UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

RAMON BATISTA DE LISBOA

ATIVIDADE NEUTRALIZANTE DE *Jatropha gossypiifolia L.* SOBRE ENZIMAS DO VENENO DE *Bothrops jararacussu*

NEUTRALIZING ACTIVITY OF *Jatropha gossypiifolia L. ON ENZYMES FROM Bothrops jararacussu VENOM*

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE

PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

RAMON BATISTA DE LISBOA

ATIVIDADE NEUTRALIZANTE DE *Jatropha gossypiifolia L.* SOBRE ENZIMAS DO VENENO DE *Bothrops jararacussu*

Dissertação de Mestrado apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Química, da Universidade Federal de Sergipe, para a obtenção do título de Mestre em Química.

Orientador: **Prof. Dr. James Almada da Silva**

NEUTRALIZING ACTIVITY OF *Jatropha gossypiifolia L. ON ENZYMES FROM Bothrops jararacussu VENOM*

Master dissertation presented to the Postgraduate Program in Chemistry of the Federal University of Sergipe to obtain MSc. in Chemistry.

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA CENTRAL

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE

Lisboa, Ramon Batista de
L769a Atividade neutralizante de jatropha gossypiifolia l. sobre enzimas do veneno de bothrops jararacussu / Ramon Batista de Lisboa; orientador James Almada da Silva - São Cristóvão, 2026.
105 f. : il.

Dissertação (mestrado em Química) – Universidade Federal de Sergipe, 2026.

1. Pinhão. 2. Flavonóides. 3. Inibidores enzimáticos. 4. Cobras venenosas. I. Silva, James Almada da. orient. II. Título.

CDU 54

SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
Programa de Pós-Graduação em Química
PPGQ

PPGQ

FOLHA DE APROVAÇÃO

Membros da Comissão Julgadora da Dissertação de Mestrado de Ramon Batista de Lisboa apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal de Sergipe em 28/07/2026.

Prof. Dr. James Almada da Silva
Departamento de Farmácia do Campus de Lagarto - UFS

Prof. Dr. Francisco das Chagas Lima Pinto
Programa de Pós-Graduação em Química - UFS

Prof. Dr. Rafael Ciro Marques Cavalcante
Departamento de Farmácia do Campus de Lagarto - UFS

SÃO CRISTÓVÃO - SE

Julho, 2026

RESUMO

A serpente *Bothrops jararacussu* é a segunda principal causadora de acidentes ofídicos no Brasil. Seu veneno é rico em metaloproteinases, fosfolipases A_2 e L-aminoácido oxidases, enzimas associadas a efeitos locais intensos. Embora a soroterapia seja o tratamento indicado para a neutralização sistêmica das toxinas, sua eficácia frente aos danos teciduais é limitada. Nesse contexto, a espécie vegetal *Jatropha gossypiifolia* L. surge como uma alternativa terapêutica, uma vez que seu uso etnofarmacobotânico contra envenenamentos já é documentado. Assim, o estudo avaliou a atividade antioxidante dos extratos das folhas, inflorescências, galhos e raízes de *J. gossypiifolia*, bem como seu potencial inibitório sobre as atividades de metaloproteinases e fosfolipases A_2 presentes no veneno de *B. jararacussu*. O extrato bruto das inflorescências apresentou os maiores índices de inibição enzimática (46,4 ± 1,3% e 72,4 ± 0,3% frente às metaloproteinases e fosfolipases, respectivamente) e de atividade antioxidante (1.094 ± 20,4 e 1.567,9 ± 26,6 μmol ET g^{-1} nos ensaios de DPPH e FRAP, respectivamente), sendo, portanto, selecionado para o fracionamento cromatográfico. Dentre as frações obtidas (hexano, diclorometano, acetato de etila, aquosa), a fração aquosa apresentou a maior atividade inibitória (78,9 ± 1,1% para as metaloproteinases e 79,6 ± 3,7% para as fosfolipases). Em seguida, foi realizado o isolamento dos flavonoides orientina, isoorientina, vitexina e isovitexina desta fração por cromatografia líquida de alta eficiência. Estas substâncias foram identificadas por espectroscopia de massas. Todos estes metabólitos apresentaram capacidade de inibição frente ao veneno, com destaque para a orientina e a isoorientina, que obtiveram resultados de inibição enzimática equivalentes aos do antídoto antibotrópico, com IC_{50} de 168,0 ± 12,3 μM para a isoorientina e 209,7 ± 9,0 μM para a orientina no ensaio de inibição proteolítica, e de 112,6 ± 4,0 μM para a isoorientina e 110,2 ± 2,6 μM para a orientina no ensaio de inibição fosfolipásica. Os resultados obtidos demonstram que a *J. gossypiifolia* apresenta substâncias capazes de interferir em atividades enzimáticas-chave do veneno de *B. jararacussu*, evidenciando seu potencial como fonte de compostos bioativos com aplicação antiofídica.

