

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA

CURSO BIOTECNOLOGIA

Estudo comparativo da inibição das atividades proteolítica e fosfolipásica de peçonha  
botrópica por diferentes tipos extratos de *Eichhornia crassipe*.

Clésio José Purcina Junior

Monografia apresentada à coordenação do Curso  
de Biotecnologia, da Universidade Federal de  
Uberlândia, para obtenção do grau de Bacharel em  
Biotecnologia

Uberlândia, MG

Dezembro/2018

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA

CURSO BIOTECNOLOGIA

Estudo comparativo da inibição das atividades proteolítica e fosfolipásica de peçonha  
botrópica por diferentes tipos extratos de *Eichhornia crassipes*

Clésio José Purcina Junior

Prof Dr Fábio Tonissi Moroni

Prof MSc. Edigar Henrique Vaz Dias (Co-orientador)

Monografia apresentada à coordenação do Curso  
de Biotecnologia, da Universidade Federal de  
Uberlândia, para obtenção do grau Bacharel em  
Biotecnologia

Uberlândia, MG

Dezembro/2018

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA

CURSO BIOTECNOLOGIA

Estudo comparativo da inibição das atividades proteolítica e fosfolipásica de peçonha  
botrópica por diferentes tipos extratos de *Eichhornia crassipes*

Clésio José Purcina Junior

Prof Dr Fábio Tonissi Moroni (Orientador)

Prof MSc. Edigar Henrique Vaz Dias (Co-orientador)

Homologado pela coordenação do Curso de

Biotechnology em \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

Prof. Dr. Edigar Silveira Campos

Uberlândia

Dezembro/2018

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA

CURSO BIOTECNOLOGIA

Estudo comparativo da inibição das atividades proteolítica e fosfolipásica de peçonha  
botrópica por diferentes tipos extratos de *Eichhornia crassipes*

Clésio José Purcina Junior

Aprovado pela Banca Examinadora em: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

Nota: \_\_\_\_\_

Prof Dr Fábio Tonissi Moroni  
Presidente da Banca Examinadora

Uberlândia, \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_

## Agradecimentos

Agradeço principalmente meus pais, Aparecida de Fátima Godoi Purcina e Clésio José Purcina, pelo apoio incondicional em toda essa jornada pela faculdade, pela compreensão nos momentos difíceis e pela paciência pelos meus erros no tempo que passei em Uberlândia e em toda minha vida, só tenho que agradecer por serem o porto seguro que são e sempre serão para mim.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Fábio Tonissi Moroni, pela paciência e pela grande ajuda que me proporcionou no último ano, sempre disposto a fazer o que for possível para me ajudar a escrever a monografia e concluir o curso. Nos momentos de dúvida, mostrou-se capaz de ajudar e eu agradeço muito a confiança depositada em mim e neste trabalho.

Ao meu co-orientador, Prof MSc. Edigar Henrique Vaz Dias, Doutoranda Déborah Fernanda da Cunha Pereira e Doutora Mariana Santos Matias, por sempre estarem dispostos a ajudar em qualquer dúvida que tivesse no laboratório. Como também, a Profa. Dra. Carla Cristine Neves Mamede pela orientação inicial nesse trabalho.

Ao Professor Doutor Fábio de Oliveira pela criação da linha de pesquisa “Purificação e caracterização de proteases de peçonhas de serpentes brasileiras” e coordenação do Laboratório de Biologia Celular e Molecular, por mais de vinte anos. Como também agradeço as demais docentes do Departamento de Biofísica do Instituto de Ciências Biomédicas, Professoras Elisângela Rosa Cordeiro, Marina Abadia Ramos e Valeska Barcelos Güzman, bem como a Doutora Danielle Reis Napolitano, técnica administrativa, responsável pelo Laboratório de Biologia Celular e Molecular, por disponibilizarem a estrutura, reagentes e peçonha bruta desse Laboratório para a execução da maioria das análises realizadas nesse estudo.

Ao Prof. Luiz Ricardo Goulart Filho, coordenador Laboratório de Nanobiotecnologia (NANOS), do Instituto de Biotecnologia da UFU, e ao Doutor Mário Machado Martins, por possibilitarem a execução das análises de Cromatografia de Massa.

Aos meus amigos da biotecnologia 11: Asaph Diniz, Camila Verardo, Filipe Naves, João Vitor, Jéssica Pereira, Géssyca Ferreira, Luiza Macedo, Marcos Paulo, Pedro Henrique e Rafael Martins, sem vocês nada disso seria possível.

Ao Professor Doutor Roberto Chang, do Instituto de Química da UFU e a Professora Doutora Anielle Christine Almeida Silva, do Instituto de Física da Universidade Federal do Alagoas, pelo apoio na obtenção dos extratos vegetais e execução das análises de IR.

A Professora Doutora Ann E. Hagerman, da Miami University, pela orientação sobre o método de difusão radial.

Aos acadêmicos do curso de Medicina da UFU, Eustáquio Costa Damsceno Júnior, Pedro Henrique Pereira Maciel e Micaela Lemos Reis, pelo auxílio nas análises de difusão radial.

## Resumo

*Bothrops* é um gênero de serpentes da família Viperidae, popularmente conhecidas como jararacas, jararacuços, urutus e outros. Esses animais são responsáveis por grande parte dos acidentes ofídicos no estado de Minas Gerais e em outras regiões do Brasil. A peçonha destes animais possui dois mecanismos de ação: sistêmico e local. O primeiro, que possui tratamento eficaz pela soroterapia, causa hemorragias por lesões dos vasos sanguíneos e inibição dos fatores de coagulação. Mas, o efeito local ainda não possui terapia específica. Esse é caracterizado por necroses e lesões teciduais devido à atividade proteolítica e fosfolipásica das enzimas presentes na peçonha botrópica. Os taninos são metabólitos secundário das plantas, que possuem capacidade de complexar com proteínas, inativando-as. Logo, extratos ricos em compostos fenólicos são possíveis inibidores enzimáticos. A aguapé (*Eichhornia crassipes*) é uma planta aquática nativa da América do Sul, com distribuição natural nas bacias do Amazonas e do Rio da Prata. Essa possui compostos fenólicos, como o ácido tânico. O objetivo do presente estudo é avaliar a ação inibitória de três tipos de extratos brutos (aquoso, metanólico e etílico) obtidos a partir da raiz de *Eichhornia crassipes*. Para tanto, foram quantificados fenóis totais e taninos nos extratos, realizados ensaios de inibição da atividade proteolítica e fosfolipásica. Como também, os compostos presentes nos extratos foram identificados por meio de cromatografia líquida de alta resolução. Os extratos etílicos e metanólico apresentaram inibições significativas ( $p < 0,05$ ), respectivamente, nas atividades fosfolipásicas e azocaseinolítica. Portanto, esses apresentam potencial aplicação terapêutica contra o envenenamento pela peçonha *Bothrops moojeni*.

Palavras-chave: *Eichhornia crassipe*, *Bothrops moojeni*, Inibição.

## SUMÁRIO

<b>1.0 INTRODUÇÃO</b>	<b>1</b>
1.1. Serpentes e peçonha	1
1.2 Principais enzimas presentes na peçonha <i>Bothrops moojeni</i>	1
1.3 Aguapé ( <i>Eichhornia crassipes</i> )	2
1.4 Taninos	2
1.5 Justificativa	3
1.6 Objetivos	4
1.6.1 Geral:	4
1.6.2 Específicos:	4
<b>2.0 MATERIAL E MÉTODO</b>	<b>4</b>
2.1 Obtenção da <i>E. crassipes</i>	4
2.2 Obtenção da Peçonha Bruta	4
2.3 Preparo dos extratos	4
2.4 Quantificações de fenóis totais nos extratos analisados	5
2.5 Quantificação dos taninos pelo método de difusão radial	5
2.6 Atividade fosfolipásica A2 (ou hemolítica direta)	6
2.7 Atividade proteolítica	6
2.8 Identificações dos compostos dos extratos	7
2.9 Análise por espectroscopia no infravermelho	7
2.10 Análises estatísticas	7
<b>3.0 Resultados</b>	<b>8</b>
3.1 Quantificações dos fenóis totais e taninos	8
3.2 Quantificação dos taninos pelo método de difusão radial	8
3.3 Atividade proteolítica	9
3.4 Atividade fosfolipásica	12
3.4 Cromatografia	13
<b>4.0 Discussão</b>	<b>18</b>
<b>6.0 REFERÊNCIAS</b>	<b>20</b>



## 1.0 INTRODUÇÃO

### 1.1. Serpentes e peçonha

Serpentes são vertebrados, carnívoros, pertencentes ao grupo dos répteis. A *Bothrops moojeni*, conhecida popularmente como caíçara, pertence à família Viperidae. Essas são serpentes de médio porte, podendo chegar até 1,95 m. Esses animais apresentam pupilas verticais, dentição solenóglifa e fosseta loreal (Freitas, 2003). O *habitat* desse animal ocorre em pastagens e ambientes do cerrado, sendo mais comumente encontrada no Sudeste e no centro do Brasil. É responsável por grande parte dos acidentes ofídicos em Minas Gerais (Freitas, 2003; Costa, 2017).

A peçonha das serpentes em modo geral apresenta alta viscosidade e uma grande quantidade de polipeptídios que podem ter atividade enzimática, principalmente as hidrolases como roteinasas, fosfodiesterases e fosfolipases que são enzimas que auxiliam na digestão da serpente (Furtado, 2007). Segundo Mamede et al. 2016, as duas superfamílias fosfolipases A2 e as metaloproteinases possuem papel central nas lesões locais produzidas pela intoxicação botrópica. Essas enzimas estão relacionadas com os sinais e sintomas de edema, mionecrose, dor e hemorragia (Kang et al., 2011, Almeida, 2016).

