Our results present that PLA2 from Cdt. venom induces increased production of Platelet-activating factor, and the control of Edema induced by this toxin involves the presence of Plasma-platelet activating factor acetylhydrolase (PAF-AH). Studies show that KPF was able to inhibit the enzymatic activity of PAF-AH and this would have increased the Edema induced by sPLA2 in animals previously treated with KPF. Our studies demonstrate the myotoxic activity of sPLA2 from Cdt. In besides its action directly on skeletal muscles also stems from the neurotoxic action of rattlesnake sPLA2, the control of myotoxic activity involves the activity of acetylcholinesterase, which is inhibited by the action of KPF and resulted in a massive increase in myotoxicity induced by rattlesnake sPLA2 in animals previously treated with KPF. The compound has antioxidant and biological beneficial properties but is a compound that also plays with the role of potential inhibitors of those proteins with alpha-beta hydrolase motif that is found in common the presence of Ser-His-Asp found in PAF-AH and Acetylcholinesterase but is not found in the active site of sPLA2 or cPLA2. Conclusions: Therefore, KPF, despite being an anti-inflammatory and antioxidant agent with proven pharmacological activities, was not able to inhibit the inflammatory and myotoxic activity of Cdt. sPLA2. venom, the compound also interacts with Acetylcholinesterase and has a potential inhibitor PAF-AH enzymes.

Contribution to the field

In the in silico screening of natural compounds with anti-inflammatory potentials, especially those that act against Phospholipase A2, the class of flavonoids, this work aims to understand their effects more deeply, since they are very reactive, altering numerous points of the organism, even the membrane cell to have a more correct use, thus avoiding side effects that can be harmful, given that in the literature, we see many natural compounds, being shown as "miraculous" since they have many benefits, however, many factors must be analyzed in addition to just a compound or just a route of action, in view of the multi complexity of the human organism. In this way, we must analyze other routes that are not considered conventional for inflammatory propagation, so that we can properly characterize a compound, synthetic or not, for its function and use, avoiding the range of adverse effects and possible harmful interactions that can cause other diseases in the individual, in the short and long term, and the appropriate doses of exposure. Therefore, the association of multidisciplinary methodologies, which add important information, are associated with the stages of research and development using, thus making a better creation or repositioning of natural or synthetic compounds.

Funding statement

This work had the financial support of FAPESP PROC. No. 2017/20291-0/ Research grant FAPESP PROC. No. 2017/19942-7/ Research Grant FAPESP PROC. No. 2020/03297-8 and Marcos H. Toyama researcher PQ2 CNPq (CNPq 2019 304153/2019-2).

Introduction.

Flavonoids are bioactive compounds which belong to the polyphenols, a group that can be found in all plants. These compounds are known as secondary metabolites responsible for protecting plants against oxidizing agents such as ultraviolet rays, chemical compounds and pollution. In addition, they reveal an antioxidant, anti-inflammatory, and immunological activities, and some studies demonstrate a relationship between dietary flavonoid intake and reductions in the risk of several chronic diseases, including cancer and diabetes (Zakaryan et al., 2017, Rodriguez-Arce et al., 2021). Many of these beneficial effects of flavonoids are centred on their antioxidant properties that strongly help to neutralize the reactive oxygen species (ROS) formation besides to complement the antioxidant defence systems generated by various pathologies (Santos et al., 2011 Tamayose et al., 2017). In the case of Brazil, many plants are catalogued as suitable for medicinal purposes, in most cases for use as teas and infusions with alternative therapies, this cataloguing is known as the National Plant List.

Among these plants we have some from the Brazilian Atlantic Forest, which are *Phyllanthus niruri*, *Eugenia uniflora*, *Schinus terebinthifolius*, *Jatropha gossypifolia* and others (Oliveira et al., 2012, Siqueira et al., 2018 e Ribeiro, 2019). These species have in common the compound Kaempferol (KPF), this flavonoid compound have antioxidant, anti-inflammatory neuroprotector characteristics; much shown in nutraceutical studies (Ilyas et al., 2022; Sudheeran et al., 2020; Gamiotea-Turro et al., 2018). These studies have described the beneficial effects of diet in they reduce the risk of chronic diseases, especially cancer (Silva dos Santos et al., 2021)

Other studies reveal a possible anti-inflammatory potential by inhibiting the enzyme ACE (Angiotensin Converting Enzyme) activity, in experimental therapies (Kin et al., 2010). kaempferol has already shown an antioxidant and a pro-oxidant activity depending on the type of cells used in the studies. For example, KPF protected HT-22 MLM 1 (neural cells), KPF against oxidative stress and oxidative peroxidation. However, the compound does not protect Caco-2 differentiated cells from colon adenocarcinoma, a model often used for normal intestinal enterocytes. Kaempferol also shows pro-oxidant activity in cellular or acellular in vitro assay systems (Bestwick et al., 2005).

Another study showed that Kaempferol and other flavonoids under experimental conditions act as an antioxidant and neutralize reactive oxygen species (ROS) in vitro. more reactive ROS species and leading to increased erythrocyte membrane destruction (Rebuglio Velloso et al., 2018). Studies with artificial membranes show that KPF together with Quercetin strongly interacts with significant erythrocyte penetration during the chronic obstructive pulmonary disease process, in the monolayer and promotes changes in cell membrane fluidity (Sanver et al., 2016). These studies reveal that KPF could potentially produce ROS, indirectly demonstrating a pro-inflammatory property by acting on the plasma membrane of some cell types, such as erythrocytes and tumour cells.

This work showed that KPF potentiated the pharmacological effects induced by secretory phospholipase A2. (sPLA2) purified from *Crotalus durissus terrificus* (Cdt.), therefore, the results suggest that KPF did not inhibit the enzymatic activity of cPLA2 nor the enzymatic activity of Cdt. KPF inhibited the enzymatic activity of Acetylcholinesterase (AChE) and Platelet-activating factor acetylhydrolase (PAF-AH), which may have been fundamental for the increase in Edema and myotoxicity induced by Cdt sPLA2.

2. Materials and Methods

2.1. Venoms, Animals, and Reagents

Crotalus durissus terrificus (Cd) venom was purchased from Bio-Agents Serpentarium (Batatais, São Paulo, Brazil). Analytical HPLC and sequencing-grade so-lutes and solvents were purchased from various suppliers (Bio-Rad, Hercules, CA, USA; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA; Boehringer Mannheim, São Paulo, SP, Brazil and Applied Biosystems; San Francisco, CA, USA). Female Swiss mice (~25 g) used in the pharmacological assays were obtained from the Multidisciplinary Center of Biological Investigations (CEMIB-UNICAMP). All animal experiments were approved by the Ethics Committee of State University of São Paulo/ LB./ São Vicente under Protocol number: 11/2018-CEUA, and Protocol n° 10/2018-CEUA, both approved in 19/03/2019. Kaempferol (KPF) (60010-25MG, Sigma-Aldrich, >97%) was purchased from Sigma-Aldrich do Brazil.