Palavras-chave: Pinhão-roxo. Flavonoides. Inibidores enzimáticos. Jararacuçu. Veneno botrópico.

ABSTRACT

The snake *Bothrops jararacussu* is the second leading cause of snakebite accidents in Brazil. Its venom is rich in metalloproteinases, phospholipases A_2, and L-amino acid oxidases-enzymes associated with severe local effects. Although antivenom therapy is the indicated treatment for the systemic neutralization of toxins, its efficacy against tissue damage is limited. In this context, the plant species *Jatropha gossypiifolia* L. emerges as a therapeutic alternative, given that its ethnopharmacobotanical use against envenomation is already documented. Thus, this study evaluated the antioxidant activity of extracts from the leaves, inflorescences, branches, and roots of *J. gossypiifolia*, as well as their inhibitory potential against the metalloproteinase and phospholipase A_2 activities present in *B. jararacussu* venom. The crude extract from the inflorescences exhibited the highest levels of enzyme inhibition (46.4 ± 1.3% and 72.4 ± 0.3% against metalloproteinases and phospholipases, respectively) and antioxidant activity (1,094 ± 20.4 µmol ET g^{-1} and 1,567.9 ± 26.6 µmol ET g^{-1} for the DPPH and FRAP assays, respectively); consequently, it was selected for fractionation. Among the fractions obtained (hexane, dichloromethane, ethyl acetate, and aqueous), the aqueous fraction demonstrated the greatest inhibitory activity (78.9 ± 1.1% for metalloproteinases and 79.6 ± 3.7% for phospholipases). Subsequently, the substances within this fraction were isolated using high-performance liquid chromatography. Mass spectrometry analysis led to the identification of the flavonoids orientin, isoorientin, vitexin, and isovitexin. All of them demonstrated an ability to inhibit the venom, notably orientin and isoorientin, which achieved inhibition results statistically equivalent to those of the anti-Bothrops antivenom; IC_{50} values were 168.0 ± 12.3 µM for isoorientin and 209.7 ± 9.0 µM for orientin in the proteolytic inhibition assay, and 112.6 ± 4.0 µM for isoorientin and 110.2 ± 2.6 µM for orientin in the phospholipase inhibition assay. The results demonstrate that *J. gossypiifolia* contains substances capable of interfering with key enzymatic activities of *B. jararacussu* venom, highlighting its potential as a source of bioactive compounds for antivenom applications.

Keywords: *Jatropha gossypiifolia* L. Enzymatic Activity. Jararacuçu. Bothropic Venom. Pinhão-roxo.

Sumário

1 INTRODUÇÃO 14
1.1 Gênero *Jatropha* 16
1.2 Descrição botânica da espécie *Jatropha gossypiifolia* L. 17
1.2.1 Etnofarmacologia de Jatropha gossypiifolia 19
1.2.2 Constituintes químicos e atividades biológicas de Jatropha gossypiifolia 20
1.3 Epidemiologia dos acidentes ofídicos 25
1.4 *Bothrops jararacussu* 26
1.4.1 Veneno botrópico 29
1.4.2 Tratamento dos acidentes ofídicos 34
2 OBJETIVOS 36
2.4 Objetivo Geral 36
2.5 Objetivos Específicos 36
3 MATERIAIS E MÉTODOS 37
3.4 Materiais 37
3.5 Obtenção do veneno de *Bothrops jararacussu* e do antídoto antibotrópico 37
3.6 Material vegetal 38
3.7 Obtenção do extrato 38
3.8 Obtenção das frações e análises cromatográficas 39
3.9 Obtenção das substâncias isoladas 39
3.10 Análises das substâncias isoladas por espectroscopia de massas 41
3.11 Quantificação de Compostos Fenólicos Totais (CFT) 42
3.12 Quantificação de Flavonoides Totais (FT) 42
3.13 Atividade de captura do radical DPPH 43
3.14 Atividade de redução do ferro (FRAP) 44
3.15 Inibição da atividade proteolítica 45
3.16 Inibição da atividade fosfolipásica 46
3.17 Ensaio de citotoxicidade (atividade hemolítica) 47
3.18 Análises estatísticas 47
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO 49
4.4 Extratos brutos de *J. gossypiifolia* 50
4.4.1 Quantificação de compostos fenólicos totais e flavonoides totais 50
4.4.2 Atividade antioxidante 52