O mecanismo de ação da peçonha botrópica, nos organismos humano e animal, pode ser dividido em sistêmico e local. O primeiro é hemorrágico, tendo a capacidade de lesionar vasos sanguíneos, ativar fatores de coagulação e interferir na função plaquetária. O segundo causa fortes dores, edemas, sangramentos e principalmente necrose tecidual (Senise, 2014).

Os efeitos sistêmicos da peçonha não apresentam grandes taxas de letalidade, devido a eficácia da soroterapia quando é administrado logo após o acidente. No entanto, os efeitos locais ainda não possuem tratamento específico, consequentemente, oferece riscos de lesões graves. Devido a necrose, existe a possibilidade de o paciente perder a funcionalidade de um de seus membros, ou ter o mesmo amputado. Logo, é necessário desenvolver medicamentos eficientes, de fácil manejo e eficazes para neutralizar os efeitos locais da peçonha botrópica (Almeida, 2016).

### 1.2 Principais enzimas presentes na peçonha *Bothrops moojeni*

As metaloproteinases são proteínas enzimáticas dependentes de íons metálicos zinco, cálcio e magnésio para sua ação catalítica e causa efeitos como hemorragia, edema e necrose, além de

ser a principal enzima associada a lesão tecidual (Gutiérrez et al., 2016). Apresentam diferenciações estruturais e funcionais, sendo divididas em três classes principais de domínios não enzimáticos: P-I, P-II e P-III. Embora estas proteínas sejam conhecidas por causar efeitos hemorrágicos diretos, ainda são capazes de causar necrose por efeitos indiretos, como exemplo a classe P-I que causa eventos hemorrágicos locais discretos ou ausentes, mas causa indiretamente por meio de lesões teciduais e degradação dos fatores de coagulação (Mamede, 2011).

As fosfolipases  $A_2$  ( $PLA_2$ ) são proteínas enzimáticas que catalisam a hidrólise de fosfolipídios e estão presentes em diversas atividades biológicas de mamíferos, porém apenas as  $PLA_2$  presentes na peçonha de serpentes são tóxicas, causando reações inflamatórias e bloqueio de transmissões neuronais (neurotoxinas), neurotoxinas estas que são amplamente estudadas e apresentam grande potencial farmacológico (Kini, 2003).

### 1.3 Aguapé (*Eichhornia crassipes*)

*Eichhornia crassipes* (Mart.) Solms-Laub. (jacinto da água, aguapé; *Pontederiaceae*) é uma espécie macrófita aquática com longas raízes, perene, formadora de tapetes, invasora, pertencente Família *Pontederiaceae*. A espécie tem origem na bacia do Amazonas e distribuição natural nas zonas planas da América do Sul, desde a Venezuela e Colômbia até a bacia do Rio da Prata. Encontra-se dispersa nas regiões tropicais e subtropicais de todos os continentes do globo terrestre (Silva et al., 2015). Devido ao seu intenso crescimento e proliferação extremamente rápida, atualmente, é uma espécie listada pela União Internacional para Conservação da Natureza como uma das 100 espécies invasoras mais perigosas do mundo. Essa planta causa problemas ambientais, econômicos e sociais em várias regiões do mundo, pois limita o tráfego de barcos, natação e pesca. Destaca-se seus impactos nas vias fluviais da África e do Sudeste Asiático (Malik, 2007; Coetzee et al., 2009). Apesar disso, ela é rica em fitocompostos, sendo utilizada na prospecção de vitaminas, ligninas, terpenos e principalmente compostos fenólicos como o ácido tânico (Tyagi, 2017).

### 1.4 Taninos

O ácido tânico (AT) é um composto polifenólico produzido no metabolismo secundário vegetal. Os taninos possuem capacidades antimicrobianas e também inibem mecanismos fagocíticos (Monteiro et.al, 2005). O ácido tânico é encontrado em frutas, vegetais e chás e é amplamente utilizado no setor alimentício como flavorizante, devido a sua característica

adstringente e também possui aplicabilidade medicinal em tratamentos dermatológicos, como queimaduras e inflamações cutâneas (Hertel et.al, 2016). Essa substância também possui grande importância biotecnológica, sendo aplicada na produção de biofilmes, capsulas e películas de revestimento; por sua característica antioxidante (Tse, 2014).

Existem dois métodos principais para quantificar a concentração de taninos em solução: colorimétricos e por difusão radial. O método colorimétrico consiste na reação dos polifenóis com reagentes redox específicos (reagente de Folin-Ciocalteu) para formar um complexo azul que pode ser quantificado por espectrofotometria de luz visível (Lamuela-Raventos, 2018).

Existem dois grupos onde os taninos são classificados: hidrolisáveis e condensados. Os hidrolisáveis são ésteres de ácidos gálicos e ácidos elágicos e formados a partir do chiquimato, enquanto que os taninos condensados são produtos do fenilpropanol que são encontrados mais especificamente no reino vegetal, estes taninos possuem alta diferenciação estrutural devido as diferentes ligações possíveis entre unidades flavânicas (Heldt, 1997). No entanto, a precipitação e ligação proteica utilizando taninos só é possível utilizando um peso molecular grande o suficiente para ocorrer a formação de ligações duradouras e estáveis, porém se o peso molecular for grande demais pode atrapalhar a transferência de moléculas entre os espaços interfibrilares (Monteiro, et.al 2005). Esta ligação entre taninos e proteínas ocorre, por meio de pontes de hidrogênio entre os grupamentos fenólicos presentes na estrutura dos taninos com determinados sítios das proteínas ou pela formação de revestimentos hidrofóbicos ao redor das proteínas (Hagerman et al. 1998, Tse, 2014), formando complexos. No entanto, ambas formas de precipitação podem inibir os mecanismos de ação local da peçonha e neutralizar o envenenamento botrópico. Assim, esses compostos polifenólicos possuem potencial terapêutico para evitar as lesões e consequentemente a perda da função ou a amputação do membro afetado pela picada da serpente. (Senise, 2014).

### **1.5 Justificativa**

*E. crassipes* pode inibir os mecanismos de ação local da peçonha botrópica utilizando compostos taninos e sua alta capacidade de ligação a proteínas, peçonha essa que é a principal causadora dos acidentes ofídicos na região do Triângulo Mineiro, possibilitando o surgimento de novos medicamentos para o tratamento de indivíduos envolvidos em nesse tipo de acidente ofídico.

## 1.6 Objetivos

### 1.6.1 Geral:

Comparar a ação inibitória das enzimas (proteolíticas e fosfolipásicas) presentes na peçonha bruta de *Bothrops moojeni* por três diferentes extratos (etanólico, metanólico e aquoso), obtidos a partir da raiz de *Eichhornia crassipes*.

### 1.6.2 Específicos:

- a) Quantificar os fenóis totais e taninos presentes nos extratos analisados;
- b) Identificar os compostos presentes nos extratos por cromatografia líquida de alta resolução acoplada a espectrofotometria de massa;
- c) Analisar a interação entre compostos de *E. Crassipes* e proteínas de peçonha de *B.Moojeni*

## 2.0 MATERIAL E MÉTODO

### 2.1 Obtenção da *E. crassipes*

Espécimes de *E. crassipes* foram coletas no setor de piscicultura do Parque do Sábia, Uberlândia, MG, e transportadas imediatamente para o Laboratório de Biologia Celular e Molecular dos Instituto de Ciências Biomédicas da UFU. As raízes foram lavadas em água corrente, cortadas do caule, pesadas, secas em estufa a 37 °C por 2 dias, pesadas novamente após a secagem e trituradas.

### 2.2 Obtenção da Peçonha Bruta

A peçonha foi adquirida no serpentário Bioagentes de Batatais – São Paulo. A peçonha foi dessecada a vácuo, em temperatura ambiente, foi preservada a -20° C até o momento do uso.

### 2.3 Preparo dos extratos

Os extratos foram produzidos no Laboratório de Produtos Naturais do Instituto de Química da UFU. Amostras das raízes de secas de *Eichhornia crassipes*, foram trituradas, tamisadas,

pesadas, ressuspensas em água, submetido ao aquecimento a 70 °C com agitação constante por duas horas e, filtradas em papel filtro. O filtrado foi congelado a -20°C e liofilizado até peso constante, obtendo-se o extrato aquoso de aguapé (EAA). Em seguida, o material retido no papel de filtro foi sequencialmente extraído com dois diferentes solventes, sendo respectivamente: 1º) etanol 70 %, 2º) metanol 70%. Na sequência, o material foi concentrado em evaporador rotativo e o resíduo aquoso congelado a -20°C e liofilizado, obtendo-se respectivamente o extrato etanólico de aguapé (EEA) e extrato metanólico de aguapé (EMA).

## **2.4 Quantificações de fenóis totais nos extratos analisados**

Foi utilizado o método Folin-Ciocalteu (FC) para quantificação das reações de oxirredução presentes no extrato segundo Makkar et.al (1993).

Foi construída uma curva padrão com cinco pontos, em triplicata. Ácido Tânico comercial foi dissolvido em água MiliQ numa concentração de 0,1 mg/ml a 0,5mg/ml. Na sequência foi adicionado em cada tudo 1 ml do reagente FC diluído 1:1 e 2 ml da solução de carbonato de sódio 20% ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) e o volume final foi completado para 5 ml com água MiliQ. Após, 30 minutos de incubação no escuro, na temperatura ambiente, foi realizada a medida da absorbância a 760 nm.