2.1. sPLA2 purification, KPF incubation.

sPLA2 purification and its incubation with KPF were performed using the method described by Cotrim et al., 2011 (16). PLA2 purity was confirmed through HPLC and its enzymatic activity. Then, this enzyme was used for the pharmacological and biochemical assays. In the first step, sPLA2 was incubated with the protein, and the product of the sPLA2: KPF incubation was purified to clear the unbound gallic acid complex.

2.2. Enzymatic and pharmacological Activity (Edema and Myonecrosis).

Enzymatic and pharmacological activities were performed following the method described by Toyama et al., 2014 (17). sPLA2 activity and the KPF potential to inhibit this enzyme were measured using a 96-well plate assay using 4-nitro-3-octanoyloxy-benzoic acid (NOBA or NOB, manufactured by BIOMOL, Plymouth Meeting, PA, USA) as the substrate. Enzyme activity, which was expressed as the initial velocity of the reaction (V_o), was calculated based on the increase in absorbance after 20 min. All assays were performed with a SpectraMax 340 multiple well plate reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA) using the absorbance at 425 nm.

To confirm the KPF potential to inhibit sPLA2 enzymatically, the paw Edema assay was performed through the samples administration via right posterior sub plantar injection using randomly chosen Swiss female mice (~25 g, $n = 5$). The first experiment included a previous incubation of sPLA2 with KPF, a positive control, which was the protein with a saline solution, and the negative control (saline solution). Paw volumes were measured immediately before the injection and at selected time intervals (data not shown). In the second assay, we investigated the effect of the previous inoculation by intraperitoneal rout (*i.p.*) of KPF dissolved in saline in a single dose of 50 μ L per animal 30 min before sPLA2 injection in the paw. All volumes administered on animals' paws were 20 μ L, always following the same concentrations of the samples: 10 μ g/per animal of sPLA2, 1mM of KPF and NaCl at 0.9%.

Myonecrosis was measured by liberation of creatine kinase (CK) from damaged muscle cells using the same animal model and treatments explained above. Hence, in the first myonecrosis assay, KPF was previously incubated for 30 min with sPLA2, and then the samples were injected into the gastrocnemius muscle (data not shown). The second treatment was made through the previous KPF administration in the peritoneum (50 μ L) 30 minutes before the sPLA2 injection into the gastrocnemius muscle. Control groups ($n = 5$) were submitted to the same procedure; however, the negative control was inoculated with 20 μ L of 0.9% NaCl, and 20 μ L (1 mM μ g) of the purified compound, and in the positive control, 20 μ L (10 μ g) of isolated sPLA2 was administered. The volumes applied into the muscle were 20 μ L, and the concentrations of each sample were described in the previous paragraph. After 60 min, the animals' blood was harvested from the tail in a heparinized tube, which was centrifuged and frozen. Seric creatine kinase (CK) levels were determined according to the manufacturer of the kit (Bioliquid, Pinhais, Brazil), and the data were expressed in units per litter (U/L).

2.3. Biochemical Determinations.

Tail vein blood was collected into heparinized tubes, and samples were centrifuged at 3000 rpm for 20 min at 4 °C; sera were collected, and plasma was separated by centrifugation (1700g, 10min, 4C) and stored at -80°C until biochemical determinations. For biochemical determination for cPLA2 that was performed Cytosolic Phospholipase A2 Assay Kit (ab133090), for quantitative measurement of Platelet Activating Factor concentrations we used Platelet Activating

Factor (PAF) (Human platelet activating factor, PAF ELISA Kit, CSB-E07929h, CUSABIO). PAF-AH activity was analysed using the colorimetric method with a commercial kit according to instructions provided by the manufacturer (Cayman Chemical) and absorbance readings at 410 nm and enzymatic activity were expressed as V_o (410nm). For the measurement of acetylcholinesterase activity inhibition, we used a MAK 324-1KT kit (Acetylcholinesterase Inhibitor Screening Kit; Sigma-Aldrich) and enzymatic activity was measured absorbance readings at 410 nm and enzymatic activity were expressed as V_o (410nm).

2.4. In silico Analyses

The PDB (Protein Data Bank-<https://www.rcsb.org>) and NCBI (NCBI-<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>) databases were used in this analysis to find the amino acid sequence of all proteins. Information on the structure of KPF was taken from the PubChem platform (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>). The crystallographic model chosen as the best model for the construction of the theoretical structural model to PLA2 from Cdt was 2qog and Acetylcholinesterase (4m0e) and PAF-AH (3D59) from human models. The SWISS-MODEL platform (<https://swissmodel.expasy.org>) and the Chimera 1.14 program (Ucsf Chimera, 2004) were used to assemble the structural molecular model of the protein and to evaluate the general possibilities of the proteins binding with KPF. After a previous study of the mechanisms and the essential residues of these proteins, molecular anchoring experiments were performed by Autodock Vina and Cavity Program Package. All molecules were prepared previously, adding polar hydrogen atoms, and aggregating the Kollman charges. Then, the files were converted in PDBQT to perform the calculations of the energy maps (Grid Box). The size was chosen to enclose all amino acids from the catalytic site's microenvironment. The results were taken using the tools Discovery Studio 4.0, LIGPLOT+, and Pymol v 2.4 to evaluate the binding energies, distances, and orientations of molecules in the microenvironment of the active site of PLA2. The Molinspiration platform was used to better visualize the structure of the compounds.

2.5. Statistical analyses

Results were reported as means $\pm$ SD of replicate experiments. The significance of differences between means was assessed by an analysis of variance, followed by a Dunnett's test when several experimental groups were compared to the control group. The confidence limit for significance was 5%.

3. Results and Discussion.

PLA2s are usually among the most abundant components of snake venoms it has several toxic and pharmacological effects including acute Edema, proinflammatory, myotoxic, neurotoxic and platelet aggregation activity and other experimental actual actions such as antitumoral and bactericidal (Camara et al., 2003; Ximenes et al., 2012, Cedro et al., 2018 and Toyama et al., 2019). Since snake venom PLA2s can act directly or indirectly on phospholipid membranes, they should be able to promote alterations in lipid biosynthesis and dysregulation of lipogenesis that could have a significant impact on the metabolism and formation of lipid mediators derived from arachidonic acid, which perform essential roles in inflammation (Cedro et al., 2018 and Toyama et al., 2019).

In addition, snake venom PLA2 are potent agents capable of inducing a significant increase in oxidative stress alongside the pro-inflammatory effect and thus either the direct or indirect action of PLA2 via the receptor can increase lipid peroxidation (Al-Quraishy et al., 2014, Dos Santos Junior et al., 2020 and Moreira et al., 2021).