4.4.3 Inibição da atividade proteolítica do veneno 54
4.4.4 Determinação das condições para a atividade fosfolipásica 55
4.4.5 Inibição da atividade fosfolipásica 57
4.5 Frações de *J. gossypiifolia* 59
4.5.1 Inibição da atividade proteolítica 59
4.5.2 Inibição da atividade fosfolipásica 60
4.5.3 Análise cromatográfica das frações 61
4.6 Substâncias isoladas 63
4.6.1 Isolamento cromatográfico 63
4.6.2 Análise dos espectros de absorbância as substâncias isoladas 67
4.6.3 Identificação das substâncias isoladas por espetroscopia de massas 69
4.6.4 Inibição da atividade proteolítica 76
4.6.5 Inibição da atividade fosfolipásica 77
4.7 *Avaliação de citotoxicidade* 79
5 CONCLUSÕES 80
6 PERSPECTIVAS DO TRABALHO 81
REFERÊNCIAS 82
APÊNDICES 96

Para minha mãe, que nunca mediu esforços para que eu pudesse estudar, e para a criança que um dia fui: nós conseguimos!

"A esperança seria a maior das forças humanas, se não existisse o desespero."

(Victor Hugo)

AGRADECIMENTOS

O presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq). O incentivo dessas agências foi fundamental para a realização desta pesquisa.

À minha mãe, meu maior alicerce e minha maior incentivadora nos estudos. Sem a senhora, eu jamais teria chegado até aqui. Ao meu pai, por ter contribuído para a formação do meu caráter e por me ensinar os valores da vida. Ao meu irmão, que sempre foi um exemplo para mim.

À minha família, por todo o apoio, carinho e incentivo ao longo dessa caminhada. Um agradecimento especial aos meus tios Aricelia e Cezar, que me deram morada durante essa jornada, serei eternamente grato. E os primos, Letícia, Emilly e Guilherme, juntos sempre.

A Universidade Federal de Sergipe, por toda a infraestrutura disponibilizada para o desenvolvimento desta pesquisa, em especial ao Departamento de Química (DQI), ao Departamento de Farmácia do Campus Lagarto (DFAL) e, acima de tudo, ao Laboratório de Produtos Naturais Bioativos (LPNBio), que foi minha segunda casa durante esses dois anos. Aos técnicos e demais profissionais da instituição, especialmente Jean Nascimento, Gabriella Melo, Tarcísio Martins, Raphael Amâncio, Rute Lisboa, Ana Márjory, Débora Bezerra e Sidnei de Oliveira, meu sincero agradecimento pelo suporte, pela dedicação e pelos inúmeros momentos de descontração compartilhados nos laboratórios.

Aos amigos das "salinhas", de ambos os campi, agradeço pela amizade, pelas risadas, pelos ensinamentos, pelo companheirismo e até pelos surtos compartilhados. Vocês tornaram essa caminhada muito mais leve.

Aos meus colegas de pesquisa e aqui não poderia deixar de citar Gustavo Souza, Mariana da Cruz, Felipe Gabriel, Luiz Felipe, e duas pessoas em específicos: Eduarda Costa, responsável por eu ter ingressado no mestrado e por não me deixar desistir nos momentos mais difíceis. Obrigado por compartilhar comigo as alegrias, os desafios e as loucuras da pós-graduação; E a Ila Oliveira, obrigado por seu meu braço direito, pelo carinho e por ser você, muito obrigado.

Ao Nickollas, por nunca deixar um dia passar sem perguntar pelos meus "babados" e por ouvir pacientemente todas as minhas reclamações sobre pessoas e situações que, muitas vezes, você nem conhecia. Obrigado pela amizade e por estar sempre presente.

Por fim, ao meu orientador, James Almada, por ter acreditado em mim desde o início e por ter me recebido em seu grupo de pesquisa sem hesitação. Agradeço pela confiança, pela paciência, pelos ensinamentos, pelas orientações e por todas as oportunidades proporcionadas ao longo dessa trajetória. Poucos têm o privilégio de encontrar um verdadeiro pai acadêmico. Eu tive essa sorte, e levarei comigo todos os aprendizados, dentro e fora da ciência.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Fotografia da espécie vegetal Jatropha gossypiifolia. 18

Figura 2 - Mapa com a distribuição geográfica do gênero Jatropha gossypiifolia L 19

Figura 3 - Fotografia da espécie Bothrops jararacussu em habitat florestal. ... 27

Figura 4 - Distribuição geográfica da espécie B. jararacussu no território brasileiro. 28

Figura 5 - Representação das subclasses de SVMPs. 30

Figura 6 - Sítios de clivagem das fosfolipases em um fosfolipídeo de membrana. 31

Figura 7 - Reação de desaminação oxidativa estereoespecífica de L aminoácidos catalisada por svLAAO. 33

Figura 8 - Fluxograma do isolamento bioguiado de substâncias de Jatropha gossypiifolia. 49

Figura 9 - Quantificação de compostos fenólicos totais (A) e flavonoides totais (B) dos extratos brutos das folhas, inflorescência, galhos e raízes de Jatropha gossypiifolia. 51

