

**Identificação e caracterização de inibidores de Fosfolipase A2
provenientes de metabólitos secundários de plantas da Mata
Atlântica listados no SUS**

Airam Roggero dos Santos Silva

SÃO VICENTE - SP

2022

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

**Identificação e caracterização de inibidores de Fosfolipase A2 provenientes de
metabólitos secundários de plantas da Mata Atlântica listados no SUS**

Airam Roggero dos Santos Silva

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

S586i

Silva, Airam Roggero dos Santos

Identificação e caracterização de inibidores de Fosfolipase A2 provenientes de metabólitos secundários de plantas da Mata Atlântica listados no SUS /

Airam Roggero dos Santos Silva. -- São Vicente, 2022

115 p. : il., tabs.

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

Orientadora: Marcos Hikari Toyama

Coorientadora: Marcos Antônio Oliveira

1. sPLA2. 2. alfa beta hidrolase. 3. Kaempferol. 4. Quercetina. 5. in silico.

I. Título.

Dedico este trabalho a minha família que viu meu desespero de todas as vezes que tentei fazer este trabalho e não deu certo, dos momentos em que pensei fortemente em desistir e mesmo assim jamais deixaram de me incentivar e acreditar que eu era capaz de fazê-lo.

Ao meu Avô que não está mais entre nós, mas sempre me apoiou em meu trabalho, e a luta que tive que passar para chegar até aqui, de algum lugar, espero que ele se orgulhe.

Aos meus amigos estes que me ouviram e me distraíram das diversas vezes em que surtei ao longo do desenvolvimento deste trabalho e da pandemia como um todo e a todos que de alguma forma tornaram este passo importante para a minha vida.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus permitindo que tudo ocorresse de modo torto, mas certo ao longo do projeto.

Ao PPG-BAC por me proporcionar a realização do projeto ao longo da pandemia e a todos os momentos que tiveram paciência comigo quando fui tirar dúvidas além de a oportunidade de apresentar este trabalho como os tantos outros que aqui realizei.

Aos meus orientadores que foram pacientes ao longo do desenvolvimento do trabalho, me incentivando na realização deste trabalho e ao desenvolvimento de novos conhecimentos na área da bioinformática, onde me sinto cada vez mais realizada Academicamente.

Aos amigos do laboratório BIOMOLPEP – UNESP/CLP que me ajudaram na revisão do trabalho, e as meninas Laila e a Vitoria Isabeli que em momento algum me deixaram desistir, que me incentivaram a tentar, entrar no PPG e chegar até aqui.

“Aprenda a enxergar. Perceba que tudo se conecta a todo o resto.”

Leonardo Da Vinci

RESUMO

Neste trabalho mostramos que a integração de métodos *in silico* foram cruciais para ajudar no levantamento de novos dados, revisão de fundamentos da ação de drogas e os experimentos *in silico* mostraram ser valiosas ferramentas na escolha de potenciais candidatos pela relativa abundância dentre de um gênero ou em vários gêneros. Usamos uma combinação de ferramentas de pesquisa estatística dos principais compostos naturais presentes em três gêneros de plantas indicados para uso no tratamento fitoterápico junto ao SUS e identificamos que a quercetina e seus derivados estão entre os compostos prevalentes e abundantes, que mostraram uma forte capacidade de interação com a PLA2 secretória da cascavel. Por outro lado, nós reexaminamos e reavaliamos dois grandes conjuntos de dados experimentais, que mostraram resultados discrepantes em relação a atividade anti-inflamatória do Kaempferol e Quercetina em presença da sPLA2 como agente indutor de inflamação e em ambos os casos a sPLA2 mesmo em presença dos dois inibidores, a inflamação e mesmo a mionecrose não foram inibidas. Os resultados das análises *in silico*, mostraram que ambos os compostos não mostraram um encaixe molecular capaz de se ligar ao sítio ativo, por outro lado os dados *in silico* mostraram que ambos compostos foram capazes de inibir enzimas como a PAF AH, que é uma enzima crucial para o controle da inflamação. Esta enzima pertencente faz parte de uma classe de proteínas denominada de alfa beta hidrolase e as análises também mostraram que outras enzimas da classe alfa beta hidrolase como a Acetil colinesterase também mostraram forte interação com estas enzimas, junto ao seu sítio ativo e que tiveram sua inibição confirmada por ensaios *in vitro*. Os nossos resultados, mostram que os experimentos *in silico* foram valiosos para o fechamento do diagnóstico dos dois trabalhos.

Palavra de chaves: sPLA2, alfa beta hidrolase, Kaempferol, Quercetina, *in silico*.

ABSTRACT

In this work, we show that the integration of in silico methods was crucial to help in the collection of new data, both the review of drug action fundamentals and the in silico experiments proved to be valuable tools in the choice of potential candidates due to the relative abundance within a genus or in various genres. We used a combination of statistical research tools of the leading natural compounds present in three genders of plants indicated for use in herbal treatment with the SUS. We identified that quercetin and its derivatives are among the prevalent and abundant compounds, which showed a solid ability to interact with the rattlesnake's secretory PLA2. On the other hand, we re-examined and re-evaluated two large experimental datasets, which showed discrepant results regarding the anti-inflammatory activity of Kaempferol and Quercetin in the presence of sPLA2 as an inflammation-inducing agent, and in both cases sPLA2 even in the presence of the two inhibitors, inflammation and even myonecrosis were not inhibited. The results of the in-silico analysis showed that both compounds did not show a molecular fit capable of binding to the active site, on the other hand, the in-silico data showed that both compounds were able to inhibit enzymes such as PAF-AH, which is an enzyme crucial for controlling inflammation. This enzyme belongs to a class of proteins called alpha-beta hydrolase and the analysis also showed that other enzymes of the alpha-beta hydrolase class such as Acetylcholinesterase also showed strong interaction with these enzymes, along with their active site and that they had their inhibition confirmed by in vitro assays. Our results show that the in-silico experiments were valuable for the conclusion of the diagnosis of the two works.

Keywords: sPLA2, alpha beta hydrolase, Kaempferol, Quercetin, in silico.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	9
<i>1.1 FOSFOLIPASES</i>	<i>9</i>
1.1.1 Funções das PLA2s	10
1.1.2 Sítio catalítico das PLA2s	10
<i>1.2 RELAÇÃO DE PLANTAS MEDICINAIS DE INTERESSE AO SUS</i>	<i>12</i>
<i>1.3 FLAVONOIDES</i>	<i>13</i>
<i>1.4 ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA DOS FLAVONOIDES</i>	<i>14</i>
<i>1.5 BIOINFORMÁTICA</i>	<i>15</i>
1.5.1 TRIAGEM E SELEÇÃO DE FLAVONOIDES	16
<i>1.5.1.1 Flavonoides selecionados</i>	<i>16</i>
2 OBJETIVO	18
<i>2.1 OBJETIVO GERAL</i>	<i>18</i>
<i>2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS</i>	<i>18</i>
3 MATERIAIS E MÉTODOS	19
<i>3.1 MINERAÇÃO DE DADOS</i>	<i>19</i>
<i>3.2 ANÁLISE IN SILICO</i>	<i>19</i>
<i>3.3 DOCK MOLECULAR</i>	<i>20</i>
<i>3.4 PURIFICAÇÃO DA SPLA2</i>	<i>21</i>
3.4.1 Cromatografia de exclusão molecular em HPLC	21
<i>3.4.1.1 Análise do grau de pureza da toxina</i>	<i>21</i>
<i>3.5 ENSAIOS ENZIMÁTICOS</i>	<i>22</i>
<i>3.6 ENSAIOS FARMACOLÓGICOS</i>	<i>22</i>
3.6.1 Avaliação do edema de pata protocolo incubado	23
3.6.2 Edema de pata	23
3.6.3 Atividade miotóxica	24
<i>3.7. ANÁLISE ESTATÍSTICA</i>	<i>24</i>
4 RESULTADOS	25
<i>4.1 QUERCETINA</i>	<i>29</i>
<i>4.1 KAEMPFEROL</i>	<i>40</i>
5 DISCUSSÃO	47
6 CONCLUSÃO	50
REFERÊNCIAS	52
ANEXO I	74
ANEXO II	78
ANEXO III	82
ANEXO IV	83
ANEXO V	84
ANEXO VI	85
ANEXO VII	87
ANEXO VIII	88
ANEXO IX	99

1 INTRODUÇÃO

1.1 FOSFOLIPASES

A fosfolipase compreende um supergrupo de enzimas de lipases-esterases presentes em células de diversos vertebrados, plantas e microrganismos que desempenham enzimaticamente a hidrólise da ligação éster em triglicerídeos. Especificamente, as fosfolipases A (PLA) catalisam a hidrólise 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).

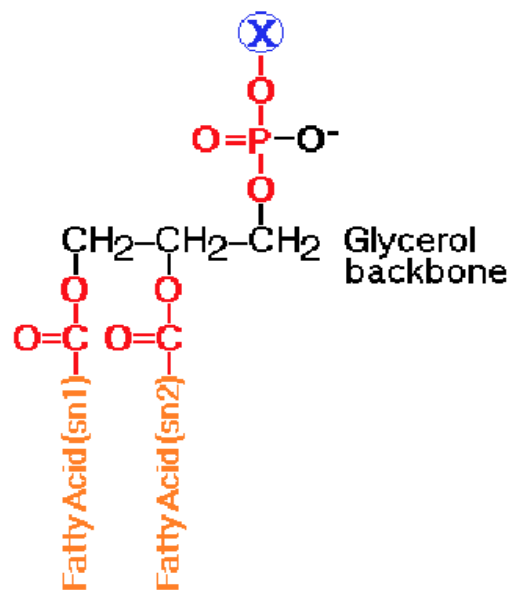


Figura 1. Estrutura básica dos fosfolípídios com seus grupos ésteres O-C=O e sua região fosfodiéster O-P=O. Fonte: Autoria Própria

As PLAs podem ser classificadas em grupos ou classes, dependendo da estrutura química do fosfoglicerídeo, apresentado na Figura 1. Elas desempenham vários papéis fisiológicos importantes, incluindo a produção de eicosanoides inflamatórios a partir do ácido araquidônico (Murakami; Lambeau, 2013).

Assim, as enzimas PLA2 (EC 3.1.1.4) pertencem a uma família de esterases, ou seja, são enzimas lipolíticas que catalisam especificamente a hidrólise das ligações ésteres nos glicerofosfolípídeos na posição sn-2 (Vulfius *et al.*, 2017). A hidrólise dos glicerofosfolípídeos liberta ácidos graxos livre, como o ácido araquidônico e a liberação dos lisofosfolípídeos, que atuam como mediadores em diversos processos biológicos.

Embora tenham sido formalmente classificadas em cerca de 16 grupos e numerosos subgrupos, as PLA2s possuem seis tipos principais, incluindo: i) secretórias (sPLA2), ii) citossólicas (cPLA2), iii) independente de Ca²⁺ (iPLA2), iv) associada a lipoproteína (LpPLA2) também conhecida como Fator ativador de plaquetas acetilhidrolase

(PAF-AH), v) lisossomal (LPLA2), e vi) adipose (AdPLA) (Cao *et al.*, 2013; Fragopoulou; Demopoulos; Antonopoulou, 2009).

1.1.1 Funções das PLA2s

As PLA2s de serpentes possuem inúmeros efeitos tóxicos, mas nem todos são explicados pela hidrólise de fosfolípidios. As PLA2s estão envolvidas na patogênese de várias condições inflamatórias, incluindo artrite reumatoide, aterosclerose, múltiplas formas de tumores, doenças cardiovasculares, e outras doenças inflamatórias.

Cada enzima tem uma atuação característica. A PLA2 do veneno de *Pseudechis australis*, por exemplo, apresenta atividade anticoagulante (Du *et al.*, 2016), enquanto a Lemnitoxina do veneno de *Micrurus lemniscatus* possui atividade miotóxica. Dentre tantas funções que as PLA2s desempenham, a ação de neurotoxicidade é a mais importante (Fathi; Rowan; Harvey, 2001; Šribar; Križaj, 2011; Casais-e-Silva *et al.*, 2016).

A atividade de neurotoxicidade ocorre devido a um bloqueio de comunicação neuromuscular em fases no organismo, iniciando em uma baixa liberação de acetilcolina (ACh), até alcançar um bloqueio irreversível (Fathi; Rowan; Harvey, 2001; Šribar, Križaj, 2011).

Ensaio com heparina apontaram uma redução da atividade de neurotoxicidade da PLA2 F16 do veneno de *Crotalus durissus terrificus* (*Cdt.*), demonstrando que mesmo apresentando semelhanças com outras isoformas de PLA2, a atividade de neurotoxicidade da F16 varia de acordo com a preparação neuromuscular para usar a crotapotina na formação do complexo de crotoxina (Hossen *et al.*, 2005). Segundo estudos de Câmara *et al.* (2003) e Freitas *et al.* (2021), a crotoxina e a PLA2 podem atuar sobre os sistemas nervosos e desencadear vários eventos celulares, e essa ativação pode modular outras atividades celulares, incluindo mastócitos, linfócitos e células musculares (Huang *et al.*, 2015).

Ao contrário do que se pensava, apenas uma fração da PLA2 tem uma atividade neurotóxica, portanto se bem purificada for a proteína extraída de venenos, ela se encontra com similaridade alta à PLA2 pancreática, no caso da PLA2 de *Cdt.*, permitindo assim uma mimetização em experimentação animal (Toyama, 2014).

1.1.2 Sítio catalítico das PLA2s

As PLA2s podem ser divididas em dois grupos de acordo com localização celular, sendo elas as PLA2s citosólicas e secretórias. Em ambos os casos, a base de seu mecanismo catalítico, seja ele dependente ou não de cálcio, tem como base bioquímica a presença da tríade catalítica das lipases-esterases (Takada; Fujita, 2016; Chen *et al.*, 2016; Casais-e-Silva *et al.*, 2016).

O mecanismo de catálise das lipases que inclui as PLA2s citosólicas é definido pela tríade catalítica dos aminoácidos Serina (Ser), Histidina (His) e Ácido Aspártico (Asp.), substituído em alguns casos pela Glutamina (Glu). A Serina ativada adiciona

nucleofílicamente a função carbonila de um substrato éster ou lactona. A Histidina, durante a reação da PLA2 com um substrato, doa e recebe elétrons e, com isso, pode realizar uma auto-oxidação, fazendo com que o substrato interaja apenas com uma cadeia da PLA2. No caso da PLA2, o primeiro produto a ser liberado seria o ácido graxo livre e o segundo o lisofosfolípido (Sharp *et al.*, 1994; Pickard *et al.*, 1996; Vasquez *et al.*, 2018).

Estudos prévios revelam que a PLA2 associada a lipoproteínas mostram bem conservada a tríade catalítica das $\alpha\beta$ -hidrolases constituídas pela serina, ácido aspártico e histidina. A hidrólise de grupos acila nas α/β hidrolases lipásicas é realizada por uma tríade catalítica Ser-His-Asp/Glu análoga à 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 PLA2s citosólicas cálcio dependentes (GIVA cPLA) e cálcio independentes (GVIA iPLA2) à His, aminoácido importantíssimo nos sítios ativos das PLA2s, foi substituído pela presença de Arginina (Arg.), pois a arginina tem um grupo guanidina que poderia desempenhar uma função análoga à histidina, sendo uma troca nonsense, mantendo a estabilidade do sítio (Pickard *et al.*, 1996; Mouchlis *et al.*, 2012; Muller *et al.*, 2019).

O papel da Tirosina (Tyr) na atividade enzimática das PLA2s está fundamentado no fato de que não somente a Tyr 52 e a Tyr 73 são resíduos que ajudam a estabilizar o sítio ativo das PLA2s secretórias, mas também por manter uma forte interação com a His 48, Asp. 99 e conceder as características espaciais da proteína (Tomoo *et al.*, 1997).

Trabalhos realizados por Salvador *et al.* (2019; 2021) revelam que o composto sintético Varespladib (LY315920) está acomodado em um local próximo à Lys 48, Gly 29, Gly 30, onde está situada a região denominada “Loop de cálcio”, pois esta alça de glicinas mantém o cálcio dentro da proteína, mantendo-a funcional, pois ela é cálcio dependente.

Com base nos estudos de Davidson e Dennis (1990), Dupureur *et al.* (1992), Moura-da-Silva *et al.* (1995), Tomoo *et al.* (1997), Janssen *et al.* (1999), Corrêa *et al.* (2008) e Kim *et al.* (2020), e utilizando dados das proteínas depositadas no PDB, criamos um modelo teórico de catálise da PLA2 secretória do grupo II de *Cdt.* (PDB 2QOG), onde os resíduos de Tyr adjacentes ao ácido aspártico teriam o papel funcional de Asp. da tríade catalítica das esterases, a His central e o complexo Gly, Asp., cálcio teriam o papel funcional da Ser (Figura 2), e todos estes resíduos localizados no sítio ativo da PLA2 secretória.

As enzimas $\alpha\beta$ -hidrolases de forma geral, estão amplamente distribuídas pelo corpo humano em funções específicas como como a PAF-AH e Acetilcolinesterase (AChE) que atua na Ach (Acetilcolina) (YARLA *et al.*, 2015; Tordera; Ferrándiz; Alcaraz, 1994).

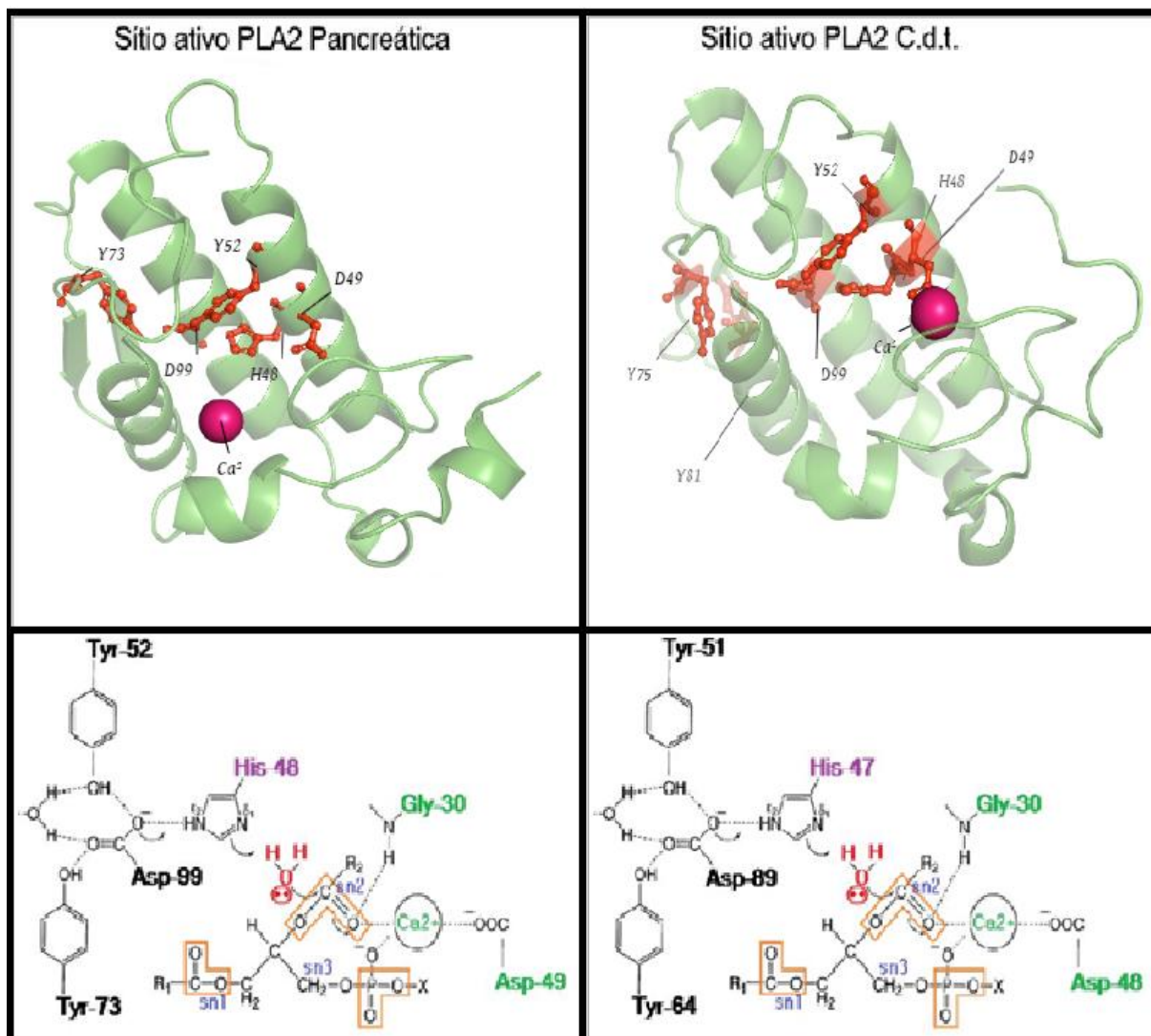


Figura 2. Modelo teórico de catálise da PLA2 secretória do grupo II de *Crotalus durissus terrificus*, depositada no RCSB, sendo elas PDB 2Q42 (sPLA2 pancreática de *Homo sapiens*) e PDB 2QOG (sPLA2 de *Crotalus durissus terrificus*). Imagens geradas pelo Pymol. Em verde, observamos a estrutura 3D das proteínas; em vermelho, observamos os aminoácidos considerados essenciais para a estrutura das proteínas; em rosa, observamos o cálcio. Fonte: Autoria Própria

1.2 RELAÇÃO DE PLANTAS MEDICINAIS DE INTERESSE AO SUS

Em 2007, o Ministério da Saúde (MS) liberou alguns fitoterápicos para utilização na rede pública. Posteriormente, em 2009, criou a Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao Sistema Único de Saúde (RENISUS), sendo uma lista composta por 71 gêneros de plantas que possuem algum benefício à saúde, de acordo com a medicina popular ou bases científicas. Esta relação popularizou na medicina nacional a prática e utilização de plantas, com artifícios de tratamento fitoterápico e nutracêutica (Brasil, 2009).

Suas funções benéficas são anti-inflamatórias, antidiarreicas, diuréticas, expectorantes, entre outras propriedades farmacológicas. Todas as espécies citadas pela

Relação estão presentes em território nacional, por serem nativas ou por serem naturalizadas e se adaptarem nos biomas brasileiros (Correa, 2018; Costa, 2018).

No campo da nutracêutica, isso ocorreu com base na ideia de utilizar alimentos funcionais, desencadeando assim inúmeros trabalhos sobre as plantas listadas pelo RENISUS e suas diversas formas de utilização.

Atualmente, percebe-se a dinâmica das pesquisas com a biodiversidade brasileira, seguindo os gêneros indicados pelo RENISUS, além de ter se tornado mais simples, menos burocrática e mais esclarecida em relação às regras dispostas na Lei 13.123 de 20 de maio de 2015. Conhecida como o Marco da Biodiversidade, a nova legislação regulamentou o acesso à biodiversidade e repartição de benefícios, e garantiu a segurança jurídica necessária para programas de inovação para o desenvolvimento de novos fármacos com potencial terapêutico.

1.3 FLAVONOIDES

Os flavonoides compõem uma ampla classe de compostos polifenólicos de origem vegetal e são encontrados nas plantas de diferentes ecossistemas, sendo considerados compostos relativamente estáveis por resistirem à oxidação. Podem se apresentar como agliconas, glicosídeos ou como parte de outros compostos químicos (Kumar; Pandey, 2014).

Nas plantas, os flavonoides são metabólitos secundários que atuam na defesa das plantas frente a adversidades, para que consigam desempenhar seu ciclo de vida de forma correta, crescendo, atingindo a maturação sexual, e gerando herdeiros com características de resistência. Alguns flavonoides atuam no transporte de substâncias e na pigmentação do mesmo (Prior *et al.*, 2007; Yonekura-Sakakibara *et al.*, 2019).

Na medicina, os compostos flavonoides não são considerados um medicamento ou suplemento alimentar, com o objetivo de melhorar a saúde, pois na literatura, diversos estudos apontam a utilização dos flavonoides e evidenciam a ausência de efeitos colaterais significativos, sendo usados somente em forma de alimento funcional (Prior *et al.*, 2007; Christen *et al.*, 2007; Chun *et al.*, 2020).

Estes compostos polifenólicos são biossintetizados pela via do ácido chiquímico, um importante intermediário na biossíntese de substâncias aromáticas em plantas com pH entre 5-9, e têm a função de originar o ácido cinâmico e seus derivados, como os ácidos cafeico, ferúlico e sináptico, com nove átomos de carbono; pela via do acetato que origina um tricetídeo com seis átomos de carbonos, seguindo a rota metabólica das plantas, eles irão conjugar mais carbonos, sintetizando os flavonoides com 15 carbonos, quando necessário para sua proteção em relação às adversidades do ambiente (Kroll *et al.*, 2003; Brudzynki, Maldonado-Alvarez, 2015; Wang *et al.*, 2018).

Sua 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, podendo ser um pirano (anel C) (Dornas *et al.* 2010; Wang *et al.*, 2018).

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 hidroxilação, metilação, acilação, glicosilação, hidrogenação e sulfatação. Devido a essa grande diversidade química, a relação da estrutura e função dos flavonoides ainda não está elucidada (Kumar, Pandey, 2013; Wang *et al.*, 2018; Jucá *et al.*, 2020).

1.4 ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA DOS FLAVONOIDES

A inflamação é um processo normal e biológico em resposta à lesão tecidual, microbiana, infecção patogênica, e irritação química, iniciada pela migração de células imunitárias dos vasos sanguíneos e liberação de mediadores no local dos danos, incluindo as PLA2s (Rodrigues, 2014; Toyama *et al.*, 2019).

Este processo é seguido pelo recrutamento de células inflamatórias, liberação de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (ROS e RNS), citocinas pró-inflamatórias para eliminar agentes patogênicos 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 PLA2 (Kumar, Pandey, 2013; Panche *et al.*, 2016; Toyama *et al.*, 2019).

De forma geral, os estudos indicam que os flavonoides apresentam diferentes mecanismos de ação, sendo eles: inibição da síntese de TNF- α , bloqueio das enzimas fosfolipase, cicloxigenase (COX) 1 e 2 ou lipoxigenase (LOX), e outras enzimas envolvidas no processo inflamatório. Além disso, alguns 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 neutrofílica humana (HNE) e as metaloproteinases da matriz, que estão associadas a processos anti-inflamatórios em estudos *in vitro*. Por sua vez, o Kaempferol-3-O- β -D-galactosídeo inibe a produção de TNF- α e a NOS, exibindo 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).

Nossa experiência com flavonoides mostra que estas moléculas têm um grande potencial farmacêutico, nutracêutica e podem auxiliar no uso funcional de determinados alimentos, além de abordarmos as chaves inflamatórias por marcadores não convencionais como as PLA2 e as $\alpha\beta$ -hidrolases de forma geral onde também possuímos enzimas amplamente distribuídas pelo corpo humano como a Acetilcolinesterase (AChE), e as PLA2, tendo ênfase na PAF-AH (LpPLA2) e sPLA2. (YARLA *et al.*, 2015; Toyama *et al.*, 2019; Tordera; Ferrándiz; Alcaraz, 1994).

1.5 BIOINFORMÁTICA

A bioinformática consiste no uso da informática para pesquisas biológicas. Nesse contexto, estudos recentemente mostraram a importância da utilização do desenho de drogas com base em algumas características de compostos naturais, para o desenvolvimento de substâncias com menores interações adversas, realizando assim uma revisão com base nos dados disponíveis na literatura. (Leeson *et al.*, 2021). Este processo, chamado de *in silico* ou triagem de substâncias se mostra cada vez mais eficaz e viável, devido à minimização de tempo de pesquisa e seus custos assim se tornam impulsionada na área de desenvolvimento de fármacos, o protocolo de triagem utilizado neste trabalho é similar ao de Matos, Júnior e Meotti (2020).

Geralmente, as técnicas *in silico* são utilizados grandes bancos de compostos químicos virtuais derivados de fontes naturais ou de composição orgânica disponíveis em domínios como Pubchem, Nature e ChEMBL (Guedes *et al.*, 2014; Moura; Halder; Cordeiro, 2019).

Duas abordagens são usadas para a triagem de compostos a partir das bibliotecas virtuais: i) estrutura do receptor biológico 3D (SBVS – structure-based virtual screening, e ii) estrutura de ligantes bioativos (LBVS - ligand-based virtual screening). Em ambos os casos, é necessário ter tanto a estrutura molecular do ligante quanto do alvo conhecido (Rodrigues *et al.*, 2012).

A triagem virtual baseada 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 de localização aos locais de interação (Domingues *et al.*, 2012; Rodrigues *et al.*, 2012).

O Dock molecular vem se desenvolvendo e aprimorando ao longo destes últimos anos, mas sua capacidade de gerar uma droga viável ainda é questionável. Apesar de controverso, atualmente existem várias drogas que foram descobertas pela técnica de Dock molecular (Lionta *et al.*, 2014; dos Santos *et al.*, 2018; Moura; Halder; Cordeiro, 2019).

1.5.1 TRIAGEM E SELEÇÃO DE FLAVONOIDES

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), a exemplo da ancoragem molecular. A segunda abordagem independe da estrutura do alvo, uma vez que utiliza as estruturas químicas dos compostos ativos como referência (ligand-based drug discovery) (Acharya, 2011; Moura; Halder; Cordeiro, 2019).

Algumas destas ferramentas investigam a similaridade na superposição das estruturas em representações bidimensionais e tridimensionais e avaliam a existência de grupos farmacofóricos. 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 (Li *et al.*, 2006; Acharya, 2011).

1.5.1.1 Flavonoides selecionados

Os compostos flavonoides mais presentes nas espécies vegetais indicados pelo RENISUS, *Eugenia uniflora* Leaves (Pitanga), *Jatropha gossypifolia* Linn (Pinhão-roxo), *Schinus terebinthifolius* Raddi (Aroeira-vermelha), foram a Quercetina e o Kaempferol

A Quercetina é um flavonoide presente em grande parte dos vegetais e compõe grande parte da dieta humana. Seu uso na indústria farmacêutica e alimentícia é amplamente investigado devido aos seus benefícios antivirais, anticâncer e anti-inflamatórios.

Outros benefícios já foram comprovados pela literatura, como a agregação plaquetária, ação de permeabilidade capilar, peroxidação lipídica e aumento da biogênese mitocondrial, diminuição de radicais livres entre outras funções, além de gama de atividades biológicas para combater a neurodegeneração (Aguirre *et al.*, 2011; Dabeek; Marra, 2019; ZAPLATIC *et al.*, 2019; KHAN *et al.*, 2019).

Pesquisas demonstraram que a Quercetina tem a capacidade de reduzir o LDL no organismo. O composto foi encontrado nos três gêneros selecionados para esse trabalho. Ela pode aparecer conjugada com um ou dois açúcares, se tornando quercitrina e rutina, respectivamente. Por meio do dock molecular, foi possível verificar que as Quercetinas presentes nos gêneros têm grande potencial de inibição da sPLA2 devido à interação presente no sítio catalítico da proteína (Stewart *et al.*, 2000; Fabre *et al.*, 2001; D'Andrea, 2015; ISLAM *et al.*, 2013).

O Kaempferol é um metabólito secundário, comum do tipo flavona, encontrado em uma grande diversidade de plantas medicinais, como *Acacia nilotica* (L.) Delile, *Aloe vera* (L.) Burm.f., *Crocus sativus* L., *Euphorbia pекinensis* Rupr., *Ginkgo biloba* L., *Hypericum perforatum* L., *Phyllanthus emblica* L., *Ribes nigrum* L., e *Rosmarinus officinalis* L (L.) (Kotani *et al.*, 2000; Bitis *et al.*, 2010; Calderón *et al.*, 2011; Devi *et al.*, 2015). A sua forma

glicosídica é conhecida como astragalina, reconhecida devido às suas propriedades terapêuticas, principalmente pelas ações antioxidantes, anti-inflamatórias (Kotani *et al.*, 2000; Bitis *et al.*, 2010; Kim *et al.*, 2017; Riaz *et al.*, 2018) e antivirais (BIKBOV *et al.*, 2020).

Em sua forma não glicosilada, ele possui a característica de atuação na resposta inflamatória, estudos recentes, pré-clínicos mostraram que o Kaempferol dietético tem uma ampla gama de atividades farmacológicas, incluindo atividades antioxidantes, anti-inflamatórias, anticancerígenas, antidepressivas, antidiabéticas, neuroprotetoras, cardioprotetoras e antialérgicas (SHIN *et al.*, 2015; SHRIVASTAVA *et al.*, 2016)

A inibição de atividade das enzimas PLA2 por flavonoides tem sido demonstrado em vários entre a inibição depende da estrutura do Flavonóide. Os flavonoides, Kaempferol e Quercetina, inibiram quase completamente a agregação plaquetária induzida pelo ácido araquidônico, onde se tem a atuação das enzimas PAF-AH e da AchE (Tzeng; Ko; Ko; Teng, 1991; Fragopoulou; Demopoulos; Antonopoulou, 2009).