## **2.5 Quantificação dos taninos pelo método de difusão radial**

O método de difusão radial consiste em aplicar as soluções a serem analisadas nos poços formados em géis de agarose e observar a formação do complexo tanino-proteína, pela visualização de halos concêntricos aos locais de aplicação. Na sequência, o cálculo da concentração de taninos é feito com base na proporção entre o raio do halo formado nos poços e a quantidade de taninos (Hagerman, 1987). Esse método possui baixo custo e não necessita de equipamentos laboratoriais sofisticados, como espectrofotômetros. No entanto, esse método não possibilita também a distinção da concentração entre taninos condensados e hidrolisados. Por isso, essa determinação precisa ser complementada por métodos colorimétricos.

Foi preparada uma solução 50 mM de ácido acético e 60  $\mu\text{M}$  de ácido ascórbico, sendo o pH ajustado para 5,0 pela adição de NaOH 0,1 N (Hagerman, 1987). O gel foi produzido utilizando agarose (1%, p/v). Subsequentemente a mistura foi homogeneizada durante o aquecimento e depois resfriada a 45°C, adicionando a albumina sérica bovina (0,1%, p/v). O gel foi distribuído em placas de Petri nas quais foram feitos os poços, com o auxílio de um perfurador de 5 mm de diâmetro. As amostras de 30  $\mu\text{L}$  dos extratos da raiz do aguapé foram

aplicadas nos poços com micropipetas. Na sequência, foi determinada a concentração de taninos na amostra pela mensuração das dimensões em centímetros dos halos de precipitação da albumina pelo tanino difundido no gel.

## **2.6 Atividade fosfolipásica A2 (ou hemolítica direta)**

A atividade fosfolipásica foi realizada de acordo com o método de Haberman & Hardt (1972). O gel foi obtido pela adição de 1,5 g de agarose, 125 ml de tampão PBS pH 7.2, 25 µl de azida, 1,25 ml de cloreto de cálcio ( $\text{CaCl}_2$ ) 1,5 ml de gema de ovo (diluída em PBS) e 1,5 ml de eritrócitos. O sangue (600 µl) foi lavado com 500 µl de PBS, centrifugado por 5 minutos a 4000 rpm três vezes, para obtenção dos eritrócitos purificados. A preparação do gel foi feita em banho maria e com auxílio de um termômetro, pois os compostos foram inseridos em determinadas faixas de temperatura. Primeiramente a agarose foi dissolvida no PBS, aquecida e agitada até 80 °C, deixando resfriar até 70 °C. Na sequência, foi acrescentado cloreto de cálcio e resfriado até 55 °C. Em 50°C foi acrescentado a azida sódica e a gema de ovo, resfriando os eritrócitos até 25 °C. Para finalizar, o gel foi transferido a uma placa de petri e conservado em lugar úmido a 37 °C por um dia até o momento das análises.

Na sequência, foi acrescentado nos poços, em triplicata, o ácido tânico, peçonha bruta e completado de tampão PBS. O ácido tânico teve volumes crescentes de 4, 6, 8 e 10 µl com concentração de 10 µg/µl, enquanto que os extratos EEA, EMA e EAA tiveram concentrações de 20 µg/µl e foram aplicados 20 µl em casa poço. Após isso, foi acrescentado 10 µg de peçonha. Como controle positivo foi colocada apenas peçonha bruta e apenas PBS em 3 poços e para controle negativo.

## **2.7 Atividade proteolítica**

A atividade proteolítica foi realizada utilizando o teste azocaseionolítico conforme Gomes et al. (2012), com modificações. Foram pesados 0,605g de Tris e 0,876g de NaCl diluídos em 100ml de água MiliQ, o pH foi ajustado para 6,8 utilizando HCl 3M. O controle negativo foi obtido utilizando 10µg de peçonha bruta de *Bothrops moojeni*, 100µL de tampão Tris e 800µL de azocaseína previamente filtrada. Nos demais eppendorfs foram acrescentadas quantidades crescentes de extrato: 8, 10 e 20 µL de EAA, EEA e EMA, na concentração de 20mg/ml; para o ensaio com ácido tânico foi utilizado a concentração de 10mg/ml onde cada eppendorf possuía 8, 10, 20 e 40 µL da solução. Todos os tubos foram deixados no banho seco a 37 °C por uma hora, depois foi acrescentado o ácido tricloro acético (TCA) para precipitar as

proteínas. Na sequência, as amostras foram centrifugas por 10 min a 10000g. O sobrenadante foi coletado e lido no espectrofotômetro, a 405 nm (Cada 0,01 de absorbância medida significa 1 unidade de atividade proteolítica).

## **2.8 Identificações dos compostos dos extratos**

As análises de cromatografia líquida de alta eficiência hifenado ao espectrômetro de massas (CLAE/EM), realizadas no Laboratório de Nanobiotecnologia do Instituto de Biotecnologia da Universidade Federal de Uberlândia (IBTEC-UFU) em um CLAE (marca Agilent modelo Infinity 1260) hifenado ao espectrômetro de massas de alta resolução do tipo Q-TOF da marca Agilent® modelo 6520 B com fonte de ionização por electrospray (IES). Os parâmetros cromatográficos foram: coluna Agilent modelo Poroshell, 3 mm de diâmetro interno, 10 cm de comprimento, partículas de 2,7  $\mu\text{m}$ , a fase móvel: água acidificada com ácido fórmico (0,1% vv-1) (A) e metanol (B), com o gradiente: 10% de B (0 min), 98% de B (0-10 min); 100% de B (10-17 min). Os parâmetros de ionização foram: pressão do nebulizador de 20 psi, gás secante a 8L/min a uma temperatura de 220 °C e no capilar foi aplicado uma energia de 4,5KV.

A identificação foi realizada levando em consideração a massa de alta resolução e o EM/EM comparada com a literatura.

## **2.9 Análise por espectroscopia no infravermelho**

As determinações dos espectros de infravermelho das amostras foram realizadas no Centro de pesquisa em Biomecânica, Biomateriais e Biologia Celular (CPBio) da Faculdade de Odontologia da UFU. Os dados foram obtidos à temperatura ambiente usando um Espectrofotômetro Shimadzu Fourier Transform IR (FT-IR) (Vertex 70, Bruker Optik) na faixa espectral de 440 a 2000  $\text{cm}^{-1}$  por meio de um elemento de refletância acoplado (ATR) com resolução de 2  $\text{cm}^{-1}$ , segundo Matias et al. (2017).

## **2.10 Análises estatísticas**

Todas as determinações de compostos fenólicos foram feitas em triplicata. As médias dos resultados obtidos foram analisadas por ANOVA (a priori), teste Tukey (a posteriori) e Bonferroni, sendo  $p \leq 0,05$ .

### 3.0 Resultados

#### 3.1 Quantificações dos fenóis totais e taninos

Os resultados obtidos demonstram que os extratos apresentaram compostos fenólicos. Houve alta correlação entre a concentração de ácido tânico e a absorvância determinada na curva padrão. Não houve diferença significativa na quantidade de fenóis totais expressos em padrão de ácido tânico, entre os três tipos de extratos analisados, conforme demonstrado pela curva de calibração e amostras quantificadas, representadas pela tabela 1.

Tabela 1: Diferenças de concentração de fenóis totais, expressos em padrão de ácido tânico, entre os extratos etanólico, metanólico e aquoso da raiz do aguapé (*Eichhornia crassipe*), respectivamente representado pelas siglas EEA, EMA e EAA. Cada valor representa a média  $\pm$  desvio padrão (n=3).

Extratos	Média das concentrações em miligramas
EEA	$0.248 \pm 3 \cdot 10^{-7}$
EMA	$0.246 \pm 3 \cdot 10^{-7}$
EAA	$0.247 \pm 3 \cdot 10^{-7}$

#### 3.2 Quantificação dos taninos pelo método de difusão radial

Em relação a análise de difusão radial, verificou-se que as amostras não formaram halos, conforme expresso na Figura 1, indicando que não houve a formação de complexos taninos-albumina em todos os três tipos de extratos testados, a não ser nos controles positivos.

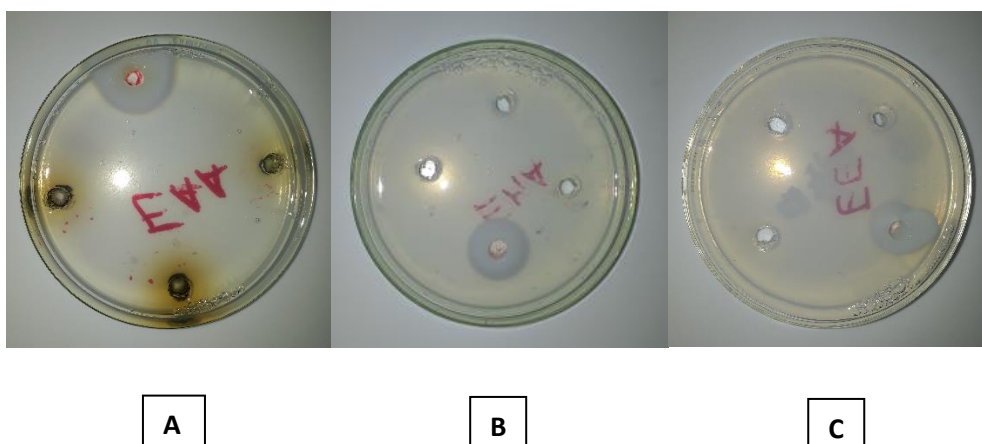




Figura 1: Ensaio de difusão radial das amostras de ácido tânico, entre os extratos aquoso (EAA), metanólico (EMA) e etanólico (EEA) da raiz do aguapé (*Eichhornia crassipe*), respectivamente sendo: A) EAA; B) EMA e C) EEA. Como controle positivo (poços com halos brancos), foram aplicados 30  $\mu$ L de ácido tânico (0,1g/ml) por poço.