Figura 10 - Atividade antioxidante dos extratos brutos de Jatropha gossypiifolia pelos ensaios de DPPH (A) e FRAP (B). 52

Figura 11 - Exemplo de flavonoide (quercetina) estabilizando um radical por meio de sua estrutura de ressonância. 53

Figura 12 - A) Inibição da atividade proteolítica do veneno de Bothrops jararacussu pelos extratos brutos das folhas, inflorescências, galhos e raízes de Jatropha gossypiifolia e do antídoto na concentração de 250 µg mL-1. B) Avaliação da resposta concentração/atividade para o extrato bruto das inflorescências. 54

Figura 13 - Cinética enzimática das fosfolipases em diferentes concentrações estimadas de substrato. 56

Figura 14 - Cinética enzimática das fosfolipases em diferentes concentrações estimadas de substrato. 57

Figura 15 - A) Inibição da atividade fosfolipásica do veneno de Bothrops jararacussu pelos diferentes extratos brutos de Jatropha gossypiifolia na concentração de 250 µg mL-1 e antídoto na concentração de 500 µg mL . B) xi Avaliação da resposta concentração/atividade para o extrato bruto das inflorescências. 58

Figura 16 - A) Inibição da atividade proteolítica do veneno de Bothrops jararacussu com as frações obtidas do extrato das inflorescências de Jatropha gossypiifolia na concentração de 250 µg mL-1. B) Avaliação da resposta concentração/atividade para a fração aquosa das inflorescências. 59

Figura 17 - A) Inibição da atividade fosfolipásica do veneno de Bothrops jararacussu pelas frações hexano, diclorometano, acetato de etila e aquosa das inflorescências de Jatropha gossypiifolia na concentração de 250 µg mL-1. B) Avaliação da resposta concentração/atividade para a fração aquosa das inflorescências. 61

Figura 18 - Cromatograma comparativo das frações hexano, diclorometano, acetato de etila e aquosa das inflorescências de Jatropha gossypiifolia, obtidos por CLAE-DAD, em modo analítico. Pode-se observar em destaque (retângulo vermelho) os picos comuns entre as frações acetato de etila e hexano. 62

Figura 19 - Cromatograma analítico (coluna C18) da fração aquosa das inflorescências de J. gossypiifolia, com destaque para os picos de interesse a (t = 18,0 min) b (t = 19,9 min), c (t = 24,9 min), d (t = 34,3 min). 63

Figura 20 - Cromatograma semipreparativo (coluna C18) obtido da fração aquosa das inflorescências de J. gossypiifolia, com destaque para os picos de interesse a (t = 12,8 min), b (t = 13,6 min), c (t = 17,2 min), d (t = 22,7 min). ... 64

Figura 21 - Cromatograma analítico (coluna fenil-hexil) da fração aquosa das inflorescências de J. gossypiifolia, com destaque para os picos de interesse a (t = 12,8 min), b (t = 16,5 min), c + d (t = 25,1 min). 65

Figura 22 - Cromatograma semipreparativo (coluna fenil-hexil) da fração aquosa das inflorescências de J. gossypiifolia, com destaque para os picos de interesse a (t = 7,8 min), b (t = 10,2 min), c (t = 14,2 min), d (t = 15,4 min). 66

Figura 23 - Cromatograma das substâncias a, b, c e d isoladas. 67

Figura 24 - Estrutura padrão dos flavonoides, destacando os anéis A, B e C....68

Figura 25 - Espectros UV das substâncias a, b, c e d. 69

Figura 26 - Região expandida dos espectros MS/MS das substâncias a e b, evidenciando os padrões isotópicos dos íons fragmento empregados na confirmação da massa dos compostos. 70

Figura 27 - Espectros MS/MS das substâncias a e b obtidos em modo de ionização negativa ($[M–H]^-$). 71

Figura 28 - Perfil de fragmentação proposto para a substância a, baseada nos dados de MS/MS. 72

Figura 29 - Comparação dos espectros MS/MS das substâncias a e b com os espectros disponíveis na base de dados GNPS2. 73

Figura 30 - Região expandida dos espectros MS/MS das substâncias c e d, evidenciando os padrões isotópicos dos íons fragmento empregados na confirmação da massa dos compostos. 73

Figura 31 - Espectros MS/MS das substâncias c e d obtidos em modo de ionização negativa ($[M–H]^-$). 74

Figura 32 - Perfil de fragmentação proposto para a substância c baseada nos dados de MS/MS. 74

Figura 33 - Comparação dos espectros MS/MS das substâncias c e d com os espectros disponíveis na base de dados GNPS2. 75

Figura 34 - Estrutura química dos flavonoides isolados, orientina, isoorientina, vitexina e isovitexina. 76