‘Para a obtenção de um composto bom, possível candidato a fármaco, é preciso inúmeros testes combinados, sendo eles in silico, in vitro e in vivo. Pois cada área é complementar a outra. Portanto os processos combinados tornam-se mais eficazes, evitando o reposicionamento errôneo de alguns fármacos.’

2 OBJETIVO

2.1 OBJETIVO GERAL

Identificação e caracterização de inibidores de Fosfolipase A2 provenientes de metabólitos secundários de plantas da Mata Atlântica listados no SUS.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1.Triagem e Seleção de Flavonoides com potencial contra a fosfolipase A2 usando a mineração de dados com base nas características dos compostos presentes em plantas utilizadas no SUS, principalmente entre os gêneros *Eugenia spp.*, *Schinus spp.* e *Jatropha spp.*;
- 2.Seleção com programas de mineração de dados e análise de estruturas químicas que incluem bancos de dados gratuitos, em conjunto com as plataformas Molinspiration, SwissADME e Cocoonut;
- 3.Estudos de Dock molecular e seleção dos melhores ligantes flavonoides contra a sPLA2 de *Crotalus durissus terrificus (Cdt.)* e das enzimas AchE e LP PLA2 de seres humanos;
- 4.Comparação de efetividade de interação in silico entre os compostos selecionados frente as enzimas alvo;
- 5.Avaliação in vitro (enzimática, cromatográfica, espectroscópica, dicroísmo circular) dos compostos em presença da sPLA2 de *Cdt.*;
- 6.Avaliação farmacológica in vivo (edematogênica, miotóxica, citotóxica).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 MINERAÇÃO DE DADOS

As estruturas químicas dos flavonoides de plantas apresentam potencial propriedade para inibição da atividade fosfolipásica A2. Obtivemos como base as moléculas que nosso grupo trabalhou ao longo dos últimos anos, que tiveram sua atividade inibitória tanto da atividade enzimática por si só, mas também pela redução ou neutralização dos efeitos inflamatórios, citotóxicos e antioxidantes.

As moléculas desse trabalho foram selecionadas por mineração de dados por características de QSAR, que são características físico-químicas baseadas no ligante e no alvo. Esses parâmetros foram importantes na mineração principalmente nas plataformas PubChem, Cocoonut e National Center for Biotechnology Information (NCBI), além de outras plataformas abertas (Ferreira *et al.*, 2015). Em todos os passos da mineração de dados priorizamos a gratuidade dos bancos de dados e a presença de estruturas tridimensionais definidas.

A regra dos cinco de Lipinski indica que uma molécula, para ser uma boa candidata a fármaco, deve ter no mínimo estes parâmetros múltiplos de 5: $\log P \geq 5$, massa molecular ≤ 500 , aceptores de ligação de hidrogênio ≤ 10 e doadores de ligação de hidrogênio ≤ 5 (Santos *et al.*, 2018).

Os descritores são parâmetros utilizados para representar propriedades moleculares, incluindo as eletrônicas, geométricas, e topológicas, implícitas na estrutura química de cada composto, seguindo a regra dos cinco de Lipinski com auxílio de conhecimentos e aplicações prévias do grupo (Acharya, 2011; Filimonov, 2014; Santos *et al.*, 2018; Moura; Halder; Cordeiro, 2019).

Nesta etapa foram utilizadas quatro plataformas para avaliação e seleção molecular dos compostos, sendo eles: PubChem, Cocoonut, Molinspiration e SwissADME, além de nos basearmos em conhecimentos prévios do grupo em relação aos flavonoides, e elucidou questões encontradas durante pesquisas realizadas anteriormente.

Para visualização da mineração de dados, foi utilizado o programa WordCloud, técnica de contagem e parametrização de palavras ou termos, onde se analisa a representação significativa de termos. De acordo com o programa, quanto maior a caixa do texto da nuvem de palavras estatísticas, maior a sua representação dentro da pesquisa de mineração de dados. As nuvens de palavras têm sido utilizadas em trabalhos acadêmicos para a realização de análises qualitativas que consistem em usar tamanhos e fontes de letras diferentes de acordo com a frequência de ocorrência das palavras no texto analisado (Carvalho, 2012).

3.2 ANÁLISE IN SILICO

A determinação da sequência de aminoácidos e a sequência parcial de aminoácidos estão 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 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.

As fosfolipases A2 sPLA2 de Cdt e LP-PLA2 foram selecionadas de acordo com sua resolução estrutural, uma estrutura molecular que acomode a maior parte dos sítios catalíticos. O modelo cristalográfico foi 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 3d59).

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., e os modelos em .PDB foram gerados pelo RCBS, para serem inseridos na plataforma SwissDock.

A preparação das coordenadas do modelo para os procedimentos de dock molecular foi efetuada utilizando a ferramenta Chimera 1.14, onde observamos os locais que possuem maiores interações entre o composto e a proteína, dentre as 250 posições geradas pelo SwissDock neste dock preliminar (Pettersen *et al.*, 2004).

Realizamos uma sobreposição de outros modelos cristalográficos conjugados com compostos similares para avaliar qual seria o local ideal de criação de grid box, no software Autodock, que gerou 10 modelos dentro deste grid, neste segundo dock.

O 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 dos programas AutoDock Tools e Vina. 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).

No caso da enzima PLA2 Cdt., utilizamos as coordenadas 100x70x100. Para a AchE, foi utilizado 50x50x50, e para a LpPla2, o grid foi de 90x90x90, devido às suas características e tamanho de seu sítio.

As análises dos modelos obtidos foram realizadas por três diferentes metodologias, e o melhor modelo foi selecionado com base em testes de atividade biológica, estruturas e inibição realizada durante o projeto. Todas as figuras resultantes desses estudos foram construídas pelo programa PYMOL v2.4 (Seeliger, De Groot, 2010). A plataforma Molinspiration foi utilizada para melhor visualização da estrutura dos compostos (Tetko, 2005), assim como o software Discovery Studio 4.0 e LigPlot (Wallace *et al.*, 1995; Biovita 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), seguindo a ideia de XU *et al.*, 2018, a associação do uso das plataformas gerou um melhor resultados, para gerar uma Grid Box mais fidedigna com a realidade, utilizando o 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. Seleccionamos os melhores modelos com base em seus RMSD 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 Fundation, 2007).

Os resultados foram avaliados com base nas ferramentas Discovery Studio (Biovia 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 PURIFICAÇÃO DA SPLA2

3.4.1 Cromatografia de exclusão molecular em HPLC

Foi utilizado 20 mg/mL do veneno total, que será homogeneizado em tampão bicarbonato de amônio 0,1M, pH 7,9 até a sua completa dissolução. Posteriormente, essa solução de veneno será centrifugada a 2500xg por 5 minutos para clarificação da solução.

O sobrenadante obtido será 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 0,2 ml/min e monitorada a uma absorbância de 280 nm. O pool de fosfolipase será agrupado e, posteriormente, liofilizado.

3.4.1.1 Análise do grau de pureza da toxina

O grau de homogeneidade molecular será realizado por dois métodos, um 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 trifluoroacético a 0,1% (TFA, 0,1%) previamente filtrado em filtro 0,22 mm. As amostras liofilizadas serão dissolvidas em 250 ml de TFA 0,1%, e centrifugadas a 4500xg por 5 minutos. O sobrenadante obtido será então aplicado na coluna cromatográfica. Para eluição da fração, foi usado um gradiente linear contínuo do solvente B (Acetonitrila 66% em solvente A). O registro da corrida cromatográfica será realizado a 214nm.

3.5 ENSAIOS ENZIMÁTICOS

A fim de avaliar o comportamento da enzima frente às diferentes concentrações de substrato cromogênico 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 das Quercetinas, a enzima foi solubilizada da mesma maneira e na mesma concentração e incubada com os compostos por 30 minutos. Neste segundo teste, o substrato (NOB) foi solubilizado com Acetonitrila a uma concentração de 1 mg/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 foram expressos em porcentagem e seu erro em pontos de porcentagem.

3.6 ENSAIOS FARMACOLÓGICOS

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

Devido à pandemia de COVID-19, foram reutilizados resultados de antigos experimentos animais aprovados pelos respectivos Comitês de Ética. 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, eutanasiados por deslocamento cervical.

3.6.1 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). Os protocolos de aprovação do Comitê de Ética utilizados foram: 008/2015; 009/2015; 010/2015; 14/2016; 15/2016; 18/2016; 19/2016; 03/2019; 04/2019.

Os testes *in vivo* foram efetuados somente após a averiguação *in vitro* da inibição ou interação com compostos com as enzimas utilizadas no estudo, de acordo com o descrito previamente sobre ensaios enzimáticos. Os animais foram separados em oito grupos: controle (salina), sPLA2, Q (Quercetina), Kpf (Kaempferol), sPLA2:Kpf (Kaempferol incubada com a sPLA2) e sPLA2:Q (Quercetina incubada com a sPLA2).

Neste primeiro experimento, foram inoculados 25 µL através de injeção subplantar posterior direita das moléculas isoladas e/ou incubadas 30 min com PLA2. No grupo controle negativo, foi injetado 25 µL de solução salina (NaCl 0,9%); no controle positivo, 10 µL de sPLA2 na concentração de $10,72 \cdot 10^{-2}$ mol/L; no grupo das Quercetinas isoladas, foi injetado 25 mg/mL de cada composto com a sPLA2 incubada previamente. As concentrações dos compostos injetados foram $8,27 \cdot 10^{-4}$ mol/L de Quercetina e $8,73 \cdot 10^{-4}$ mol/L de Kaempferol.

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.

3.6.2 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 (25 mg/mL) com solução salina estéril de camundongos fêmeas (n = 5).

As concentrações dos compostos injetados foram, respectivamente, $8,27 \cdot 10^{-4}$ mol/L de Quercetina e $8,73 \cdot 10^{-4}$ mol/L de Kaempferol. O monitoramento do volume do edema será conduzido através de hidropletismômetro nos tempos 0, 30, 60, 120, e 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 as análises bioquímicas 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 coletadas e congeladas 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 “Polytron Homogenizer” durante 15 segundos com 1mL de HTAB para cada 50 mg de amostra. Após esta etapa, os homogenatos serão agitados em vórtex e centrifugados em centrífuga de eppendorf a 4500xg por 5 minutos e o sobrenadante obtido será submetido à análise.

3.6.3 Atividade miotóxica

Para avaliar a atividade miotóxica, serão inoculados no músculo gastrocnêmico direito as proteínas e os compostos a serem escolhidos para os ensaios, numa concentração de $10,72 \times 10^{-2}$ mol/L de PLA2, tendo o sangue coletado da calda 30 minutos após a aplicação de 25 μ L 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 molecular. Ao final do experimento, amostras de 100 a 200 mg de tecido das patas serão coletadas e congeladas 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 “Polytron Homogenizer” durante 15 segundos com 1mL de HTAB para cada 50mg de amostra. Após essa etapa, os homogenatos serão agitados em vórtex e centrifugados em centrífuga de eppendorf a 4500 xg por 5 minutos e o sobrenadante obtido será submetido a análises bioquímicas.

A atividade miotóxica será quantificada pela atividade da enzima creatina cinase (CK), determinada pelo uso de 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 340 nm após 3 minutos. A atividade da creatina cinase será expressa em unidades/litro.

3.7 . 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 Dunett ou Bonferroni. Valores de $p < 0,01$ foram considerados significativos. Para o ensaio enzimático, 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 flavonoides das espécies *Eugenia* spp., *Schinus* spp., e *Jatropha* 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, e 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 aos artigos com acesso aberto, para consulta de dados concentrados nos indexadores NCBI, Google Acadêmico e Elsevier, gerando uma tabela com a apresentação por espécie vegetal e seus flavonoides principais isolados, descritos e referenciados (Anexo I). Para melhor explicação, apresentamos um resumo na forma de infográfico (Figura 3) baseado no programa WordCloud.

Nesta primeira fase do projeto, foi realizada uma extensa pesquisa de plantas mencionadas, citadas e que tenham sido descritas com medicinais, seguindo basicamente as definições da OMS, que afirma que planta medicinal é “[...] todo e qualquer vegetal que possui, em um ou mais órgãos, substâncias que podem ser utilizadas com fins terapêuticos ou que sejam precursores de fármacos semissintéticos”, e do Ministério da Saúde, que relata que “[...] as plantas medicinais são aquelas capazes de aliviar ou curar enfermidades e têm tradição de uso como remédio em uma população ou comunidade”.

Para utilizar uma planta medicinal, é preciso conhecê-la, saber onde colhê-la, e como prepará-la. Normalmente, são utilizadas na forma de chás e infusões. Junto a estes critérios, também foi foco desta primeira triagem home office a presença de trabalhos que, em sistema aberto (open access) ou com um conjunto de informações de acesso livre, colocassem detalhes sobre o isolamento, caracterização estrutural, funcional e biológica de plantas medicinais.

A seleção dos compostos seguiu a regra dos cinco de Lipinski. Todos os compostos atenderam as características para um bom fármaco. Os resultados revelaram que os compostos da classe dos flavonoides interagiram fortemente com as proteínas, sendo elas pró-inflamatórias ou apenas outras proteínas da classe das esterases.

Após a primeira catalogação, foi elaborada a Tabela II (Anexo II), onde as plantas foram separadas de acordo com seus respectivos biomas e comparadas ao RENISUS, com o respectivo potencial farmacológico (Brasil, 2009).

Devido ao nosso grupo BIOMOLPEP ter feito um extensivo uso de flavonoides como moléculas capazes de inibir a atividade farmacológica induzida pela sPLA2 de *Crotalus durissus terrificus*, e com base nos dados das Tabelas I e II (Anexo I e II), selecionamos para a Tabela III (Anexo III) os compostos polifenólicos com predominância de flavonoides que apareciam em comum nos três gêneros selecionados e possuíam espécies. A catalogação de acordo com o RENISUS, presente na Tabela II, prossegue com a sistemática de base da metodologia QSAR.

A triagem de compostos foi conduzida com base no seguinte esquema de trabalho: busca no site pela combinação dos termos atividade farmacológica, estrutura molecular definida e propriedades, e após selecionados, os componentes foram relacionados com a plantas medicinais usadas no SUS e propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias.

Assim, seguiu-se para o último ponto da classificação estrutural, onde selecionamos os compostos com propriedade anti-inflamatória mais evidente, com base nos estudos estruturais de Farooqui e Farooqui (2010). O estudo caracterizou regiões com maior atividade anti-inflamatória e outras que possuem maior atuação antioxidante.

Após esta separação, prosseguimos o estudo com as estruturas moleculares dos compostos em 3D, onde já se inicia a preparação para o dock molecular. Essa etapa ocorreu com o auxílio da plataforma Molinspiration, inserindo a nuvem eletrônica, evidenciando as propriedades de hidrofobicidade e hidrofobicidade de cada composto e suas relações com a estrutura e atividade, conforme indicado na Tabela IV (Anexo IV).



Figura 3: Análises da nuvem de termos ou palavras mostrando os gêneros *Eugenia* spp., *Schinus* spp. e *Jatropha* spp. Esta análise cruzando a mineração de dados com a nuvem de dados indica que os compostos presentes nos três gêneros mais frequentemente isolados são a quercitrina, Quercetina, Apenina e Kaempferol.

De acordo com Farooqui e Farooqui (2010), dois tipos de atividade podem ser encontrados em flavonoides: os antioxidantes e as anti-inflamatórias. Nesse sentido, criamos uma derivação da Tabela VI explicando a imagem e suas interações, conforme Anexo V.

Realizamos uma visualização do perfil químico dos compostos, para melhor entendimento, indo de acordo com as características apresentadas pela plataforma SwissADME (Anexo VI). A seleção dos compostos seguiu a regra dos cinco de Lipinski. Todos os compostos atenderam as características para um bom fármaco.

Após esta etapa, partiu-se para os estudos de ancoragem molecular dos compostos selecionados (Quercetina; Kaempferol), frente à *Cdt. sPLA2* (PDB 2qog), conforme ilustra a Figura 4. As estruturas foram retiradas das plataformas PubChem e NCBI.

Para melhor compreensão deste trabalho, seguimos a realização de dock com as proteínas AchE (Acetilcolinesterase); (PDB 4m0e); e com a fosfolipase A2 associada a lipoproteína (LpPLA2) também conhecida como Fator ativador de plaquetas acetilhidrolase (PAF-AH); (3D59).

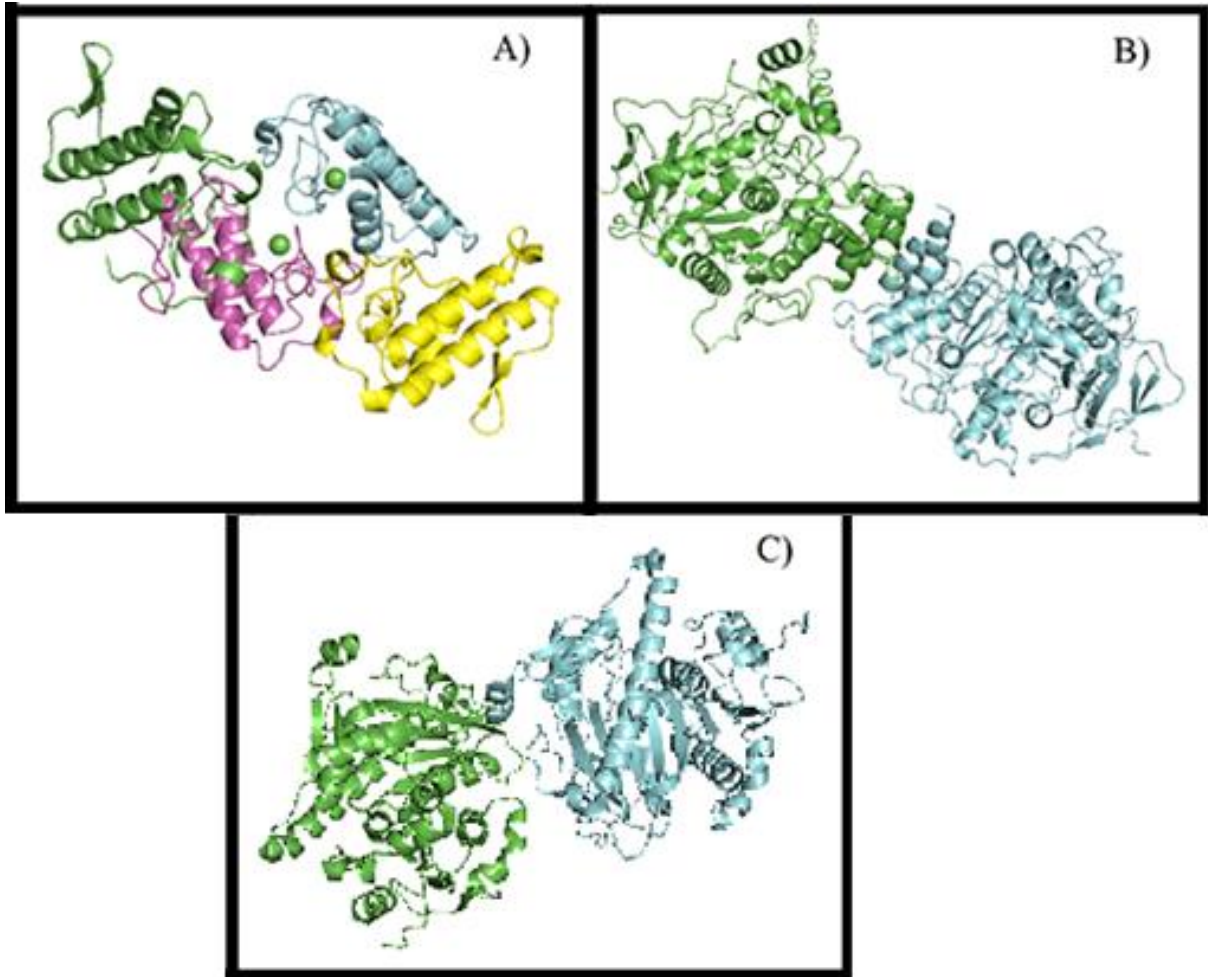


Figura 4: Estruturas tridimensionais das proteínas utilizadas (3D). Figura 5A: Fosfolipase A2 de *Crotalus durissus terrificus*; as esferas verdes representam o cálcio. Figura 5B: Acetilcolinesterase de *Homo sapiens*. Figura 5C: Fator ativador de plaquetas acetilhidrolase de *Homo sapiens*. A cor segue a ordem de cor do software Pymol, sendo cadeias A (verdes), B (azuis), C (rosas), e D (amarelas).

Durante o processo de Dock molecular, foram feitos dois refinamentos, onde o primeiro foi obtido por meio da plataforma SwissDock com 250 possíveis locais de ancoragem.

Seguimos para a análise de cavidades de interação para uma melhor comparação, utilizando assim a plataforma Cavity Plus, que nos gerou múltiplas cavidades de interação, selecionamos as que apareciam com interações mais fortes entre a proteína e o composto testado, com a associação do uso das plataformas gerou um melhor resultado, como podemos observar na Figura 5.

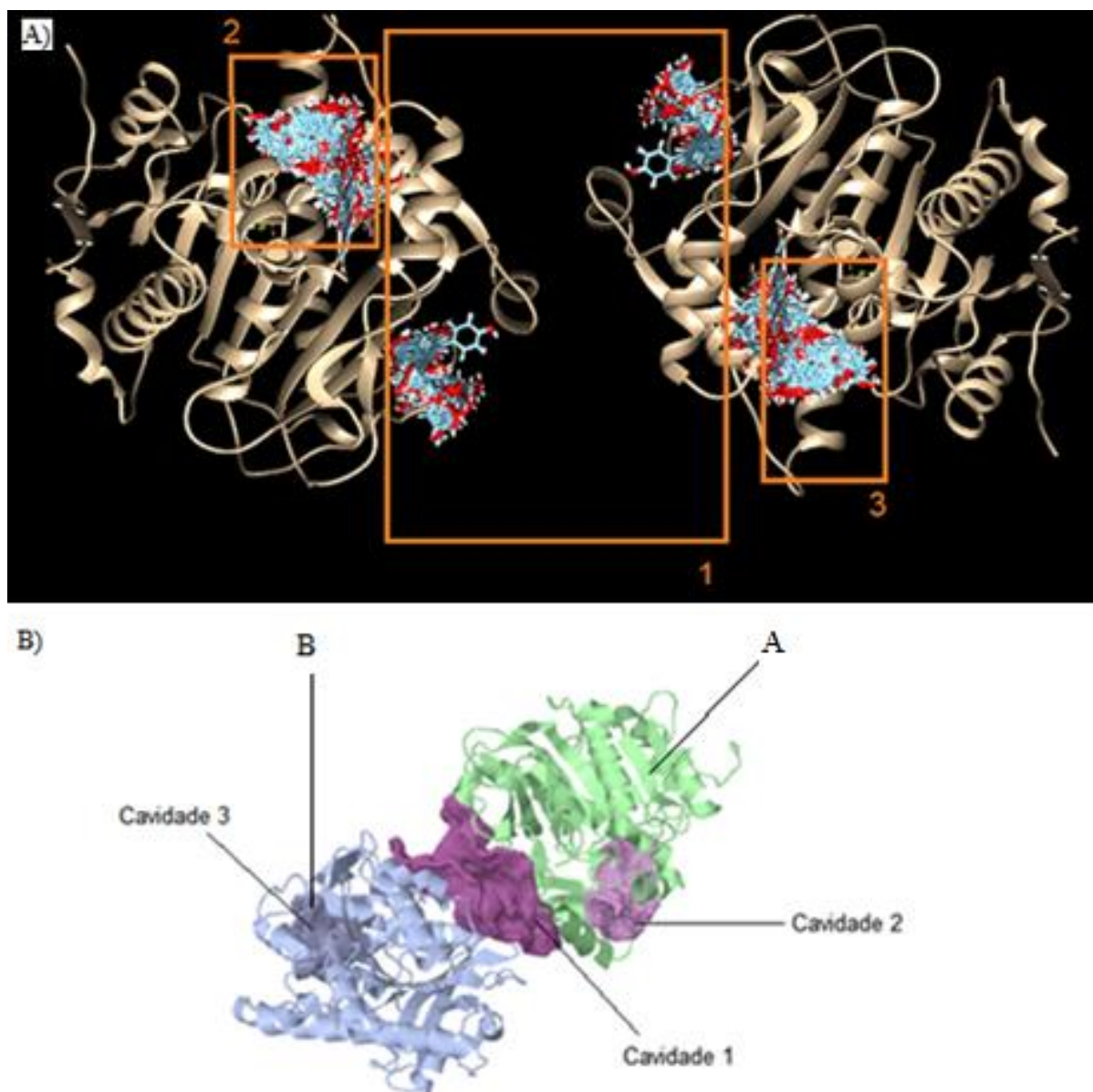


Figura 5: Representação do dímero da proteína PAF-AH de *Homo sapiens* interagindo com o composto. Na Figura 5A, está presente a estrutura 3D com as interações do composto Kaempferol geradas pelo SwissDock e analisadas pelo Chimera1.14; a Figura 5B ilustra as cavidades de interação do composto com a proteína. A cor segue a ordem de cor da plataforma CavityPlus, sendo a cadeia A (verdes) e B (azuis).

Após este resultado, foi feita uma segunda ancoragem com a montagem de coordenadas para criar uma Grid Box feita pelo Autodock Tools, nos locais em que o SwissDock sinalizou maior quantidade de interações. Para melhor localização da Grid box, realizamos uma pesquisa preliminar, avaliando o encaixe e sobreposição de PLA2 similares provenientes de venenos de cobras. Os modelos cristalográficos já conhecidos estão depositados no banco de dados RCSB-PDB.

Com o Autodock, foram gerados 10 modelos seguindo as coordenadas refinadas da Grid box, considerando o local de maior interação dos compostos.

Dentre os dez, selecionamos o melhor, de acordo com o índice RMSD, onde a melhor ancoragem deve ter um valor de 0 – 6 Å. O valor mais recomendado é abaixo de 1,5 Å (Bell; Zhang, 2019). Dentro deste parâmetro, selecionamos um modelo de cada composto, e

avaliamos suas interações com a proteína. As interações avaliadas foram os tipos de ligação, locais e a distância do composto com a proteína. As imagens foram geradas no Discovery.

Para melhor visualização das interações entre o modelo de ancoragem com a proteína, e entre o modelo de Dock com a proteína, foram utilizados os softwares Discovery e LigPlot Plus. Os softwares permitem observar os tipos de interação, locais de interação e suas respectivas forças.

Em um melhor entendimento e interpretação das interações dos compostos frente às proteínas, foi montada uma tabela geral que mostra as ligações, os tipos de ligação, forças e distância média entre o composto e as respectivas proteínas (Anexos VII).

4.1 QUERCETINA

A Figura 6 revela que a Quercetina interage no tetrâmero da sPLA2 de Cdt., onde ela interage apenas com a cadeia C, sendo as ligações com o Ácido Aspártico(D) 49 de forma covalente e com o Cálcio de forma Infavorável, com a Histidina (H) 48, que são aminoácidos do sítio catalítico da enzima. O composto também interagiu com as Isoleucinas (I) 9 e 19, Cistina (C)29, Asparagina (N) 6, Leucina (L)2 e o Triptofano (W)31 por Van der Walls.

Os aminoácidos Fenilalanina (F)5, Alanina (A)18 e 23, e Tirosina(Y)22 se ligam de forma Alkyl. A Glicina (G)32 faz pontes de hidrogênio de forma covalente em uma distância de 3,08 Å e ponte de carbono com a Lisina (K) 69. A média de distância nas interações entre os aminoácidos e a proteína foi de 3,25 Å.

Observa-se na Figura 7 os gráficos obtidos no HPLC de fase reversa em coluna Wide Pore C5, previamente calibrado com tampão A (TFA 0,1%). Seu tampão B é de ACN66%. Nas Figuras 7A1 e 7A2, a varredura de absorvância foi realizada em 280nm e 360nm, respectivamente, com o composto Q incubado por 30 minutos com a sPLA2 de *Cdt.*, onde observa-se uma diminuição no cume do pico (sinalizado pela seta).

Nas Figuras 7B1 e 7B2, a varredura de absorvância foi conduzida em 280nm e 360nm, respectivamente, onde aparece apenas a sPLA2, mostrando que seu pico mais alto ocorre sem o composto. Tal resultado demonstra uma diminuição no tempo de retenção dos picos quando incubados, tendo uma interação entre o composto e a proteína, onde observamos a junção dos picos e redução da afinidade pela coluna (Figura 7C).

Na Figura 7D, observa-se que quando os picos estavam puros, foram passados no HPLC e seus gráficos ficaram sobrepostos, mostrando seus diferentes tempos de retenção de acordo com o gradiente de tampão B. A linha tracejada exemplifica o gradiente de tampão B, que se inicia aos 5 minutos de corrida e chega a 100% em 40 minutos.

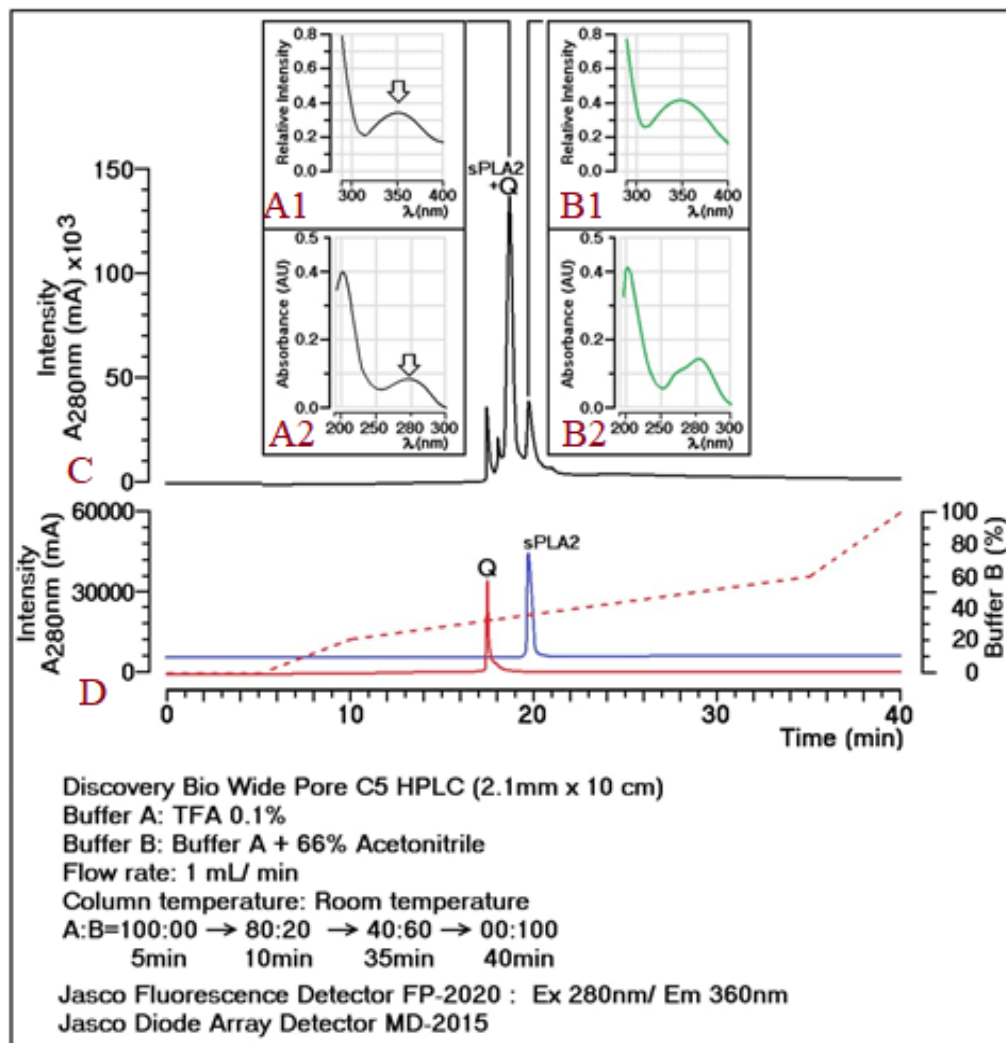


Figura 7: Diagramas de perfis em HPLC de sPL2 de *Cdt.* e Kpf, com varreduras de absorvância (7A; 7B) incubados por 30 min (7C), e puros (7D).

No teste enzimático, a sPLA2 mostrou que, ao degradar o substrato cromogênico 4N3OBA em comparação ao composto Quercetina, possuem atividades enzimáticas diferentes com absorbâncias e intensidades distintas, pois a sPLA2 com Quercetina apresentou uma diminuição de atividade da sPLA2, porém, ambas possuem comportamento sigmoide (Figura 8A). O teste V Max demonstrou que a sPLA2 com Quercetina alterou a atividade da sPLA2, potencializando sua atividade no início do teste e inibindo-a ao final (Figura 8B).