### 3.3 Atividade proteolítica

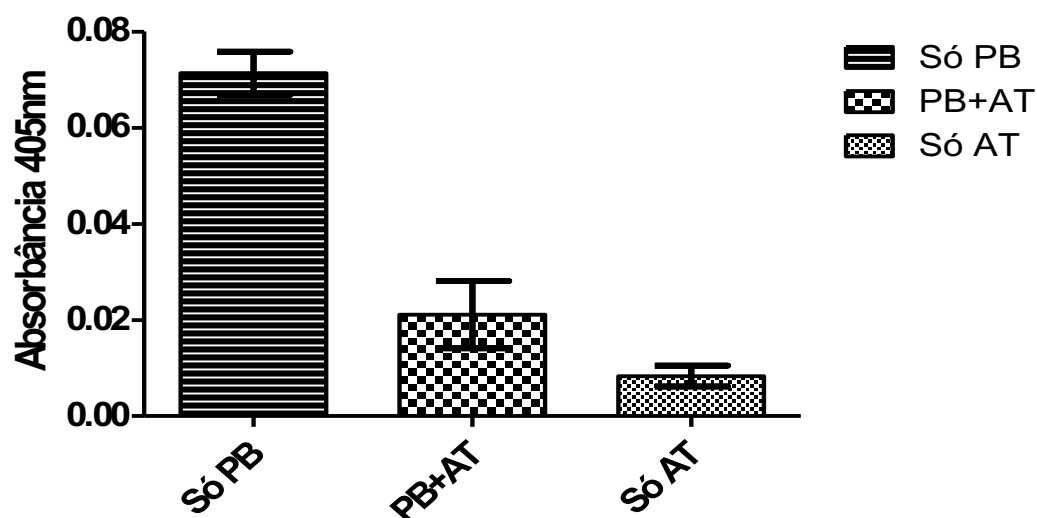


Figura 2: Análise da inibição da atividade azocaseínolítica de 10  $\mu$ L peçonha bruta (PB) e ácido tânico (AT) de *Bothrops moojeni*, pré-incubada com 8  $\mu$ L de ácido tânico (AT), 01 hora, 37°C, mensuradas por espectrofotometria em 405 nanômetros.

Tabela 2: Análise da inibição da atividade azocaseínolítica em diferentes proporções entre peçonha bruta (PB) de *Bothrops moojeni* pelo ácido tânico (AT), pré-incubada com 8  $\mu$ L de ácido tânico (AT), 01 hora, 37°C, mensuradas por espectrofotometria em 405 nanômetros. \* = ( $p < 0,05$ ) ANOVA e Turkey.

Proporção (AT: peçonha bruta)	Absorbância média 405nm		
	PB	AT + PB	Apenas AT
0,8:1	-	0.028*	-
1:1	0.071	0.037*	-
2:1	-	0.008*	-
4:1	-	0.010*	0.008

O ácido tânico inibiu significativamente a atividade proteolítica. Conforme demonstrado na figura 2, os tubos com maiores concentrações de AC (ácido tânico) apresentaram apenas 1

unidade de atividade, indicando inibição de aproximadamente 85% da ação proteolítica da peçonha bruta.

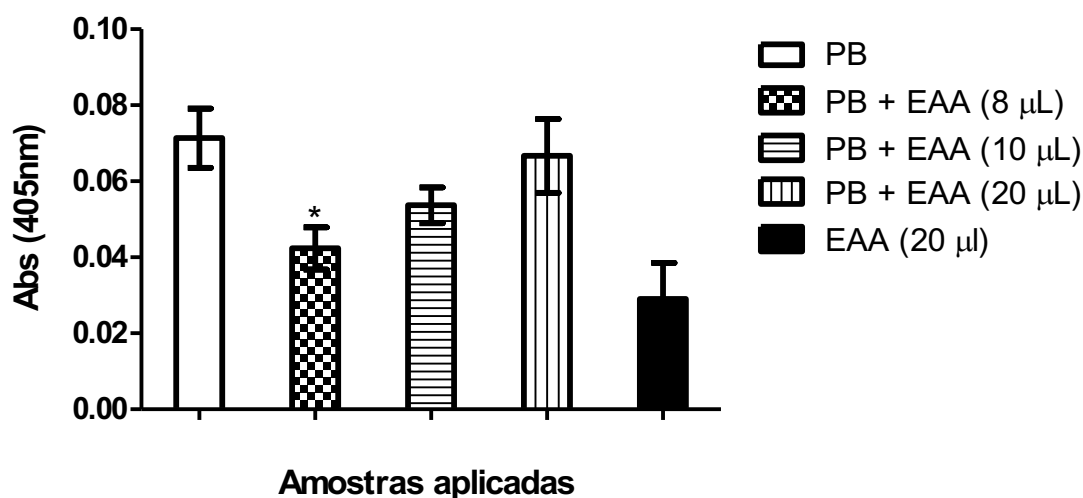


Figura 3: Análise da inibição da atividade azocaseínolítica entre 10 µL de peçonha bruta (PB) de *Bothrops moojeni*, pré-incubada, 01 hora, 37°C, com 8, 10, 20 µL de extrato aquoso da raiz do aguapé (EAA), mensuradas por espectrofotometria em 405 nanômetros. \* = (p<0,05) ANOVA e Turkey.

Tabela 3: Análise da inibição da atividade azocaseínolítica em diferentes proporções entre peçonha bruta (PB) de *Bothrops moojeni* e extrato aquoso da raiz do aguapé (EAA), pré-incubadas, 01 hora, 37°C, mensuradas por espectrofotometria em 405 nanômetros. \* = (p<0,05) ANOVA e Turkey.

Proporção (EAA: peçonha bruta)	Absorbância média 405nm		
	PB	EAA + PB	Apenas EAA
0,8:1	-	0.042*	-
1:1	0.071	0.053	-
2:1	-	0.066	0.029

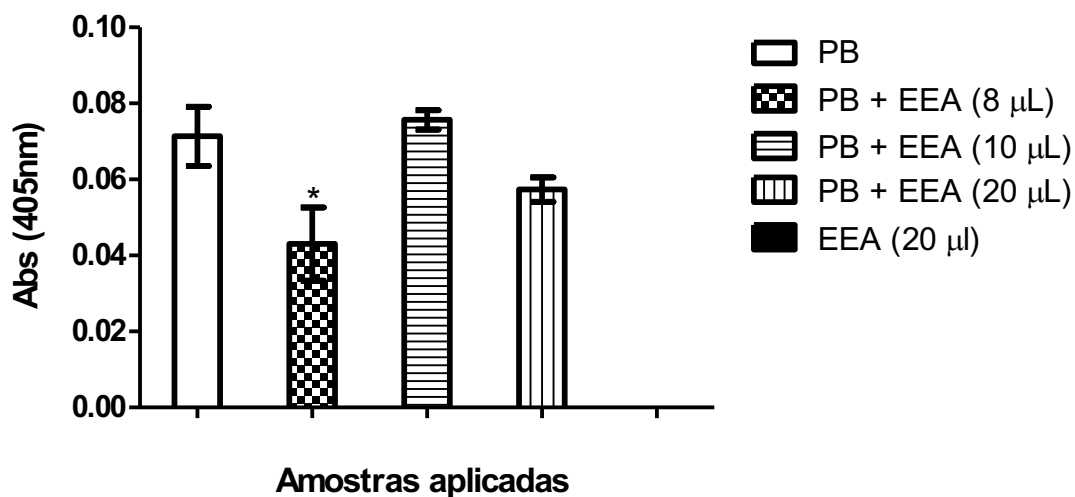


Figura 4: Análise da inibição da atividade azocaseínolítica entre 10 µL de peçonha bruta (PB) de *Bothrops moojeni*, pré-incubada, 01 hora, 37°C, com 8, 10, 20 µL de extrato etanólico da raiz do aguapé (EEA), mensuradas por espectrofotometria em 405 nanômetros. \* = ( $p < 0,05$ ) ANOVA e Turkey.

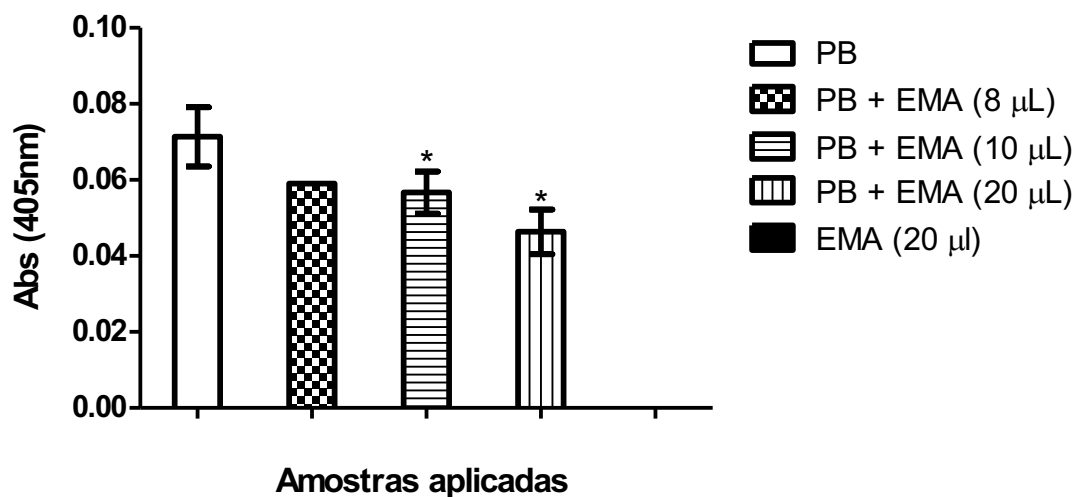


Figura 5: Análise da inibição da atividade azocaseínolítica entre 10 µL de peçonha bruta (PB) de *Bothrops moojeni*, pré-incubada, 01 hora, 37°C, com 8, 10, 20 µL de extrato metanólico da raiz do aguapé (EMA), mensuradas por espectrofotometria em 405 nanômetros. \* = ( $p < 0,05$ ) ANOVA e Turkey.