Figura 35 - Inibição da atividade proteolítica do veneno de Bothrops jararacussu pelas substâncias isoladas na concentração de 250 µg mL-1 e respectivos IC_{50}. 77

Figura 36 - Inibição da atividade proteolítica do veneno de Bothrops jararacussu pelas substâncias isoladas na concentração de 250 µg mL-1 e respectivos IC_{50}. 78

Figura 37 - Ensaio de citotoxicidade hemolítica do extrato bruto (A) e da fração aquosa das inflorescências (B). 80

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

OMS – Organização Mundial de Saúde
DTN – Doença Tropical Negligenciada
SINAN – Sistema de Informações de Agravos de Notificações
PLA_2 – Fosfolipases A_2
SVSP – Serinoproteases de Veneno de Serpente tipo C
CLECL – Proteínas Semelhantes a Lectinas tipo C
CLEC – Lectinas tipo C
LAAO – L-aminoácidos oxidases
NFG – Fator de Crescimento Nervoso
CRISP – Proteínas Secretoras Ricas em Cisteínas
ECTO – Ecto-5'-nucleotidases
SvLAAO – L-aminoácido oxidases de Veneno de serpentes
FAD – Mononucleotídio de flavina
CLAE – Cromatografia Líquida de Alta eficiência
DAD – Detetor de Arranjo de Diodos
CFT – Compostos Fenólicos Totais
FT – Flavonoides Totais
EDTA – Ácido etilenodiaminotetraacético
Abs – Absorbância
DMSO – Dimetilsulfóxido
ERO – Espécies Reativas em Oxigênio
UV – Ultravioleta

1 INTRODUÇÃO

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), o envenenamento por picada de cobra é a Doença Tropical Negligenciada (DTN) mais letal do mundo. Estima-se que ocorram, anualmente, cerca de 2,7 milhões de casos de envenenamento e 138.000 mortes. O impacto econômico desses acidentes é imensurável na maioria dos países, afetando não apenas as vítimas, mas também suas famílias, especialmente em comunidades pobres de nações de baixa e média renda, onde muitas vezes não há acesso a sistemas de previdência social [1].

Considerando os dados do Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN), entre 2020 e 2025, foram registrados no Brasil 1.700.963 casos de acidentes envolvendo animais peçonhentos. Dentre esses, os incidentes com serpentes representam a terceira maior causa, totalizando 181.419 notificações, sendo a principal causa de óbitos (746) registrados no período. Para populações rurais, incluindo agricultores, crianças em idade escolar e comunidades tradicionais, o risco de envenenamento por serpentes configura-se como uma ameaça cotidiana, presente em atividades básicas como o deslocamento a pé, o manejo de cultivos, a pecuária extensiva e até mesmo no uso de sanitários externos. Essa realidade expõe vulnerabilidades socioambientais e reforça a necessidade de estratégias integradas para prevenção e tratamento [1, 2].

Entre os gêneros de serpentes com maior número de acidentes e fatalidades, as do gênero *Bothrops* ocupam a primeira posição, com 100.795 [2]. As serpentes do complexo *Bothrops* são amplamente distribuídas em todo o território brasileiro. Essas serpentes inoculam uma peçonha rica em proteases e fosfolipases A_2, cujas ações bioquímicas desencadeiam manifestações locais e sistêmicas graves quando não rapidamente tratadas [3, 4].

A soroterapia continua sendo o principal tratamento para envenenamentos ofídicos, consistindo na administração de imunoglobulinas purificadas obtidas por meio da hiperimunização de equinos com venenos

específicos. Embora eficaz na neutralização sistêmica das toxinas, essa abordagem apresenta limitações significativas. Primeiramente, sua ação é restrita aos venenos utilizados no processo de imunização, o que não garante proteção cruzada contra outras espécies de serpentes. Além disso, os antivenenos convencionais demonstram baixa eficácia no controle das manifestações locais do envenenamento, como necrose tecidual, miólise e hemorragia no local da picada, que frequentemente evoluem para complicações graves mesmo com o tratamento adequado [5, 6].

Diante da complexidade do envenenamento por serpentes e das limitações dos antivenenos, a busca por tratamentos alternativos ou complementares tem se tornado cada vez mais relevante. Nesse contexto, o uso de plantas medicinais no combate aos efeitos do veneno de serpentes remonta a séculos e continua sendo objeto de investigação científica [7–12]. Diante disso, a espécie vegetal *Jatropha gossypiifolia* L. (Euphorbiaceae) destaca-se como alternativa com potencial terapêutico no tratamento de acidentes ofídicos. Popularmente conhecida por pinhão-roxo, erva-purgante, mamoninha, jalapão e batata-de-téu, essa espécie, originária da América Central, encontra-se amplamente distribuída no território brasileiro [13]. Diferentes partes da planta, incluindo folhas, galhos, raízes, sementes e látex, são tradicionalmente utilizadas em diversas formas de preparação e por distintas vias de administração [14]. Estudos apontam que essa espécie possui potencial para atividades antiofídicas [15, 16], anti-inflamatórias [17, 18], antineoplásicas [19], antimicrobianas [20], antioxidantes e hepatoprotetora [21], anticolinesterásicas [22], anti-hipertensiva [16, 23] e antidiabéticas [24].