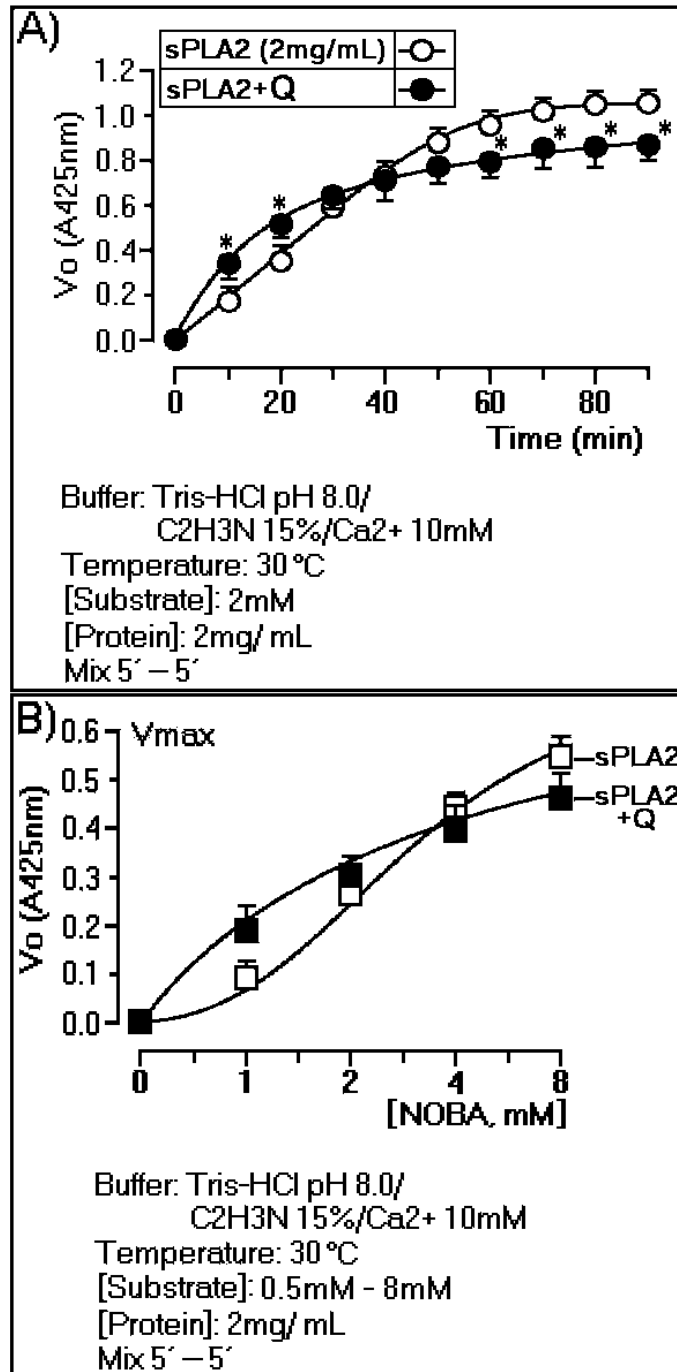


Figura 8: Ensaio de atividade enzimática utilizando substrato cromogênico sintético 4N3OBA específico para PLA2. Reação monitorada em 425 nm por 80 minutos, com intervalos de 5 minutos. Amostras das sPLA2 ácidas com concentração de 1 mg/mL, concentrações de 4N3OBA 2 mg/mL.

Observamos no ensaio de edema de pata um edema imediato após a administração da sPLA2 na pata direita traseira do camundongo, onde a atividade edematogênica atingiu seu máximo em 15 minutos ($n=3$ e $p<0,001$).

Com o composto Quercetina incubado com a sPLA2, analisamos o pico máximo da atividade edematogênica em 30 minutos e uma diminuição significativa no edema comparado apenas com a sPLA2. Percebemos no teste que a Quercetina não tem capacidade de causar atividade edematogênica significativa (Figura 9A).

Analisamos a atividade miotóxica da sPLA2 pela dosagem da enzima creatina quinase (CK), presente no plasma sanguíneo dos camundongos injetados. Foi realizado também um comparativo com a sPLA2 incubada com a Quercetina e com um controle. A concentração de CK no plasma dos animais demonstrou que a sPLA2 com a Quercetina apresentou menor atividade miotóxica comparada com a atividade da sPLA2 sem o composto (Figura 9B).

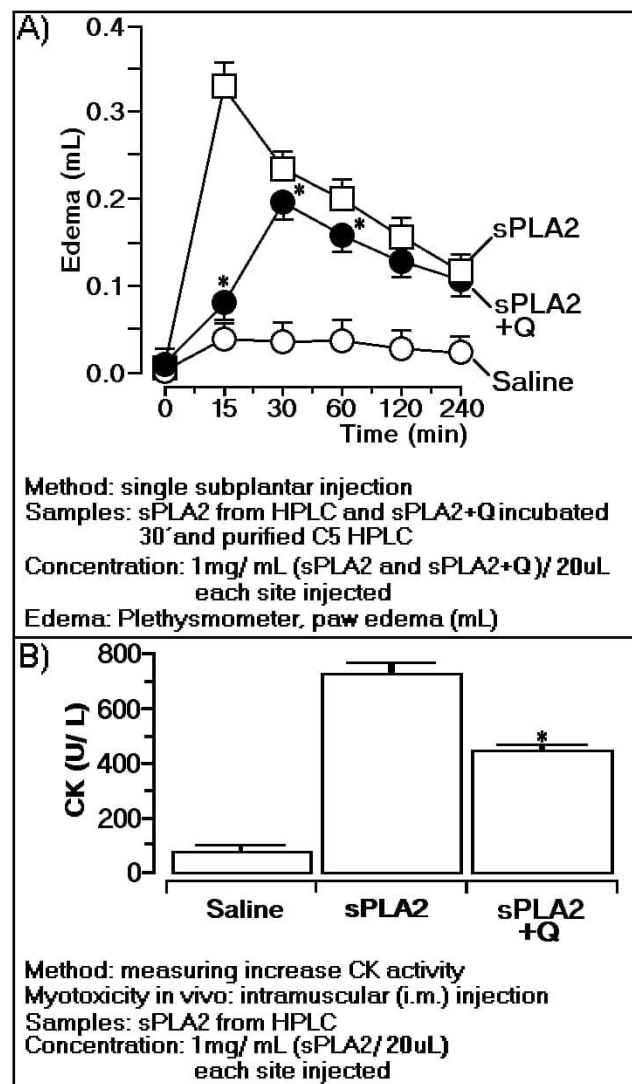


Figura 9: Ensaio farmacológicos. 9A: Ensaio de volume de edema de pata quando a sPLA2 ácida é injetada via subplantar. Análise estatística ANOVA seguida de Bonferroni a posteriori, $p < 0,05$. 9B: Ensaio de quebra da creatina quinase. Os dados foram expressos em média e desvio padrão ($n=3$) e a ANOVA foi utilizada como teste estatístico, com Dunnet como teste a posteriori. As proteínas foram administradas isoladamente, mostrando diferenças estatísticas em relação à PLA2.

Com o composto Quercetina incubado com a sPLA2, analisamos o pico máximo da atividade edematogênica após 30 minutos, tendo um aumento no edema comparado apenas com a sPLA2. Percebemos no teste que o composto Quercetina reduz a afinidade da enzima com o substrato, mas continua seu curso de ação (Figura 10A).

A atividade miotóxica da sPLA2 foi analisada pela dosagem da enzima creatina quinase (CK), presente no plasma sanguíneo dos camundongos injetados. Foi realizado também um comparativo com a sPLA2 incubada com a Quercetina e com um controle. A concentração de CK no plasma dos animais demonstrou que a sPLA2 com a Quercetina apresentou menor atividade miotóxica comparada com a atividade da sPLA2 sem o composto (Figura 10B).

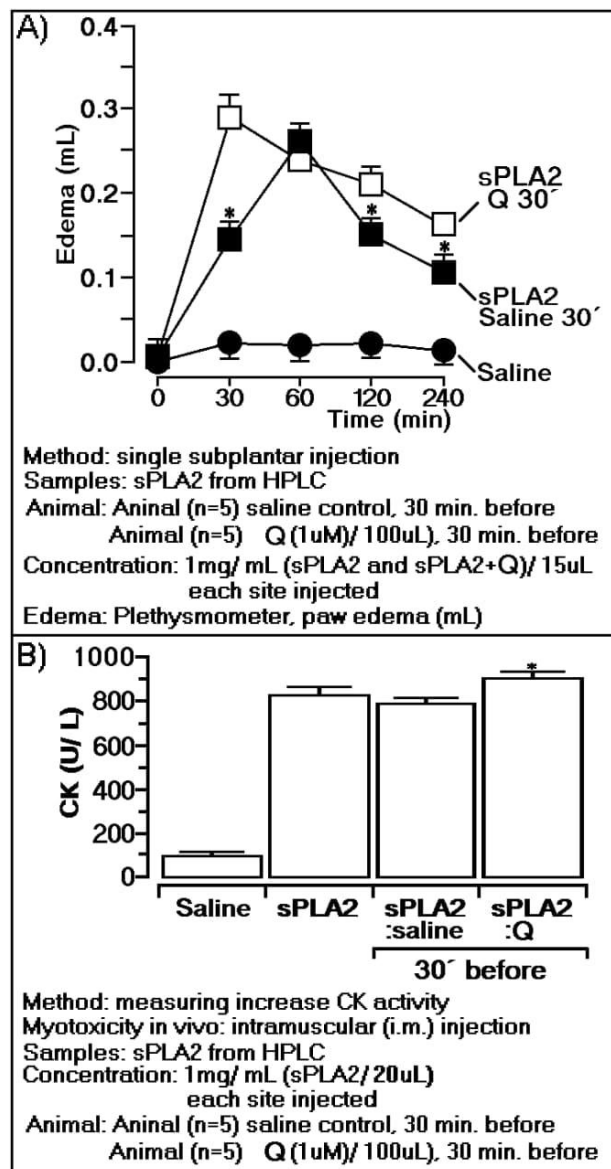


Figura 10: Ensaio farmacológico com avaliação após 30 minutos. 10A: Ensaio de volume de edema de pata quando a sPLA2 ácida é injetada via subplantar. Análise estatística ANOVA seguida de Bonferroni a posteriori, $p < 0,05$. 10B: Ensaio de quebra da creatina quinase. Os dados foram expressos em média e desvio padrão ($n=3$) e a ANOVA foi utilizada como teste estatístico, com Dunnet como teste a posteriori. As proteínas foram administradas isoladamente, mostrando diferenças estatísticas em relação à PLA2.

Seguimos nossas pesquisas realizamos testes *in silico* com PAF-AH, caracterizada como uma enzima esteárica pertencente à inflação e coagulação, posteriormente realizamos testes *in silico* com a AchE, caracterizada como uma enzima esteárica pertencente à comunicação muscular, para um melhor entendimento sistêmico da atuação deste composto.

Nossos estudos *in silico* mostraram que o composto Q; observamos na Figura 11; pode interagir em três cavidades da PAF-AH por serem as cavidades do sítio optamos por criarmos a grid box diretamente na cavidade 2 que abrange o sítio ativo da subunidade A do dímero, já que a proteína tem subunidades simétrica.

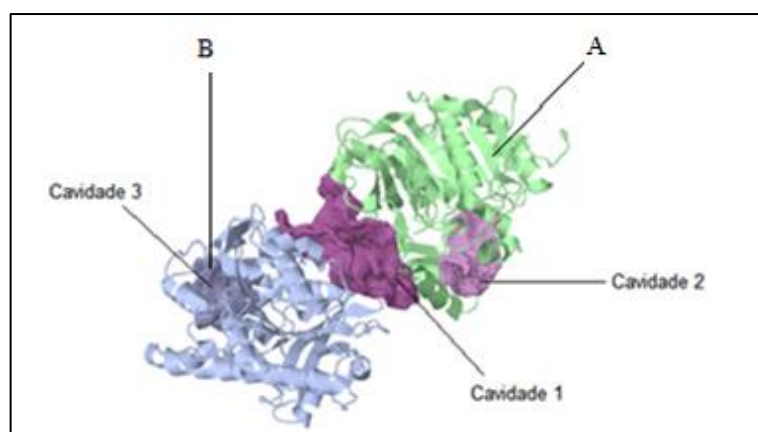


Figura 11: ilustra as cavidades de interação do composto com a proteína. A cor segue a ordem de cor da plataforma CavityPlus, sendo a cadeia A (verdes) e B (azuis).

Após a docagem foi selecionado o melhor dock seguindo os parâmetros já citados, na figura 11, observamos as interações do composto com o sítio ativo da proteína, seguindo a cavidade 2, onde o composto interage com todos os aminoácidos que formam o sítio ativo da PAF-AH de humanos, sendo eles, Leucina (Leu) 153, Serina (Ser) 273, Fenilalanina (Phe) 274, Acido Aspártico (Asp) 296 e Histidina (His) 351. Também tiveram interações com outros aminoácidos ao redor do sítio ativo como podemos observar em cinza na figura 13A, His 272, Glutamina (Gln) 352, Phe 357, Glicina (Gly) 152 e Leu 227

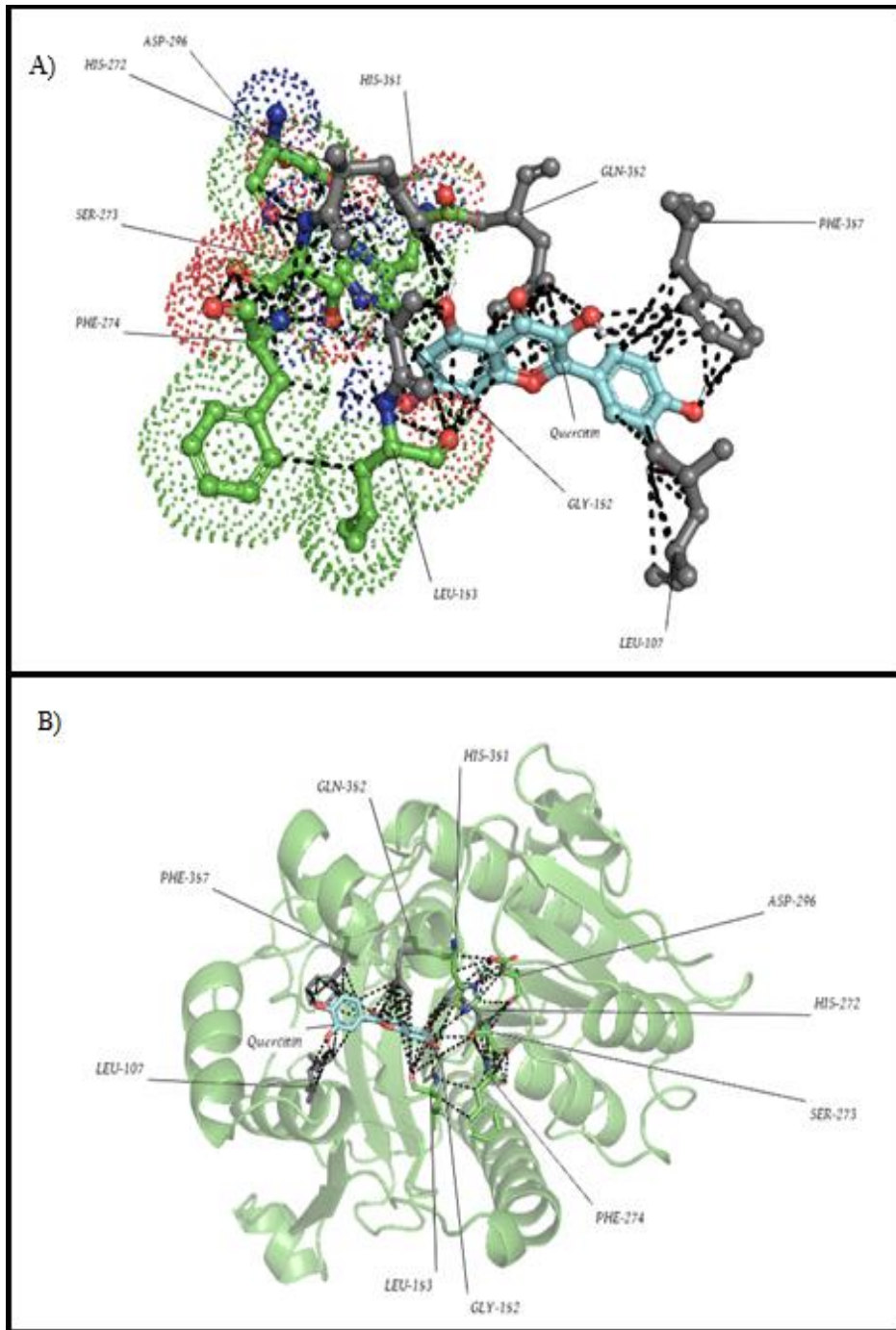


Figura 11: Representação do monômero de PAF- AH de *Homo sapiens* (PDB 3D59), em sua forma tridimensional, com os aminoácidos de onde o composto interage. Imagens geradas pelo software Pymol. A Figura 11A, ilustra a interação do composto com a proteína, com os aminoácidos essenciais do sítio catalítico com a nuvem eletrônica destacada em verde, em cinza observa-se outros aminoácidos que interagem com o composto representado em azul. Na Figura 11B, ilustra a interação do composto com a proteína.

Em uma visão do diagrama em segunda dimensão nos observamos as inúmeras interações que o composto tem com a proteína sendo em especial as interações covalentes com a His 272 e Tirosina (Tyr) 100 em pontes de hidrogênio, em pontes de carbono interage com Gly152 e Gln 352, de forma pi-stacked com Phe 357 e Alanina (Ala) 355 e Ala 155 com os outros aminoácidos vistos na Figura 12 tem interações fracas.

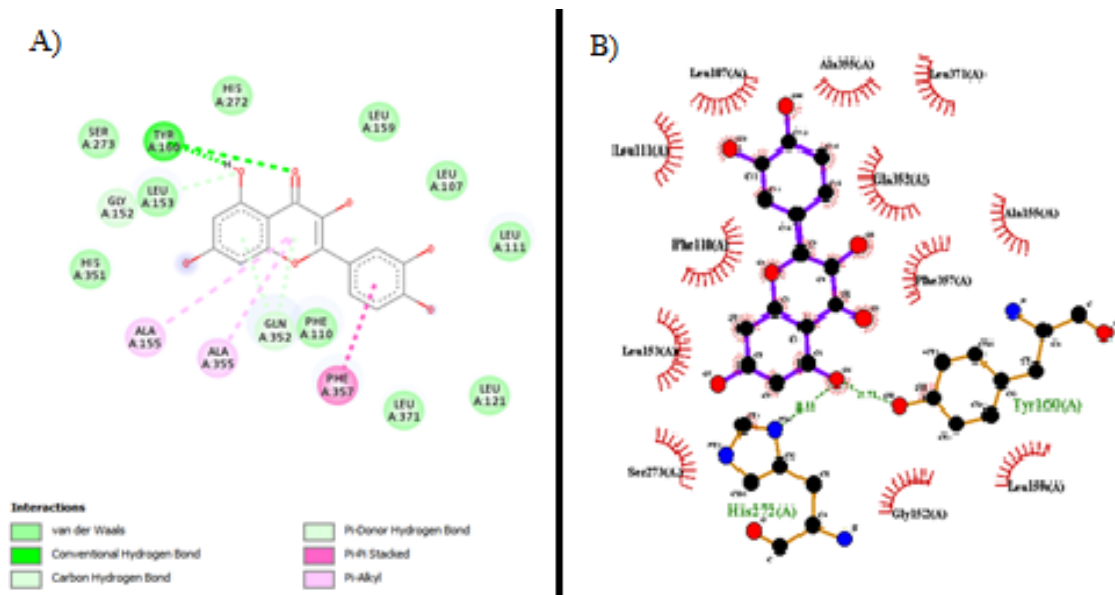


Figura 12: Representação das interações do composto com a proteína. Na Figura 12A, ilustra a interação do composto com a proteína, imagem obtida pelo software Discovery; na Figura 12B, estão representadas as interações pelo software Lig Plot.

Durante os testes *in silico* com a AchE, caracterizada como uma enzima esteérica pertencente à comunicação muscular, para um melhor entendimento sistêmico da atuação deste composto.

Nossos estudos *in silico* mostraram que o composto Q; observamos na Figura 13; pode interagir em quatro cavidades da AchE por serem as cavidades do sítio optamos por criarmos a grid box diretamente na cavidade 3 que abrange o sítio ativo da subunidade A do dímero, já que a proteína tem subunidades simétrica.

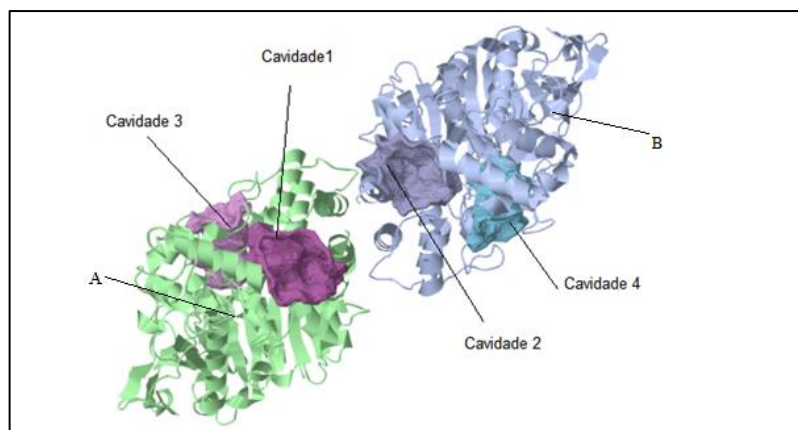


Figura 14: ilustra as cavidades de interação do composto com a proteína. A cor segue a ordem de cor da plataforma CavityPlus, sendo a cadeia A (verdes) e B (azuis).

Após a docagem foi selecionado o melhor dock seguindo os parâmetros já citados, na figura 15, observamos as interações do composto com o sítio ativo da proteína, seguindo a cavidade 3, onde o composto interage com todos os aminoácidos que formam o sítio ativo da AchE de humanos, Ser 203, His 447, Glutamina (Glu) 334. Também tiveram interações com outros aminoácidos ao redor do sítio ativo como podemos observar em cinza na figura 15A,

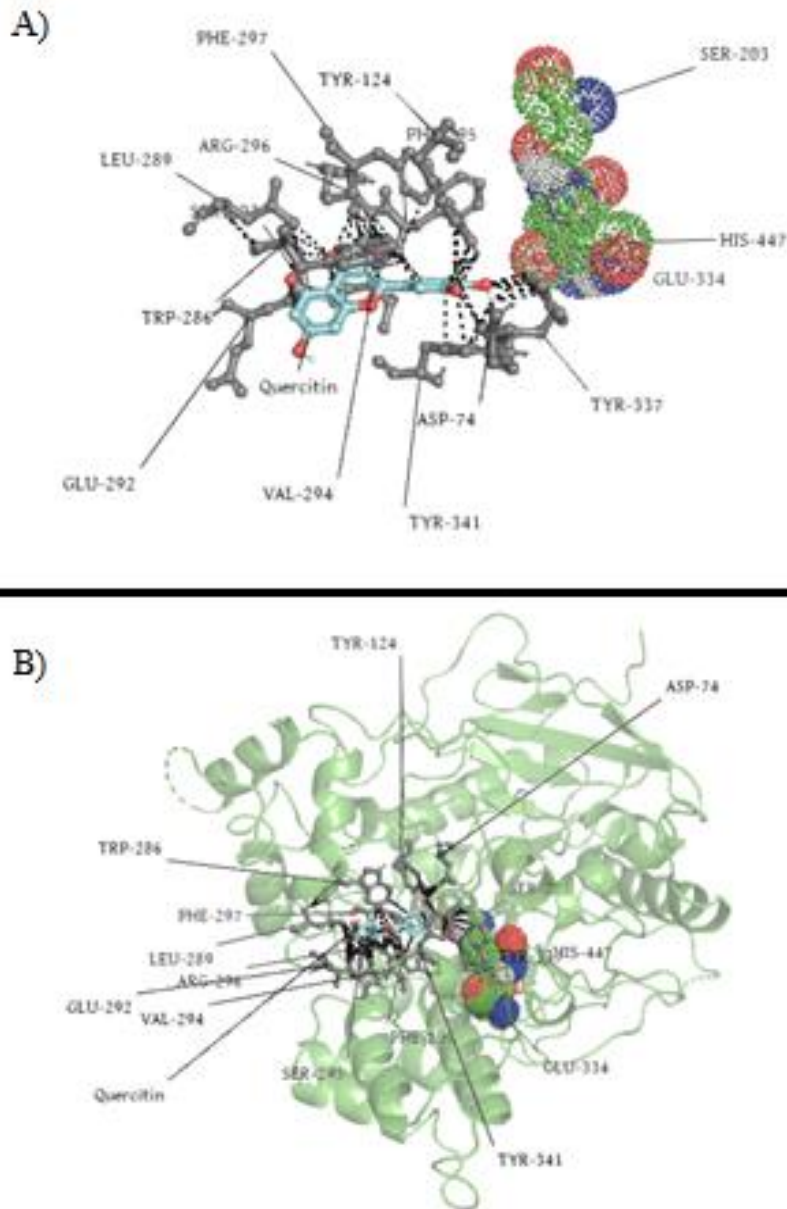
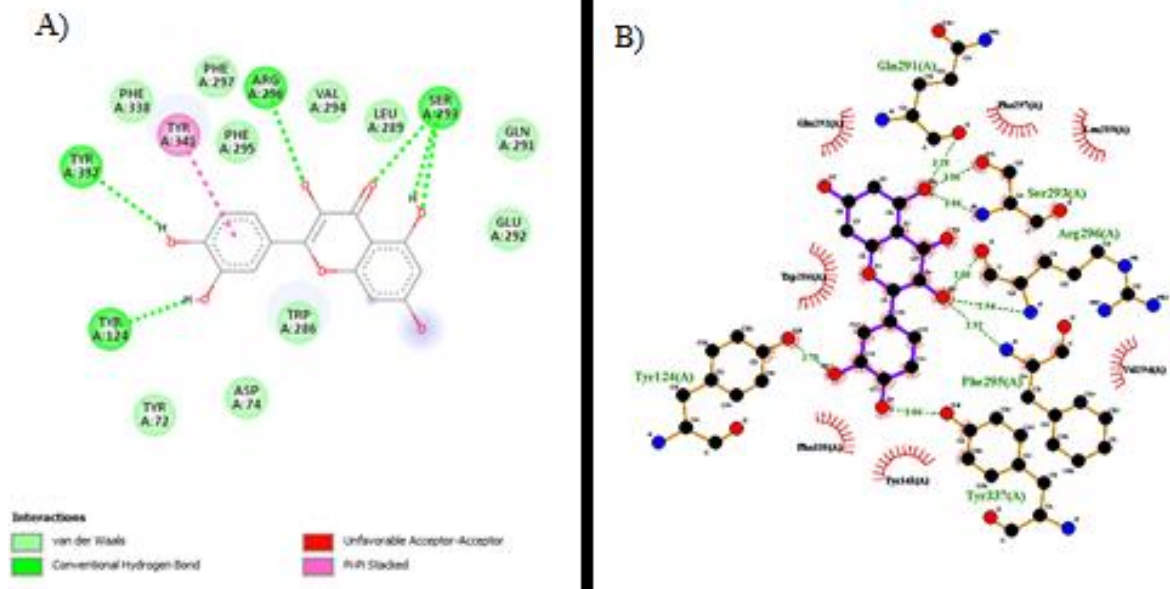


Figura 15: Representação do monômero de AchE de *Homo sapiens* (4M0E), em sua forma tridimensional, com os aminoácidos de onde o composto interage. Imagens geradas pelo software Pymol. A Figura 15A, ilustra a interação do composto com a proteína, com os aminoácidos essenciais do sítio catalítico com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

Em uma visão do diagrama em segunda dimensão nos observamos as inúmeras interações que o composto tem com a proteína sendo em especial as interações Tyr 332, Arginina (Arg.) 296, Ser 293, Tyr 124, Gln 291, Phe295 que são covalentes, em ponte de hidrogênio tem uma interação Pi-pi Stacked com Tyr 341, o composto também interage com os outros aminoácidos de forma fraca, onde podemos observar na figura 16.



4.1 KAEMPFEROL

In silico, podemos observar que o Kaempferol interage no tetrâmero da sPLA2 de *Cdt* (Figura 17). Com o Ácido Aspártico(D) 49 um de forma covalente em ponte de hidrogênio em uma distância de 3.2 Å, no principal aminoácido do sítio catalítico da sPLA2 de *Cdt.*, acreditamos que essa interação altere a conformação da enzima, e interaja com a Tirosina (Y) 52, que são importantes aminoácidos em esterases.

Além de interagir com a Glicina (G) 53 do anel do Loop de cálcio e a Lisina (K) 69, também interage com a Serina (S) 113 de forma covalente em ponte de hidrogênio em uma distância de 3,1 Å, sendo ela e o Ácido aspártico (D) 122 os únicos aminoácidos da cadeia B. A média de distância nas interações entre os aminoácidos e a proteína foi de 3,44 Å.

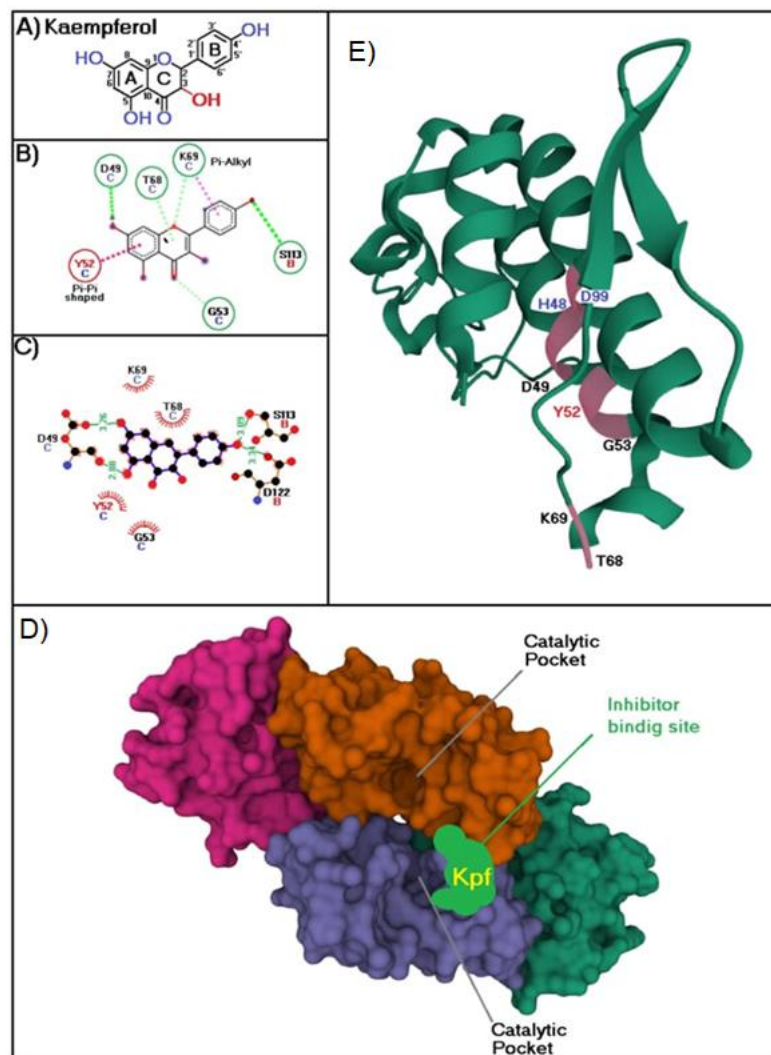


Figura 17: Representação do tetrâmero da proteína sPLA2 de *Cdt*. Na Figura 17A, está presente a estrutura química do composto Kaempferol; a Figura 17B ilustra a interação do composto com a proteína, imagem obtida pelo software Discovery; na Figura 17C, estão representadas as interações pelo software Lig Plot. A Figura 17D foi elaborada pela plataforma RCSB, onde observamos a superfície da proteína com as quatro subunidades destacadas por cor; o sítio da proteína e de ligação estão respectivamente destacados por setas. A Figura 17E, elaborada pela plataforma RCSB, ilustra apenas o monômero de interação com seu sítio destacado na cor magenta.

Observa-se na Figura 18 os gráficos obtidos no HPLC de fase reversa em coluna Wide Pore C5, previamente calibrado com tampão A (TFA 0,1%). O tampão B é de ACN66%. Nas Figuras 18A1 e 18A2, ilustra-se a varredura de absorvância em 280nm e 360nm, respectivamente, com o composto Kpf incubado por 30 minutos com a sPLA2 de *Cdt.*, o qual registra uma diminuição no cume do pico (sinalizado pela seta).

Nas Figuras 18B1 e 18B2, na varredura de absorvância em 280nm e 360nm, respectivamente, aparece apenas a sPLA2, mostrando que seu pico é mais alto que quando sem o composto. Tal resultado demonstra uma redução no tempo de retenção dos picos quando incubados, tendo uma interação entre o composto e a proteína, onde observamos a junção dos picos e menor afinidade pela coluna (Figura 18C).