### 3.4 Atividade fosfolipásica

Os dados obtidos na atividade fosfolipásica estão descritos na Figura 6.

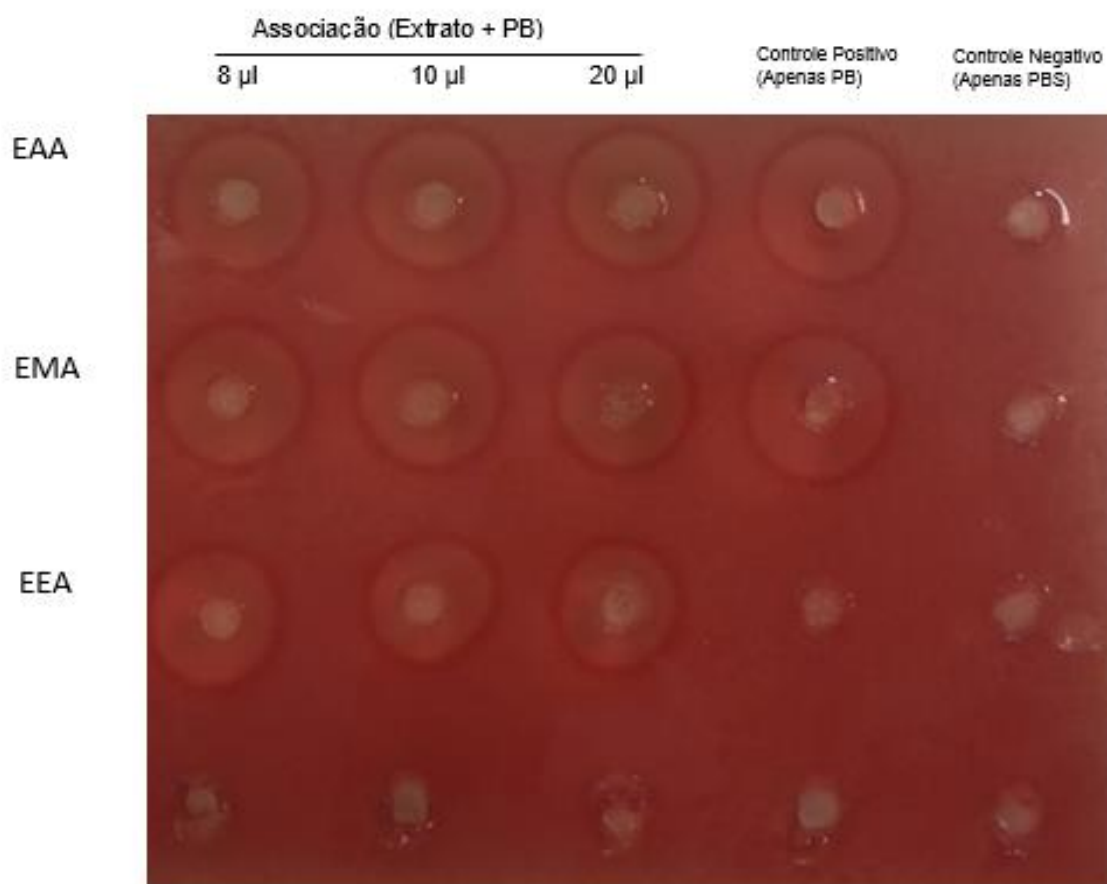


Figura 6: Análise da inibição da atividade fosfolipásica em gel de agarose, copolimerizado com sangue, sendo aplicado em cada poço 10 µL com 10µg peçonha bruta (PB) de *Bothrops moojeni* pré-incubada, 01 hora, 37°C, com 8, 10, 20 µL de dos extratos aquoso (EAA), metanólico (EMA) e etanólico (EEA) da raiz do aguapé (*Eichhornia crassipe*). Como controle positivo e negativo foram, respectivamente, utilizados apenas peçonha bruta (PB) de *B. moojeni* e PBS.

Nesse ensaio, houve a formação uniformes nos poços contendo peçonha bruta. Ocorreu inibição significativa da fosfolipase presente na peçonha de *Bothrops moojeni* apenas quando a mesma foi incubada com os extratos etanólico da raiz do aguapé (EEA). A Tabela 4 representa o tamanho dos halos, em centímetros.

Tabela 4: Análise da inibição da atividade fosfolipásica comparando o diâmetro dos halos formados em gel de agarose, copolimerizado com sangue, sendo aplicado em cada poço 10 µL peçonha bruta (PB) de *Bothrops moojeni* pré-incubada, 01 hora, 37°C, com 8, 10, 20 µL de dos extratos aquoso (EAA), metanólico (EMA) e etanólico (EEA) da raiz de aguapé (*Eichhornia crassipe*). Como controle positivo e negativo foram, respectivamente, utilizados apenas peçonha bruta (PB) de *B. moojeni* e PBS. \*= inibição significativa pelo teste ANOVA one-way com pós teste de Bonferroni ( $p < 0.05$ ).

Extratos	Diâmetro dos halos formados (centímetros)					
	8 µL	10 µL	20 µL	Tamanho do poço	Média extratos	Média PB
EAA	2.5	2.5	2.4	0.8	1.66	-
EMA	2.5	2.6	2.3	0.8	1.66	-
EEA	2.4	2.2	2.1	0.8	1.43*	-
PB	2.8	2.7	2.5	0.8	-	1.66

### 3.4 Cromatografia

A análise dos compostos presentes na aguapé foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência utilizando a ionização por eletrospray (ESI), os compostos foram bombardeados por íons positivos ou negativos no intuito de quebrá-los em partes menores, essas partes foram analisadas pelo espectrofotômetro de massa e os resultados pesquisados na literatura, no intuito de identificar os compostos presentes.

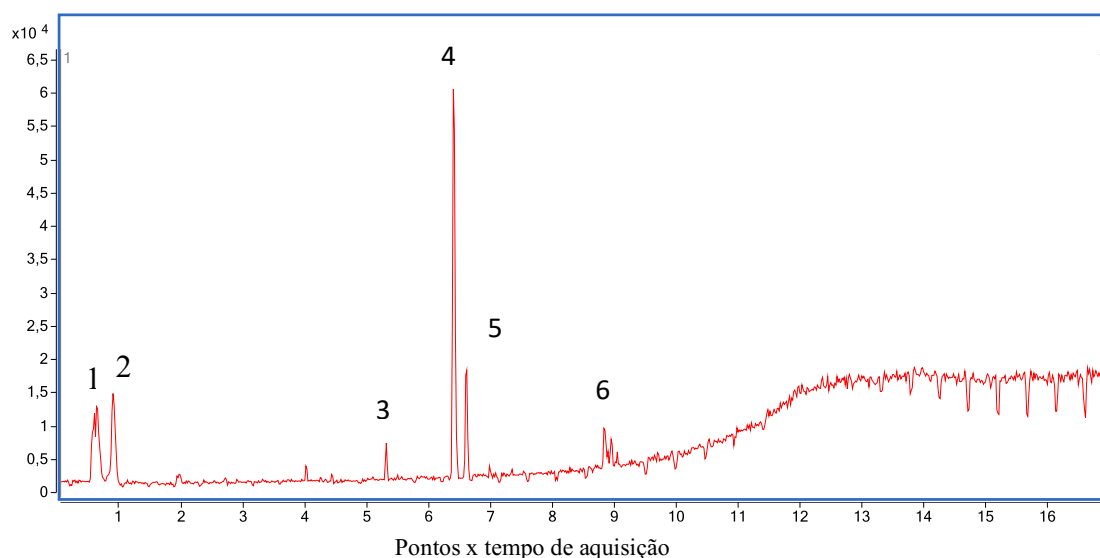


Figura 7: Cromatograma de massa contendo x tempo de retenção mostrando 6 picos atribuídos e um composto de carga negativa do extrato aquoso  $[M-H]^-$ .

Tabela 4: Identificação do tempo de retenção, massa experimental, massa teórica, erro em PPM (partes por milhão), massas resultantes após o spray de ionização, nome do composto e referência utilizada para esta identificação, respectivamente para cada um dos pontos presentes na Figura 7.