Thus, although KPF did not inhibit the enzymatic activity of sPLA2, as shown in figure 1A show structure of the compound KPF, at figure 1B and 1C and which shows that KPF was able to interact with residues of Y52, G53, T68 and K69 and that it could be associated with a molecular region of sPLA2 that could be important for interaction with the sPLA2 receptor, which shows to be an extremely important element for the course of pharmacological activities of rattlesnake sPLA2. Figure 1D and 1E displays that KPF was not able to significantly inhibit the

enzymatic activity of sPLA2 from *Cdt.* and the modelling data demonstrate that the compound is unable to insert properly into the active site of the secretory phospholipase A2 enzyme.

The capability of sPLA2 to interact with the receptor or the enzymatic ability of sPLA2 was not affected and KPF, that fact suggest who the compound not an inhibitor of phospholipase A2 activity.

Furthermore, Figure 2 A shows that sPLA2 previously incubated with KPF, significantly declined the Edema volume values, untreated sPLA2. The Edema peak of sPLA2+KPF at the 15-minute time point was 0.121 ± 0.023 (n=5 and *P<0.05) and the other Edema values were also much smaller than the native toxin-induced Edema values.

Thus, prior treatment of sPLA2 with KPF would have decreased the edematogenic activity of sPLA2 but was not able to counteract the acute inflammatory effect of the toxin. Figure 2A, reveals sPLA2 induced a peak of acute Edema in the mouse paw of 0.342 ± 0.032 mL (n=5 and *P<0.05) and returned to lower values after 240 minutes of the experiment. Figure 2B on the other hand, showed that the animals were previously treated with KPF 30 min before the injection of sPLA2.

The results presented in figure 2B, show that KPF potentialized the pro-inflammatory effect of sPLA2 from *Cdt.*, where the peak Edema value was sPLA2/KPF30' of 0.374 ± 0.026 mL (n=5 and *P<0.05) and remained elevated throughout the first 30 minutes.

The presence of inflammatory stimuli or factors that can lead to structural changes in the membrane such as ultraviolet radiation in general can lead to lipid peroxidation and in the case of sPLA2, from snake venom two factors can increase these changes can lead to the activation of cytosolic PLA2 through the reactions of the Lands cycle, responsible for the remodelling reactions and repair of the plasma membrane.

During the remodelling and repair process, of the membrane by the Lands cycle through cytosolic PLA2 are the polyunsaturated fatty acids oxidized or not as is the case of Arachidonic acid and PAF, which is a potent mediator of inflammation and the concentration of PAF is kept at low levels by the action of the enzyme PAF-AH (Wu et al., 2016, Law et al., 2019, Ashraf et al., 2021, O'Donnell et al., 2022). Furthermore, sPLA2 from snake venom is an Edema-inducing agent and an activating agent of cPLA2 and the data presented.

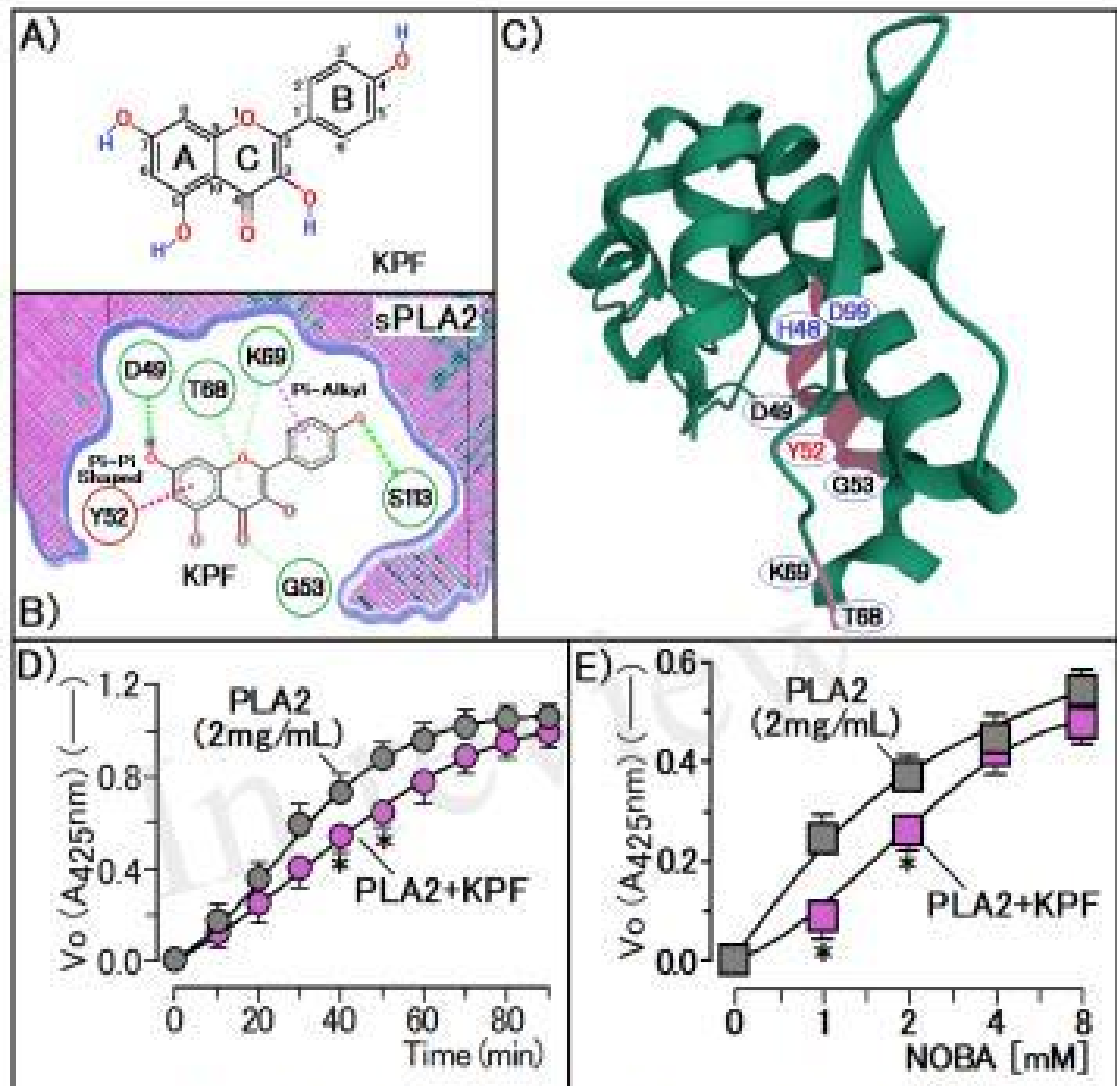


Figure1: Figure 1A, demonstrate the molecular structure of kaempferol (KPF). In Figure 1B, the results of molecular docking studies of KPF in the cavity of sPLA2 showed the best molecular fit. Figure 1C, shows the molecular docking site of KPF that does not interact with the active site of sPLA2 and Figure 1D, reveals the speed of reaction product production over time for the native enzymes and those previously incubated with KPF and figure 1E, we demonstrate the effect of substrate concentration characterizing changes of K_m and V_{max} of the native sPLA2 and previously incubated with KPF and in both cases, no significant kinetic changes were observed for the native sPLA2 and with the sPLA2 incubated with KPF.