Na Figura 18D, quando os picos estavam puros, foram passados no HPLC e seus gráficos ficaram sobrepostos, mostrando seus diferentes tempos de retenção de acordo com o gradiente de tampão B. Observa-se a linha tracejada exemplificando o gradiente de tampão B que se inicia aos 5 minutos de corrida e chega a 100% em 40 minutos.

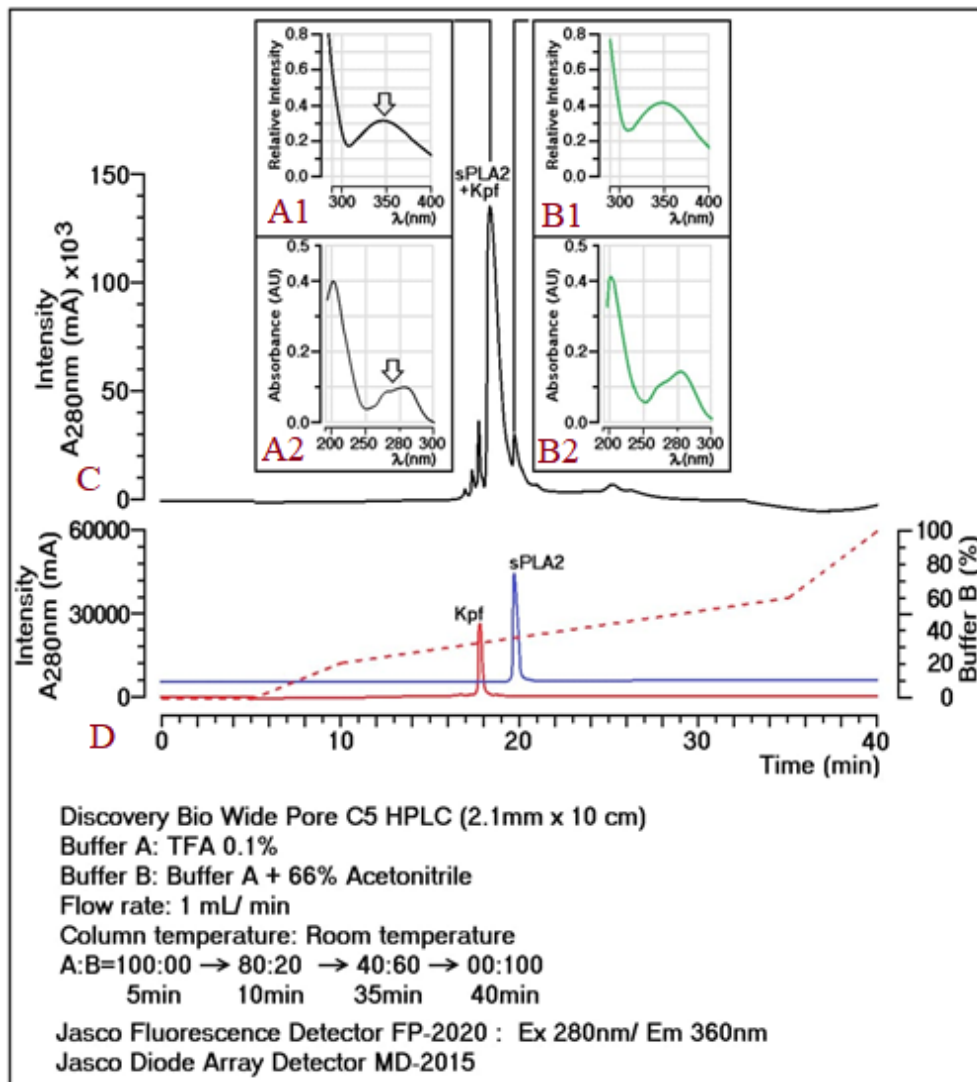


Figura 18: Diagramas de perfis em HPLC de sPL2 de *Cdt.* e Kpf, com varreduras de absorvância (18A; 18B) incubados por 30 min (18C), e puros (18D).

No teste enzimático, a sPLA2 mostrou que, ao degradar o substrato cromogênico 4N3OBA comparada ao composto Quercetina, possuem atividades enzimáticas diferentes com absorvâncias e intensidades distintas, pois a sPLA2 com Quercetina apresentou uma diminuição de atividade da sPLA2, porém ambas possuem um comportamento sigmoide (Figura 19A). Com o teste V Max, foi possível analisar que a sPLA2 com Quercetina alterou a atividade da sPLA2, potencializando sua atividade no início do teste e inibindo-a ao final (Figura 19B).

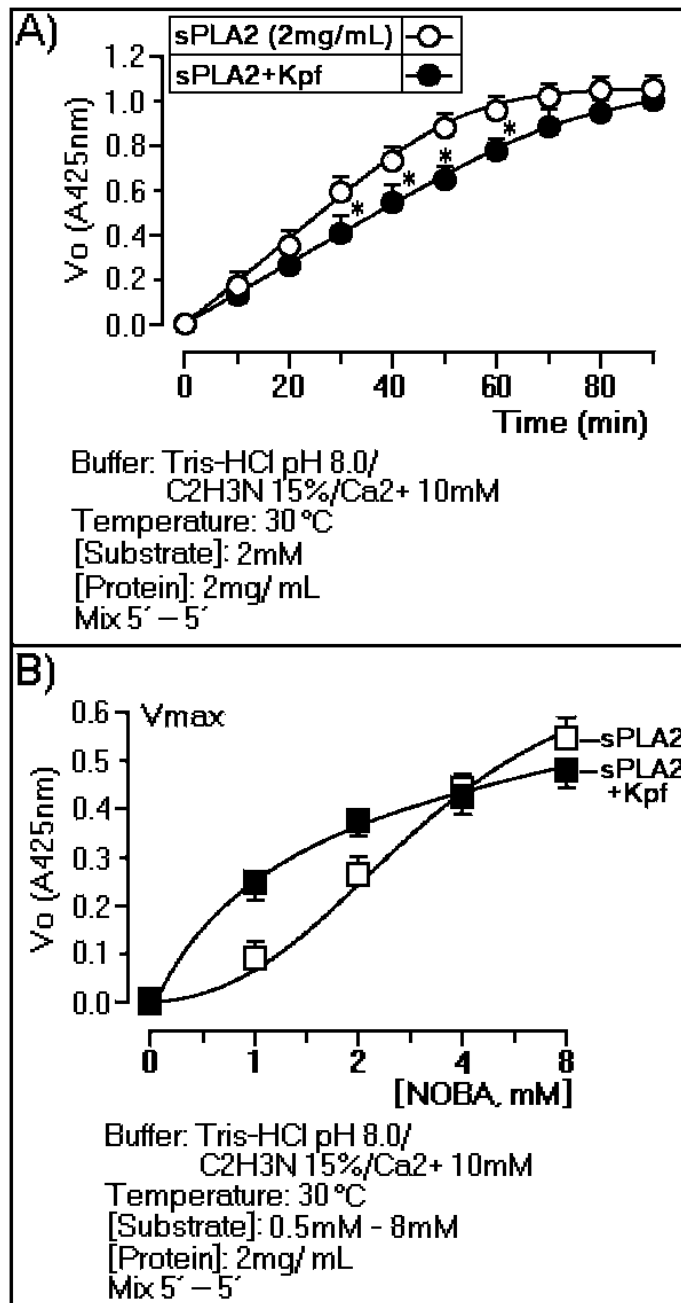


Figura 19: Ensaio de atividade enzimática utilizando substrato cromogênico sintético 4N3OBA específico para PLA2. Reação monitorada em 425 nm por 80 minutos, com intervalos de 5 minutos. Amostras das sPLA2 ácidas com concentração de 1 mg/mL, concentrações de 4N3OBA 2 mg/mL.

No ensaio de edema de pata, observou-se um edema imediato após a administração da sPLA2 na pata direita traseira do camundongo, onde a atividade edematogênica obteve seu máximo em 15 minutos ($n=3$ e $p<0,001$).

Além disso, o teste revelou que o Kaempferol com sPLA2 atrasou a atividade edematogênica, que obteve seu máximo em 30 minutos e gerou uma diminuição significativa no edema em comparação ao causado somente pela sPLA2. Ao analisar o composto Kaempferol de forma isolada, notou-se a ausência de capacidade de causar atividade edematogênica significativa (Figura 20A).

A atividade miotóxica da sPLA2 pode ser quantificada pela dosagem da enzima creatina quinase (CK), presente no plasma sanguíneo dos camundongos injetados. Foi realizado também um comparativo da sPLA2 com o Kaempferol e com um controle. De acordo com os resultados, a concentração de CK no plasma dos animais indicou que a sPLA2 com o Kaempferol interagiram e promoveram um aumento do efeito miotóxico em torno de 50 μ L, quando comparado com a atividade miotóxica da sPLA2 (Figura 20B).

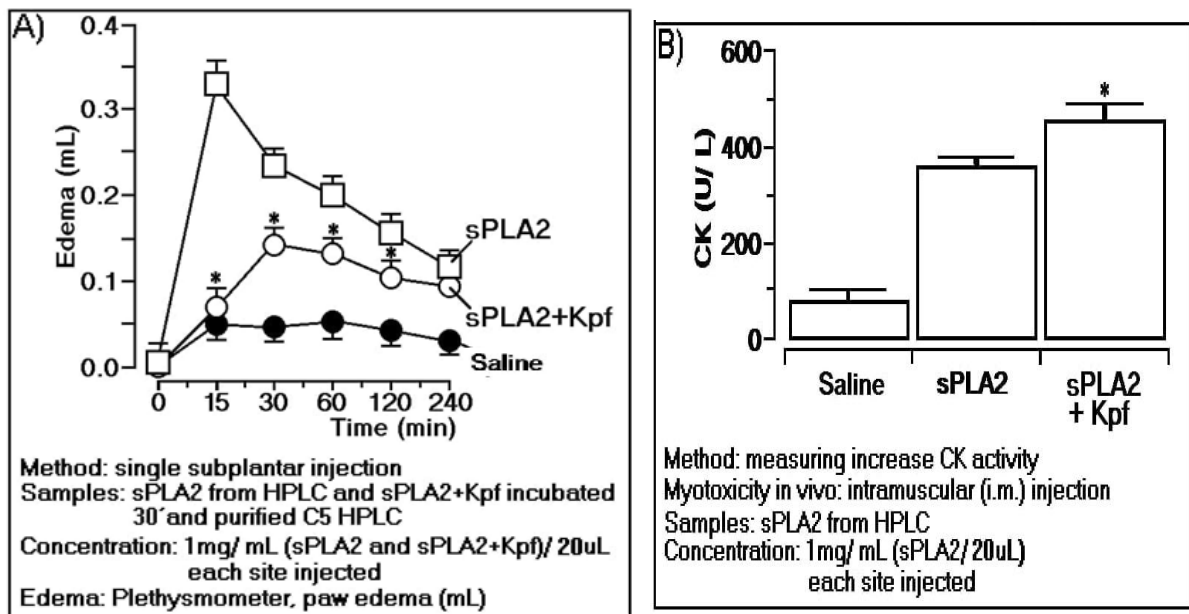


Figura 20: Ensaios Farmacológicos. 20A: Ensaio de volume de edema de pata quando a sPLA2 ácida é injetada via subplantar. Análise estatística ANOVA seguida de Bonferroni a posteriori, $p < 0,05$. 10B: Ensaio de quebra da creatina quinase. Os dados foram expressos em média e desvio padrão ($n=3$) e a ANOVA foi utilizada como teste estatístico, com Dunnet como teste a posteriori. As proteínas foram administradas isoladamente, mostrando diferenças estatísticas em relação à PLA2.

Para se ter um maior entendimento de nossos resultados, realizamos testes *in silico* com a acetilcolinesterase (AChE), caracterizada como uma enzima esteárica pertencente à comunicação muscular, explicando assim os resultados de miotoxicidade.

In silico, a Figura 21 indica que o Kaempferol interage com dois importantes aminoácidos do sítio catalítico da AChE, sendo a Histidina (H) 447, de forma covalente em ponte de hidrogênio, alterando a conformação da enzima, e por Van der Waals com a Serina (S) 203. Com a Serina (S) 125, o composto interage por ponte de hidrogênio de forma covalente em uma distância de 3.15 Å, e com as Tirosinas (Y) 133, 337, 72 e 124, respectivamente, sendo pontes de hidrogênio Y133 e Y337, Van der Waals Y72 e interação

alkyl a Y24. O Kaempferol também interage com Ácido Aspártico (D) 74 por Van der Waals, com Triptofano (W)86 em Alkyl e com Glutamina (E) 220 por Van der Waals. A média de distância nas interações foi de 3,21Å.

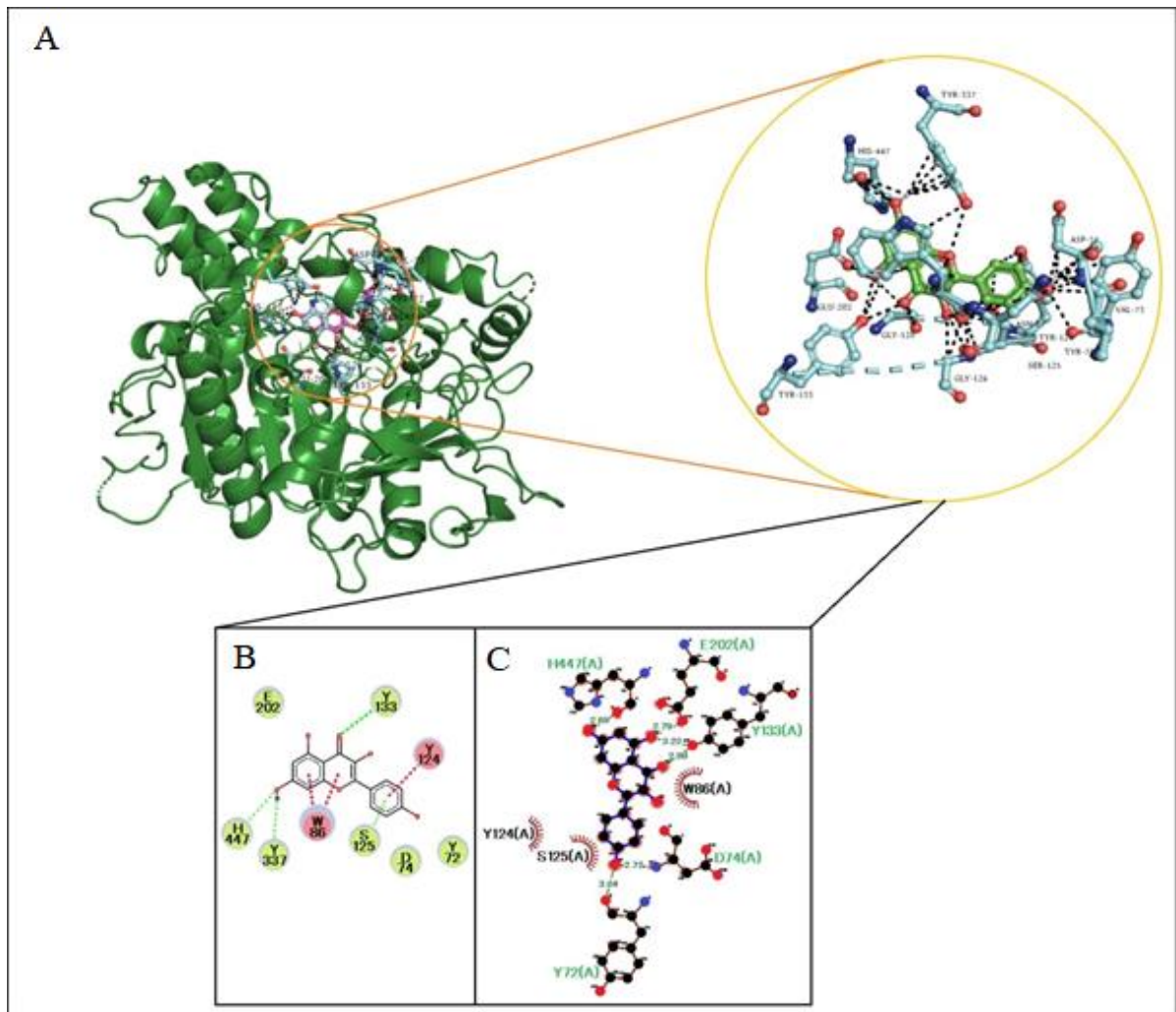


Figura 21: Representação do dímero da proteína Acetilcolinesterase (AChE) de *Homo sapiens* (PDB 4m0e), em sua forma tridimensional, com os aminoácidos essenciais do sítio catalítico destacados em azul. Observamos também a superfície tridimensional do monômero com a representação de onde o composto interage. Imagens retiradas da plataforma RCSB. A Figura 21A, retirada do software Pymol, ilustra a interação do composto com a proteína. Na Figura 21B, estão representadas as interações pelo software Discovery. Na Figura 21C, estão representadas as interações pelo software Lig Plot.

Seguimos nossas pesquisas realizamos testes *in silico* com o Fator de Agregação plaquetária acetilhidrolase (PAF-AH) caracterizada como uma enzima esteéica pertencente à inflação e coagulação, para um melhor entendimento sistêmico da atuação deste composto.

Nossos estudos *in silico* mostraram que o composto Kaempferol; observamos na Figura 22; pode interagir em três cavidades da PAF-AH por serem as cavidades do sítio optamos por criarmos a grid box diretamente na cavidade 2 que abrange o sítio ativo da subunidade A do dímero, já que a proteína tem subunidades simétrica.

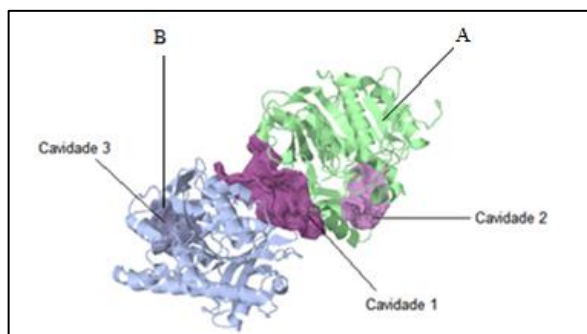


Figura 22: ilustra as cavidades de interação do composto com a proteína. A cor segue a ordem de cor da plataforma CavityPlus, sendo a cadeia A (verdes) e B (azuis).

Após a docagem foi selecionado o melhor dock seguindo os parâmetros já citados, na figura 23, observamos as interações do composto com o sítio ativo da proteína, seguindo a cavidade 2, onde o composto interage com todos os aminoácidos que formam o sítio ativo da PAF-AH de humanos, sendo eles Leu 153, Ser 273, Phe 274, Asp 296 e His 351. Também tiveram interações com outros aminoácidos ao redor do sítio ativo como podemos observar na Figura 24A, A Leu 159, Phe110, Gly 152, Phe 357, Leu 371 e Gln 352.

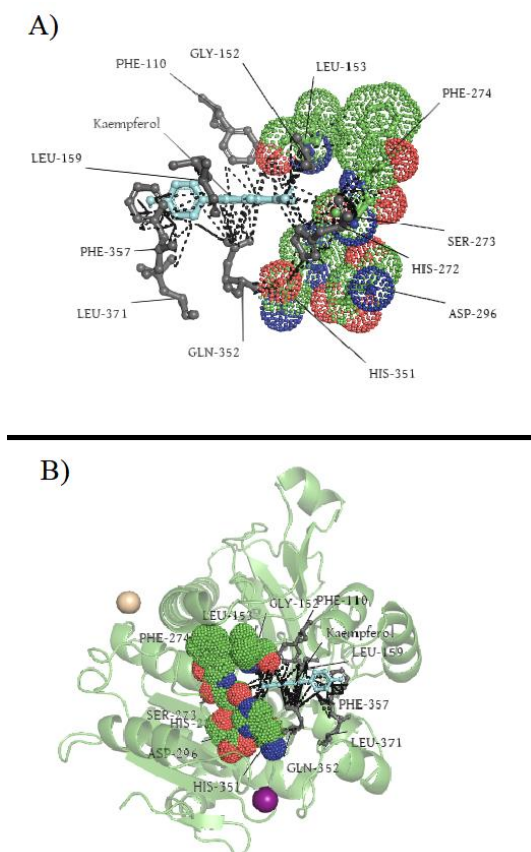


Figura 23: Representação do monômero de PAF- AH de *Homo sapiens* (PDB 3D59), em sua forma tridimensional, com os aminoácidos de onde o composto interage. Imagens geradas pelo software Pymol. A Figura 23A, ilustra a interação do composto com a proteína, com os aminoácidos essenciais do sítio catalítico com a nuvem eletrônica destacada em verde, em cinza observa-se outros aminoácidos que interagem com o composto representado em azul. Na Figura 23B, ilustra a interação do composto com a proteína.

Em uma visão do diagrama em segunda dimensão, podemos observar as inúmeras interações que o composto tem com a proteína sendo em especial as interações Tyr 160 e His 272 que são covalentes, em ponte de hidrogênio tem uma interação Pi-pi Stacked com Phe 357, ligações Alkyl com Ala 355 e 155, além de uma ponte de carbono com Gln 352. O composto também interage com os outros aminoácidos de forma fraca, onde podemos observar na figura 24.

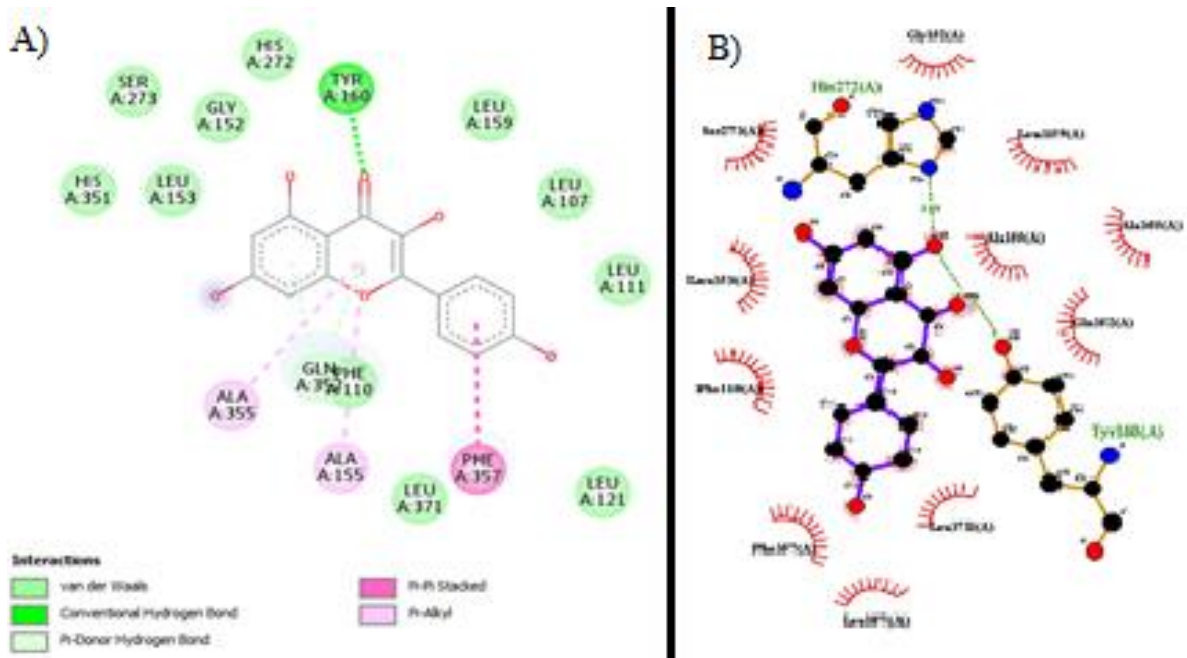


Figura 24: Representação das interações do composto com a proteína. Na Figura 24A, ilustra a interação do composto com a proteína, imagem obtida pelo software Discovery; na Figura 24B, estão representadas as interações pelo software Lig Plot.

5 DISCUSSÃO

Nos últimos anos, houve um aumento no número de trabalhos voltados para a triagem de compostos naturais para inibir o vírus por meio da técnica de Dock molecular (Derosa *et al.*, 2021). Uma dessas triagens foi realizada na China com diversos compostos naturais, incluindo a Quercetina e o Kaempferol, os quais já apresentam estudos na literatura relacionados a outras doenças. O Flavonóide Quercetina apresentou no Dock uma inibição significativa do vírus da COVID-19, com uma energia livre correspondente a -6,25 kcal (Zhang *et al.*, 2020).

Pesquisadores relatam que os flavonoides Kaempferol, Quercetina e quercitrina estão associados à inibição da produção de citocinas pró-inflamatórias, como a TNF- α e IL-1, e através do dock molecular, percebemos que todos esses flavonoides apresentam uma possível forte inibição da sPLA2 (Costa *et al.*, 1994; Silván *et al.*, 1996; Nijveldt *et al.*, 2001; Kim *et al.*, 2004; López- Pousadas *et al.*, 2008; Inaba *et al.*, 2008; De Melo *et al.*, 2009; De Melo *et al.*, 2009).

Segundo Devi *et al.* (2015), o Kaempferol inibe inúmeras enzimas envolvidas com a inflamação e seus efeitos colaterais. Porém, em nosso trabalho, foi observado que este metabólito não aboliu a atividade de PLA2, mas apenas retardou sua afinidade com a enzima, potencializando assim sua atividade miotóxica devido à sua interação com outras enzimas esteáricas (Tordera; Ferrándiz; Alcaraz, 1994).

Yarla, *et al.* 2015 e Tu *et al.* 2016, descrevem a interação da via das PLA2 no desenvolvimento de neoplasias, visto que as PLA2 são intrinsecamente pro-inflamatórias, acredita-se que algumas neoplasias possam ser de origem inflamatória. Levantando-se a ideia, de que possamos usar em breve base das características de compostos naturais, para o desenvolvimento de drogas antitumorais específicas a alguns tipos de tumores, visto que no trabalho de Tu *et al.* (2016), onde ele nos mostra a interação do composto Kaempferol com a membrana celular, aumentando o estresse oxidativo e a quantidade de peróxido de hidrogênio, levando a desestabilização da célula, reforçando nosso resultado de atividade miotóxica aumentada, ainda se tem a ideia de que o Kaempferol além de atuar com outras enzimas da classe das fosfolipases A2, como a cPLA2 ativando assim a rota intra celular para apoptose.

A interação do composto Kaempferol com a enzima AchE potencializou a atividade tóxica da PLA2 em decorrência de uma reação orgânica do metabolismo. Os ensaios in silico demonstraram que ela interage com o sítio ativo da sPLA2 de *Cdt.*, entretanto é uma enzima fundamentalmente dimerica, Marchi-Salvador *et al.* (2008), mostram que ela pode formar tetrâmeros, o composto interage apenas com um dos sítios dela, justificando sua redução de afinidade, mas continuando com a reação.

A enzima PAF-AH tem como uma de suas funções a formação de coágulos, estudos recentes mostram a atuação do Kaempferol na redução de trombose, reforçando

nossos resultados da atuação dela na via das PLA2, no caso diretamente com a sPLA2 e a LpPLA2/PAF-AH. (Laszuk; Petelska, 2021; Ren *et al.*, 2019).

No estudo de Laszuk & Petelska (2021), se tem outro ponto de interação do Kaempferol com a rota da PAF-AH, que é no receptor de PAF (fator de agregação plaquetária), onde se tem interação. Por tanto, reforça a ideia das múltiplas interações, gerando efeitos colaterais com doses altas de composto, em Ren *et al.*, 2019, nos mostra que essas altas doses de Kaempferol o torna tóxico, pois, quanto maior a dose menor sua especificidade.

Durante o estudo, foi observado, que os compostos Kaempferol e Quercetina apesar de interagirem com o sítio catalítico de algumas enzimas, observamos que tiveram respostas diferentes na atuação da enzima, dado este resultado nos levanta a hipótese de que os compostos possam atuar de diferentes formas devido a posição da hidroxila que difere os dois na posição R3', como podemos observar na Figura 25, corroborando com os estudos de Farooqui e Farooqui (2010), onde situam as funções em cada parte do flavonoide, no caso está diferença torna a Quercetina mais Antioxidante, tendo assim uma atuação mais específica e estável com algumas enzimas, pois conforme o compreendido no trabalho de Farooqui e Farooqui (2010), um bom composto deve possuir três ligações, em cada uma das regiões supra, para que possa ter boa atividade farmacológica.

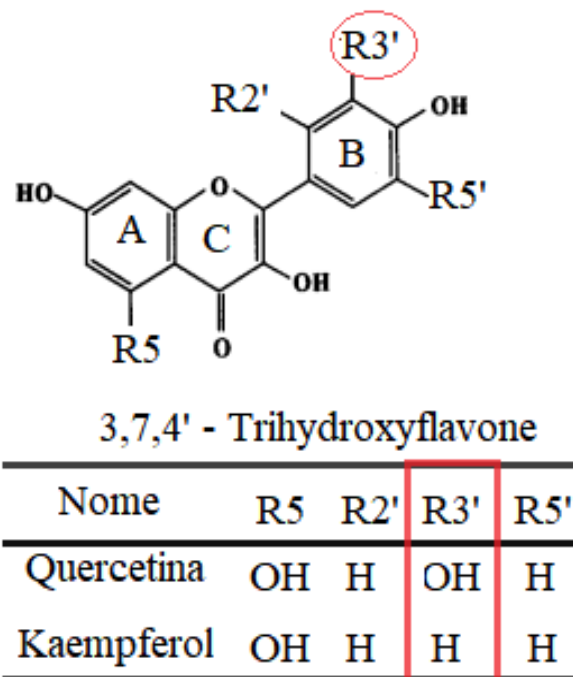


Figura 25: Representação da estrutura de flavonoide, constituído por três anéis, sendo dois aromáticos e um pirano, onde no anel B está o radical (R) que se altera entre Quercetina e Kaempferol.

Os testes com a Quercetina mostraram uma redução no tempo de interação da sPLA2, aumentando assim o tempo para uma resposta do organismo. Porém, ela elevou a miotoxicidade, mesmo com o edema reduzido. Este composto, devido aos grupamentos carbonilas em sua estrutura, põe em xeque a auto-oxidação que alguns flavonoides podem realizar (Hajji, 2006; Boots *et. al.*, 2008), em nossos estudos in silico, demonstrou capacidade de se ligar fortemente com a sPLA2 de Cdt., podendo inibi-la, e interagiu com outras enzimas da classe das esterases. (Boots *et al.*, 2008).

Os compostos interagem com a PAF-AH que tem uma relação importante com a Arteriosclerose justificando as pesquisas de Fragopoulou; Demopoulos; Antonopoulou (2009) e Ren *et al.*, 2019, onde nos mostram o uso do Kaempferol e seus efeitos, porém normalmente não se verificam outros pontos regulatórios do organismo que, quando se encontram em desequilíbrio geram efeitos adversos. (LASZUK *et al.*, 2021)

Outro ponto importante de nossas pesquisas, foi verificar a é a interação dos compostos com a enzima esteárica AchE que é amplamente encontrada no organismo, hemácias, atua em dois pontos importantes na cascata de coagulação (Ren *et al.*, 2019; Choi *et al.*, 2015). Segundo Tzeng *et. al.*, (1991) e Shrivastava *et. al.* 2016, o Kaempferol interage com a enzima AchE dentro e fora da Barreira Hemato Encefálica, assim como a Quercetina, tem potencial neuroprotetor (Islam, *et al.*, 2013; Khan, *et al.*, 2019). Entretanto dados os nossos resultados in vivo vemos que os compostos, obtiveram respostas diferentes no organismo dos camundongos.

Reforçando nossas ideias de que existem mais pontos de interação, principalmente no caso do Kaempferol que é pouco se encontra pouco disponível no metabolismo, em quantidade controlada, quanto maior a concentração utilizada no organismo maiores interações e desregulações sistêmicas podendo até desencadear inflamações indiretas e interações com outros fármacos, alterando sua farmacocinética.

Analisar outras vias, como por exemplo as que envolvem os receptores de PAF ou para o LPS (lipopolissacaríeo), seria a melhor forma para a caracterização correta de um composto, minimizando assim sua gama de efeitos adversos e possíveis interações danosas, pois segundo as bases da farmacocinética “*quanto maior a concentração de certa substância no organismo, menor será sua especificidade de ação efetiva*”.

6 CONCLUSÃO

Ao longo do trabalho, foi visto que a busca de anti-inflamatórios a partir de metabólitos secundários de plantas pode permitir o uso de moléculas com estas características presentes em gêneros vegetais indicados pelo Renisus-SUS (Brasil, 2009), o qual popularizou na medicina nacional a prática e utilização de plantas, com artifícios de tratamento na fitoterapia e no campo da nutraceutica.

Pela mineração de dados os compostos flavonoides mais presentes nas espécies vegetais indicados pelo RENISUS, *Eugenia uniflora* Leaves (Pitanga), *Jatropha gossypifolia* Linn (Pinhão-roxo), *Schinus terebinthifolius* Raddi (Aroeira-vermelha).