TR	M-H (exp.)	M-H (teórico)	$\Delta_m$	EM/EM	Nome	Referência	Pico
0,67	131,0461	131,0462	0,76	114; 113	L-Asparagina	Metlin	1
0,91	117,0191	-	-	108;106	NI	-	2
5,32	173,0811	173,0819	4,62		Ácido subérico	Metlin	3
6,42	187,0972	187,0976	2,13	125	Ácido nonadecanóico	Metlin	4
6,70	173,1187	173,1183	2,31	127	Metil-4-butil butanoato	Rodriguez Perez	5
8,83	329,2332	-	-	283	NI	-	6

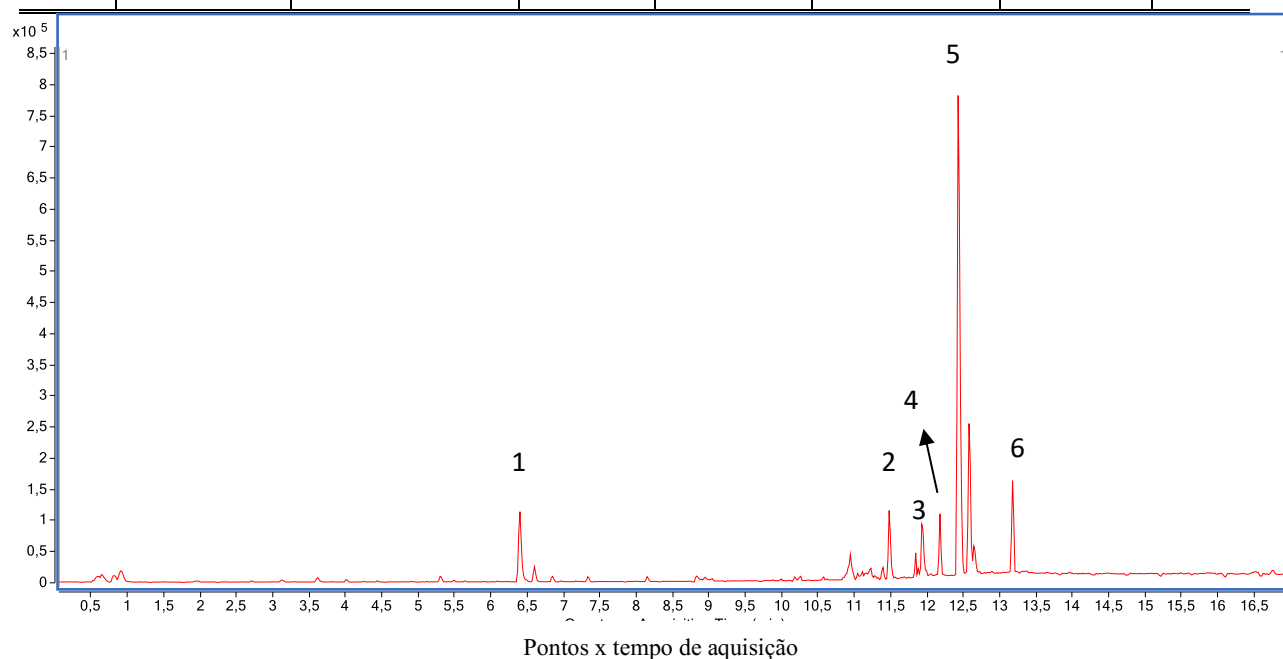


Figura 8: Cromatograma de massa contendo x tempo de retenção mostrando 6 picos atribuídos e um composto de carga negativa do extrato etílico  $[M-H]^-$ .

Tabela 5: Identificação do tempo de retenção, massa experimental, massa teórica, erro em PPM (partes por milhão), massas resultantes após o spray de ionização, nome do composto e referência utilizada para esta identificação, respectivamente para cada um dos pontos presentes na Figura 8.

TR	M-H (exp)	M-H (teórico)	$\Delta_m$	EM/EM	Nome	Referência	Pico
6,40	187,0972	187,0976	2.13	125	Ácido nonadecanóico	Metlin	1
11.57	299.2590	-	-	297	-	NI	2
11,99	271.2279	271.2279	0	225	Ácido 2-hidroxihexadecanóico	Metlin	3
12.22	279.2330	279.2330	0	261	Ácido linoleico	Metlin	4
12.59	255.2333	255.2330	1.17	237	Ácido palmítico	Metlin	5
13.18	283.2642	283.2643	0.35	-	Ácido esteárico	Metlin	6

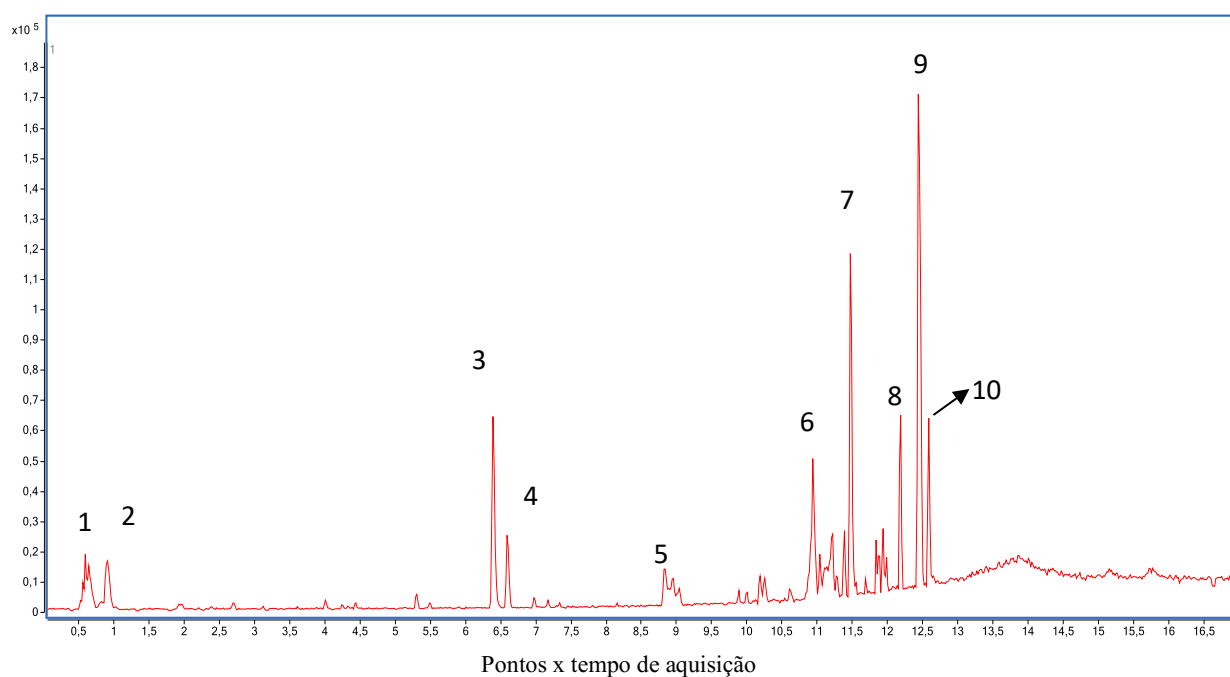


Figura 9: Cromatograma de massa contendo x tempo de retenção mostrando 6 picos atribuídos e um composto de carga negativa do extrato metílico  $[M-H]^-$ .

Tabela 6: Identificação do tempo de retenção, massa experimental, massa teórica, erro em PPM (partes por milhão), massas resultantes após o spray de ionização, nome do composto e referência utilizada para esta identificação, respectivamente para cada um dos pontos presentes na Figura 8.

TR	M-H (exp)	M-H (teórico)	$\Delta_m$	EM/EM	Nome	Referência	Pico
0,67	131.0461	131.0462	0.76	114;113	L-Asparagina	Metlin	1
0,91	117.0191	-	-	108;106	NI	-	2
6,42	187.0969	187.0976	3.74	125	Ácido Nonadecanóico	Metlin	3
6,59	173.1187	173.1183	2.31	127	Metil-4-butil butanoato	Rodriguez Perez	4
8,82	329.2332	329.2333	-	311;293; 299;183;171; 155;127	Ácido trihidroxioctadecanóico	Agalar	5
10.94	295.2276	-	1.1	277;171	Hydroxyoctadecadienoic acid	Metlin	6
11.47	299.2591	-	-	281;253;241	NI	-	7
12.18	279.2328	279.2330	0.71	261	Ácido linoleico	Metlin	8
12.43	255.2339	-	-	215;114	NI	-	9
12.58	281.2485	-	-	179	NI	-	10

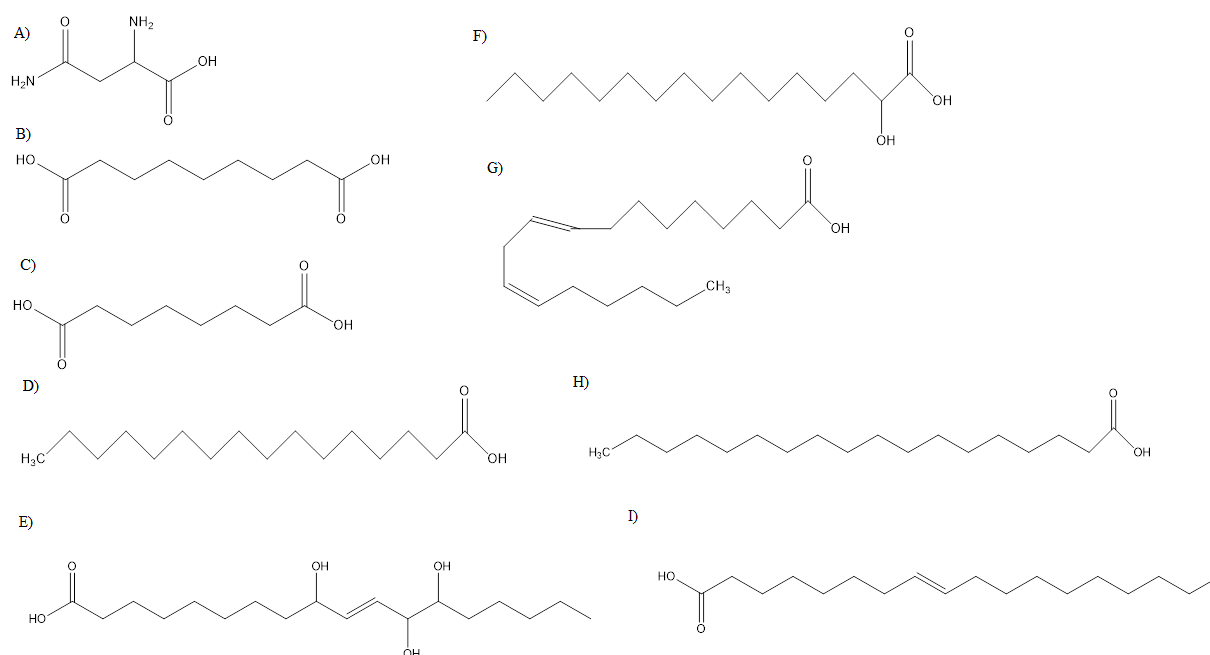


Figura 10: Estrutura química dos compostos identificados através da cromatografia presentes nas figuras 7, 8 e 9. A) L-asparagina; B) ácido nonadecanóico; C) Ácido subérico; D) Ácido palmítico; E) Ácido trihidroxi-octadecanóico; F) Ácido 2-hidroxi-hexadecanóico; G) Ácido linoleico; H) Ácido palmítico I) Ácido oleico.