Dessa forma, a investigação do potencial terapêutico de espécies vegetais tradicionalmente utilizadas contra acidentes ofídicos constitui uma estratégia relevante para ampliar as opções disponíveis para o manejo desses envenenamentos. A espécie *Jatropha gossypiifolia L.* apresenta características que a tornam especialmente promissora nesse contexto, reunindo histórico de uso popular e evidências farmacológicas iniciais que apontam para atividades compatíveis com os principais mecanismos de toxicidade do veneno botrópico. Assim, a avaliação sistemática de seus efeitos pode fornecer subsídios para o desenvolvimento de alternativas terapêuticas complementares, contribuindo

tanto para o avanço científico, quanto para o fortalecimento das políticas de saúde voltadas ao enfrentamento das Doenças Tropicais Negligenciadas.

1.1 Gênero *Jatropha*

O gênero *Jatropha* pertence à família Euphorbiaceae e é constituído por 175 espécies de plantas que estão amplamente distribuídas pelas regiões tropicais, subtropicais, tropicais secas e tropicais semiáridas mundo [25, 26]. Sendo descrita inicialmente por Linnaeus em 1737, as espécies desse gênero, em sua maioria, são plantas perenes, com algumas exceções, a exemplo da *Jatropha curcas* e *Jatropha mollissima*. Elas exibem uma notável diversidade anatômica, podendo assumir formas de arbustos, árvores ou plantas suculentas [27].

Apresentam desenvolvimento articulado e morfologia irregular, podendo atingir alturas entre 8 e 10 metros em condições ambientais favoráveis. Seus galhos são ricos em látex, e a floração de suas espécies ocorre principalmente no verão e no outono, embora possa ocorrer ao longo de todo o ano quando submetidas a regiões de maior umidade. Os frutos costumam ser formados por três cápsulas globosas com deiscência explosiva, e as sementes se destacam por sua alta concentração de óleos [24].

Sua origem remonta a região do México e da América Central continental. Apesar de ser motivo de um longo debate, acredita-se que as espécies desse gênero tenham sido derivadas de uma forma ancestral da espécie *Jatropha curcas*, tendo suas mudanças evolutivas baseadas no seu hábito de crescimento e especialização na estrutura vegetativa [28, 29]. Devido ao potencial culinário, medicinal e na produção de óleo, as espécies do gênero começaram a ser introduzidas pelos portugueses em suas colônias africanas (Cabo Verde, Guiné-Bissau, Moçambique e Angola) a partir do século XVI, sendo posteriormente, levadas para a Ásia (China, Índia e Indonésia) [30]. Dadas as suas diversas formas de crescimento e adaptação, e a capacidade de sobreviverem nos mais diversos solos, incluindo solos com condições pobres de crescimento, o gênero acabou prosperando e tendo uma vasta distribuição geográfica [31].

O nome *Jatropha* é derivada das palavras gregas *Jatrós* (médico) e *trophé* (alimento), o que denota o uso medicinal das plantas desse gênero [32]. Seu uso medicinal é relatado por povos nativos em diversos países tropicais e subtropicais da Ásia, da América Latina e da África. Várias espécies conhecidas do gênero já foram relatadas por seus usos medicinais, a exemplo da *J. curcas* L*., J. gossypiifolia* L*, J. multifida* L*, J. isabelli, J. mutabilis* Baill, *J. integerrima* e *J. macrorhiza*.

1.2 Descrição botânica da espécie *Jatropha gossypiifolia* L.

A espécie *Jatropha gossypiifolia* L. (Euphorbiaceae) pertence ao gênero *Jatropha* e ao subgênero *Jatropha*. São encontradas diversas grafias alternativas para o nome científico dessa espécie, como *Jatropha gossipifolia* L., *Jatropha gossipyfolia* L., *Jatropha gossypifollia* L., *Jatropha gossypyfolia* L., e *Jatropha gossypifolia* L., além da forma correta, *Jatropha gossypiifolia* L. Popularmente, é conhecida por diversos nomes, incluindo pinhão-roxo, erva-purgante, mamoninha, jalapão e batata-de-téu [13].