A seleção dos compostos seguiu a regra dos cinco de Lipinski. Todos os compostos atenderam as características para um bom fármaco. Os flavonoides Kaempferol e Quercetina foram os que mais se correlacionaram em nossos quesitos durante a mineração e refino de dados, principalmente quando colocados frente à PLA2.

Ao longo deste trabalho, observamos que o uso de apenas um modelo inflamatório não mostra de forma fidedigna a real interação de um composto no organismo devido às diferentes complexidades metabólicas. Assim, sugerimos o uso de mais que um modelo inflamatório a fim de gerar mais resultados conclusivos em futuros testes de substâncias com potencial anti-inflamatório.

Ambos os compostos *in vitro* interagiram fortemente com a sPLA2 mostrando assim uma alteração de afinidade da proteína pelo seu substrato, mesmo que ambos chegaram ao platô e fim da reação.

Quando testado *in vivo*, em decorrência dos múltiplos sistemas orgânicos presentes nos animais, ocorreram reações danosas aos animais que diferem da cascata inflamatória, atuando inclusive em AchE e PAF-AH, importante enzimas presente em muitas células do organismo, e crucial para a comunicação do sistema nervoso e coagulação sanguínea, respectivamente.

Dentre os compostos analisados, a Quercetina demonstrou ser o melhor composto em interação, tanto *in silico* quanto *in vitro* e *in vivo*, pois reduziu o tempo de interação da PLA2, aumentando assim o tempo para uma resposta do organismo, de fármaco, porém futuramente precisará passar por um processo de melhoramento, com a utilização de ferramentas de drug design, por ela apresentar mais pontos favoráveis para se tornar um fármaco proveniente de bases naturais.

Contudo, devemos analisar outras rotas que não são tidas como convencionais para a propagação inflamatória, para que assim possamos caracterizar devidamente um composto, sintético ou não, para sua função e utilização, evitando a gama de efeitos adversos e possíveis interações danosas, que possam causar outras doenças no indivíduo, a curto médio e longo prazo e as devidas doses de exposição. Portanto a associação de metodologias multidisciplinares, que agregam informações importantes, associada as múltiplas-etapas de pesquisa e desenvolvimento utilizando, fazem assim uma melhor criação ou reposicionamento de fármacos.

REFERÊNCIAS

AATI, H. Y.; EL-GAMAL, A. A.; KAYSER, O.; AHMED, A. F. The phytochemical and biological investigation of *Jatropha pelargoniifolia* root native to the Kingdom of Saudi Arabia. **Molecules**, v. 23, n. 8, p. 1892, 2018.

ACHARYA, C.; COOP, A.; POLLI, J. E.; MACKERELL JUNIOR, A. D. 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.

ACHÉ. **Bula** Acheflan: cordia verbenacea dc. Cordia verbenacea DC. 2016. Disponível em: https://docs.google.com/gview?url=https://uploads.consultaremedios.com.br/drug_leaflet/Bula-Acheflan-Paciente-Consulta-Remedios.pdf?1563307093&embedded=true. Acesso em: 17 set. 2020.

AGUIRRE, L.; ARIAS, N.; MACARULLA, M. T.; GRACIA, A.; PORTILLO, M. P. Efeitos benéficos da Quercetina na obesidade e diabetes. **Open Nutraceuticals Journal**, v. 4, p. 189-198, 2011.

Anvisa. CARTILHA DE ORIENTAÇÕES SOBRE O USO DE FITOTERÁPICOS E PLANTAS MEDICINAIS. 2022. Disponível em: <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/centraisdeconteudo/publicacoes/medicamentos/publicacoes-sobre-medicamentos/orientacoes-sobre-o-uso-de-fitoterapicos-e-plantas-medicinais.pdf>. Acesso em: 05 abr. 2022.

BAKR, R. O.; MOHAMED, S. A.; WALY, N. E. Phytochemical and biological investigation of *Eugenia uniflora* L. cultivated in Egypt. **Journal of Pharmacognosy and Phytotherapy**, v. 9, n. 5, p. 57-66, 2017.

BALIGA, M. S.; BHAT, H. P.; BALIGA, B. R. V.; WILSON, R.; PALATTY, P. L. Phytochemistry, traditional uses and pharmacology of *Eugenia jambolana* Lam. (black plum): a review. **Food Research International**, v. 44, n. 7, p. 1776-1789, 2011.

BELL, E. W.; ZHANG, Y. 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.

BIKBOV, B. *et al.* Global, regional, and national burden of chronic kidney disease, 1990–2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. **The Lancet**, v. 395, n. 10225, p. 709-733, 2020.

BIOVITA FOUNDATION. **Discovery Studio – Accelrys**. Versão 4.0. San Diego, 2007

BITIS, L.; KULTUR, S.; MELIKOGLU, G.; OZSOY, N.; CAN, A. Flavonoids and antioxidant activity of *Rosa agrestis* leaves. **Natural Products Research**, v. 24, p. 580-589, 2010. doi: 10.1080/14786410903075507

BONE, K.; MILLS, S. **Principles and practice of Phytotherapy**: modern herbal medicine. 2nd Edition. 2013

BOOTS, A. W.; HAENEN, G. R. M. M.; BAST, A. A. L. T. Health effects of quercetin: from antioxidant to nutraceutical. **European Journal of Pharmacology**, v. 585, n. 2-3, p. 325-337, 2008.

BRASIL. Ministério da Saúde. Sistema Único de Saúde. RENISUS. **MS elabora relação de plantas medicinais de interesse ao SUS**. 2009.

BRASIL. Ministério da Saúde. RENISUS - **Relação Nacional de Plantas Mediciniais de Interesse ao SUS**. Espécies vegetais. 2009.

BRUDZYNSKI, K.; MALDONADO-ALVAREZ, L. Polyphenol-protein complexes and their consequences for the redox activity, structure and function of honey. A current view and new hypothesis – A review. **Polish Journal of Food and Nutrition Sciences**, v. 65, n. 2, p. 71-80, 2015.

CALDERÓN-MONTAÑO, J. M.; BURGOS-MORÓN, E.; PÉREZ-GUERRERO, C.; LÓPEZ-LÁZARO, M. A review on the dietary flavonoid Kaempferol. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 11, p. 298-344, 2011. doi: 10.2174/138955711795305335

CAO, B.; *et al.* A trial of lopinavir–ritonavir in adults hospitalized with severe Covid-19. **New England Journal of Medicine**, v. 382, n. 19, 2020.

CARVALHO, M. G.; MELO, A. G. N.; ARAGÃO, C. F. S.; RAFFIN, F. N.; MOURA, T. F. A. L. *Schinus terebinthifolius* Raddi: chemical composition, biological properties and toxicity. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 15, n. 1, p. 158-169, 2013.

CARVALLO JR, P. M.; ROSA, R. S. L.; SGAMBATTI, M. S.; ADACHI, E. A.; CARVALHO, V. C. L. Avaliação do programa de residência multiprofissional em saúde da família: uma análise qualitativa através de duas técnicas. **Revista do Hospital Universitário Pedro Ernesto**, v. 11, n. supl 1, p. 114-119, 2012.

CASAI-SILVA, L. L.; TEIXEIRA, C. F. P.; LEBRUN, I.; LOMONTE, B.; ALAPE-GIRÓN, A.; GUTIÉRREZ, J. M. 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.

CELLI, G. B.; PEREIRA-NETTO, A. B.; BETA, T. Comparative analysis of total phenolic content, antioxidant activity, and flavonoids profile of fruits from two varieties of Brazilian cherry (*Eugenia uniflora* L.) throughout the fruit developmental stages. **Food Research International**, v. 44, n. 8, p. 2442-2451, 2011.

CHEN, X.; WANG, K.; XU, W.; MA, Q.; CHEN, M.; DU, L.; MO, M.; WANG, Y.; SHEN, J. 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.

CHOI, Jun-Hui *et al.* Kaempferol inhibits thrombosis and platelet activation. **Biochimie**, [S.L.], v. 115, p. 177-186, ago. 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biochi.2015.06.001>.

CHRISTINE, K. Y.; SHIH, C. H.; CHU, I. K.; LO, C. Accumulation of trans-piceid in sorghum seedlings infected with *Colletotrichum sublineolum*. **Phytochemistry**, v. 69, n. 3, p. 700-706, 2008.

CHU, H.; *et al.* 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**, v. 1, p. 14-23, 2020. doi: 10.1016/S2666-5247(20)30004-5.

CORRÊA, L. C.; MARCHI-SALVADOR, D. P.; CINTRA, A. C.; SAMPAIO, S. V.; SOARES, A. M.; FONTES, M. R. Crystal structure of a myotoxic Asp49-phospholipase A2 with low catalytic activity: Insights into Ca²⁺-independent catalytic mechanism. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1784, n. 4, p. 591-599, 2008.

CORREA, G.; MELO, P. C. de, SOUZA, F. I. B. de, RODRIGUES, S. T. Plantas medicinais da renisus de ocorrência na Amazônia. In: Embrapa Amazônia Oriental-Artigo em anais de congresso (ALICE). In: Seminário de Iniciação Científica da Embrapa Amazônia Oriental, 22., 2018, Belém, PA. **Anais...** Belém, PA: Embrapa Amazônia Oriental, 2018., 2018.

COSTA, I. B. S. Da S.; *et al.* O Coração e a COVID-19: O que o Cardiologista precisa saber. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 114, p. 805-816, 2020.

COSTA, J. C. F. Da; HOSCHEID, J. Perfil fitoquímico e avaliação da atividade antimicrobiana de extratos aquoso e etanólico de folhas de *Cecropia pachystachya*. **Revista Fitos**, v. 12, n. 2, 2018.

COSTA, M. F. *et al.* *Eugenia aurata* and *Eugenia puniceifolia* HBK inhibit inflammatory response by reducing neutrophil adhesion, degranulation and NET release. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 16, n. 1, p. 1-10, 2016.

DA CUNHA, F. A. B. *et al.* Cytotoxic and antioxidative potentials of ethanolic extract of *Eugenia uniflora* L. (Myrtaceae) leaves on human blood cells. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 84, p. 614-621, 2016.

DA ROCHA, P. dos S.; BOLETI, A. P. A.; VIEIRA, M. C.; CAROLLO, C. A.; SILVA, D. B.; ESTEVINHO, L. M.; SANTOS, E. L.; SOUZA, K. P. Microbiological quality, chemical profile as well as antioxidant and antidiabetic activities of *Schinus terebinthifolius* Raddi. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 220, p. 36-46, 2019.

DA SILVA, Marciane M.; IRIGUCHI, E. K. K.; KASSUYA, C. A. L.; VIEIRA, M. C.; FOGGIO, M. A.; CARVALHO, J. E.; RUIZ, A. L. T. G.; SOUZA, K. P.; FORMAGIO, A. S. N. *Schinus terebinthifolius*: phenolic constituents and *in vitro* antioxidant, antiproliferative and *in vivo* anti-inflammatory activities. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 27, n. 4, p. 445-452, 2017.

DABEEK, W. M.; MARRA, M. V. Dietary quercetin and Kaempferol: bioavailability and potential cardiovascular-related bioactivity in humans. **Nutrients**, v. 25, n. 11, 2288, 2019.

DAVIDSON, F. F.; DENNIS, E. A. Evolutionary relationships and implications for the regulation of phospholipase A2 from snake venom to human secreted forms. **Journal of Molecular Evolution**, v. 31, n. 3, p. 228-238, 1990.

DE MELO, G. O.; MALVAR, D. C.; VANDERLINDE, F. A.; ROCHA, F. F.; PIRES, P. A.; COSTA, E. A.; DE MATOS, L. G.; KAISER, C. R.; COSTA, S. S. Antinociceptive and anti-inflammatory Kaempferol glycosides from *Sedum dendroideum*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 124, n. 2, p. 228-232, 2009.

DENNIS, E. A.; CAO, J.; HSU, Y. H.; MAGRIOTI, V.; KOKOTOS, G. Phospholipase A2 enzymes: physical structure, biological function, disease implication, chemical inhibition, and therapeutic intervention. **Chemical Reviews**, v. 111, n. 10, p. 6130-6185, 2011.

DEROSA, G.; MAFFIOLI, P.; D'ANGELO, A.; DI PIERRO, F. A role for quercetin in coronavirus disease 2019 (COVID-19). **Phytotherapy Research**, v. 35, n. 3, p. 1230-1236, 2021. doi: 10.1002/ptr.6887.

DESSEN, A. Structure and mechanism of human cytosolic phospholipase A (2). **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1488, n. 1-2, p. 40-47, 2000.

DEVI, K. P.; MALAR, D. S.; NABAVI, S. F.; SUREDA, A.; XIAO, J.; NABAVI, S. M.; DAGLIA, M. Kaempferol and inflammation: From chemistry to medicine. **Pharmacological Research**, v. 99, p. 1-10, 2015.

DEWI, B. E.; RATNINGPOETI, E.; DESTI, H.; ANGELINA, M. *In vitro* and *in silico* study to evaluate the effectiveness of quercitrin as antiviral drug to dengue virus. **4th Biomedical Engineering's Recent Progress in Biomaterials, Drugs Development, Health, and Medical Devices: Proceedings of the International Symposium of Biomedical Engineering, ISBE 2019**. Editor / LISCHER, K.; ABUZAIRI, T.; RAHMAN, S. F.; GOZAN, M. American Institute of Physics Inc., 2019.

DOMINGUES, B. F. **3D-Pharma: uma ferramenta para triagem virtual baseada em fingerprints de farmacóforos**. 2012. 193 p. Tese (Doutorado em Bioinformática) – Departamento de Bioquímica e Imunologia, Universidade Federal de Minas Gerais, 2012.

DORNAS, W. C.; OLIVEIRA, T. T.; AUGUSTO, L. E. F.; NAGEM, T. J. Experimental atherosclerosis in rabbits. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 95, n. 2, p. 272-278, 2010.

DOS SANTOS JUNIOR, A. B.; TAMAYOSE, C. I.; FERREIRA, M. J. P.; BELCHOR, M. N.; COSTA, C. R. C.; 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**, v. 25, n. 2, p. 282, 2020.

DOS SANTOS, R. N.; FERREIRA, L. G.; ANDRICOPULO, A. D. Practices in molecular Dock and structure-based virtual screening. In: **Computational drug discovery and design**. Humana Press, New York, NY, 2018. p. 31-50.

DUMITRU, G.; EL-NASHAR, H. A. S.; MOSTAFA, M. N.; ELDAHSHAN, O. A.; BOIANGIU, R. S.; CIORNEA, E. T.; HRITCU, L.; SINGAB, A. N. B. Agathisflavone

isolated from *Schinus polygamus* (Cav.) Cabrera leaves prevents scopolamine-induced memory impairment and brain oxidative stress in zebrafish (*Danio rerio*). **Phytomedicine**, v. 58, p. 152889, 2019.

DUPUREUR, C. M.; YU, B. Z.; JAIN, M. K.; NOEL, J. P.; DENG, T.; LI, Y.; BYEON, I. J.; TSAI, M. D. Phospholipase A2 engineering. Structural and functional roles of highly conserved active site residues tyrosine-52 and tyrosine-73. **Biochemistry**, v. 31, n. 28, p. 6402-6413, 1992.

EL DIWANI, G.; EL RAFIE, S. H.; HAWASH, S. Antioxidant activity of extracts obtained from residues of nodes leaves stem and root of Egyptian *Jatropha curcas*. **African Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 3, n. 11, p. 521-530, 2009.

EL-BAZ, F. K.; *et al.* HPLC evaluation of phenolic profile, and antioxidant activity of different extracts of *Jatropha curcas* leaves. **International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research**, v. 29, n. 1, p. 203-210, 2014.

FAROOQUI, T.; FAROOQUI, A. Molecular mechanism underlying the therapeutic activities of propolis: a critical review. **Current Nutrition & Food Science**, v. 6, n. 3, p. 186- 199, 2010.

FATHI, B.; ROWAN, E. G.; HARVEY, A. 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.

FERREIRA, F. P. S.; MORAIS, S. R.; BARA, M. T. F.; CONCEIÇÃO, E. C.; PAULA, J. R.; CARVALHO, T. C.; VAZ, B. G.; COSTA, H. B.; ROMAO, W.; REZENDE, M. H. *Eugenia calycina* Cambess extracts and their fractions: their antimicrobial activity and the identification of major polar compounds using electrospray ionization FT-ICR mass spectrometry. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 99, p. 89-96, 2014.

FRAGOPOULOU, E; DEMOPOULOS, C.A.; ANTONOPOULOU, Smaragdi. Lipid minor constituents in wines. A biochemical approach in the French paradox. **International Journal of Wine Research**, [S.L.], p. 131, mar. 2009. Informa UK Limited.

<http://dx.doi.org/10.2147/ijwr.s4587>.

GEHRKE, I. T. S.; NETO, A. T.; PEDROSO, M.; MOSTARDEIRO, C. P.; CRUZ, I. B. M.; SILVA, U. F.; ILHA, V.; DALCOL, I. I.; MOREL, A. F. Antimicrobial activity of *Schinus lentiscifolius* (Anacardiaceae). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 148, n. 2, p. 486-491, 2013.

GINWALA, R.; BHAVSAR, R.; CHIGBU, D. I.; JAIN, P.; KHAN, Z. K. Potential role of flavonoids in treating chronic inflammatory diseases with a special focus on the anti-inflammatory activity of apigenin. **Antioxidants**, v. 8, n. 2, 35, 2019.

GOLEBIEWSKA, E. M.; POOLE, A. W. Platelet secretion: from haemostasis to wound healing and beyond. **Blood Reviews**, v. 29, p. 153–162, 2015.

GOMÉZ-ZORITA, S.; LASA, A.; ABEDANO, N.; FERNÁNDEZ-QUINTELA, A.; MOSQUEDA-SOLÍS, A.; GARCIA-SOBREVIELA, M. P.; ARBONÉS-MAINAR, J. M. Phenolic compounds apigenin, hesperidin and Kaempferol reduce in vitro lipid accumulation in human adipocytes. **Journal of Translational Medicine**, v. 15, n. 1, p. 1-10, 2017.

GOODSELL, D. S.; MORRIS, G. M.; OLSON, A. J. Automated Dock of Flexible Ligands: Applications of AutoDock **Journal of Molecular Recognition**, v. 9, p. 1-5, 1996.

GRIFFITHS, K.; AGGARWAL, B. B.; SINGH, R. B.; BUTTAR, H. S.; WILSON, D.; de MEESTER, F. Food antioxidants and their anti-inflammatory properties: a potential role in cardiovascular diseases and cancer prevention. **Diseases**, v. 4, n. 3, p. 28, 2016.

GROSDIDIER, A.; ZOETE, V.; MICHIELIN, O. SwissDock, a protein-small molecule Dock web service based on EADock DSS. **Nucleic Acids Research**, v. 39, n. 2, p. 270-277, 2011. doi: 10.1093/nar/gkr366.

GRZEGOROWSKA, O.; LORKOWSKI, J. Possible correlations between atherosclerosis, acute coronary syndromes and COVID-19. **Journal of Clinical Medicine**, v. 9, n. 11, p. 3746, 2020.

GUEDES, R. L. M. *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.

GUTIÉRREZ, J. M.; RUCAVADO, A.; CHAVES, F.; DÍAZ, C.; ESCALANTE, T. Experimental pathology of local tissue damage induced by *Bothrops asper* snake venom. **Toxicon**, v. 54, n. 7, p.958-975, 2009. doi: 10.1016/J.Toxicon.2009.01.038.

HAJJI, H. E.; NKHILI, E.; TOMAO, V.; DANGLES, O. Interactions of quercetin with iron and copper ions: complexation and autoxidation. **Free Radical Research**, v. 40, n. 3, p. 303-320, 2006.

HIROTA, B. C. K. **Estudo fitoquímico e das propriedades biológicas de *Jatropha multifida* L. (Euphorbiaceae)**. 2011. 149 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2011.

HOSSEN, M.; HERNANDEZ, E. 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.

HUANG, Q.; WU, Y.; QIN, C.; HE, W.; WEI, X. Phylogenetic and structural analysis of the phospholipase A2 gene family in vertebrates. **International Journal of Molecular Medicine**, v. 35, n. 3, p. 587-596, 2015.

HUANG, Q.; GUO, Y.; FU, R.; PENG, T.; ZHANG, Y.; CHEN, F. Antioxidant activity of flavonoids from leaves of *Jatropha curcas*. **ScienceAsia**, v. 40, n. 3, p. 193-197, 2014.

INABA, H.; TAGASHIRA, M.; HONMA, D.; KANDA, T.; KOU, Y.; OHTAKE, Y.; AMANO, A. Identification of hop polyphenolic components which inhibit prostaglandin E₂ production by gingival epithelial cells stimulated with periodontal pathogen. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 31, n. 3, p. 527-530, 2008.

INFANTE, J.; ROSALEN, P. L.; LAZARINI, J. G.; FRANCHIN, M.; ALENCAR, S. M. Antioxidant and anti-inflammatory activities of unexplored Brazilian native fruits. **PLoS One**, v. 11, n. 4, p. e0152974, 2016.

ISLAM, Md. Rezaul et al. In silico QSAR analysis of quercetin reveals its potential as therapeutic drug for Alzheimer's disease. *Journal Of Young Pharmacists*, [S.L.], v. 5, n. 4, p. 173-179, dez. 2013. EManuscript Technologies. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jyp.2013.11.005>.

JANSSEN, M. J.; VAN DE WIEL, W. A.; BEIBOER, S. H.; VAN KAMPEN, M. D.; VERHEIJ, H. M.; SLOTBOOM, A. J.; EGMOND, M. R. Catalytic role of the active site histidine of porcine pancreatic phospholipase A2 probed by the variants H48Q, H48N and H48K. **Protein Engineering, Design and Selection**, v. 12, n. 6, p. 497-503, 1999.

JUCÁ, M. M.; *et al.* Flavonoides : atividades biológicas e potencial terapêutico. **Pesquisa de Produtos Naturais**, v. 34, n. 5, p. 692-705, 2020.

JUFFRIE, M.; MEER, G. M.; HACK, C. E.; HAASNOOT, K.; SUTARYO, A.; VEERMAN, A. J.; THIJS, L. G. Inflammatory mediators in dengue virus infection in children: interleukin-6 and its relation to C-reactive protein and secretory phospholipase A2. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 65, n. 1, p. 70-75, 2001.

JUNIOR, C. E. T. Sobre a teoria da difração de raios-X em estruturas tridimensionais. 2014.

KHAN, Haroon et al. Neuroprotective Effects of Quercetin in Alzheimer's Disease. *Biomolecules*, [S.L.], v. 10, n. 1, p. 59, 30 dez. 2019. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/biom10010059>.

KASSITERIDI, C.; MONACO, C. Macrophages and dendritic cells: the usual suspects in atherogenesis. **Current Drug Targets**, v. 16, n. 4, p. 373-382, 2015.

KIM, R. R.; CHEN, Z.; MANN, T. J.; BASTARD, K.; SCOTT, K.; CHURCH, W. B. Structural and functional aspects of targeting the secreted human group IIA Phospholipase A2. **Molecules**, v. 25, n. 19, p. 4459, 2020.

KIM, Y. H.; CHOI, Y. J.; KANG, M. K.; PARK, S. H.; ANTIKA, L. D.; LEE, E. J.; KIM, D. Y.; KANG, Y. H. Astragalín inhibits allergic inflammation and airway thickening in ovalbumin-challenged mice. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 65, p. 836–845, 2017. doi: 10.1021/acs.jafc.6b05160

KIM, H. P.; SON, K. H.; CHANG, H. W.; KANG, S. S. Anti-inflammatory plant flavonoids and cellular action mechanisms. **Journal of Pharmacological Sciences**, v. 96, n. 3, p. 229–245, 2004.

KOTANI, M.; MATSUMOTO, M.; FUJITA, A.; HIGA, S.; WANG, W.; SUEMURA, M.; KISHIMOTO, T.; TANAKA, T. Persimmon leaf extract and astragalín inhibit development of dermatitis and IgE elevation in NC/Nga mice. **The Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 106, p. 159-166, 2000. doi: 10.1067/mai.2000.107194

KROLL, J.; HARSHADRAI, M.; RAWEL, M.; ROHN, S. Reactions of plant phenolics with food proteins and enzymes under special consideration of covalent bonds. **Food Science and Technology Research**, v. 9, n. 3, p. 205-218, 2003.

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

KUMAR, S.; PANDEY, A. 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.

LASZUK, Paulina; PETELSKA, Aneta D. Interactions between Phosphatidylcholine and Kaempferol or Myristicin: langmuir monolayers and microelectrophoretic studies. **International Journal of Molecular Sciences**, [S.L.], v. 22, n. 9, p. 4729, 29 abr. 2021. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/ijms22094729>.

LAZARINI, J. G.; FRANCHIN, M.; SOARES, J. C.; NANI, B. D.; MASSARIOLI, A. P.; ALENCAR, S. M.; ROSALEN, P. L. Anti-inflammatory and antioxidant potential, *in vivo*

toxicity, and polyphenolic composition of *Eugenia selloi* BD Jacks. (Pitangatuba), a Brazilian native fruit. **Plos One**, v. 15, n. 6, p. e0234157, 2020.

LEESON, Paul D.; BENTO, A. Patricia; GAULTON, Anna; HERSEY, Anne; MANNERS, Emma J.; RADOUX, Chris J.; LEACH, Andrew R.. Target-Based Evaluation of “Drug-Like” Properties and Ligand Efficiencies. **Journal Of Medicinal Chemistry**, [S.L.], v. 64, n. 11, p. 7210-7230, 13 maio 2021. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/acs.jmedchem.1c00416>.

LI, H. *et al.* TarFisDock: a web server for identifying drug targets with docking approach. **Nucleic Acids Research**, v. 34, n. suppl_2, p. 219-224, 2006.

LIEBSCHER, S.; *et al.* Phospholipase A2 activity during the replication cycle of the flavivirus West Nile virus. **PLoS Pathogens**, v. 14, n. 4, p. e1007029, 2018.

LIN, S. H.; ZHAO, Y. S.; ZHOU, D. X.; ZHOU, F. C.; XU, F. Coronavirus disease 2019 (COVID-19): cytokine storms, hyper-inflammatory phenotypes, and acute respiratory distress syndrome. **Genes & Diseases**, v. 7, n. 4, p. 520-527, 2020. doi: 10.1016/j.gendis.2020.06.009.

LINDEN, M.; BRINCKMANN, C.; FEUEREISEN, M. M.; SCHIEBER, A. Effects of structural differences on the antibacterial activity of biflavonoids from fruits of the Brazilian peppertree (*Schinus terebinthifolius* Raddi). **Food Research International**, v. 133, p. 109134, 2020.

LINTON, M.F.; YANCEY, P.G.; DAVIES, S. S.; JEROME, W. G.; LINTON, E. F.; SONG, W. L.; DORAN, A. C.; VICKERS, K. C. **The role of lipids and lipoproteins in atherosclerosis**. In: Feingold, K. R.; *et al.* Endotext [Internet]. South Dartmouth (MA): MDText.com, Inc.; 2000.

LIONTA, E.; SPYROU, G.; VASSILATIS, D. K.; COURNIA, Z. 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.

LIU, M.; HE, P.; LIU, H. G.; WANG, X, J.; LI, F. J.; CHEN, S.; LIN, J.; CHEN, P.; LIU, J. H.; LI, C. H. Clinical characteristics of 30 medical workers infected with new coronavirus pneumonia. **Chinese Journal of Tuberculosis and Respiratory Diseases**, v. 43, n. 3, p. 209-214, 2020.

LÓPEZ-POSADAS, R.; BALLESTER, I.; ABADÍA-MOLINA, A. C.; SUÁREZ, M. D.; ZARZUELO, A.; MARTÍNEZ- AUGUSTIN, O.; DE MEDINA, F. S. Effect of flavonoids on rat splenocytes, a structure-activity relationship study. **Biochemical Pharmacology**, v. 76, n. 4, p. 495-506, 2008.

LUNDIN, A.; *et al.* Targeting membrane-bound viral RNA synthesis reveals potent inhibition of diverse coronaviruses including the middle East respiratory syndrome virus. **PLoS Pathogens**, v. 10, n. 5, p. e1004166, 2014.

MAAS, C.; RENNÉ, T. Coagulation factor XII in thrombosis and inflammation. **Blood**, v. 131, n. 17, p. 1903-1909, 2018.

MADESWARAN, A.; UMAMAHESWARI, M.; ASOKKUMAR, K.; SIVASHANMUGAM, T.; SUBHADRADEVI, V.; JAGANNATH, V. Dock studies: *In silico* lipoxygenase inhibitory activity of some commercially available flavonoids. **Bangladesh Journal of Pharmacology**, v. 6, n. 2, p. 133-138, 2011.

MALEKI, S. J.; CRESPO, J. F.; CABANILLAS, B. Anti-inflammatory effects of flavonoids. **Food Chemistry**, v. 299, p. 125124, 2019.

MARCHI-SALVADOR, Daniela P. *et al.* Insights into the role of oligomeric state on the biological activities of crotoxin: crystal structure of a tetrameric phospholipase A2 formed by two isoforms of Crotoxin B from *Crotalus durissus terrificus* venom. **Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics**, [S.L.], v. 72, n. 3, p. 883-891, 14 fev. 2008. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/prot.21980>.

MARZOUK, M. S.; MOHARRAM, F. A.; HAGGAG, A. G.; IBRAHIM, M. T.; BADARY, O. A. Antioxidant flavonol glycosides from *Schinus molle*. **Phytotherapy Research**, v. 20, n. 3, p. 200-205, 2006.

MATOS, Isaac de Araújo; COSTA JÚNIOR, Nivan Bezerra da; MEOTTI, Flavia Carla. Integration of an Inhibitor-like Rule and Structure-based Virtual Screening for the Discovery of Novel Myeloperoxidase Inhibitors. **Journal Of Chemical Information and Modeling**, [S.L.], v. 60, n. 12, p. 6408-6418, 3 dez. 2020. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/acs.jcim.0c00813>.

MOUCLIS, V. D.; MICHOPULOU, V.; CONSTANTINO-KOKOTOU, V.; MAVROMOUSTAKOS, D.; DENNIS, E. A.; KOKOTOS, G. Binding conformation of 2-oxoamide inhibitors to group IVA cytosolic phospholipase A2 determined by molecular Dock combined with molecular dynamics. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 52, n. 1, p. 243-254, 2012.

MOURA, Ana S; HALDER, Amit K; CORDEIRO, M Natália Ds. From biomedical to in silico models and back to therapeutics: a review on the advancement of peptidic modeling. **Future Medicinal Chemistry**, [S.L.], v. 11, n. 17, p. 2313-2331, set. 2019. Future Science Ltd. <http://dx.doi.org/10.4155/fmc-2018-0365>.

MOURA-DA-SILVA, A. M.; PAINE, M. J.; DINIZ, M. R.; THEAKSTON, R. D.; CRAMPTON, J. M. The molecular cloning of a phospholipase A2 from *Bothrops jararacussu* snake venom: evolution of venom group II phospholipase A2's may imply gene duplications. **Journal of Molecular Evolution**, v. 41, n. 2, p. 174-179, 1995.

MÜLLER, C.; HARDT, M.; SCHWUDKE, D.; NEUMAN, B. W.; PLESCHKA, S.; ZIEBUHR, J. Inhibition of cytosolic phospholipase a2 α impairs an early step of Coronavirus replication in cell culture. **Journal of Virology**, v. 92, n. 4, p. e01463-17, 2018.

MURAKAMI, M.; TAKETOMI, Y. Secreted Phospholipase A 2 and Mast Cells. **Allergology International**, v. 64, n. 1, p. 4-10, 2015. doi: 10.1016/J.Alit.2014.07.005.

NASCIMENTO, A. K. L. **Atividade imunomoduladora de diferentes extratos obtidos da espécie *Plukenetia volubilis* Linneo (*Euphorbiaceae stricto sensu*)**. 2017. 100 p. Tese (Doutorado em Bioquímica) – Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2017.

NIJVELDT, R. J.; NOOD, E.; HOORN, D. E. C.; BOELENS, P. G.; NORREN, K.; LEEUWEN, P. A. M. Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 74, n. 4, p. 418-425, 2001.

OBRENOVICH, M. E.; NAIR, N. G.; BEYAZ, A.; ALIEV, G.; REDDY, V. P. The role of polyphenolic antioxidants in health, disease, and aging. **Rejuvenation Research**, v. 13, n. 6, p. 631-643, 2010.

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

PAPALIA, T.; BARRECA, D.; PANUCCIO, M. R. Assessment of antioxidant and cytoprotective potential of *Jatropha (Jatropha curcas)* grown in Southern. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 3, p. 660, 2017.

PATRO, R. K.; MOHANTY, S.; PRUSTY, B. K.; SINGH, D. K.; GAIKWAD, S.; SASWAT, T.; CHATTOPADHYAY, S.; DAS, B. K.; TRIPATHY, R.; RAVINDRAN, B. Cytokine signature associated with disease severity in dengue. **Viruses**, v. 11, n. 1, p. 34, 2019.