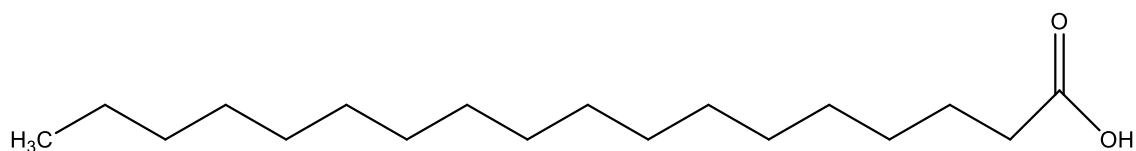


Figura 11: ácido esteárico.

### 3.5 Espectroscopia no infravermelho

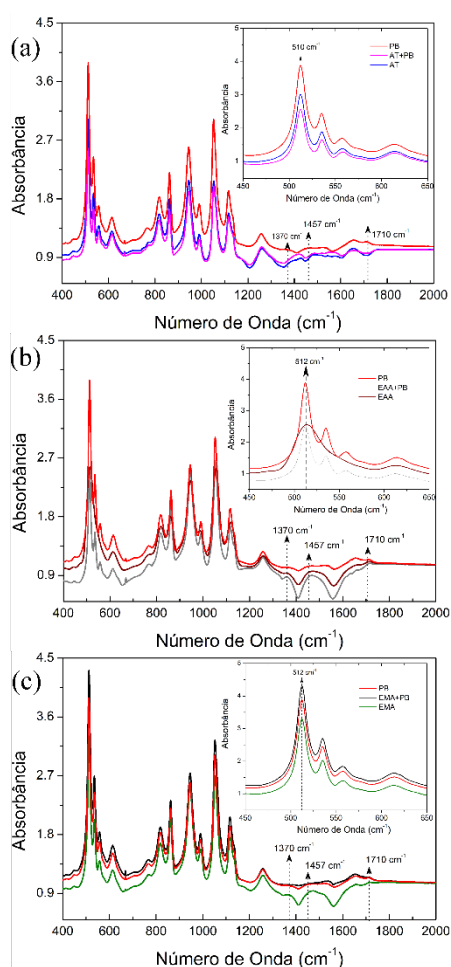


Figura 12. Espectros de Infravermelho das amostras (a) PB, AT+PB, AT, (b) PB, EAA+PB, EAA, (c) PB, EMA+PB, EMA.

A Figura 12 representa os espectros de infravermelho (IR) das amostras PB, AT, EAA, EMA e misturadas com PB. Na Figura 12 (a) mostra os espectros de IR das amostras PB, AT e AT+PB e AC em que se observa bandas de absorção correspondentes aos modos vibracionais

dos componentes das amostras. Em destaque, as bandas  $1370$  e  $1457\text{ cm}^{-1}$  observa-se apenas na amostra PB, verificando sua ausência na mistura. Essas bandas são correspondentes aos modos vibracionais das ligações  $\text{CH}_3$  e  $\text{CH}_2$ . Em adição, verifica a presença da banda  $1560\text{ cm}^{-1}$  e a uma supressão da banda  $1710\text{ cm}^{-1}$  na amostra mistura, estando correlacionadas, respectivamente a ligação N-H flexão no plano e lipídios ésteres.

Portanto, com base nesses resultados dá indícios de que o extrato AT interage nos sítios CH e lipídeos presentes no PB bem como forma ligações N-H. Na mistura EAA+PB (Figura 12 b) e EMA+PB (Figura 12 c) não foi observado a banda em torno de  $1560\text{ cm}^{-1}$  confirmando que a interação não ocorreu formação da ligação N-H entre a proteína e o extrato. Contudo, os extratos EAA e EMA interagem com PB via lipídeos e nas ligações C-H da proteína PB.

#### 4.0 Discussão

Os dados obtidos na análise de fenóis totais e taninos não corroboram a análise fitoquímica realizada por Haggag et al. (2017) nesse trabalho, os autores afirmam que os extratos metanólicos de *Eichhornia crassipes* contem taninos. Por isso, pode-se inferir que talvez outros compostos fenólicos foram detectados por esse método colorimétrico. Uma explicação possível para esses dados pode ser a variação sazonal na produção de taninos por essas plantas, como ocorre com outras espécies vegetais como o Alecrim-do-campo (*Baccharis dracunculifolia*). Espírito-Santo et al. (1999), determinaram taninos em amostras dessa espécie coletadas no cerrado mineiro, e não constatarem a presença desses compostos no período de julho a outubro. No entanto, os valores de compostos fenólicos são relativamente maiores aos encontrados por Vasu et al. (2009) em extratos metanólicos de *E. crassipes*, com também por Tyagi and Agarwal (2017) em raízes de aguapé da Índia.

O ácido tânico apresentou forte inibição no teste proteolítico da azocaseína. A peçonha bruta incubada com de  $40\text{ }\mu\text{L}$  de uma solução de ácido tânico  $10\text{ mg/ml}$  apresentou apenas 1 unidade de atividade proteolítica. No entanto,  $20\text{ }\mu\text{L}$  da mesma solução também apresentou média de 1 unidade. Logo, pode-se inferir que a relação 2:1 de ácido tânico pra peçonha é suficiente para inibi-la quase que completamente a degradação de azocaseína pela PB. De acordo com Ozdal et al. (2013), compostos fenólicos são excelentes doadores de hidrogênio e com isso são capazes de formar ligações de hidrogênio com o grupo carboxila das proteínas, fazendo com que o sítio catalítico da enzima perca afinidade pelo substrato.

Fernandes et al. (2011) descreveram a atividade antiofídica de extratos metanólicos de *Serjania erecta*, atribuindo a ação a taninos e flavonoides. No entanto, embora compostos

fenólicos apresentem grande afinidade por proteínas, no teste fosfolipásico o ácido tânico não formou halos, o que deveria ter ocorrido como controle positivo. De acordo com Ozdal et al. (2013), em ambientes com pH alcalino, os compostos fenólicos interagem com oxigênio presente nas cadeias laterais dos peptídeos e se transformam em quininas, que se condensam e formam compostos de coloração marrom, com alto peso molecular. Possivelmente por isso, o ácido tânico não foi capaz de difundir pela malha do gel de agarose da Figura 1, impedindo a formação de complexos com as enzimas fosfolipásicas presentes na peçonha bruta de *B. moojeni*.

A inibição da fosfolipase A2 (PLA2) possivelmente pode ser atribuída à presença de ácidos graxos insaturados na amostra, como o ácido linoléico. Essa não é a primeira descrição desses compostos em *E. crassipes*. Liebezeit et al. (2017) analisaram, entre outros compostos lipídicos, ácidos graxos. Eles determinaram o ácido graxo n16:0 como dominante na fração ácida. Segundo Ballou (1985) esse e outros ácidos graxos, como por exemplo o palmitoleico, oleico, linolenico e aracdônico, inibem as PLA2, possivelmente de forma não competitiva. Segundo Zambelli et al. (2017), a PLA2 secretada é encontrada em várias peçonhas animais e provavelmente contribui para o desenvolvimento de dor, inflamação e lise celular devido ao envenenamento.

Outra explicação dessa inibição seria a presença de compostos fenólicos não-taninos presentes no extrato. Segundo Silva et al. (2009) compostos fenólicos como flavonóides apresentam atividade inibidora de fosfolipase A2. Segundo PEREAÑEZ et al. (2011) esses podem fazer ligações do tipo pontes de hidrogênio com os sítios ativos das fosfolipases A2. Nesse caso, bloqueiam o sítio catalítico da enzima, resultando em possíveis efeitos antimiotóxicos. No entanto, são necessários estudos futuros para quantificar a concentração desses ácidos graxos, visto que a técnica cromatográfica utilizada nesse estudo tem como objetivo apenas identificar os compostos presentes nos extratos e não quantificá-los.

Em relação à inibição da atividade proteolítica, apenas o extrato metanólico inibiu significativamente a peçonha bruta no teste proteolítico com azocaseína. Este extrato foi o que mais apresentou compostos quando se compara os picos mostrados na Figura 9 com os da Figura 8 e 7. Os outros extratos apresentaram inibição da atividade azocaseínolítica, mas apenas em baixas concentrações quando comparados com os resultados do extrato metílico, o que corrobora os dados de Haggag et al. (2017).

As bandas obtidas na análise por espectroscopia no infravermelho são correspondentes aos modos vibracionais das ligações CH3 e CH2. Como também, verifica-se a presença de

ligação N-H flexão no plano e lipídios ésteres. No entanto, os principais sinais para identificar os taninos nos extratos não foram registrados. Segundo Grasel et al. (2015) os taninos hidrolisáveis têm na região entre 1734-1707  $\text{cm}^{-1}$ , o alongamento de ésteres C = O, enquanto o taninos condensados têm em 1285-1283  $\text{cm}^{-1}$ , alongamento de flavonóide pirano C-O. Logo, esses dados estão de acordo com os resultados obtidos na difusão radial.