É um arbusto perene, com sistema radicular raso, que pode atingir cerca de 4 metros de altura e copa com mais de 2 metros de largura, em condições favoráveis. A planta apresenta galhos grossos e macios, com casca verde ou roxa quando jovem, que, quando danificados, liberam uma seiva aquosa e pegajosa. Suas folhas possuem de 3 a 5 lóbulos, com margens dentadas e coloração que varia de acordo com o biotipo e a idade, podendo ser verde, vermelha ou roxa. As inflorescências são pequenas, medindo de 6 a 9 mm de diâmetro, e variam de vermelho-claro a roxo-escuro nas bordas das pétalas, com um centro amarelo (Figura 1). Elas crescem em cachos localizados nas extremidades dos galhos. Os frutos da planta, de cor verde-clara e casca dura, são cápsulas trilobadas, arredondadas ou oblongas, medindo cerca de 12 mm de comprimento e 10 mm de largura, contendo, geralmente três sementes (Figura 2) [13, 33].

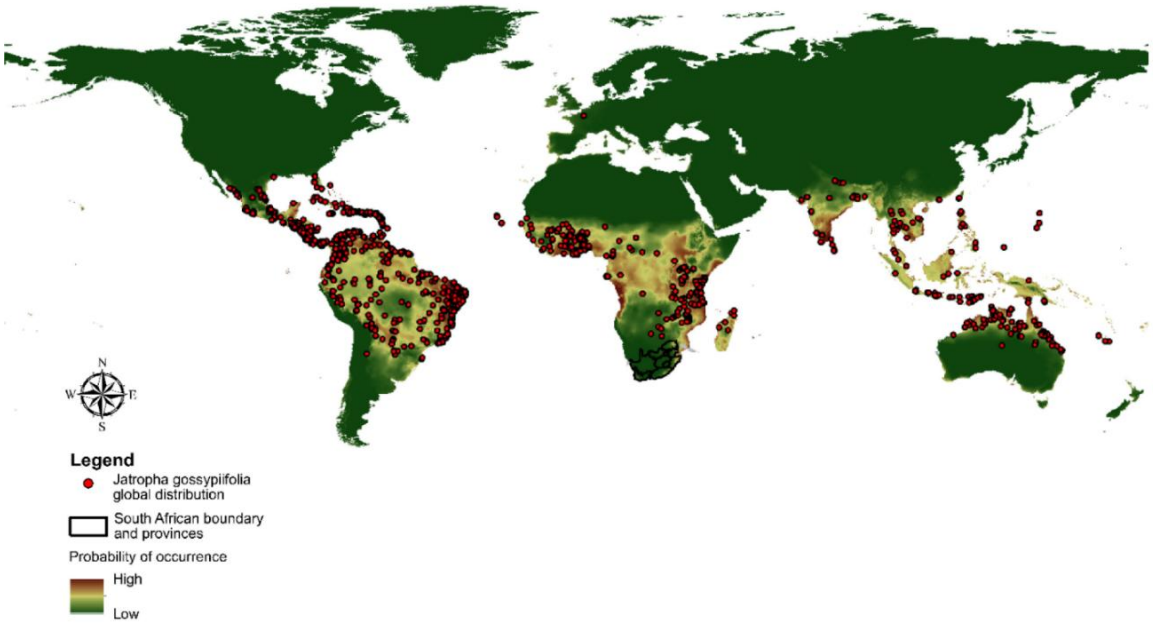
Figura 1 - Fotografia da espécie vegetal *Jatropha gossypiifolia.*



Fonte: Próprio autor.

Sua rápida disseminação, tanto por sementes quanto por partes vegetativas, possibilitou sua expansão muito além de sua área de origem. Atualmente, encontra-se naturalizada em grande parte dos países tropicais, abrangendo amplas regiões da América do Sul, toda a América Central, parte da América do Norte (Estados Unidos e México), grande parte da África Central, da Ásia, da Austrália e de alguns países da Oceania (Figura 2). Em determinadas regiões, a planta adquiriu o status de espécie invasora devido à sua rusticidade, resistência a longos períodos de seca, imunidade a pragas e doenças, além de sua notável capacidade de adaptação a diferentes tipos de solo e clima [33, 34].

Figura 2 – Mapa com a distribuição geográfica do gênero *Jatropha gossypiifolia* L.



Fonte: Retirado de Moshobane, *et al.,* 2022 [34].

1.2.1 Etnofarmacologia de Jatropha gossypiifolia

Diversos usos na medicina popular têm sido atribuídos à *Jatropha gossypiifolia*, abrangendo diferentes partes da planta como folhas, galhos, raízes, sementes e látex, e variadas formas de preparo, incluindo infusão, decocção, maceração, entre outras. Essas preparações são administradas por distintas vias, como oral, tópica ou por meio de banhos, refletindo a ampla versatilidade terapêutica associada à espécie em diferentes contextos culturais [35].