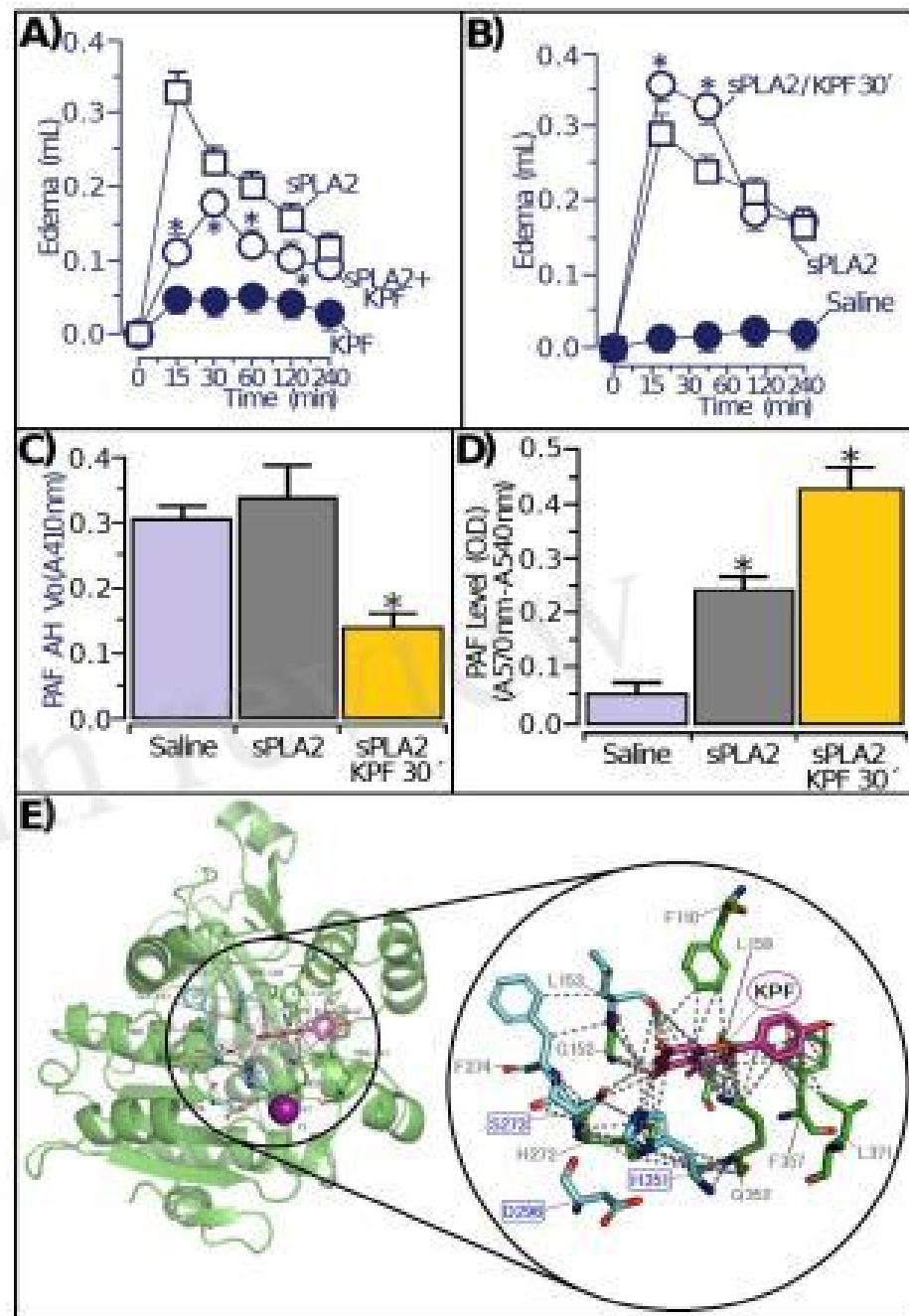


Figure 2. Figure 2A, demonstrate Edema induced by sPLA2 previously incubated with KPF, Figure 2B shows the effect of pre-treatment of KPF 30 minutes before application of sPLA2 ($n = 5$, and $* p < 0.05$). Figure 2C and 2D, shows the activity of the PAF-AH enzyme and the levels of PAF from the animals used in the experiments Figure A and B ($n = 15$, and $* p < 0.05$). In figure 2E results of the PAF-AH Modeling and Dock study with KPF.

Recently Wu et al., 2020 showed that secretory PLA2 from other snakes during the Edema process also increased PAF concentrations in addition to increased TNF-alpha and expression of several other pro-inflammatory signalling pathways. This increase involves the activation of cytosolic cPLA2, which is stimulated by sPLA2, cPLA2 increases the generation of Arachidonic Acid, and hydrogen peroxide (Fonteh et al., 2000, Han et al., 2003 Moreira et al., 2014). Our data show that the presence of PAF-AH is crucial for the resolution of Edema in-induced by sPLA2 from *Cdt*.

Figure 3A and 3B display the results of myotoxic activity induced by PLA2 from *Cdt*. The results of figure 3A present that KPF previously incubated with sPLA2 also decreased the myotoxic activity of sPLA2 and that this activity seems to be unrelated to the enzymatic activity and must involve the ability of rattlesnake sPLA2 to recognize sPLA2 receptors. Figure 3B shows the effect of the earlier application of KPF in animals 30 minutes before the application of rattlesnake sPLA2 and comparing it with another group of animals previously injected with Saline, and after 30 minutes the sPLA2 samples were applied. The enzyme applied with or without prior incubation with saline showed a Crete Kinase value of 400 U/L and in the case of animals treated with KPF, the values were 935 ± 34 (U/L; n=5 and * $p < 0.05$).

In general, it is a pharmacological consensus that phospholipase A2 enzyme-induced myotoxicity involves the interaction of venom sPLA2 on the muscle cell membrane and that it leads to local changes in muscle fibres and some studies suggest the presence of a receptor responsible for the interaction of venom sPLA2 with muscle fibres (Lomonte and Gutiérrez, 2011 and Salvador et al., 2017).

In our investigations, our results demonstrate that there is another important physiological element, which has not been considered in the myotoxic action of venom PLA2, rattlesnake secretory PLA2 is a sPLA2 with a characteristic neurotoxic and neurostimulator activity (Nogueira et al., 2005 and Beghini et al., 2008).

Myotoxicity induced by PLA2 from *Echydna schistosa* revealed that when sPLA2 is experimentally applied intravenously, this toxin induced an increase in neurotransmitter liberation and that it led to myonecrosis (Brook et al., 1987 Gallacci and Cavalcante et al., 2010). The increased myonecrosis in animals experimentally treated with KPF may be due to two events, one due to the synergistic action of PAF that can cause muscle ischemia (Silver et al., 1996 Loucks et al., 1997).