PECHLIVANI, N.; AJJAN, R. A. Thrombosis and Vascular Inflammation in Diabetes: Mechanisms and Potential Therapeutic Targets. **Frontiers in Cardiovascular Medicine**, v. 5, n. 1, 2018.

PERETZ, A.; AZRAD, M.; BLUM, A. Influenza virus and atherosclerosis. **International Journal of Medicine**, v. 112, n. 10, p. 749-755, 2019.

PEREZ, F. *et al.* The decline of dengue in the Americas in 2017: discussion of multiple hypotheses. **Tropical Medicine & International Health**, v. 24, n. 4, p. 442-453, 2019.

PETROVA, S. D.; ATANASOV, V. N.; BALASHEV, K. Vipoxin and its components: structure-function relationship. **Advances in Protein Chemistry and Structural Biology**, v. 87, p. 117-153, 2012.

PETTERSEN, E. F.; GODDARD T. D.; HUANG C. C.; COUCH G. S.; GREENBLATT D. M.; MENG E. C.; FERRIN T. E. UCSF Chimera – a visualization system for exploratory research and analysis. **Journal of Computational Chemistry**, v. 25, n. 13, p. 1605-1612, 2004.

PICANÇO, L. C. S.; *et al.* Study of molecular Dock, physicochemical and pharmacokinetic properties of GSK-3 β inhibitors. **Journal of Pharmaceutical Research International**, p. 152-175, 2015.

PICKARD, R. T.; CHIOU, X. G.; STRIFLER, B. A.; DEFELIPPIS, M. R.; HYSLOP, P. A.; TEBBE, A. L.; YEE, Y. K.; REYNOLDS, L. J.; DENNIS, E. A.; KRAMER, R. M.; SHARP, J. D. Identification of essential residues for the catalytic function of 85-kDa cytosolic phospholipase A2. Probing the role of histidine, aspartic acid, cysteine, and arginine. **Journal of Biological Chemistry**, v. 271, n. 32, p. 19225-19231, 1996.

PRASAD, D. R.; IZAM, A.; KHAN, M. M. R. *Jatropha curcas*: Plant of medical benefits. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 6, n. 14, p. 2691-2699, 2012.

PRIOR, R. L.; GU, L.; WU, X.; JACOB, R. A.; SOTOUDEH, G.; KADER, A. A.; COOK, R. A. 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.

PROCHAZKOVA, D.; BOUSOVA, I.; WILHELMOVA, N. Antioxidant and prooxidant properties of flavonoids. **Fitoterapia**, v. 82, p. 513-523, 2011.

RATTMAN, Y. D.; de SOUZA, L. M.; MALQUEVICZ-PAIVA, S. M.; DARTORA, N.; SASSAKI, G. L.; GORIN, P. A. J.; IACOMINI, M. Analysis of flavonoids from *Eugenia uniflora* leaves and its protective effect against murine sepsis. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**. 2012.

REN, Jie *et al.* Recent progress regarding Kaempferol for the treatment of various diseases (Review). **Experimental And Therapeutic Medicine**, [S.L.], p. 2759-2776, 13 ago. 2019. Spandidos Publications. <http://dx.doi.org/10.3892/etm.2019.7886>.

RIAZ, A.; RASUL, A.; HUSSAIN, G.; ZAHOR, M. K.; JABEEN, F.; SUBHANI, Z.; YOUNIS, T.; ALI, M.; SARFRAZ, I.; SELAMOGLU, Z. Astragalín: a bioactive phytochemical with potential therapeutic activities. **Advances in Pharmacological Sciences**, v. 2018, n. 9794625, 2018. doi: 10.1155/2018/9794625

RODRIGUES, L. M. de S. **Estudos de docking molecular de derivados tiazóis com a BSA e como potenciais intercaladores de DNA e inibidores da topoisomerase II**. 2019. 62 p. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Química) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Serra Talhada, Pernambuco.

RODRIGUES, R. P.; MANTOANI, S. P.; ALMEIDA, J. R.; PINSETTA, F. R.; SEMIGHINI, E. P.; da SILVA, E. B.; da SILVA, C. H. T. P. Estratégias de triagem virtual no planejamento de fármacos. **Revista Virtual de Química**, v. 4, n. 6, 2012.

SALIM, M. N.; MASYITHA, D.; HARRIS, A.; BALQIS, U.; ISKANDAR, C. D.; HAMBAL, M. Anti-inflammatory activity of *Jatropha curcas* Linn. latex in cream formulation on CD68 expression in mice skin wound. **Veterinary World**, v. 11, n. 2, p. 99, 2018.

SALVADOR, G. H. M.; GOMES, A. A. S.; BRYAN-QUIRÓS, W.; FERNÁNDEZ, J.; LEWIN, M. R.; GUTIÉRREZ, J. M.; LOMONTE, B.; FONTES, M. R. Structural basis for phospholipase A2-like toxin inhibition by the synthetic compound Varespladib (LY315920). **Scientific Reports**, v. 9, n. 17203, p. 1-13, 2019.

SALVADOR, G. H. M.; BORGES, R. J.; LOMONTE, B.; LEWIN, M. R.; FONTES, M. R. M. The synthetic Varespladib molecule is a multi-functional inhibitor for PLA2 and PLA2-like ophidic toxins. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1865, n. 7, p. 129913, 2021.

SANTOS, V. L. dos A.; GONSALVES, A. de A.; ARAÚJO, C. R. M. Abordagem didática para o desenvolvimento de moléculas bioativas: regra dos cinco de Lipinski e preparação de heterociclo 1, 3, 4-oxadiazol em forno de micro-ondas doméstico. **Química Nova**, v. 41, p. 110-115, 2018.

SEELIGER, D.; DE GROOT, B. L. Ligand Dock and binding site analysis with PyMOL and Autodock/Vina. **Journal of Computer-Aided Molecular Design**, v. 24, n. 5, p. 417-422, 2010.

SGANZERLA, W. G.; BELING, P. C.; FERRAREZE, J. P.; KOMATSU, R. A.; NUNES, M. R.; VEECK, A. D. L. Nutritional, physicochemical and antimicrobial properties of uvaia pulp (*Eugenia pyriformis* Cambess). **Communications in Plant Sciences**, v. 8, n. 1, p. 1-7, 2018.

SHARP, J. D.; PICKARD, R. T.; CHIOU, X. G.; MANETTA, J. V.; KOVACEVIC, S.; MILLER, J. R.; VARSHAVSKY, A. D.; ROBERTS, E. F.; STRIFLER, B. A.; BREMS, D. N. Serine 228 is essential for catalytic activities of 85-kDa cytosolic phospholipase A2. **Journal of Biological Chemistry**, v. 269, n. 37, p. 23250-23254, 1994.

SHIN, Daekeun et al. Dietary Compound Kaempferol Inhibits Airway Thickening Induced by Allergic Reaction in a Bovine Serum Albumin-Induced Model of Asthma. *International Journal of Molecular Sciences*, [S.L.], v. 16, n. 12, p. 29980-29995, 16 dez. 2015. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/ijms161226218>.

SHRIVASTAVA, Sadhana et al. Protective Role of Kaempferol Against Acrylamide Intoxication. *Free Radicals and Antioxidants*, [S.L.], v. 7, n. 1, p. 36-42, 1 set. 2016. EManuscript Technologies. <http://dx.doi.org/10.5530/fra.2017.1.6>.

SILVÁN, A. M.; ABAD, M. J.; BERMEJO, P.; SOLLHUBER, M.; VILLAR, A. Antiinflammatory activity of coumarins from *Santolina oblongifolia*. **Journal of Natural Products**, v. 59, n. 12, p. 1183-1185, 1996.

SILVEIRA, R. S. *et al.* Determination of phenolic and triterpenic compounds in *Jatropha gossypifolia* L by Ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometric (UHPLC-MS/MS). **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 56, 2020.

ŠRIBAR, J.; KRIŽAJ, I. Secreted phospholipases A 2-not just enzymes. **Acta Chimica Slovenica**, v. 58, n. 4, 2011.

STEWART, A. J.; BOZONNET, S.; MULLEN, W.; JENKINS, G. I.; LEAN, M. E.; CROZIER, A. Occurrence of flavonols in tomatoes and tomato-based products. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, n. 7, p. 2663-2669, 2000.

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

TENFEN, A.; SIEBERT, D. A., SPUDEIT, D.; DE CORDOVA, C. M.; MICKE, G. A.; ALBERTON, M. D. Determination of phenolic profile by HPLC-ESI-MS/MS and antibacterial activity of *Eugenia platysema* against mollicutes strains. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, v. 7, n. 05, p. 007-011, 2017.

TESKE, S. **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, I. 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. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1340, n. 2, p. 178-186, 1997.

TORDERA, María; FERRÁNDIZ, María Luisa; ALCARAZ, María José. Influence of Anti-Inflammatory Flavonoids on Degranulation and Arachidonic Acid Release in Rat Neutrophils. *Zeitschrift Für Naturforschung C*, [S.L.], v. 49, n. 3-4, p. 235-240, 1 abr. 1994. Walter de Gruyter GmbH. <http://dx.doi.org/10.1515/znc-1994-3-412>.

TOYAMA, D.O.; FERREIRA, M. J.; ROMOFF, P.; FÁVERO, O. A.; GAETA, H. H.; TOYAMA, M. H. Effect of chlorogenic acid (5-Caffeoylquinic Acid) isolated from *Baccharis*

oxydonta on the structure and pharmacological activities of secretory phospholipase A2 from *Crotalus durissus terrificus*. **Biomed Research International**, v. 2014, 2014.

TOYAMA, D. de O. **Estudo de frações proteicas derivadas do veneno de serpentes crotálicas" e "bothropicas" com atividade antibacteriana: isolamento, purificação e caracterização bioquímica e biológica**. 2004. 212 p. Tese (Doutorado em Bioquímica, Biologia Funcional e Molecular) - Universidade Estadual De Campinas, Campinas, 2004.

TOYAMA, M. H.; COSTA, C. R. C.; BELCHOR, M. N.; NOVAES, D. P.; OLIVEIRA, M. A.; IE, R.; GAETA, H. H.; TOYAMA, D. O. 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. AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of Dock with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. **Journal of Computational Chemistry**, v. 31, n. 2, p. 455-461, 2010.

TU, Lv-Ying *et al.* The mechanism of Kaempferol induced apoptosis and inhibited proliferation in human cervical cancer SiHa cell: from macro to nano. **Scanning**, [S.L.], v. 38, n. 6, p. 644-653, 18 fev. 2016. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/sca.21312>.

TZENG, Shu-Huey; KO, Wun-Chang; KO, Feng-Nien; TENG, Che-Ming. Inhibition of platelet aggregation by some flavonoids. **Thrombosis Research**, [S.L.], v. 64, n. 1, p. 91-100, out. 1991. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/0049-3848\(91\)90208-e](http://dx.doi.org/10.1016/0049-3848(91)90208-e).

ULIANA, M. P.; FRONZA, M.; da SILVA, A. G.; VARGAS, T. S.; de ANDRADE, T. U.; SCHERER, R. Composition and biological activity of Brazilian rose pepper (*Schinus terebinthifolius* Raddi) leaves. **Industrial Crops and Products**, v. 83, p. 235-240, 2016.

VASQUEZ, A. M.; MOUCLIS, V. D.; DENNIS, E. A. Review of four major distinct types of human phospholipase A2. **Advances in Biological Regulation**, v. 67, p. 212-218, 2018.

VULFIUS, C. 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, A. C.; LASKOWSKI, R. A.; THORNTON, J. 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, T. Y.; LI, Q.; BI, K. S. Bioactive flavonoids in medicinal plants: Structure, activity and biological fate. **Asian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 13, n. 1, p. 12-23, 2018.

XAVIER-SANTOS, J. B. *et al.* Development of an effective and safe topical anti-inflammatory gel containing *Jatropha gossypifolia* leaf extract: results from a pre-clinical trial in mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 227, p. 268-278, 2018.

XIMENES, R.M.; *et al.* Harpalycin 2 inhibits the enzymatic and platelet aggregation activities of PrTX-III, a D49 phospholipase A2 from *Bothrops pirajai* venom. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 12, n. 1, p. 1-10, 2012.

XU, S.; PEI, R.; GUO, M.; HAN, Q.; LAI, J.; WANG, Y.; WU, C.; ZHOU, Y.; LU, M.; CHEN, X. Cytosolic phospholipase A2 gamma is involved in hepatitis C virus replication and assembly. **Journal of Virology**, v. 86, n. 23, p. 13025-13037, 2012.

XU, Youjun; WANG, Shiwei; HU, Qiwan; GAO, Shuaishi; MA, Xiaomin; ZHANG, Weilin; SHEN, Yihang; CHEN, Fangjin; LAI, Luhua; PEI, Jianfeng. CavityPlus: a web server for protein cavity detection with pharmacophore modelling, allosteric site identification and covalent ligand binding ability prediction. *Nucleic Acids Research*, [S.L.], v. 46, n. 1, p. 374-379, 10 Maio 2018. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/nar/gky380>. Disponível em: <https://academic.oup.com/nar/article/46/W1/W374/4994680>. Acesso em: 09 Dez. 2021.

YARLA, Nagendra Sastry *et al.* Phospholipase A2: a potential therapeutic target in inflammation and cancer (in silico, in vitro, in vivo and clinical approach). *Journal Of Cancer Science & Therapy*, [S.L.], v. 07, n. 08, p. 249-252, 2015. OMICS Publishing Group. <http://dx.doi.org/10.4172/1948-5956.1000357>.

YONEKURA-SAKAKIBARA, K.; HIGASHI, Y.; NAKABAYASHI, R. The origin and evolution of plant flavonoid metabolism. **Frontiers in Plant Science**, v. 10, p. 943, 2019.

ZAPLATIC, Elizabeta et al. Molecular mechanisms underlying protective role of quercetin in attenuating Alzheimer's disease. *Life Sciences*, [S.L.], v. 224, p. 109-119, maio 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.lfs.2019.03.055>.

ZHANG, D. H.; WU, K. L.; ZHANG, X.; DENG, S. Q.; PENG, B. *In silico* screening of Chinese herbal medicines with the potential to directly inhibit 2019 novel coronavirus. **Journal of Integrative Medicine**, v. 18, n. 2, p. 152-158, 2020. doi: 10.1016/j.joim.2020.02.005.

ZHANG, Z.; SUN, M.; DENG, J.; YU, J.; YANG, X.; ZHAO, W.; CHEN, G.; WANG, P. Zika virus induced more severe inflammatory response than dengue virus in chicken embryonic livers. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, n. 1127, 2019.

ANEXO I

Tabela I - Apresentação por espécie vegetal e seus flavonoides principais isolados, descritos e referenciados.

Espécie	Flavonóide	Referência
<i>Schinus polygamus</i>	Agathisflavone	Dumitru, 2019
<i>Schinus terebinthifolius</i> Raddi	Agathisflavone (AGF)	Da Rocha, 2019; Carvalho, 2013
<i>Schinus terebinthifolius</i> Raddi	Amentoflavone (AMF)	Da Rocha, 2019; Carvalho, 2013
<i>Eugenia selloi</i> B.D. Jacks	Apiagin-7-Glicosidade	Lazarini, 2020
<i>Eugenia brasiliensis</i>	Apigenin	Tenfen, 2017
<i>Eugenia uniflora</i> Leaves	Apigenin	Celli, 2011
<i>Jatropha cinerea</i> (Ortega) Müll. Arg	Apigenin	Aati, 2018; Prasad, 2012
<i>Jatropha gossypifolia</i>	Apigenin	Silveira <i>et al.</i> , 2020
<i>Schinus terebinthifolius</i> Raddi	Apigenin	Uliana, 2016; Carvalho, 2013
<i>Jatropha platyphylla</i>	Apigenin 7-o-glucoside	Nascimento, 2017
<i>Jatropha platyphylla</i>	Apigenin 7-o-neohesperoside	Nascimento, 2017
<i>Jatropha platyphylla</i>	Apigenin 8-c-glucoside rhamnoside	Nascimento, 2017
<i>Jatropha platyphylla</i>	Apigenin 8-c-glucoside rhamnoside	Nascimento, 2017
<i>Jatropha curcas</i> Leaves	Benzoic	El-Baz, 2014
<i>Eugenia jambolana</i> Lam. (black plum)	Caffeic acid	Baliga, 2011
<i>Eugenia uniflora</i> Leaves	Caffeic acid	Da Cunha, 2016
<i>Jatropha cordata</i> (Ortega) Ml Arg	Caffeic acid	Aati, 2018
<i>Jatropha gossypifolia</i>	Caffeic acid	Silveira <i>et al.</i> , 2020
<i>Schinus terebinthifolius</i> Raddi	Caffeic acid	Uliana, 2016; Carvalho, 2013
<i>Jatropha curcas</i>	Caffeic acids	El Diwani, 2009
<i>Jatropha curcas</i> Leaves	Catechin	El-Baz, 2014
<i>Jatropha gossypifolia</i>	Catechin	Silveira <i>et al.</i> , 2020
<i>Eugenia brasiliensis</i>	Catechin	Tenfen, 2017
<i>Jatropha cinerea</i> (Ortega) Müll. Arg	Catechol	Aati, 2018
<i>Eugenia uniflora</i> Leaves	Chlorogenic acid	Da Cunha, 2016
<i>Jatropha gossypifolia</i>	Chlorogenic acid	Silveira <i>et al.</i> , 2020
<i>Schinus molle</i>	Chlorogenic acid	Marzouk, 2006
<i>Schinus terebinthifolius</i> Raddi	Chlorogenic acid	Uliana, 2016; Carvalho, 2013
<i>Jatropha curcas</i>	Chlorogenic acids	El Diwani, 2009
<i>Jatropha curcas</i>	Cinnamic acids	El Diwani, 2009
<i>Jatropha curcas</i> Leaves	Coumaric acid	El-Baz, 2014
<i>Jatropha curcas</i> Leaves	Coumarin	El-Baz, 2014
<i>Jatropha curcas</i>	Coumarins	El Diwani, 2009

<i>Eugenia jambolana</i> Lam. (black plum)	Delphinidin	Baliga, 2011
<i>Eugenia uniflora</i> Leaves	Delphinidin	Da Cunha, 2016
<i>Schinus terebinthifolius</i> Raddi	Dihydroamentoflavone	Da Rocha, 2019; Carvalho, 2013
<i>Eugenia uniflora</i> Leaves	Ellagic acid	Da Cunha, 2016
<i>Eugenia calycina</i> Cambess	Epicatechin	Ferreira, 2014
<i>Eugenia pyriformis</i> Cambess	Epicatechin	Sganzerla, 2018
<i>Eugenia brasilienses</i> Lam. (Grumixama)	Epicatechind	Teixeira, 2015
<i>Eugenia brasilienses</i> Lam. (Grumixama)	Epigallocatechin gallated	Teixeira, 2015
<i>Jatropha curcas</i> Leaves	Ferulic	El-Baz, 2014
<i>Jatropha gossypifolia</i>	Ferullic acid	Silveira <i>et al.</i> , 2020
<i>Eugenia aurata</i>	Gallic acid	Costa, 2016
<i>Eugenia punicifolia</i>	Gallic acid	Costa, 2016
<i>Eugenia uniflora</i> Leaves	Gallic acid	Da Cunha, 2016
<i>Jatropha curcas</i> Leaves	Gallic acid	El-Baz, 2014
<i>Jatropha gossypifolia</i>	Gallic acid	Silveira <i>et al.</i> , 2020
<i>Schinus molle</i>	Gallic acid	Marzouk, 2006
<i>Schinus terebinthifolius</i> Raddi	Gallic acid	Uliana, 2016; Carvalho, 2013
<i>Schinus lentiscifolius</i>	Gallic acid	Gehrke, 2013
<i>Jatropha curcas</i> Leaves	Genistein	El-Baz, 2014
<i>Eugenia uniflora</i> Leaves	Hesperidin	Bakr, 2017
<i>Jatropha gossypifolia</i>	Isoorientin	Xavier-Santos, 2018
<i>Eugenia brasiliensis</i>	Isoquercitin	Tenfen, 2017
<i>Eugenia uniflora</i> Leaves	Isoquercitrin	da Cunha, 2016
<i>Schinus molle</i>	Isoquercitrin	Marzouk, 2006
<i>Schinus molle</i>	Isoquercitrin 6"-gallate	Marzouk, 2006
<i>Jatropha curcas</i> L. leaves	Isorhoifolin (5)	Papalia, 2017
<i>Jatropha gossypifolia</i>	Isovitexina	Xavier-Santos, 2018
<i>Jatropha curcas</i> L. leaves	Isovitexina	Papalia, 2017
<i>Jatropha curcas</i>	Isovitexina	Prasad, 2012; Huang, 2014
<i>Jatropha multifida</i> L.	Isovitexina	Hirota, 2011
<i>Jatropha cinerea</i> (Ortega) Müll. Arg	Isovitexina	Aati, 2018
<i>Eugenia brasiliensis</i>	Kaempferol	Tenfen, 2017
<i>Eugenia myrcianthes</i>	Kaempferol	Infante, 2016
<i>Eugenia uniflora</i> Leaves	Kaempferol	da Cunha, 2016
<i>Eugenia uniflora</i> Leaves	Kaempferol	de Oliveira, 2018
<i>Jatropha gossypifolia</i>	Kaempferol	Silveira <i>et al.</i> , 2020
<i>Eugenia jambolana</i> Lam. (black plum)	Kaempferol	Baliga, 2011
<i>Eugenia pyriformis</i> Cambess	Kampoferol	Sganzerla, 2018

<i>Schinus terebinthifolius</i> Raddi	Kampoferol	Carvalho, 2013
<i>Eugenia uniflora</i> Leaves	Luteolin	da Cunha, 2016
<i>Jatropha gossypifolia</i>	Luteolin	Silveira <i>et al.</i> , 2020
<i>Schinus terebinthifolius</i>	Luteolin	da Silva, 2017; Carvalho, 2013
<i>Jatropha curcas</i> Leaves	Luteolin	El-Baz, 2014
<i>Jatropha platyphylla</i>	Luteolin 8-c-glucosidade	Nascimento, 2017
<i>Eugenia jambolana</i> Lam. (black plum)	Malvidin	Baliga, 2011
<i>Schinus terebinthifolius</i> Raddi	Methyl digallate	da Rocha, 2019; Carvalho, 2013
<i>Schinus molle</i>	Methyl gallate	Marzouk, 2006
<i>Eugenia pyriformis</i> Cambess	Myricerin	Sganzerla, 2018
<i>Eugenia brasiliensis</i>	Myricetin	Tenfen, 2017
<i>Eugenia jambolana</i> Lam. (black plum)	Myricetin	Baliga, 2011
<i>Eugenia myrcianthes</i>	Myricetin	Infante, 2016
<i>Eugenia uniflora</i> Leaves	Myricetin	de Oliveira, 2018
<i>Eugenia uniflora</i> Leaves	Naringin	Bakr, 2017
<i>Jatropha curcas</i>	Orientin	Huang, 2014
<i>Jatropha gossypifolia</i>	Orientin	Xavier-Santos, 2018
<i>Eugenia jambolana</i> Lam. (black plum)	Petunidin	Baliga, 2011
<i>Eugenia aurata</i>	Quercitin	Costa, 2016
<i>Eugenia brasiliensis</i>	Quercitin	Tenfen, 2017
<i>Eugenia Involucrata</i>	Quercitin	Infante, 2016
<i>Eugenia jambolana</i> Lam. (black plum)	Quercitin	Baliga, 2011
<i>Eugenia myrcianthes</i>	Quercitin	Infante, 2016
<i>Eugenia puniceifolia</i>	Quercitin	Costa, 2016
<i>Eugenia pyriformis</i> Cambess	Quercitin	Sganzerla, 2018
<i>Eugenia uniflora</i> Leaves	Quercitin	da Cunha, 2016; Bakr, 2017; de Oliveira, 2018
<i>Jatropha cinerea</i> (Ortega) Müll. Arg	Quercitin	Aati, 2018
<i>Jatropha curcas</i> Linn	Quercitin	Salim, 2018
<i>Jatropha gossypifolia</i>	Quercitin	Silveira <i>et al.</i> , 2020
<i>Jatropha pelargonifolia</i>	Quercitin	Aati, 2018
<i>schinus lentiscifolius</i>	Quercitin	Gehrke, 2013
<i>Schinus terebinthifolius</i> Raddi	Quercitin	da Silva, 2017; Carvalho, 2013
<i>Eugenia calycina</i> Cambess	Quercitrin	Ferreira, 2014
<i>Eugenia jambolana</i> Lam. (black plum)	Quercitrin	Baliga, 2011
<i>Eugenia uniflora</i> Leaves	Quercitrin	da Cunha, 2016; Bakr, 2017; de Oliveira, 2018
<i>Jatropha gossypifolia</i>	Quercitrin	Silveira <i>et al.</i> , 2020

<i>schinus lentiscifolius</i>	Quercitrin	Gehrke, 2013
<i>Schinus terebinthifolius</i> Raddi	Quercitrin	Carvalho, 2013
<i>Jatropha curcas</i>	Rhoifolin	Huang, 2014
<i>Jatropha curcas</i> L. leaves	Rhoifolin	Papalia, 2017
<i>Eugenia uniflora</i> Leaves	Rutin	Bakr, 2017; da Cunha, 2016
<i>Jatropha cordata</i> (Ortega) Müll. Arg	Rutin	Aati, 2018
<i>Jatropha curcas</i> Leaves	Rutin	El-Baz, 2014
<i>Jatropha curcas</i> Linn	Rutin	Salim, 2018
<i>Jatropha gossypifolia</i>	Rutin	Silveira <i>et al.</i> , 2020
<i>Schinus terebinthifolius</i> Raddi	Rutin	Carvalho, 2013
<i>Eugenia brasiliensis</i>	Rutin	Tenfen, 2017
<i>Eugenia florida</i> DC. (Myrtaceae)	Rutin	Bastos, 2019
<i>Jatropha curcas</i>	Sterol stigmasterol.	Prasad, 2012
<i>Schinus terebinthifolius</i> Raddi	Tri-o-galloyl hexoside	da Rocha, 2019; Carvalho, 2013
<i>Jatropha gossypifolia</i>	Vanillic acid	Silveira <i>et al.</i> , 2020
<i>Jatropha cinerea</i> (Ortega) Müll. Arg	Vitexin	Aati, 2018
<i>Jatropha curcas</i>	Vitexin	Huang, 2014
<i>Jatropha multifida</i> L.	Vitexin	Hirota, 2011
<i>Jatropha curcas</i> L. leaves	Vitexin	Papalia, 2017
<i>Jatropha gossypifolia</i>	Vitexin	Xavier-Santos, 2018
<i>Jatropha curcas</i>	Vitexin	Prasad, 2012

Tabela I: Apresentação por espécie vegetal e seus flavonoides principais isolados, descritos e referenciados. A catalogação da tabela está organizada por cores: Laranja, Azul e Verde são referentes às espécies *Eugenia* spp., *Jatropha* spp. e *Schinus* spp., respectivamente. Nesta paleta de cores, os tons mais escuros do azul, laranja ou verde referem-se às espécies medicinais que estão no catálogo de espécies pertencentes ao SUS. As cores mais claras referem-se às demais espécies do gênero.

ANEXO II

Tabela II: Apresentação por espécie vegetal e seus flavonoides principais isolados, descritos e referenciados.

Espécie	Composto	Pertence ao RENISUS	Bioma Brasileiro	Atividade Biológica	Referências
<i>Eugenia brasiliensis</i>	Apigenina	Não	Mata Atlântica	Anti-inflamatório, antioxidante	Tenfen, 2017
<i>Eugenia uniflora</i> Leaves	Apigenina	Sim	Cerrado e Mata Atlântica	Antioxidante	Celli, 2011
<i>Jatropha gossypifolia</i>	Apigenina	Sim	Caatinga	Antioxidante, Anti-inflamatória	Silveira <i>et al.</i> , 2020
<i>Schinus terebinthifolius</i> Raddi	Apigenina	Sim	Cerrado, Mata Atlântica, Pampa	Antimicrobianos, Antioxidantes	Carvalho, 2013; Uliana, 2016;
<i>Eugenia jambolana</i> Lam. (black plum)	Caffeic acid	Não	Mata Atlântica	Anti-inflamatório	Baliga, 2011
<i>Eugenia uniflora</i> Leaves	Caffeic acid	Sim	Cerrado e Mata Atlântica	Antioxidante	da Cunha, 2016
<i>Jatropha gossypifolia</i>	Caffeic acid	Sim	Caatinga	Antioxidante, Anti-inflamatória	Silveira <i>et al.</i> , 2020
<i>Schinus terebinthifolius</i> Raddi	Caffeic acid	Sim	Cerrado, Mata Atlântica, Pampa	Antimicrobianos, Antioxidantes	Carvalho, 2013; Uliana, 2016
<i>Jatropha curcas</i>	Caffeic acids	Não	Caatinga	Antioxidante	El Diwani, 2009; Drumond, 2016
<i>Jatropha curcas</i> Leaves	Catechin	Não	Caatinga	Antioxidante	El-Baz, 2014; Drumond, 2016
<i>Jatropha gossypifolia</i>	Catechin	Sim	Caatinga	Antioxidante, Anti-inflamatória	Silveira <i>et al.</i> , 2020
<i>Eugenia brasiliensis</i>	Catechin	Não	Mata Atlântica	Antioxidante, Anti-inflamatória	Tenfen, 2017
<i>Eugenia uniflora</i> Leaves	Chlorogenic acid	Sim	Cerrado e Mata Atlântica	Antioxidante	da Cunha, 2016
<i>Jatropha gossypifolia</i>	Chlorogenic acid	Sim	Caatinga	Antioxidante, Anti-inflamatória	Silveira <i>et al.</i> , 2020
<i>Schinus terebinthifolius</i> Raddi	Chlorogenic acid	Sim	Cerrado, Mata Atlântica, Pampa	Antimicrobianos, Antioxidantes	Carvalho, 2013; Uliana, 2016
<i>Eugenia uniflora</i> Leaves	Cyanidin	Sim	Cerrado e Mata Atlântica	Antioxidante	da Cunha, 2016
<i>Eugenia uniflora</i> Leaves	Delphinidin	Sim	Cerrado e Mata	Antioxidante	da Cunha, 2016

			Atlântica		
<i>Schinus terebinthifolius</i> Raddi	Dihydroaemontoflavone (DHAF)	Sim	Cerrado, Mata Atlântica, Pampa	Antioxidante	Carvalho, 2013; da Rocha, 2019
<i>Eugenia uniflora</i> Leaves	Ellagic acid	Sim	Cerrado e Mata Atlântica	Antioxidante	da Cunha, 2016
<i>Jatropha gossypifolia</i>	Ferullic acid	Sim	Caatinga	Antioxidante, Anti-inflamatória	Silveira <i>et al.</i> , 2020
<i>Eugenia puniceifolia</i>	Gallic acid	Não	Caatinga, Cerrado, Mata Atlântica.	Antioxidante, Anti-inflamatória	Costa, 2016
<i>Eugenia uniflora</i> Leaves	Gallic acid	Sim	Cerrado e Mata Atlântica	Antioxidante	da Cunha, 2016
<i>Jatropha curcas</i> Leaves	Gallic acid	Não	Caatinga	Antioxidante	El-Baz, 2014; Drumond, 2016
<i>Jatropha gossypifolia</i>	Gallic acid	Sim	Caatinga	Antioxidante, Anti-inflamatória	Silveira <i>et al.</i> , 2020
<i>Schinus molle</i>	Gallic acid	Não	Mata Atlântica	Antioxidante	Marzouk, 2006
<i>Schinus terebinthifolius</i> Raddi	Gallic acid	Sim	Cerrado, Mata Atlântica, Pampa	Antimicrobianos, Antioxidantes	Uliana, 2016; Carvalho, 2013
<i>schinus lentiscifolius</i>	Gallic acid	Não	Mata Atlântica	Antioxidante, antimicrobiano	Gehrke, 2013
<i>Eugenia uniflora</i> Leaves	Hesperidin	Sim	Cerrado e Mata Atlântica	Antioxidante, Anti-inflamatória	Bakr, 2017
<i>Eugenia uniflora</i> Leaves	Isoquercitrin	Sim	Cerrado e Mata Atlântica	Antioxidante	da Cunha, 2016
<i>Jatropha gossypifolia</i>	Isovitexin	Sim	Caatinga	Anti-inflamatório	Hirota, 2011; Xavier-Santos, 2018
<i>Eugenia Myrcianthes</i>	Kaempferol	Não	Mata Atlântica, Pampa, Cerrado	Anti-inflamatório, antioxidante	Infante, 2016
<i>Eugenia uniflora</i> Leaves	Kaempferol	Sim	Cerrado e Mata Atlântica	Antioxidante, Anti-inflamatória	da Cunha, 2016; de Oliveira, 2018
<i>Jatropha gossypifolia</i>	Kaempferol	Sim	Caatinga	Antioxidante, Anti-inflamatória	Silveira <i>et al.</i> , 2020
<i>Eugenia pyriformis</i> Cambess	Kampoferol	Não	Cerrado e Mata Atlântica	Antioxidante	Sganzerla, 2018
<i>Schinus terebinthifolius</i> Raddi	Kampoferol	Sim	Cerrado, Mata Atlântica, Pampa	Antimicrobianos, Antioxidantes	Carvalho, 2013
<i>Eugenia uniflora</i> Leaves	Luteolina	Sim	Cerrado e Mata	Antioxidante	da Cunha, 2016