Portanto, até onde se sabe, esse é o primeiro trabalho que descreve a aplicação dos extratos aquosos e metanólico de raiz do aguapé como fonte de compostos lipídicos, os quais atuam formando complexos com as proteínas presentes na peçonha bruta de *Bhotrops moojeni*. conforme demonstrado pelas análises espectrofotométricas no infravermelho (fig. 12).

## 5.0 CONCLUSÃO

Os extratos etílico e metanólico apresentaram inibições significantes, respectivamente, nas atividades fosfolipásicas e azocaseinolítica. Portanto, esses apresentam potencial aplicação terapêutica contra o envenenamento pela peçonha *Bothrops moojeni*.

## 6.0 REFERÊNCIAS

- AGALAR, H.G.D et al. Activity guided fractionation of arum italicum Miller Tubers and the LC/MS - MS Profiles. **Record of Natural Products**, [S. l.], v. 12, p. 64-75, set. 2017.
- ALMEIDA, J.R. **Estudos estruturais e funcionais de uma fosfolipase A2 homóloga K49 purificada do veneno de Crotalus Oreganus abyssus**. 2016. Tese (Doutorado em Biologia Funcional e Molecular) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2016. Disponível em: <<http://repositorio.unicamp.br/jspui/handle/REPOSIP/321587>>. Acesso em: 26 jun. 2019.
- BALLOU, L.R et al. Substrate-specific forms of human platelet phospholipase A2. **The journal of biological chemistry**, [S. l.], v. 261, n. 7, p. 3107-3111, 5 mar. 1986.
- COSTA, K.C.T. **Avaliação dos efeitos sistêmicos induzidos por uma fosfolipase A2 isolada da peçonha da serpente Bothrops moojeni**. 2017. 56 p. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Estrutural Aplicadas) - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2017.
- ESPIRÍTO-SANTO, M. M. et al. Taninos em Baccharis dracunculifolia (Asteraceae): efeitos da sazonalidade, disponibilidade de água e sexo da planta. **Acta Botânica Brasileira**, [S. l.], v. 13, n. 2, p. 167-174, ago. 1999.
- FREITAS, M.A. **Serpentes brasileiras**. São Paulo: Grupo Unigel, 2003. 81 p.
- FERNANDES, RS et al. Neutralization of pharmacological and toxic activities of Bothrops jararacussu snake venom and isolated myotoxins by Serjania erecta methanolic extract and its fractions. **J. Venom. Anim. Toxins incl. Trop. Dis**, Botucatu, v. 17, n. 1, p. 85-93, 2011.

- FURTADO, M.F.D. Aspectos sistemáticos e biológicos que atuam na diversidade da composição de venenos em serpentes peçonhentas brasileiras. In: Nascimento, L.B. & Oliveira, M.E. (Eds). **Herpetologia no Brasil II**. Sociedade Brasileira de Herpetologia, 2007 p. 183-200.
- GOMES, M. S. R.; et al. Purification and functional characterization of a new metalloproteinase (BleucMP) from *Bothrops leucurus* snake venom. **Comparative Biochemistry and Physiology**, Part C, v. 153, p.290–300, 2011.
- GRASEL F.S et al. Characterization of natural tanning extracts by FTIR and multivariate analysis. In: XXXIII IULTCS Congress, 2015, Novo Hamburgo. *Leather tomorrow's Today.*, 2015.
- GUTIÉRREZ, J.M *et al.* Hemorrhage Caused by Snake Venom Metalloproteinases: A Journey of Discovery and Understanding. **Toxins**, [S. l.], p. 98-116, mar. 2016.
- HABERMANN, E.; HARDT, K.L. A sensitive and specific plate test for the quantitation of phospholipases. **Analytical Biochemistry** [S.l.], v. 50, p. 163-173, 1972.
- HAGERMAN, A. E. Radial diffusion method for determining tannin in plant extracts. **Journal of Chemical Ecology**, [S.l.], v. 13, n. 3, p.437-449, mar. 1987. Springer Nature.
- HAGERMAN, A. E., RICE, M. E., AND RITCHARD, N. T. Mechanisms of protein precipitation for two tannins, pentagalloyl glucose and epicatechin16 (4→8) catechin (Procyanidin) **Journal of Agricultural and Food Chemistry** [S.l.], v. 46, p. 2590-2595, 1998.
- HAGGAG, M.W. et al. Phytochemical analysis, antifungal, antimicrobial activities and application of *Eichhornia crassipes* against some plant pathogens. **Planta Daninha**, [S.l.], v. 35, p. 1-11, 2017.
- HELDT, H.W. **Plant biochemistry and molecular biology**. [S. l.: s. n.], 1997.
- HERTEL, S. *et al.* Effect of Tannic Acid on the Protective Properties of the in situ Formed Pellicle. **Caries Research**, [S. l.], p. 34-45, 14 dez. 2016.
- KANG, T.S *et al.* Enzymatic toxins from snake venom: structural characterization and mechanism of catalysis. **The FEBS journal**, [S. l.], v. 278, p. 4544-4576, dez. 2011.
- KINI, R.M. Excitement ahead: structure, function and mechanism of snake venom phospholipase A2 enzymes. **Toxicon X**, [S. l.], v. 42, n. 8, p. 827-840, dez. 2003.
- LAMUELA-RAVENTOS, R.M. Folin-Ciocalteu method for the measurement of the total phenolic content and antioxidant capacity. In: SHAHIDI, F.; APAK, R.; CAPANOGLU, E. (Org.). **Measurement of antioxidant activity & capacity**. Pondicherry: John Wiley & Sons Ltd, 2018. p. 107-114.
- LIEBEZEIT, G. et al. Lipid composition of the water hyacinth *Eichhornia crassipes* (Mart.) Solms. **Chemistry Research Journal** [S. l.], p. 1-12, 2017.

- MAKKAR, H. P. S., et al. Gravimetric determination of tannins and their correlations with chemical and protein precipitation methods. **Journal of the Science of Food and Agriculture** [S. l.], v. 61, p. 161–165, 1993.
- MALIK, A. Environmental challenge vis a vis opportunity: the case of water hyacinth. **Environ Int** [S. l.], v. 33, p. 122–138, 2007.
- MAMEDE, C.C.N. **Caracterização bioquímica e funcional de uma metaloprotease isolada da peçonha da serpente *Bothrops moojeni***. 83 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2011. Disponível em: <<https://repositorio.ufu.br/handle/123456789/15833>>. Acesso em: 28 mar. 2018.
- MAMEDE, C.C.N et al. Comparative analysis of local effects caused by *Bothrops alternatus* and *Bothrops moojeni* snake venoms: enzymatic contributions and inflammatory modulations. **Toxicon**. p. 37-45. Jul, 2016.
- MATIAS, M.S et al. BaltDC: purification, characterization and infrared spectroscopy of an antiplatelet DC protein isolated from *Bothrops alternatus* snake venom. **JOURNAL OF VENOMOUS ANIMALS AND TOXINS INCLUDING TROPICAL DISEASES**, v. 23, p. 23-36, 2017.
- MONTEIRO, J.M et al. Taninos: uma abordagem da química a ecologia. **A Química Nova**, Recife, v. 28, n. 5, p.892-896, 19 jan. 2005.
- OZDAL, T.; ALTAY, F.L; CAPANOGLU, E. A review on protein–phenolic interactions and associated changes. **Elsevier** [S. l.], p. 954-970, 2013
- PEREAÑEZ, J.A. et al. Inhibitory effects of plant phenolic compounds on enzymatic and cytotoxic activities induced by a snake venom phospholipase A2. **Vitae**, [S. l.], v. 18, n. 3, p.295-304, dez. 2011.
- RODRÍGUEZ. P.C. et al. Comparative characterization of phenolic and other polar compounds in Spanish melon cultivars by using high-performance liquid chromatography coupled to electrospray ionization quadrupole-time of flight mass spectrometry. **Food Research International**. Granada, Espanha, p. 1519-1527, dez. 2013.
- SILVA, R. et al. Polar and lipophilic extracts characterization of roots, stalks, leaves and flowers of water hyacinth (*Eichhornia crassipes*), and insights for its future valorization. **Industrial Crops And Products** [S.l.], p. 1033-1038, dez. 2015.
- SILVA, S.L. et al. Molecular modeling and inhibition of phospholipase A2 by polyhydroxy phenolic compounds. **European Journal of Medicinal Chemistry**, [S.l.], v. 44, n. 1, p.312-321, jan. 2009.

SENISE, L.V. **Avaliação dos distúrbios hemostáticos induzidos por venenos de serpentes Bothrops jararaca (Squamata: viperidae) adultas e filhotes e eficácia do tratamento com soro antibotrópico.** 2014. Doutorado (Doutorando em ciências na área de fisiologia geral) - Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, 2014.

TSE, H.M. et al. Hydrogen bonded multilayers of tannic acid as mediators of T cell immunity. **Advanced Healthcare Materials.** Weinheim, p. 686-694. 09 dez. 2014. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/adhm.201400657>>. Acesso em: 26 jun. 2018.

TULIKA T. et al. Antioxidant properties and phenolic compounds in methanolic extracts of *Eichhornia crassipes*. **Res. J.Phytochem** [S.l.], v. 11, p. 85-89, 2017.

TYAGI, T.; AGARWAL M. Antioxidant properties and phenolic compounds in methanolic extracts of *Eichhornia crassipes*. **Research Journal of Phytochemistry**, [S.l.], v. 11, p. 85-89, 2017.

VASU, K., et al. Biomolecular and phytochemical analyses of three aquatic angiosperms. **African journal of microbiology research**, [S.l.], v. 3, p. 418-421, 2019

ZAMBELLI, V.O. et al. Secreted phospholipases A2 from animal venoms in pain and Analgesia. **Toxins**, [S.l.], v. 9, n. 12, p.406-433, 19 dez. 2017.