However, another important fact that we investigated in this project was the ability of KPF to inhibit the enzyme acetylcholinesterase (AChE) through molecular docking studies and enzymatic assays. Using the Cavity Plus program, we saw that KPF was able to interact strongly with the cavity where the active site of AChE is found (Figure 3C) and the results of other in silico analyses demonstrate that KPF was able to interact strongly with H447, which is part of the catalytic triad.

KPF was able to interact with several other amino acid residues found in the active site of the enzyme and so inhibiting its enzymatic activity (Figure 3D) in the insert Figure 3E we demonstrate how KPF at a concentration of 1mg/mL with 5% DMSO was able to strongly inhibit the activity of the Acetylcholinesterase enzyme. Thus, KPF administration can potentiate the pharmacological activities of sPLA2 from *Cdt* by inhibiting PAF-AH and AChE.

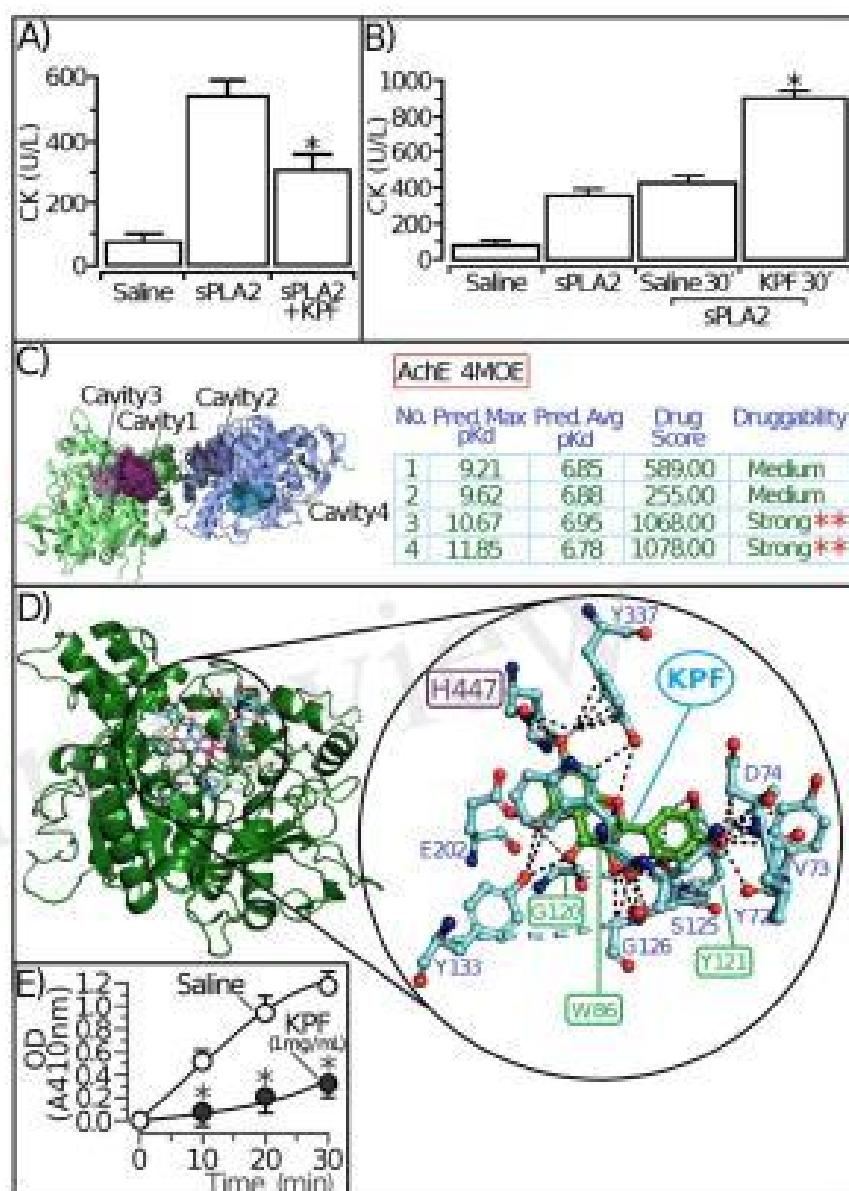


Figure 3. Figure 3A, is show the myotoxic activity of native sPLA2 compared to sPLA2 previously treated with KPF and figure 3B the effect of the previous inoculation of KPF in a group of experimental animals 30 minutes before inoculation of rattlesnake PLA2. Myotoxic effect results from the animal previously treated with KPF (1mM/30 min) reveal a raise in the CK values when compared with the positive and negative controls (n = 5, and * p < 0.05). In figure 3C, it shows the results of the preliminary study using the Cavity program to discover the potential sites of interaction of KPF with Acetylcholinesterase and in figure 3D the results of the molecular docking study of the KPF interaction and the enzymatic assay to evaluate the ability of the KPF in inhibiting Acetylcholinesterase activity and 3E demonstrate the speed of reaction product production over time for the enzymes AChE with KPF

Figure 4 summarizes most of our findings, and our results show that clearly KPF was not able to abolish or significantly inhibit the edematogenic and myotoxic activity of PLA2

isolated from *Crotalus durissus terrificus*. KPF indeed is a molecule with anti-inflammatory potential, when the inflammation-inducing agent is lipopolysaccharide (LPS), which is a molecule composed of three main components (O-antigen, B. Core polysaccharide, C. Lipid A). In figure 4A, we show that in general, LPS interacts with Toll Like receptor and that leads to the activation of a series of kinases such as Syk, Src, IRAK1/4 and that act to stimulate the synthesis of TNF- α , COX-2, Nitric Oxide synthase and various proinflammatory interleukins (Kim et al., 2015, Noailles et al., 2018, Nair et al., 2019 e Ahmad et al., 2020). Modeling studies and enzymatic assays have clearly shown that the mode of anti-inflammatory action of KPF against the action of LPS is related to the ability of this compound to inhibit the activity of several kinases by strong interaction with the active site of this protein (Kim et al., 2015, Noailles et al., 2018).

Cytosolic Phospholipases A2 enzymes (cPLA2) participates in the inflammatory reaction in several diverse ways, including liberation of free fatty acids and lysophospholipids by their enzymatic hydrolytic action on phospholipids that are found in membranes and during inflammation stimuli. Arachidonic Acid (AA) is the key fatty acid liberated from phospholipids by cPLA₂. This reaction regulates the availability of AA which, in turn, is the rate limiting precursor for the formation of prostaglandins. On the other hand, snake venom secretory PLA2 such as PLA2 purified from total *Crotalus durissus terrificus* venom is another type of pro-inflammatory agent that leads to cPLA2 activation and arachidonic acid generation and with concomitant increase in hydrogen peroxide production, which is a potentiating agent of oxidative stress. Already, PAF produced during the inflammatory process under the action of PLA2 (sPLA2 and cPLA2) is a known and potent inflammatory agent (Camara et al., 2003, Tamayose et al., 2017, Toyama et al., 2019, Dos Santos et al., 2020 and Toyama et al., 2022).