			Atlântica		
<i>Jatropha gossypifolia</i>	Luteolina	Sim	Caatinga	Antioxidante, Anti-inflamatória	Silveira <i>et al.</i> , 2020
<i>Schinus terebinthifolius</i>	Luteolina	Sim	Cerrado, Mata Atlântica, Pampa	Antioxidante, Anti-inflamatória	da Silva, 2017; Carvalho, 2013
<i>Eugenia uniflora</i> Leaves	Myricetin-arabinoside	Sim	Cerrado e Mata Atlântica	Antimicrobiano, Antioxidantes; Anti-inflamatórias	Rattman, 2012
<i>Eugenia uniflora</i> Leaves	Myricetin-hexoside	Sim	Cerrado e Mata Atlântica	Antimicrobiano, Antioxidantes; Anti-inflamatórias	Rattman, 2012
<i>Eugenia uniflora</i> Leaves	Myricitin	Sim	Cerrado e Mata Atlântica	Antioxidantes; Anti-inflamatórias	de Oliveira, 2018
<i>Eugenia uniflora</i> Leaves	Naringin	Sim	Cerrado e Mata Atlântica	Antioxidantes; Anti-inflamatórias	Bakr, 2017
<i>Jatropha gossypifolia</i>	Orientin	Sim	Caatinga	Anti-inflamatório	Xavier-Santos, 2018
<i>Eugenia aurata</i>	Quercetina	Não	Mata Atlântica	Antioxidantes; Anti-inflamatórias	Costa, 2016
<i>Eugenia brasiliensis</i>	Quercetina	Não	Mata Atlântica	Antioxidantes; Anti-inflamatórias	Tenfen, 2017
<i>Eugenia Involucrata</i>	Quercetina	Não	Mata Atlântica	Antioxidantes; Anti-inflamatórias	Infante, 2016
<i>Eugenia jambolana</i> Lam. (black plum)	Quercetina	Não	Mata Atlântica	Antioxidantes; Anti-inflamatórias	Baliga, 2011
<i>Eugenia myrcianthes</i>	Quercetina	Não	Mata Atlântica, Pampa, Cerrado	Antioxidantes; Anti-inflamatórias	Infante, 2016
<i>Eugenia punicifolia</i>	Quercetina	Não	Caatinga, Cerrado, Mata Atlântica	Antioxidantes; Anti-inflamatórias	Costa, 2016
<i>Eugenia pyriformis</i> Cambess	Quercetina	Não	Cerrado e Mata Atlântica	Antioxidante	Sganzerla, 2018
<i>Eugenia uniflora</i> Leaves	Quercetina	Sim	Cerrado e Mata Atlântica	Antioxidantes; Anti-inflamatórias	da Cunha, 2016; Bakr, 2017; de Oliveira, 2018
<i>Jatropha curcas</i> Linn	Quercetina	Não	Caatinga	Anti-inflamatório	Drumond, 2016; Salim, 2018
<i>Jatropha gossypifolia</i>	Quercetina	Sim	Caatinga	Antioxidantes; Anti-inflamatórias	Silveira <i>et al.</i> , 2020
<i>Schinus lentiscifolius</i>	Quercetina	Não	Mata Atlântica	Antioxidantes; Anti-inflamatórias	Gehrke, 2013
<i>Schinus terebinthifolius</i> Raddi	Quercetina	Sim	Cerrado, Mata Atlântica, Pampa	Antioxidantes; Anti-inflamatórias	Carvalho, 2013; da Silva, 2017

<i>Schinus terebinthifolius</i> Raddi	Quercetina o-deoxyhexoside	Sim	Cerrado, Mata Atlântica, Pampa	Antioxidante	Carvalho, 2013; da Rocha, 2019
<i>Schinus terebinthifolius</i> Raddi	Quercetina o-hexoside	Sim	Cerrado, Mata Atlântica, Pampa	Antioxidante	Carvalho, 2013; da Rocha, 2019
<i>Eugenia uniflora</i> Leaves	Quercitrin-rhamnoside	Sim	Cerrado e Mata Atlântica	Antimicrobiano; Antioxidantes; Anti-inflamatórias	Rattman, 2012
<i>Eugenia uniflora</i> Leaves	Quercitrin-rhamnosyl-gallate	Sim	Cerrado e Mata Atlântica	Antimicrobiano; Antioxidantes; Anti-inflamatórias	Rattman, 2012
<i>Eugenia uniflora</i> Leaves	Quercitrin-rhamnosyl-hexoside	Sim	Cerrado e Mata Atlântica	Antimicrobiano; Antioxidantes; Anti-inflamatórias	Rattman, 2012
<i>Eugenia uniflora</i> Leaves	Quercetina	Sim	Cerrado e Mata Atlântica	Antioxidante	Da Cunha, 2016
<i>Eugenia uniflora</i> Leaves	Quercetina	Sim	Cerrado e Mata Atlântica	Antimicrobiano; Antioxidantes; Anti-inflamatórias	De Oliveira, 2018
<i>Jatropha gossypifolia</i>	Quercitrina	Sim	Caatinga	Antimicrobianos, Antioxidantes	Silveira <i>et al.</i> , 2020
<i>Schinus terebinthifolius</i> Raddi	Quercitrina	Sim	Cerrado, Mata Atlântica, Pampa	Antimicrobianos, Antioxidantes	Carvalho, 2013
<i>Eugenia uniflora</i> Leaves	Quercitrina	Sim	Cerrado e Mata Atlântica	Antimicrobianos, Antioxidantes	Bakr, 2017
<i>Schinus terebinthifolius</i>	Robustaflavone	Sim	Cerrado, Mata Atlântica, Pampa	Antimicrobianos, Antioxidantes	Carvalho, 2013; da Silva, 2017;
<i>Eugenia uniflora</i> Leaves	Rutin	Sim	Cerrado e Mata Atlântica	Antioxidante	da Cunha, 2016; Bakr, 2017
<i>Jatropha curcas</i> Linn	Rutin	Não	Caatinga	Anti-inflamatório	Drumond, 2016; Salim, 2018
<i>Jatropha gossypifolia</i>	Rutin	Sim	Caatinga	Antimicrobianos, Antioxidantes	Silveira <i>et al.</i> , 2020
<i>Schinus terebinthifolius</i> Raddi	Rutin	Sim	Cerrado, Mata Atlântica, Pampa	Antimicrobianos, Antioxidantes	Carvalho, 2013
<i>Eugenia brasiliensis</i>	Rutin	Não	Mata Atlântica	Antimicrobianos, Antioxidantes	Tenfen, 2017
<i>Jatropha gossypifolia</i>	Vanillic acid	Sim	Caatinga	Antimicrobianos, Antioxidantes	Silveira <i>et al.</i> , 2020

Tabela II: Apresentação por espécie vegetal e seus flavonoides principais isolados, descritos e referenciados. A catalogação da tabela está organizada por cores: Laranja, Azul e Verde são referentes às espécies *Eugenia* spp., *Jatropha* spp. e *Schinus* spp., respectivamente. Nesta paleta de cores, os tons mais escuros do azul, laranja ou verde referem-se às espécies medicinais que estão no catálogo de espécies pertencentes ao SUS. As cores mais claras referem-se às demais espécies do gênero.

ANEXO III

Tabela III: Estruturas de flavonoides encontrados em comum nas espécies selecionadas pertencentes ao RENISUS.

Indicados pelo SUS	Composto	Aplicações	Referência
<i>Eugenia uniflora</i> Leaves	Apgenina	Antioxidante e Anti-inflamatório	Celli, 2011; Carvalho, 2013; Uliana, 2016; Silveira <i>et al.</i> , 2020
<i>Jatropha gossypifolia</i>			
<i>Schinus terebinthifolius</i> Raddi			
<i>Eugenia uniflora</i> Leaves	Kaempferol	Antioxidante e Anti-inflamatório	Carvalho, 2013 da Cunha, 2016; de Oliveira, 2018; Silveira <i>et al.</i> , 2020
<i>Jatropha gossypifolia</i>			
<i>Schinus terebinthifolius</i> Raddi			
<i>Eugenia uniflora</i> Leaves	Luteolina	Antioxidante e Anti-inflamatório	Carvalho, 2013 da Cunha, 2016; da Silva, 2018; Silveira <i>et al.</i> , 2020
<i>Jatropha gossypifolia</i>			
<i>Schinus terebinthifolius</i> Raddi			
<i>Eugenia uniflora</i> Leaves	Quercetina	Antioxidante e Anti-inflamatório	Carvalho, 2013; Da Silva, 2017; De Oliveira, 2018; Silveira <i>et al.</i> , 2020
<i>Jatropha gossypifolia</i>			
<i>Schinus terebinthifolius</i> Raddi			
<i>Eugenia uniflora</i> Leaves	Quercitrina	Antimicrobianos, Antioxidantes, Anti-inflamatória	da Cunha, 2016; Bakr, 2017; de Oliveira, 2018; Silveira <i>et al.</i> , 2020
<i>Jatropha gossypifolia</i>			
<i>Schinus terebinthifolius</i> Raddi			
<i>Eugenia uniflora</i> Leaves	Rutin	Anti-inflamatório	Carvalho, 2013; da Cunha, 2016; Bakr, 2017
<i>Jatropha gossypifolia</i>			
<i>Schinus terebinthifolius</i> Raddi			
<i>Eugenia uniflora</i> Leaves	Caffeic Acid	Anti-inflamatório	Carvalho, 2013; da Cunha, 2016; Uliana, 2016; Silveira <i>et al.</i> , 2020
<i>Jatropha gossypifolia</i>			
<i>Schinus terebinthifolius</i> Raddi			
<i>Eugenia uniflora</i> Leaves	Chlorogenic Acid	Antioxidante	Carvalho, 2013; da Cunha, 2016; Uliana, 2016; Silveira <i>et al.</i> , 2020
<i>Jatropha gossypifolia</i>			
<i>Schinus terebinthifolius</i> Raddi			

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

ANEXO IV

Tabela IV: Estrutura 3D dos compostos com sua respectiva nuvem eletrônica.

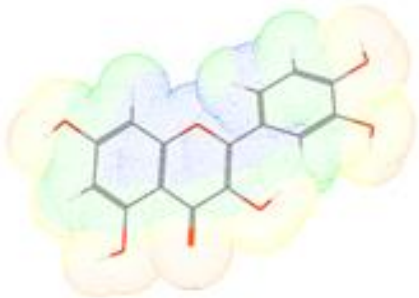
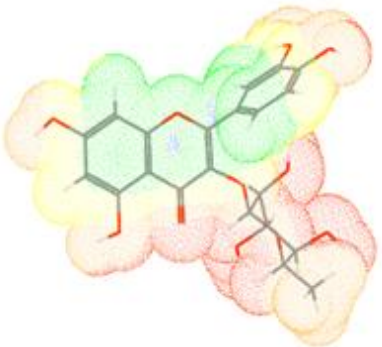
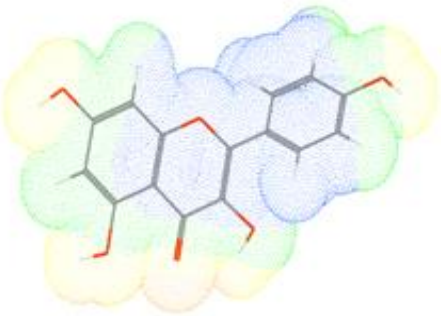
Compostos	Estrutura 3D	Referência
Quercetina		Carvalho, 2013 da Silva, 2017 de Oliveira, 2018 Silveira <i>et al.</i> , 2020
Quercitrina		Da Cunha, 2016; Bakr, 2017; De Oliveira, 2018; Silveira <i>et al.</i> , 2020
Kaempferol		Carvalho, 2013; da Cunha, 2016; de Oliveira, 2018; Silveira <i>et al.</i> , 2020

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

ANEXO V

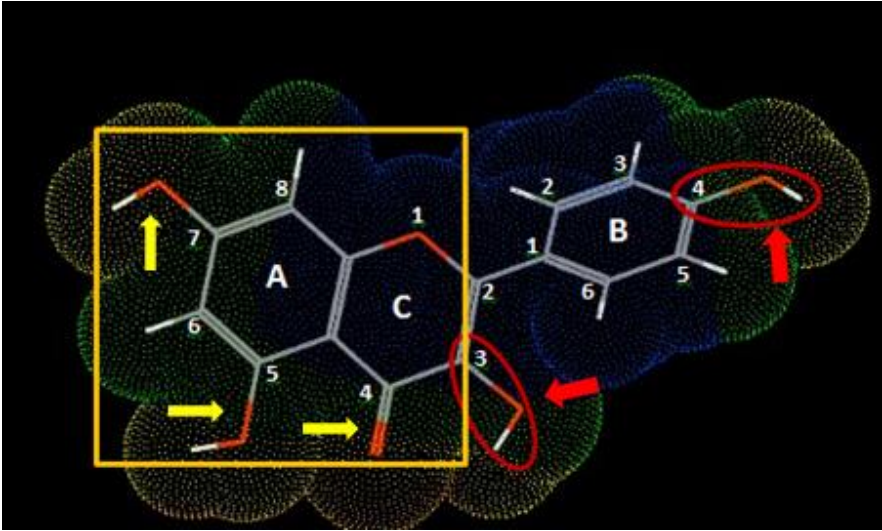
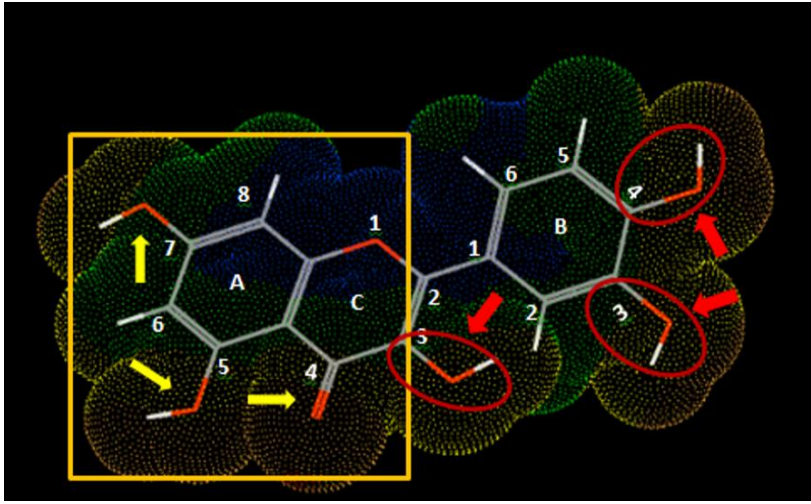
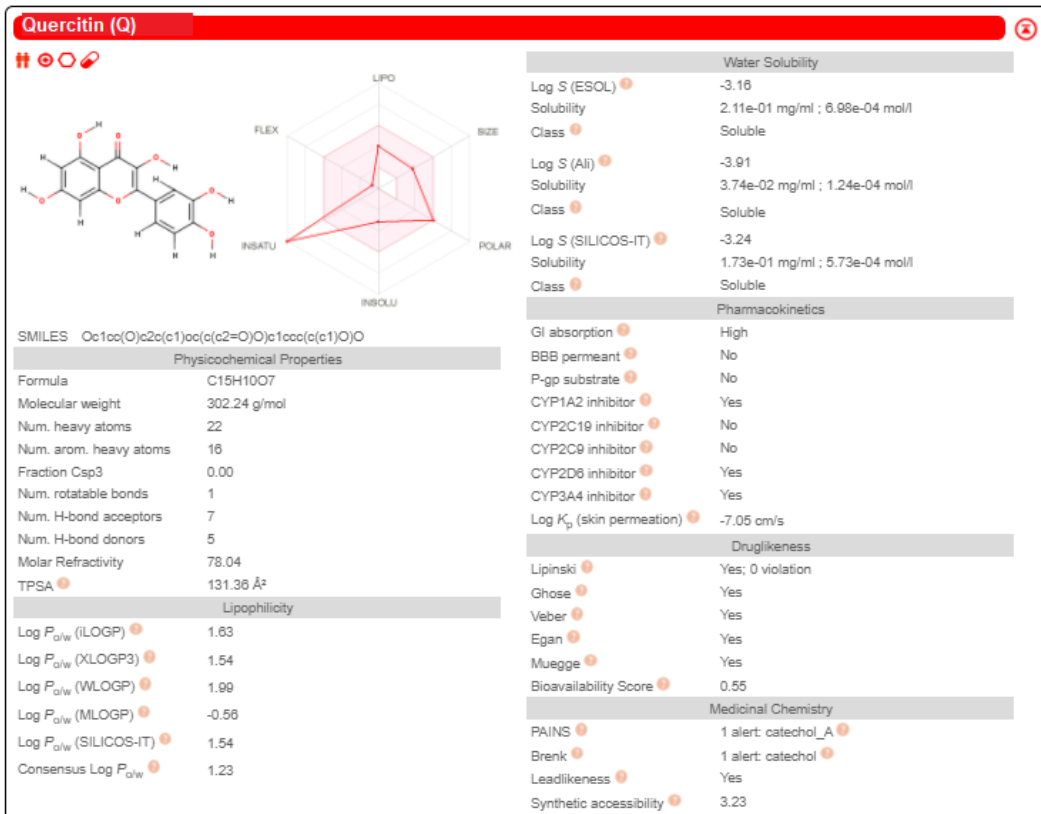
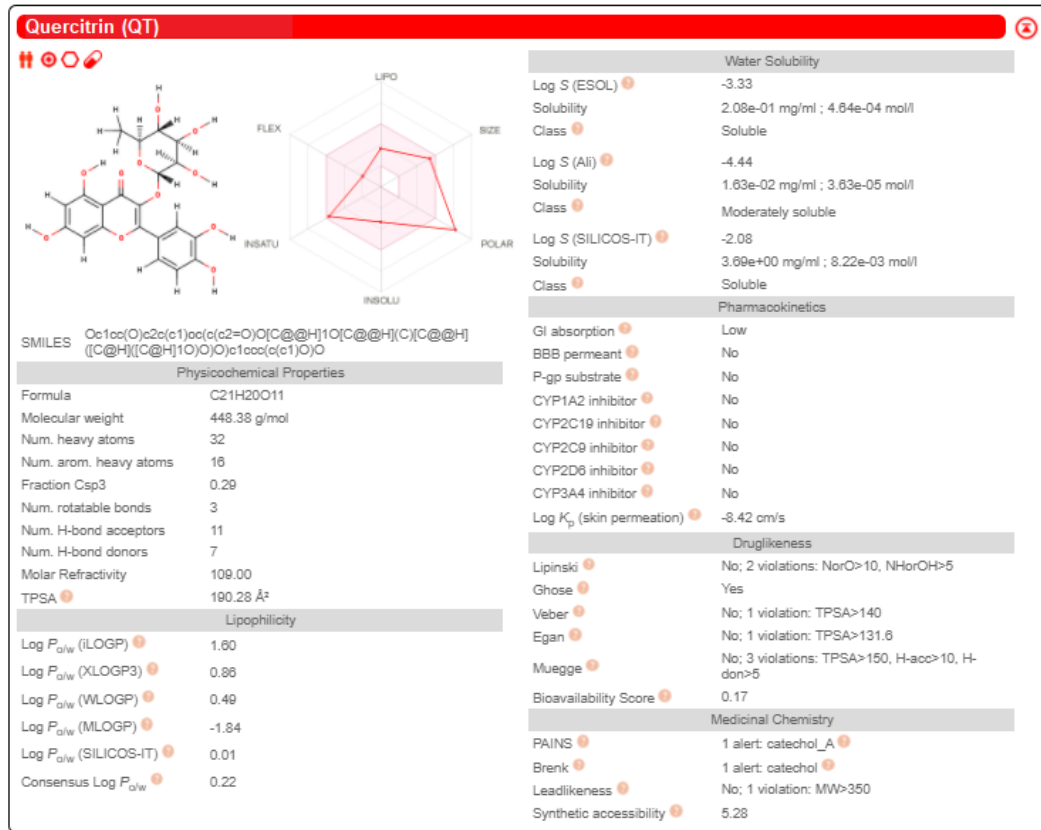
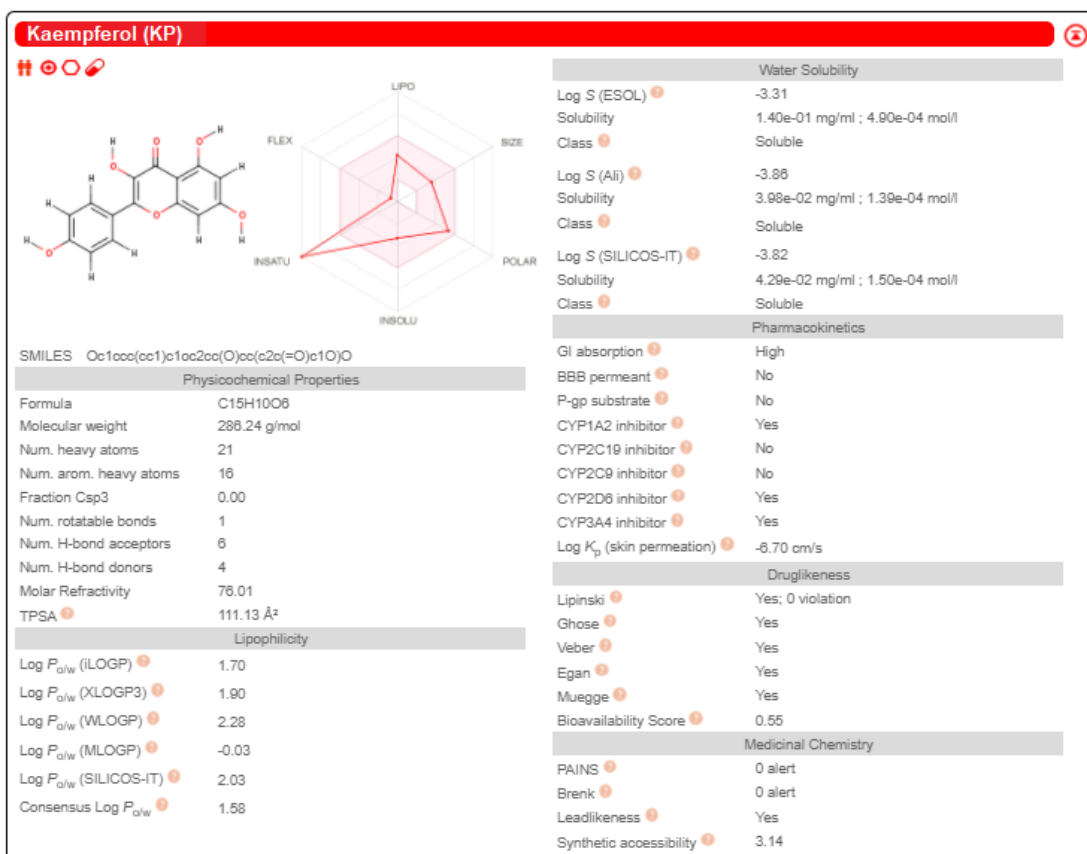
Composto	Atividade Antioxidante	Atividade Anti-inflamatória
Kaempferol	1 ligação no grupo hidroxila no carbono 3 do anel C 1 ligação no grupo hidroxila no carbono 4 do anel B	1 ligação dupla no grupo carbonila no carbono 3;4 do anel C; Ligação no 5 e 7 do carbono A um grupo de hidroxila.
		
Composto	Atividade Antioxidante	Atividade Anti-inflamatória
Quercetina	1 ligação no grupo hidroxila no carbono 3 do anel C; 1 ligação no grupo hidroxila no carbono 3 do anel B; 1 ligação no grupo di-hidroxil no carbono 4 do anel B.	1 ligação dupla no grupo carbonila no carbono 3;4 do anel C; 5 e 7 do carbono A um grupo de hidroxila.
		

Figura: Caracterização dos compostos Kaempferol e Quercetina segundo Farooqui e Farooqui (2010). Na imagem acima, vemos o quadrado amarelo, com setas que sinalizam a região anti-inflamatória do Flavonóide, e na seta em destaque na cor vermelha, observamos a região antioxidante.

ANEXO VI

Dados obtidos na plataforma SwissADME





ANEXO VII

Tabela V: Interpretação e resultados de Dock de compostos frente às proteínas, parte I

<i>Proteína</i>	<i>AchE - Homo sapiens</i>		<i>Lp-PLA2 – Homo sapiens</i>		<i>sPLA2 – Cdt.</i>	
	KP	Q	KP	Q	KP	Q
<i>Ligações com Asp.</i>	6	2	----	----	6	5
<i>Tipo de ligações com Asp.</i>	Van der Walls	Van Der Walls	----	----	Van der Walls Ponte de Hidrogênio	Favorável Aceptor, acceptor. Pi Ânion
<i>Distância ligações com Asp. (a)</i>	2,92	3,3	----	----	3,1	3,24
<i>Ligações com His</i>	4	----	5	6	1	5
<i>Tipo de ligações com His</i>	Ponte de Carbono	----	Van Der Walls Ponte De Hidrogênio	Van Der Walls	4,6	Van der Walls
<i>Distância ligações com His (a)</i>	3,05	----	3,5	3,23	Van der Walls	2,84
<i>Ligações com Gly.</i>	7	----	7	4	3	5
<i>Tipo de ligações com Gly.</i>	Van der Walls	----	Van Der Walls	Ponte De Carbono	Ponte de Carbono	Ponte de Hidrogênio
<i>Distância ligações com Gly. (a)</i>	3,12	----	3,2	3,6	3,3	3,08
<i>Número de interações com o sítio ativo</i>	5	7	13	10	5	10
<i>Proximidade das interações. (a)</i>	3,21	2,86	4,18	3,5	3,44	3,25
<i>Hidrofóbica VS hidrofílica</i>	44::19	24::17	66::2	6::31	08:07	15:30
<i>Força das ligações, tipos covalentes e pontes de hidrogênio</i>	34	19	33	14	7	14
<i>Ligações Infavoráveis</i>	0	0	0	0	0	2
<i>Van der Walls</i>	29	22	35	23	10	16
<i>Total de ligações</i>	63	41	68	37	17	32



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

Marcus Hikari Toyama ^{1,*}, Airam Rogero ¹, Laila Lucyane Ferreira de Moraes ¹, Gustavo Antônio Fernandes ¹, Carline Ramos da Cruz Costa ^{1,2}, Mariana Novo Belchior ^{1,2}, Agatha Manzi De Carli ² and Marcus Antônio de Oliveira ^{1,3}

- ¹ BICMOLPEP Group, Biosciences Institute, São Paulo State University (UNESP), São Vicente 11220-900, São Paulo, Brazil; airam.roggero@hotmail.com (A.R.); laila_luciane@hotmail.com (L.L.F.M.); gustavoopharmades2004@gmail.com (G.A.F.); carlobert@gmail.com (C.R.d.C.C.); belchiormariana@gmail.com (M.N.B.); agatha.manzi@yahoo.com.br (A.M.D.C.); scaffi@gmail.com (M.A.d.O.)
² Postgraduate Program in Biotechnosciences, Federal University of ABC, Santo André 08210-580, São Paulo, Brazil
³ Correspondence: marcoshikari@unesp.br



Citation: Toyama, M.H.; Rogero, A.; de Moraes, L.L.F.; Fernandes, G.A.; da Cruz-Costa, C.R.; Belchior, 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. *Pharmaceuticals* **2022**, *14*, 368. <https://doi.org/10.3390/pharmaceuticals14020368>

Academic Editor: Ariane Leme-Rizua

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-acylhydrolase (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/IB/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: 30 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. 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 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 2qog 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, 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.

2.6. 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.

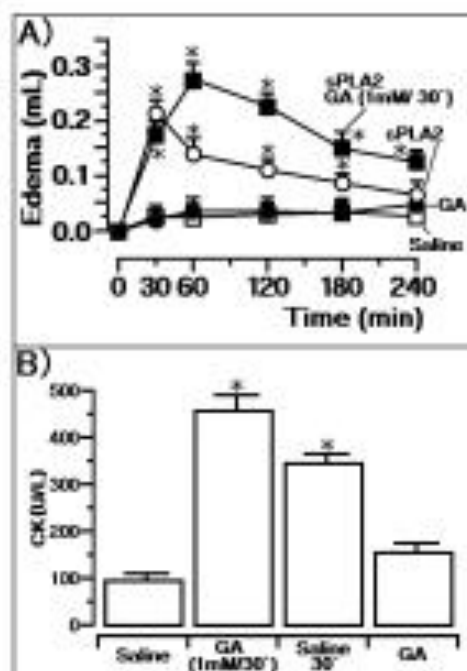


Figure 1. Evaluation of the GA previous treatment on the edema and myotoxicity triggered by sPLA2 from Cdt. In (A), the effect of the previous injection of GA, revealing an edema peak at 60 min, which is higher than the positive control (sPLA2) ($n = 5$, and $* p < 0.05$). In (B), myotoxic effect results 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} nm/min = 0.18/min in Absorbance units (A_{425} 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} nm/min = 0.36/min in Absorbance units (A_{425} 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.

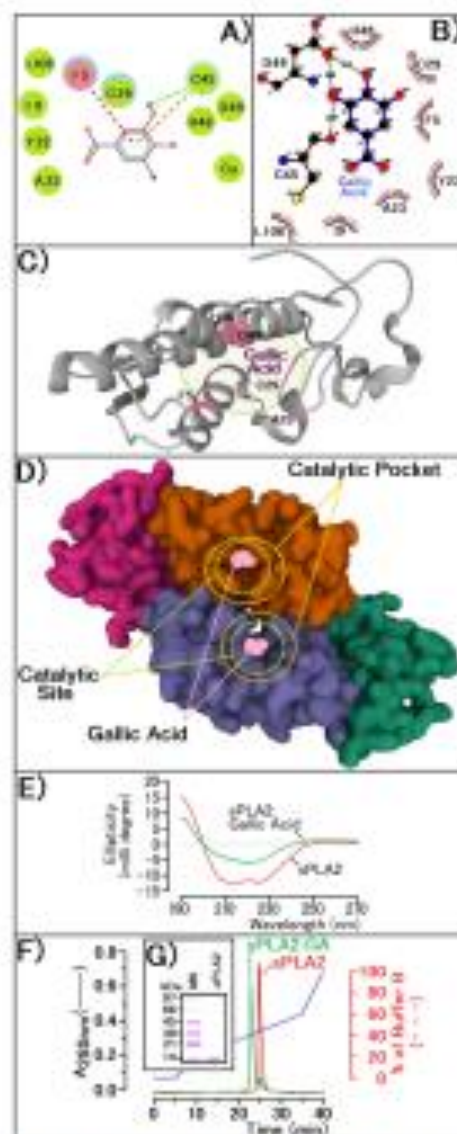


Figure 2. (A,B) show the molecular interaction models of GA with the active site of PLA2 using Discovery and LigProT programs, respectively. The figures exhibit the main groups of the ligand and proteins responsible for the interaction with the active site of sPLA2 from *Crotalus durissus terrificus*. 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 pathophysiological 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 Ca²⁺-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 Drive, 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 Fluorophosphate, MAFF) showed an IC50 of 250 nM and GA showed an IC50 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].