PAF is an inflammatory lipid mediator that is produced by mast cells, monocytes, macrophages, neutrophils, endothelial cells, and platelets. Phospholipase A2 and acetyltransferase are required for its synthesis. Cytosolic phospholipase A2 constitutes a group of inflammatory lipid enzymes that act on cellular phospholipids to generate free fatty acids (e.g., PAF) and lysophospholipids and are known to enhance the systemic inflammatory response. In addition, both secretory phospholipase A2 (sPLA2) and cytoplasmic phospholipase A2 are known to generate and regulate PAF synthesis, and both are produced by mast cells, endothelial cells, hepatocytes, monocytes and many types of epithelial cells and are degraded upon binding to specific binding proteins. The activity of cPLA2 and sPLA2 is also induced by inflammatory cytokines such as TNF α , IL-1 β , and IL-6 (Jeewandara et al., 2016, Toyama MH et al., 2020). In addition, recent studies show that platelet-activating factor (PAF) is a phospholipid inflammatory signalling molecule implicated in synaptic plasticity, learning and memory, and neurotoxicity and PAF can alter synaptic plasticity and may fuel neuroinflammation and thus play multiple roles in neurodegenerative disease (Hammond et al., 2016).

Our enzymatic, pharmacological and in silico experimental data clearly show that inhibition of PAF AH, which is an enzyme that acts on PAF, potentiated both the pharmacological effects induced by rattlesnake sPLA2, Edema and myotoxicity. Thus, in addition to the enzyme activity, the presence of a receptor for PAF generation seems to be a crucial element for the acute inflammatory activity and oxidative stress induced by rattlesnake sPLA2.

In the result presented in figure 2C and 2D it is shown that the flavonoid KPF significantly inhibited the PAF AH enzyme in the enzymatic assays and this resulted in a significant increase in PAF in the animals previously treated with the KPF compound and how this event promoted an increase in the acute inflammatory effect induced by the subsequent application of the secretory PLA2 from *Crotalus durissus terrificus* venom (Figure 4 B). Thus, what we can conclude is that the control of the resolution of the inflammatory process induced by rattlesnake sPLA2 actively involves the activity of both cytosolic and extracellular PAF-AH. Platelet-activating factor (PAF) is one of the most potent lipid mediators involved in inflammatory events. The acetyl group at the sn-2 position of its glycerol backbone is essential for its biological activity. Deacetylation induces the formation of the inactive metabolite lyso-PAF.

Functional impact of hGIIA expression (human secretory phospholipase A2) is highly dependent on cell and tissue type and varies substantially depending on the biochemical context of its expression. In a physiological context, hGIIA has a well described role in host defence mediated by its catalytic activity and substrate preference for bacterial membrane phospholipids phosphatidylglycerol and phosphatidylethanolamine.

However, recent studies show that this group II PLA2 enzyme, despite not being mobilized at the beginning of the inflammatory process, has the function of amplifying the inflammation process that has been initiated, and therein lies the problem that we observed when we experimentally used the secretory group II PLA2 from rattlesnakes. KPF is an anti-inflammatory that inhibits the synthesis of pro-inflammatory factors but does not influence PAF signalling and the action of sPLA2 either from snake or human. KPF has also been shown to be an inhibitor of esterase and lipases that depend on the presence of the alpha-Betha hydrolase structural motif, found in several other enzymes such as serine protease.

The alpha/beta-hydrolase family of folding enzymes is one of the largest groups of structurally related enzymes with diverse catalytic functions. Members of this family include acetylcholinesterase, PAF AH, lipase, thioesters, serine carboxypeptidase, proline iminopeptides, proline oligopeptides, haloalkane dehalogenase, haloperoxidase, epoxy hydrolase, hydroxynitrile lyase and others. Recently, also this alpha beta hydrolase structural motif is found in enzymes involved in cell signalling such as cyclic AMP-activated protein kinase A (PKA) and other kinases. All enzymes have a Nucleophilic-His-Acid catalytic triad designed to operate efficiently on substrates with different chemical compositions or physicochemical properties and in various biological contexts. Thus, KPF would be a potent modulator of enzymes with this alpha-beta hydrolase domain and thus its activity is nonspecific.

4. Conclusion.

Our results clearly show that the treatment of animals with KPF promoted a significant increase in the myotoxic activity of rattlesnake PLA2 and these data show that there is a relationship between the increase in PAF that could enhance the myotoxic effect besides the PAF itself can modulate the contractile activity of muscle fibres. Several experiments have shown that PAF induces not only the aggregation and activation of platelets and leukocytes but also many various biological activities including modulation of dose dependent enhance muscle contraction (Liu et al., 2022), however the mechanism of PAF induced contraction is not yet fully clarified. In the case of myotoxicity, we also observed that KPF was also able to inhibit the activity of the acetylcholinesterase enzyme and thus the ability of KPF to modulate the increased myotoxic activity of rattlesnake sPLA2 is due to KPF's inhibition of the PAF AH and acetylcholinesterase enzymes (Figure 4 B).

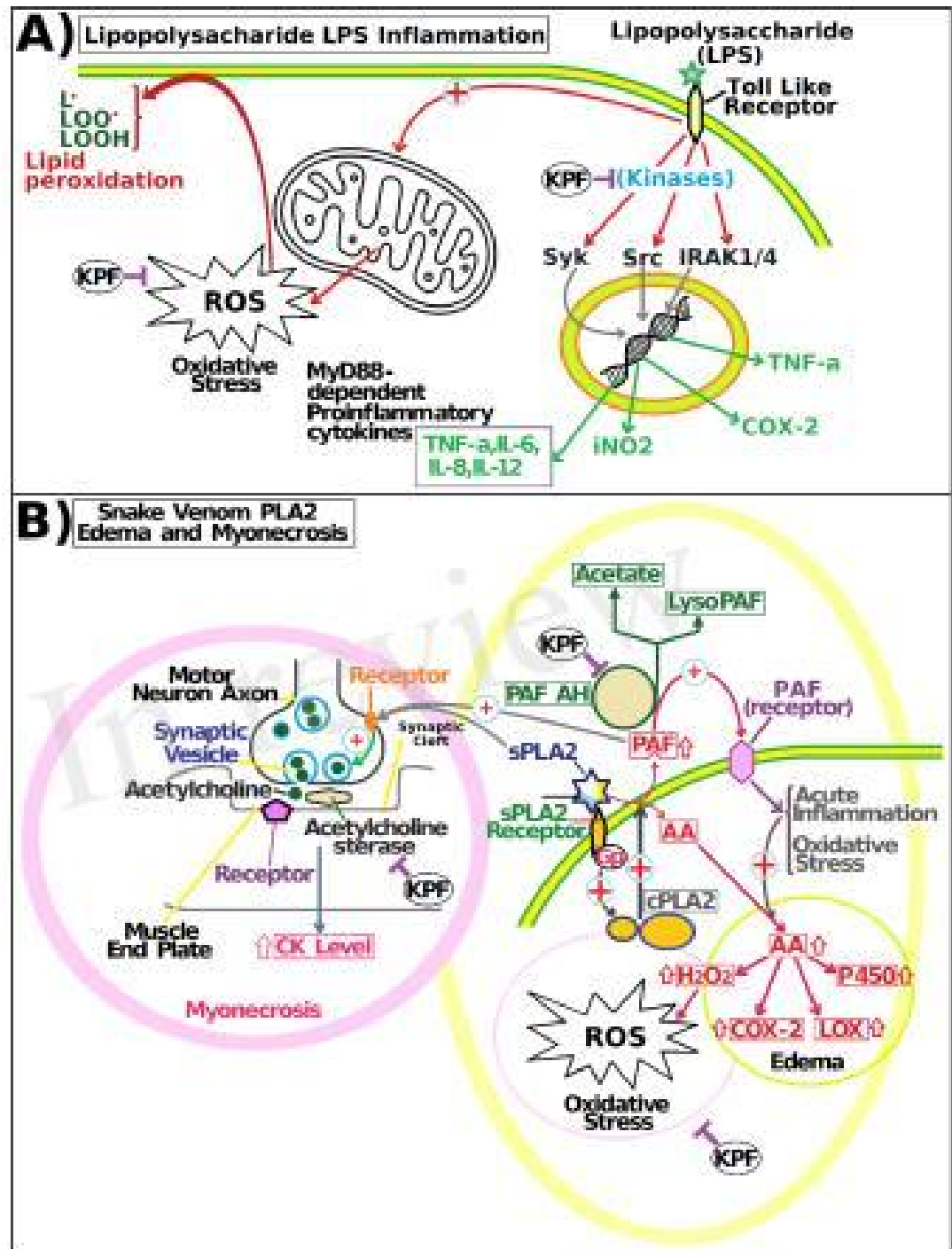


Figure 4. Schematic of the pro-inflammatory action of LPS via activation of kinases and signalling for the activation of various inflammation factors, especially those activated by MyD88 factor and the role of the TOLL-Like receptor, which also stimulates production (Figure 4 A). Figure 4B, proposed possible mechanism of action of KPF and increased Edema and myotoxicity induced by rattlesnake sPLA2.

Author Contributions: Marcos Hikari Toyama: Conceptualization, Supervision, project administration, funding acquisition writing—original draft preparation, formal analysis; Airam Roggero; Laila L. F. de Moraes; Agatha Manzi De Carli responsible for Software use, in silico modelling, and gallic acid docking experiment, validation and formal analysis; Caroline R. C. Costa; Mariana N. Belchor; Gustavo A. Fernandes biological, biochemical and pharmacological assay; Marcos A. de Oliveira: Conceptualization, Supervision, funding acquisition and in silico supervision. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This work had the financial support of FAPESP PROC. No. 2017/20291-0/ Research grant FAPESP PROC. No. 2017/19942-7/ Research Grant FAPESP PROC No. 2020/03297-8 and Marcos H. Toyama researcher PQ2 CNPq (CNPQ 2019 304153/2019-2).

Institutional Review Board Statement: The study was conducted according to the guidelines and validated studies. In vivo experiments were performed according to institutional rules and were approved by the ethics committee of UNESP. All animal experiments were approved by the Ethics Committee of Paulista State University/ LB. / São Vicente under Protocol number 11/2018-CEUA and Protocol n° 10/2018-CEUA.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: All data in the paper followed all current analyses and are original.

Acknowledgements: We thank the Council Nacional de Disinvolvement Scientific and Technologic of the Government of the Federative Republic of Brazil for its support of the productivity fellows and our university (UNESP - State University of São Paulo) for the institutional support of our research efforts.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

- Zakaryan, H.; Arabyan, E.; Oo, A.; Zandi, K. Flavonoids: promising natural compounds against viral infections. *Arch Virol.* 2017, 162(9), 2539–2551.
- Rodríguez-Arce, E.; Siddins, M. Antioxidant properties of flavonoid metal complexes and their potential inclusion in the development of novel strategies for the treatment against neurodegenerative diseases. *Biomed Pharmacother.* 2021, 143, 112236.
- Santos, M.L.; Toyama, D.O.; Oliveira, S.C.; Cotrim, C.A.; Da-Filho, E.B.; Fagundes, F.H.; Soares, V.C.; Apuricio, R.; Toyama, M.H. Modulation of the pharmacological activities of secretory phospholipase A2 from *Crotalus durissus cascavella* induced by naringin. *Molecules.* 2011 Jan 18;16(1):738–61.
- Tamayoze, C.L.; Romoff, P.; Toyama, D.O.; Gieta, H.H.; Costa, C.R.C.; Belchor, M.N.; Oetelan, B.D.; Veloso, L.S.M.; Kaplan, M.A.C.; Ferreira, M.J.P.; Toyama, M.H. Non-Clinical Studies for Evaluation of 8-C-Rhamnosyl Apigenin Purified from *Peperomia obtusifolia* against Acute Edema. *Int J Mol Sci.* 2017, 18(9), 1972.
- Oliveira, S.G.; de Moura, F.R.; Demarco, F.F.; Nascente, P.da S.; Pino, F.A.; Lund, R.G. An ethnomedicinal survey on phytotherapy with professionals and patients from Basic Care Units in the Brazilian Unified Health System. *J Ethnopharmacol.* 2012, 140(2), 428–437.
- Siqueira, B.V.L.; Sakuragui, C.M.; Soares, B.E.; de Oliveira, D.R. The rise of medicalization of plants in Brazil: A temporal perspective on vernacular names. *J Ethnopharmacol.* 2018, 224, 535–540.
- Ribeiro, L.H.L. Analysis of medicinal plant and herbal medicine programs in the Unified Health System (SUS) from the territorial perspective. *Cien Saude Colet.* 2019, 24(5), 1733–1742.
- Iyas, U.K.; Elayadeth-Meerthul, M.; Kurimiyin, M.S.; Quidri, S.A.; Rajasee, R.S.; Naseef, P.P. Densitometric Quantification and Optimization of Polyphenols in *Phyllanthus maderaspatensis* by HPTLC. *Saudi J Biol Sci.* 2022, 29(3), 1521–1529.