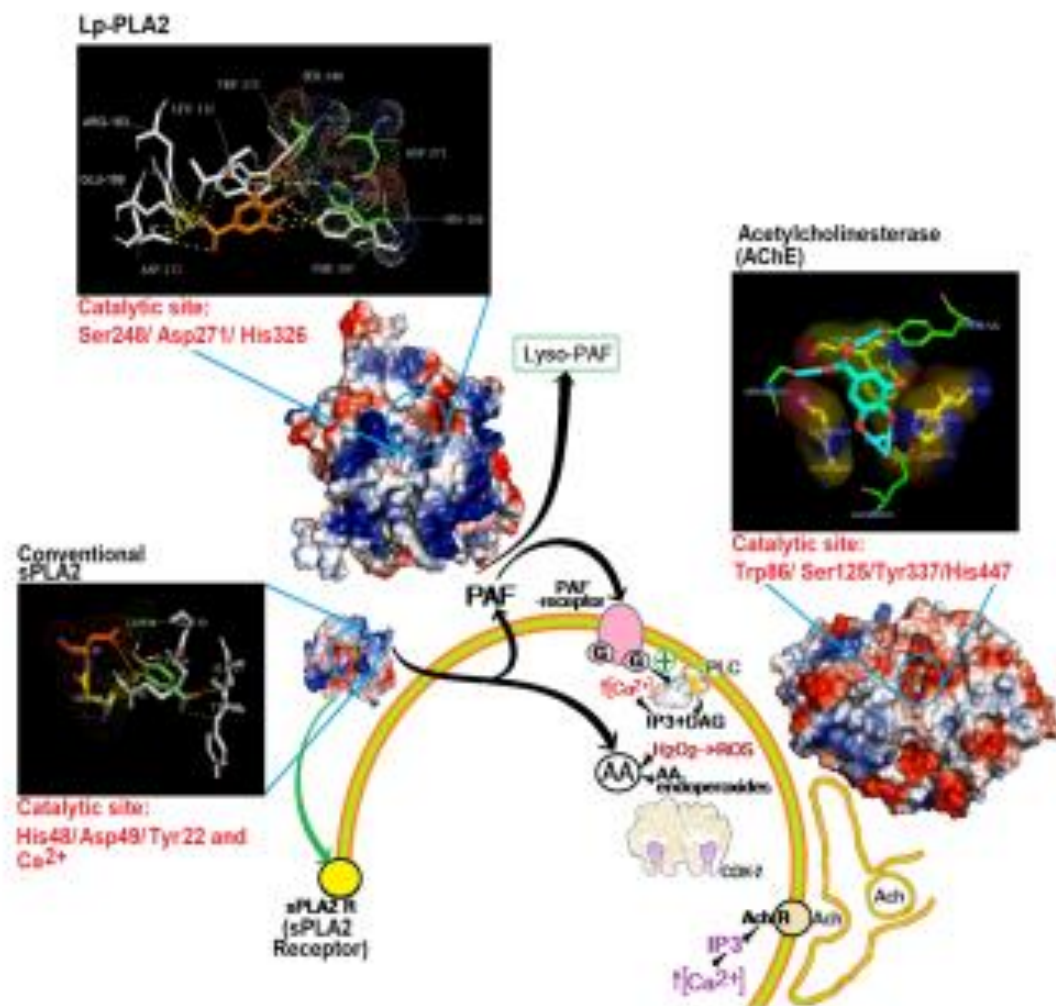


Figure 3. Possible actions of GA that led to increased levels of PAF and AA. The compound interacts with sPLA2 at the active site, binding with essential amino acid residues located in the N-terminal region (P5) and with Histidine (H48) and Aspartic acid (D49). The compound was able to bind with the 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 GA, 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 interleukin (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 PESQ, FAPESP PROC. No. 2017/19942-7/AUXILIO PESQ and FAPESP PROC. No. 2020/03297-8 and Marcos H. Toyama is a researcher PQ2 CNPq (CNPQ 2019 304155/2019-2).

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/IB./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

- 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. [\[CrossRef\]](#)
- Kahkeshani, N.; Farzati, F.; Fotouhi, M.; Alavi, S.S.; Bahramsooliani, R.; Nasiri, R.; Momtaz, S.; Abbasbadi, Z.; Rahimi, R.; Farzati, 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. [\[PubMed\]](#)
- Badhari, B.; Sharma, N.; Kakkas, R. Gallic acid: A versatile antioxidant with promising therapeutic and industrial applications. *Res. Adv.* **2013**, *5*, 27940. [\[CrossRef\]](#)
- 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. [\[CrossRef\]](#)
- Paria, A.; Chaudhari, N.S.; Singh, D.; Kesavan, A.K.; Kaur, S.; Sehgal, S.K. Effect of gallic acid on the larvae of *Spodoptera litura* and its parasitoid *Brachy helioles*. *Sci. Rep.* **2021**, *11*, 531. [\[CrossRef\]](#)
- Lerfant, N.; Hotelier, T.; Bourne, Y.; Manchot, P.; Chabronnet, A. Proteins with an alpha/beta hydrolase fold: Relationships between subfamilies in an ever-growing superfamily. *Chem. Biol. Interact.* **2013**, *203*, 266–268. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Bauer, T.L.; Buchholz, P.C.F.; Fleiss, J. The modular structure of α/β -hydrolases. *FEBS J.* **2020**, *287*, 5. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Samarita, U.; Robinson, B.J. Crystal Structure of Human Plasma Platelet-activating Factor Acetylhydrolase. *J. Biol. Chem.* **2006**, *281*, 31617–31624. [\[CrossRef\]](#)
- 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. [\[CrossRef\]](#)
- Cousin, X.; Hotelier, T.; Giles, K.; Liovin, P.; Toutant, J.P.; Chabronnet, A. The alpha/beta fold family of proteins database and the cholinesterase gene server ESTHER. *Nucleic Acids Res.* **1997**, *25*, 1125–1139. [\[CrossRef\]](#)
- Bourne, 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. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Dosson, A. Phospholipase A2 enzymes: Structural diversity in lipid messenger metabolism. *Structure* **2000**, *8*, R15–R22. [\[CrossRef\]](#)
- Costa, T.R.; Francisco, A.F.; Cardoso, F.F.; Moniza-Dill, 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 *Anacardium humile*. *Int. J. Biol. Macromol.* **2021**, *165*, 494–512. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Karikara, L.A.; Abdullahi, I.; Paulina, G.A. Ethnomedicinal plants: A source of phytochemical compounds against snake venom PLA2s activity. *J. Pharmacogn. Phytochem.* **2020**, *9*, 1270–1275.
- Assunção, P.L.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 Lipid Extracts of *Eugenia uniflora* L. (Myrtaceae) Leaves and Its Ultrasound-Assisted Extraction Optimization. *Evid.-Based Complement. Altern. Med.* **2017**, *2017*, 1–9. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Cotrim, C.A.; de Oliveira, S.C.B.; Ditz Filho, E.B.S.; Fonseca, F.V.; Baldissera, L.; Aritanes, E.; Ximenes, R.M.; Monteiro, H.S.A.; Rabello, M.M.; Hernandes, M.Z.; et al. Quercetin as an inhibitor of snake venom secretory phospholipase A2. *Chem.-Biol. Interact.* **2011**, *189*, 9–16. [\[CrossRef\]](#)
- Toyama, M.H.; Gaeta, H.H.; Pinho, M.V.T.; Ferreira, M.J.P.; Romoff, P.; Mattioli, F.F.; Magno, 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*. *BioMed Res. Int.* **2014**, *2014*, 341270. [\[CrossRef\]](#)
- Samad, N.; Javed, A. Therapeutic Effects of Gallic Acid: Current Scenario. *J. Phytochem. Biotech.* **2019**, *2*, 113.
- Simmons, M.A. Platelet Activating Factor. In *xPharm: The Comprehensive Pharmacology Reference*; NEOLUCOM: Knotsdown, OH, USA, 2007; pp. 1–3.

20. Marathe, G.K.; Chaitra, V.H.; Ko, L.Y.; Chen, C.H. Effect of acyl and alkyl analogs of platelet-activating factor on inflammatory signaling. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* **2020**, *151*, 106478. [\[CrossRef\]](#)
21. Toyama, M.H.; Costa, C.R.C.; Belchior, M.N.; Novais, D.P.; Oliveira, M.A.; Ie, R.; Goeta, H.H.; Toyama, D.O. Edema Induced by sPLA2 from *Crotalus Durissus Terrificus* Involves PLC and PKC Signaling, Activation of sPLA2 and Oxidative Stress. IntechOpen: London, UK, 2019. [\[CrossRef\]](#)
22. Toyama, M.H.; Costa, C.R.C.; Belchior, M.N.; Junior, A.R.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 *Bothrops jarroviensis*. *Preprints* **2021**, 0012. [\[CrossRef\]](#)
23. Teófilo, C.; Fernandes, C.M.; Leitner, E.; Chudzinski-Tavares, 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.; Jancar, S.; Chamma, R. Platelet activating factor receptor antagonists improve the efficacy of experimental chemo- and radiotherapy. *Clínica* **2018**, *73*, e7926. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
25. Liu, G.; Baird, A.W.; Parsons, M.J.; Fan, K.; Skoretti-Byrne, D.A.; Nair, P.M.; Makaryung, S.; Chen, J.; Neal, R.; Giggins, B.J.; et al. Platelet activating factor receptor acts to limit colitis-induced liver inflammation. *JASEP J.* **2020**, *34*, 7718–7732. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
26. Huang, F.; Wang, K.; Shen, J. Lipoprotein-associated phospholipase A2: The story continues. *Med. Res. Rev.* **2020**, *40*, 79–134. [\[CrossRef\]](#)
27. Fang, L.; Pan, Y.; Muzeyka, 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, P.R.S.; Esposito, L.C.M.; Camargo, E.A.; Toyama, M.H.; Marangoni, S.; Ribela, M.T.C.; De Nucci, G.; Arturios, 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. *Toxicol* **2003**, *41*, 825–829. [\[CrossRef\]](#)
29. Sarittim, M.A.; Souza, C.O.S.; Diniz, C.R.A.F.; da Fonseca, V.M.B.; Sousa, L.O.; Peti, A.P.F.; Costa, T.R.; Lourenço, A.G.; Borges, M.C.; Seogi, C.A.; et al. Crotalin-Induced Mice Lung Impairment: Role of Nicotinic Acetylcholine Receptors and COX-Derived Prostanoids. *Biomolecules* **2020**, *10*, 794. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
30. Ranawaka, U.K.; Lallio, D.G.; de Silva, H.J. Neurotoxicity in Snakebite—The Limits of Our Knowledge. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2013**, *7*, e2302. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
31. Kudner, 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. Proteome 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.; Boemo, C.N.; Silva, M.D.S.; Evangelista, J.R.; Pontes, A.S.; da Silva Setúbal, S.; Rego, 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-arginine acid oxidase from *Callisotoma rhodostoma* venoms. *Sci. Rep.* **2020**, *10*, 10976. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
35. Amarevarri, M.; Prasad, N.K.; Kamakrishna, V. COX-2 structural analysis and docking studies with gallic acid structural analogues. *SpringerPlus* **2012**, *1*, 58. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
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. Pharmacother.* **2021**, *133*, 110985. [\[CrossRef\]](#)
37. Chang, K.F. Platelet-Activating Factor. *Encycl. Respir. Med.* **2022**, *22*, 462–473.
38. Attig, A.; Jallé, J.; Hussain, K.; Ahmad, W. Raging the War Against Inflammation with Natural Products. *Front. Pharmacol.* **2018**, *8*, 976. [\[CrossRef\]](#)
39. Britt, R.D., Jr.; Loey, M.L.; Tipple, T.E.; Nellin, L.D.; Rogers, L.K. Lipopolysaccharide-induced cyclooxygenase-2 expression in mouse transformed Cl2a cells. *Cell Physiol. Biochem.* **2012**, *29*, 215–222. [\[CrossRef\]](#)



Evaluation of kaempferol against rattlesnake sPLA2 Edema and myotoxicity.

Marcos Toyama^{1, 2*}, Aíram Roggero^{1, 2}, Laila L. Ferreira De Moraes^{1, 2}, Gustavo A. Fernandes², Caroline R. Costa^{1, 2}, Mariana N. Belchior^{2, 3}, Igor Nicodemo^{2, 1}, 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:
984856

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; Alram 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 H. 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, secretary 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 secretary 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. 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 PQ3 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 MLM1 (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 (Samver 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_0), 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 liter (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 sPLA2 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_0 (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_0 (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.

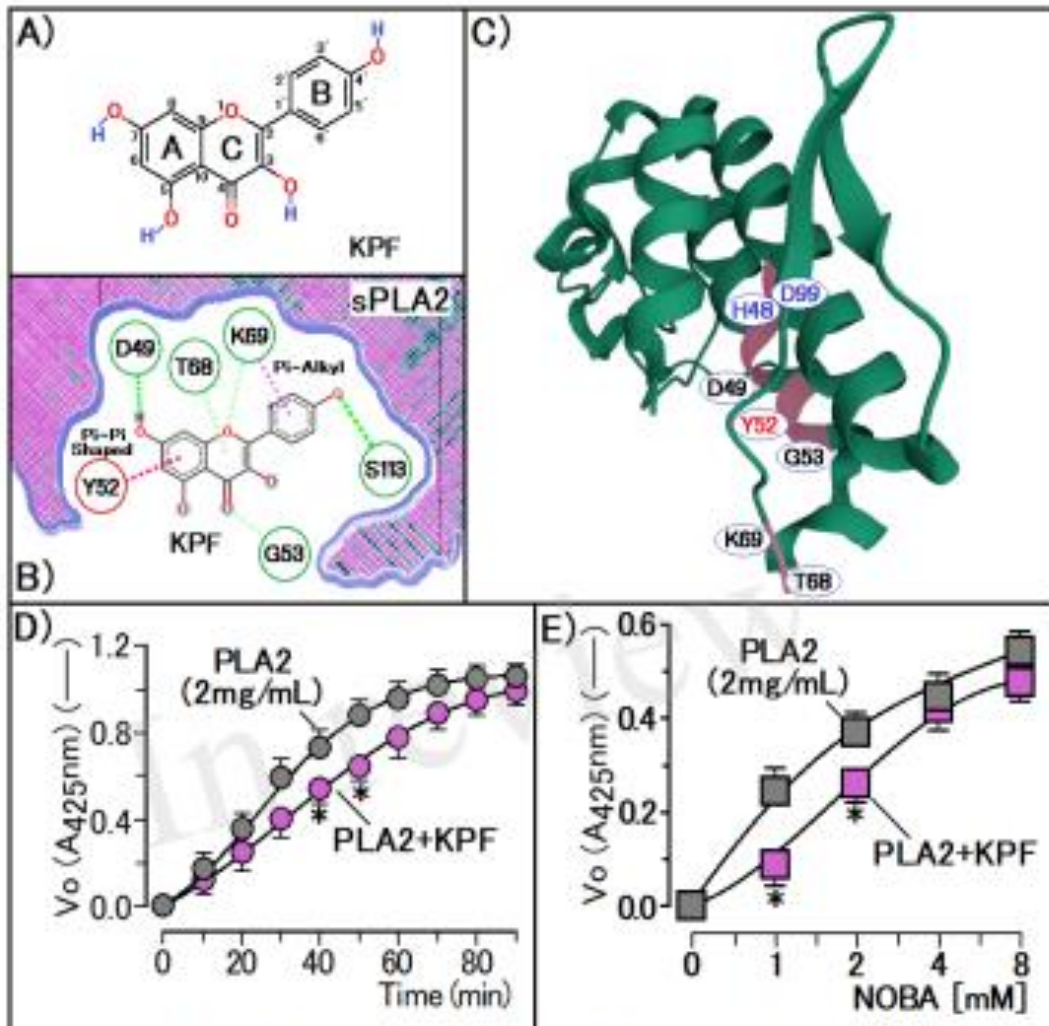


Figure 1: Figure 1A, demonstrate the molecular structure of kaempferol (KPF). In Figure 1B, the results of molecular docking studies of KPF in the cavity of sPLA2 showed the best molecular fit. Figure 1C, shows the molecular docking site of KPF that does not interact with the active site of sPLA2 and 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.

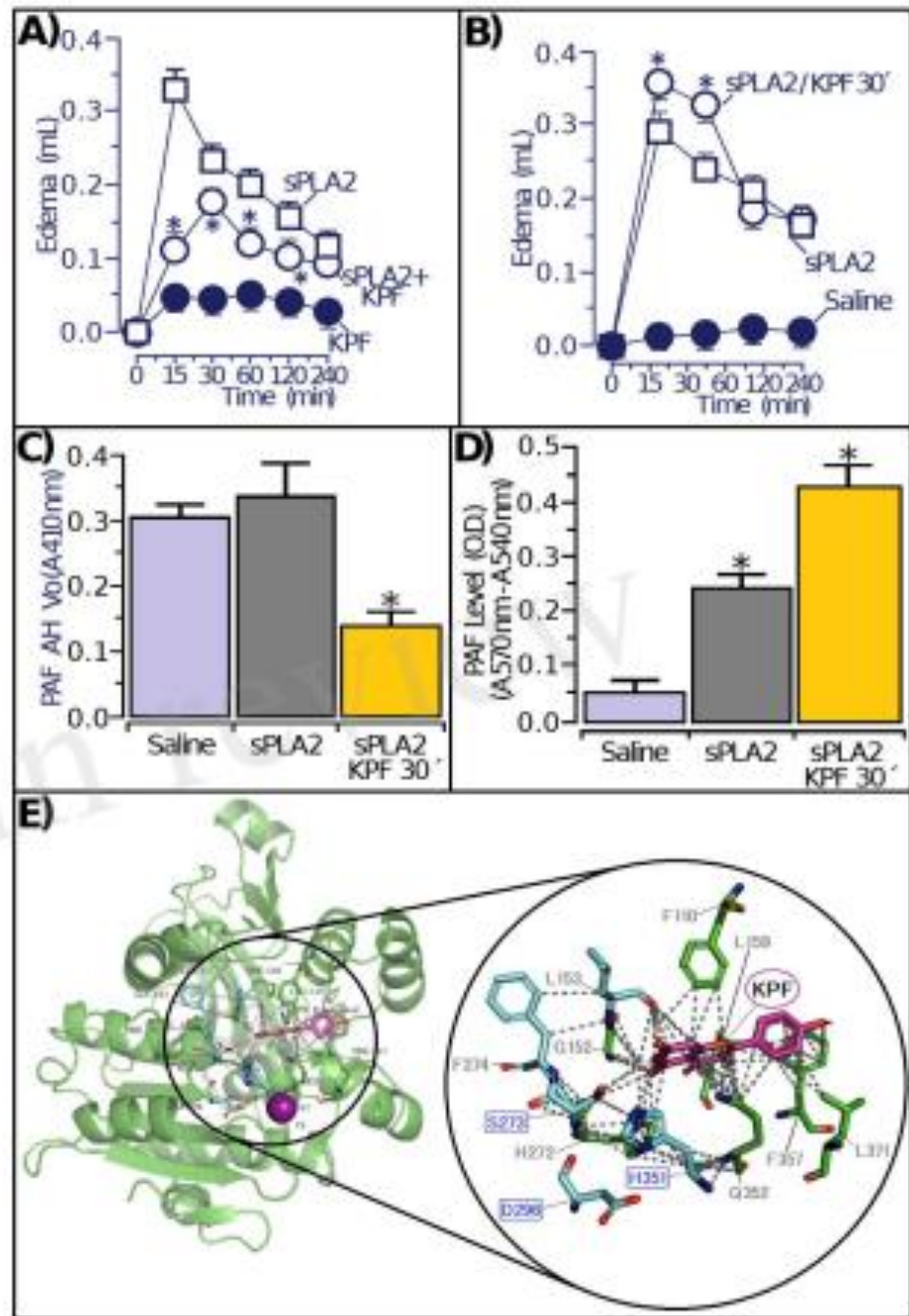


Figure 2. Figure 2A, demonstrate Edema induced by sPLA2 previously incubated with KPF, Figure 2B shows the effect of pre-treatment of KPF 30 minutes before application of sPLA2 ($n = 5$, and $* p < 0.05$). Figure 2C and 2D, shows the activity of the PAF-AH enzyme and the levels of PAF from the animals 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 *Echidna 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.

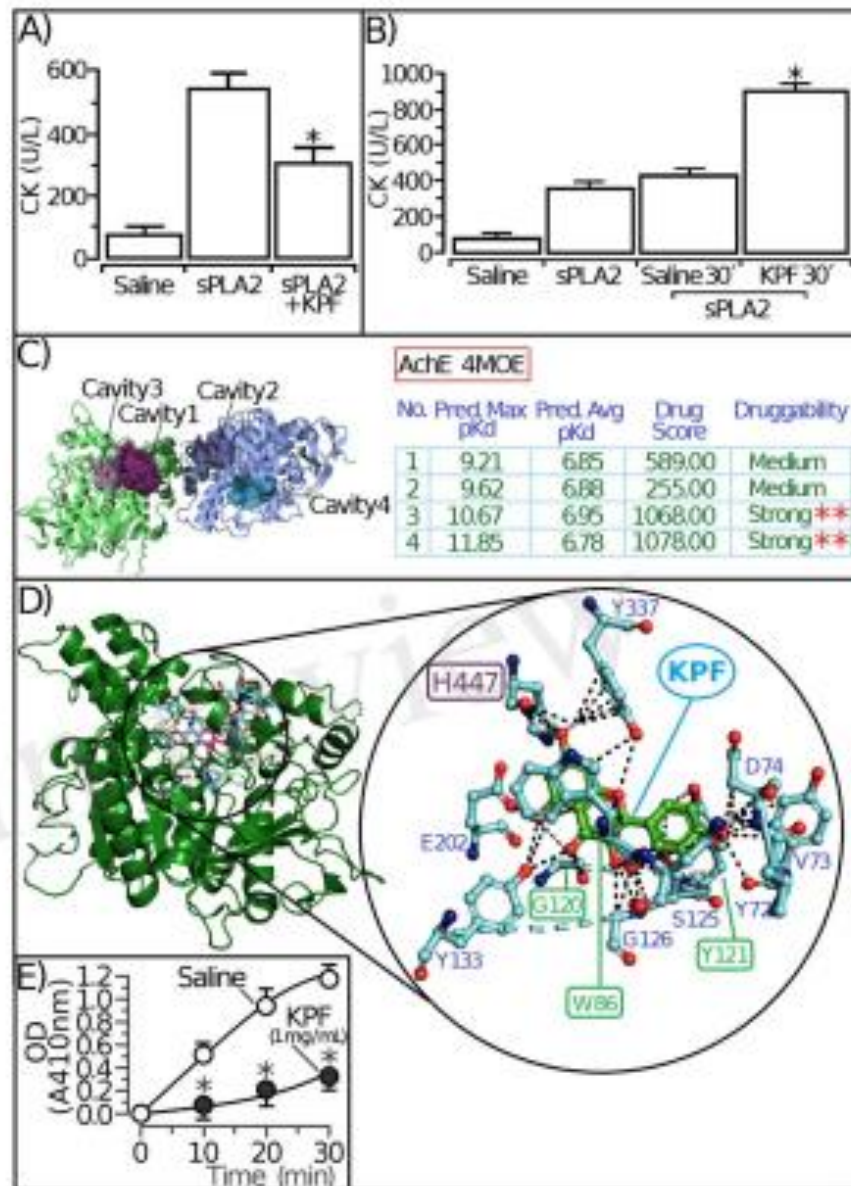


Figure 3. Figure 3A, is show the myotoxic activity of native sPLA2 compared to sPLA2 previously treated with KPF and figure 3B the effect of the previous inoculation of KPF in a group of experimental animals 30 minutes before inoculation of rattlesnake PLA2. Myotoxic effect results from the animal previously 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-Beta 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).

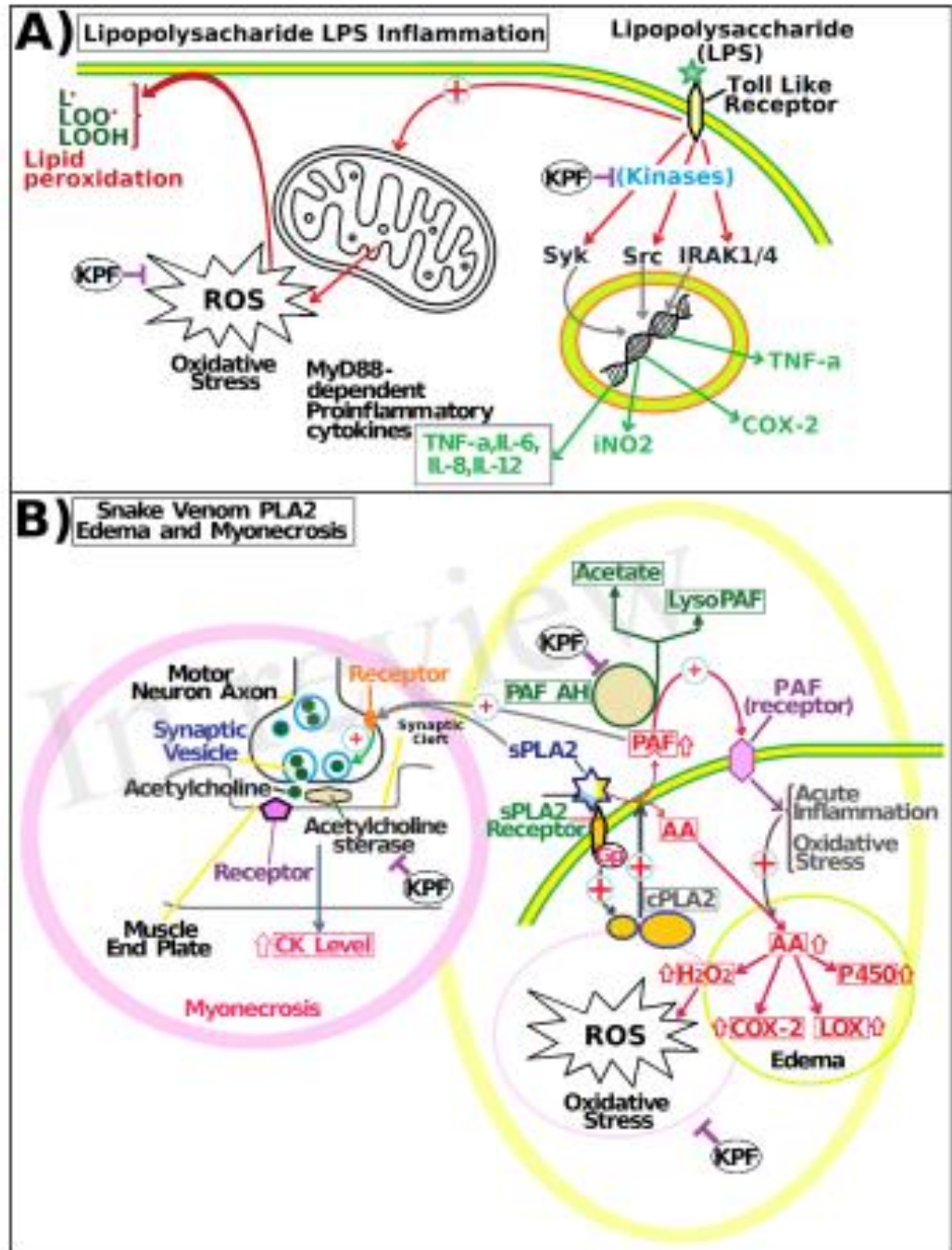


Figure 4. Schematic of the pro-inflammatory action of LPS via activation of kinases and signalling for the activation of various inflammation factors, especially those activated by MyD88 factor and the role of the TOLL-Like receptor, which also stimulates production (Figure 4 A). Figure 4B, proposed 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., Saldías, 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., Diz-Filho, E.B., Fagundes, F.H., Soares, V.C., Aparicio, 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.
- Tamayo, C.I., Romoff, P., Toyama, D.O., Gaeta, H.H., Costa, C.R.C., Belchor, M.N., Orotan, B.D., Velozo, 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.
- Ilyas, U.K., Elayadeth-Meehal, M., Kurumyan, M.S., Quadri, S.A., Rajaseec, 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., Alkan, N. Glycosylated flavonoids: fruit's concealed antifungal arsenal. *New Phytol.* 2020, 225(4), 1788-1798.

Gamiotea-Turro, D., Camaforte, 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., Maisar 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 isoquercitrin. *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.

Cimara, 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., Fernandes, 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 PtTX-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., Santim, 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 Júnior, 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.

Moreira, 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., Adediyi, M.G., Jin, J., Alexander, D.C., Milburn, M.V., Idowu, M., Juneja, H.S., Kellems, R.E., Doulhan, 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 Lysophosphatidylethanolamine 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/>

O'Donnell, 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., Sagirstein, 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.

- Morcina, V., Lomonte, B., Vinolo, M.A., Curi, R., Gutiérrez, J.M., Teixeira, C. An Asp49 phospholipase A2 from snake venom induces cyclooxygenase-2 expression and prostaglandin E2 production via activation of NF- κ B, p38MAPK, and PKC in macrophages. *Mediators Inflamm.* 2014, 2014, 105879. Lomonte, B., Gutiérrez, J.M. Phospholipases A2 from viperidae snake venoms: how do they induce skeletal muscle damage? *Acta Chim Slov.* 2011, 58(4), 647-659.
- Salvador, G.H., Dos Santos, J.I., Lomonte, B., Fontes, M.R. Crystal structure of a phospholipase A2 from *Bothrops asper* venom: Insights into a new putative "myotoxic cluster". *Biochimie.* 2017, 133, 95-102.
- Nogucira, T.C., Ferreira, F., Toyama, M.H., Stoppiglia, L.F., Marangoni, S., Boschero, A.C., Carneiro, E.M. Characterization of the insulinotropic action of a phospholipase A2 isolated from *Crotalus durissus collilineatus* rattlesnake venom on rat pancreatic islets. *Toxicol.* 2005, 45(2), 243-248.
- Beghini, D.G., Damico, D.C., da Cruz-Höfling, M.A., Rodrigues-Simioni, L., Delatorre, M.C., Hyslop, S., Marangoni, S. Ability of rabbit antiserum against crotoxin to neutralize the neurotoxic, myotoxic and phospholipase A2 activities of crotoxin from *Crotalus durissus cascavella* snake venom. *Toxicol In Vitro.* 2008, 22(1), 240-248.
- Brook, G.A., Torres, L.F., Gopalakrishnakone, P., Duchon, L.W. Effects of phospholipase of *Enhydrina schistosa* venom on nerve, motor endplate and muscle of the mouse. *Q J Exp Physiol.* 1987, 72(4), 571-591.
- Gallucci, M., Cavalcante, W.L. Understanding the in vitro neuromuscular activity of snake venom Lys49 phospholipase A2 homologues. *Toxicol.* 2010, 55(1), 1-11.
- Silver, D., Dhue, A., Slocum, M., Adams, J.G. Jr, Shukla, S. Role of platelet-activating factor in skeletal muscle ischemia-reperfusion injury. *Adv Exp Med Biol.* 1996;416:217-21.
- Loucks, E.B., Symersky, P., Qayumi, A.K. Platelet-activating factor antagonism: a new concept in the management of regional myocardial ischemia-reperfusion injury. *J Invest Surg.* 1997, 10(6), 321-338.
- Kim et al., 2015, Noailles et al., 2018, Nair et al., 2019 e Ahmad et al., 2020
- Kim, S.H., Park, J.G., Lee, J., Yang, W.S., Park, G.W., Kim, H.G., Yi, Y.S., Back, K.S., Sung, N.Y., Hossen, M.J., Lee, M.N., Kim, J.H., & Cho, J.Y. The dietary flavonoid Kaempferol mediates anti-inflammatory responses via the Src, Syk, IRAK1, and IRAK4 molecular targets. *Mediators of inflammation*, 2015, 904142.
- Noailles, A., Măneș, V., Campello, L., Lax, P., Cuenca, N. Systemic inflammation induced by lipopolysaccharide aggravates inherited retinal dystrophy. *Cell Death Dis.* 2018, 9(3), 350.
- Nair, S., Sobotka, K.S., Joshi, P., Gressens, P., Fleiss, B., Thornton, C., Mallard, C., Hagberg, H. Lipopolysaccharide-induced alteration of mitochondrial morphology induces a metabolic shift in microglia modulating the inflammatory response in vitro and in vivo. *Glia.* 2019, 67(6):1047-1061.
- Ahmad, A., Wali, A.F., Rehman, M.U., Khan, A., Raish M, Kazi M, Alnemer O, G M Rao P. Therapeutic Potential of *Rhododendron arboreum* Polysaccharides in an Animal Model of Lipopolysaccharide-Inflicted Oxidative Stress and Systemic Inflammation. *Molecules.* 2020 Dec 21;25(24):6045.
- Dos Santos Junior AB, Tamayose CI, Ferreira MJP, Belchor MN, Costa CRC, de Oliveira MA, Toyama MH. Bioaffinity Fishing Procedure Using Secretory Phospholipase A2 for Screening for Bioactive Components: Modulation of Pharmacological Effect Induced by sPLA2 from *Crotalus durissus terrificus* by Hispidalin from *Mesquiteirostrum floribundum*. *Molecules.* 2020 Jan 9;25(2), 282.
- Toyama MH, Rogero A, de Moraes LLF, Fernandes GA, da Cruz Costa CR, Belchor MN, De Carli AM, de Oliveira MA. 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 Feb 6;14(2):368.
- Jeevandara, C., Gomes, L., Udari, S., Pararavitane, S.A., Shyamali, N.L., Ogg, G.S., Malavige, G.N. Secretory phospholipase A2 in the pathogenesis of acute dengue infection. *Immun Inflamm Dis.* 2016, 5(1), 7-15.
- Hammond, J.W., Lu, S.-M., Gelbard, H.A. Platelet Activating Factor Enhances Synaptic Vesicle Exocytosis Via PKC, Elevated Intracellular Calcium, and Modulation of Synapsin 1 Dynamics and Phosphorylation. *Frontiers in Cellular Neuroscience* 2016, 2016.
- Liu, G., Kaneko, M., Yoshioka, K., Ohara, K., Tamaka, Y. Platelet-activating factor (PAF) strongly enhances contractile mechanical activities in guinea pig and mouse urinary bladder. *Sci Rep.* 2022, 12(1):2783.