- Sudheeran, P.K., Ovadia, R., Galsarker, O., Maoz, I., Sela, N., Maurer, D., Feygenberg, O., Oren Shamir, M., Allam, N. Glycosylated flavonoids: fruit's concealed antifungal arsenal. *New Phytol.* 2020, 225(4), 1788-1798.
- Gamiotea-Turro, D., Canaforte, N.A.P., Valerino-Díaz, A.B., Ortiz Nuñez, Y., Rinaldo, D., Dokkedal, A.L., Bosqueiro, J.R., Santos, L.C.D. Qualitative and Quantitative Analysis of Ethanolic Extract and Phenolic Fraction of *Jatropha aethiopica* (Euphorbiaceae) Leaves and Their Hypoglycemic Potential. *J Agric Food Chem.* 2018, 66(6), 1419-1427.
- Silva Dos Santos, J., Gonçalves Cirino, J.P., de Oliveira Carvalho, P., Ortega, M.M. The Pharmacological Action of Kaempferol in Central Nervous System Diseases: A Review. *Front Pharmacol.* 2021, 11, 565700.
- Kim, J.M., Lee, E.K., Kim, D.H., Yu, B.P., Chung, H.Y. Kaempferol modulates pro-inflammatory NF-kappaB activation by suppressing advanced glycation endproducts-induced NADPH oxidase. *Age (Dordr).* 2010, 32(2), 197-208.
- Bestwick, C.S., Milne, L., Pirie, L., Duthie, S.J. The effect of short-term kaempferol exposure on reactive oxygen levels and integrity of human (HL-60) leukaemic cells. *Biochim Biophys Acta.* 2005, 1740(3), 340-349.
- Rebuglio Velloso, J. C., O. Regasini, L., Maissar Khalil, N., da Silva Bolzani, V., A. K. Khalil, O., Manente, F. A., Pasquini Netto, H., & M. de Faria Oliveira, O. M. 2018. Antioxidant and cytotoxic studies for kaempferol, quercetin and isquercitrin. *Eclética Química Journal*, 36(2), 07-20.
- Sanver, D., Murray, B.S., Sadeghpour, A., Rappolt, M., Nelson, A.L. Experimental Modeling of Flavonoid-Biomembrane Interactions. *Langmuir.* 2016 Dec 13;32(49):13234-13243.
- Climara, P.R., Esquisatto, L.C., Camargo, E.A., Ribela, M.T., Toyama, M.H., Marangoni, S., De Nucci, G., Antunes, E. Inflammatory oedema induced by phospholipases A2 isolated from *Crotalus durissus* sp. in the rat dorsal skin: a role for mast cells and sensory C-fibers. *Toxicon* 2003, 41(7):823-839.
- Ximenes, R.M., Alves, R.S., Pereira, T.P., Araújo, R.M., Silveira, E.R., Rabello, M.M., Hernandez, M.Z., Soares, V.C., Bristol, D., Pires, C.L., Toyama, D.O., Gaeta, H.H., Monteiro, H.S., Toyama, M.H. Harpalycin 2 inhibits the enzymatic and platelet aggregation activities of PrTX-III, a D49 phospholipase A2 from *Bothrops pirajai* venom. *BMC Complement Altern Med.* 2012, 12:139.
- Cedro, R.C.A., Menaldo, D.L., Costa, T.R., Zoccal, K.F., Sartim, M.A., Santos-Filho, N.A., Faccioli, L.H., Sampaio, S.V. Cytotoxic and inflammatory potential of a phospholipase A2 from *Bothrops jararaca* snake venom. *J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis.* 2018, 24, 33.
- Toyama, M. H. , Costa, C. R. , Belchor, M. N. , Novaes, D. P. , de Oliveira, M. A. , Ie, R. , Gaeta, H. H. , de O. Toyama, D. Edema Induced by sPLA2 from *Crotalus durissus terrificus* Involves PLC and PKC Signaling, Activation of ePLA2, and Oxidative Stress. In: Kumar, V. , Salgado, A. A. , Athari, S. S. , editors. *Inflammation in the 21st Century* (Internet). London: IntechOpen; 2019 Available from: <https://www.intechopen.com/chapters/65249> doi: 10.5772/intechopen.80848
- Al-Quraishy, S., Dkhil, M.A., Abdel Moneim, A.E. Hepatotoxicity and oxidative stress induced by Naja haje crude venom. *J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis.* 2014, 20(1), 42.
- Dos Santos Junior, A.B., Tamayose, C.I., Ferreira, M.J.P., Belchor, M.N., Costa, C.R.C., de Oliveira, M.A., Toyama, M.H. Bioaffinity Fishing Procedure Using Secretory Phospholipase A2 for Screening for Bioactive Components: Modulation of Pharmacological Effect Induced by sPLA2 from *Crotalus durissus terrificus* by Hispidulin from *Moquiniastrum floribundum*. *Molecules.* 2020 Jan 9;25(2):282.
- Morais, V., Leiguez, E., Janovits, P.M., Maia-Marques, R., Fernandes, C.M., Teixeira, C. Inflammatory Effects of *Bothrops* Phospholipases A2: Mechanisms Involved in Biosynthesis of Lipid Mediators and Lipid Accumulation. *Toxins (Basel).* 2021, 13(12), 868.
- Wu, H., Bogdanov, M., Zhang, Y., Sun, K., Zhao, S., Song, A., Luo, R., Parchim, N.F., Liu, H., Huang, A., Adibiyyi, M.G., Jin, J., Alexander, D.C., Milburn, M.V., Idowu, M., Juneja, H.S., Kellems, R.E., Dowhan, W., Xia, Y. Hypoxia-mediated impaired erythrocyte Lands' Cycle is pathogenic for sickle cell disease. *Sci Rep.* 2016, 6:29637.
- Law, S.H., Chan, M.L., Marathe, G.K., Parveen, F., Chen, C.H., Ke, L.Y. An Updated Review of Lysophosphatidylcholine Metabolism in Human Diseases. *Int J Mol Sci.* 2019, 20(5), 1149.
- Ashraf MA, Nookala V. Biochemistry of Platelet Activating Factor. (Updated 2021 Apr 19). In: StatPearls (Internet). Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2022 Jan-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK557392/>
- ODonnell, V.B. New appreciation for an old pathway: the Lands Cycle moves into new arenas in health and disease. *Biochem Soc Trans.* 2022, 50(1), 1-11.
- Wu, Y., Liao, G.Y., Ke, H.J., Liu, P. Effects of Snake-Derived Phospholipase A2 Inhibitors on Acute Pancreatitis: In vitro and in vivo Characterization. *Drug Des Devel Ther.* 2020;14, 4765-4774.
- Fontch, A.N., Atsumi, G., LaPorte, T., Chilton, F.H. Secretory phospholipase A2 receptor-mediated activation of cytosolic phospholipase A2 in murine bone marrow-derived mast cells. *J Immunol.* 2000, 165(5), 2773-2782.
- Han, W.K., Sapirstein, A., Hung, C.C., Alessandrini, A., Bonventre, J.V. Crosstalk between cytosolic phospholipase A2 alpha (cPLA2 alpha) and secretory phospholipase A2 (sPLA2) in hydrogen peroxide-induced arachidonic acid release in murine mesangial cells: sPLA2 regulates cPLA2 alpha activity that is responsible for arachidonic acid release. *J Biol Chem.* 2003, 278(26), 24153-24163.