Os relatos etnomedicinais mais recorrentes descrevem propriedades analgésicas [36, 37], antibacterianas [31, 38], antipiréticas [14], antimaláricas [39], antidiabéticas [40], antidiarreicas [31], anti-hemorrágicas [14], anti-inflamatórias [38], além de efeitos benéficos em distúrbios gastrointestinais [31] e hepatopatias [14]. Notadamente, a espécie também é amplamente citada na medicina popular como agente no tratamento de picadas de cobra [31, 41, 42]. Outros usos tradicionais incluem o tratamento do reumatismo, das anemias, de

feridas cutâneas com efeito cicatrizante [37], de distúrbios hemostáticos [37] e de condições tumorais ou cancerígenas [43].

1.2.2 *Constituintes químicos e atividades biológicas de Jatropha gossypiifolia*

Jatropha gossypiifolia é uma espécie reconhecidamente rica em metabólitos secundários de relevância biológica, que podem ser isolados de diferentes partes da planta, incluindo caules, folhas, raízes, cascas, sementes, inflorescências e látex. Diversos estudos fitoquímicos têm identificado uma ampla variedade de compostos em seus extratos, com os terpenos, lignanas e flavonoides como os principais constituintes [44]. Além desses metabólitos, a espécie também apresenta em sua composição, cumarinas, taninos, alcaloides, saponinas e glicosídeos cardioativos (Quadro 1), evidenciando sua complexidade química e potencial farmacológico [45].

Quadro 1 - Classe dos metabólitos secundários e substâncias isoladas de *Jatropha gossypiifolia.*

(continua)

Parte da planta	**Classes de metabólitos secundários identificadas#**	**Substâncias identificadas***	**Ref.**
Planta inteira	Cumarinas	Propacina **(1)** Venkatasin **(2)**	[46, 47]
	Flavonoides	-	[48]
	Lignanas	Arilnaftaleno **(3)** Gadaina **(4)** Jatrophan **(5)**	[49–51]
	Terpenos	Citlalitrione **(6)** Jatrophenone **(7)**	[52, 53]
Partes aéreas	Compostos fenólicos	-	[23]
	Esteroides	-	[23]
	Flavonoides	-	[23]
	Lignanas	Gossypiline **(8)** Gossypifan **(9)**	[54, 55]
	Taninos	-	[23]
	Terpenos	Jatrogossol A **(10)** Jatrogossol B **(11)** Jatrogossol C **(12)** Jatrogossol D **(13)**	[19]

Quadro 1 - Classe dos metabólitos secundários e substâncias isoladas de *Jatropha gossypiifolia.*

(continuação)

Folhas	Alcaloides	Ricina **(14)** Ácido quinurênico **(15)**	[56–59]
	Compostos fenólicos	Ácido vanílico **(16)** Catecol **(17)** Ácido gálico **(18)** Ácido cinâmico **(19)** Ácido gentísico **(20)** Ácido quínico **(21)** Bergenina **(22)** Ácido ferúlico **(23)** Ácido p-cumariníco **(24)**	[24, 59]
	Cumarina	Escopoletina **(25)**	[59]
	Esteroides	-	[16]
	Flavonoides	Vitexina **(26)** Isovitexina **(27)** Orientina **(28)** Isoorientina **(29)** Schaftoside **(30)** Isoschaftoside **(31)** Scoparin **(32)** Isoscoparin **(33)** Apigenina **(34)** Luteolina **(35)** Rhoifolin **(36)** Catequina **(37)** Epicatequina **(38)** Pinostrobin **(39)** Taxifolina **(40)** Dihydrokaempferol **(41)** Eriodictyol **(42)** Narigenina **(43)** Rutina **(44)**	[15, 18, 24, 57, 59, 60]
	Quinonas	Biflorin **(45)** Isobiflorin **(46)**	[24]
	Saponinas	-	[16, 57]
	Taninos	-	[57]
	Terpenos	Jatrofoliane A **(47)** Jatrofoliane B **(48)** (13α,14β,20S)-2,24,25 Trihydroxylanosta-1,7-dien-3-one **(49)**	[59, 61, 62]

Quadro 1 - Classe dos metabólitos secundários e substâncias isoladas de *Jatropha gossypiifolia.*

(conclusão)

Folhas	Terpenos	(2α,13α,14β,20S)-2,24,25 Trihydroxylanost-7-en-3-one **(50)** Loliolide **(51)** Isololiolide **(52)** Dihydroactinidiolide **(53)**	[59, 61, 62]
Inflorescências	Flavonoides	Vitexina **(26)** Isovitexina **(27)**	[20]
Galhos	Alcaloides	-	[57]
	Cumarinas	Cleomiscosin A **(54)**	[63]
	Flavonoides	-	[57]
	Lignanas	Gossypidien **(55)** Isogadain **(56)** Jatrodien **(57)**	[64–66]
	Saponinas	-	[57]
Raízes	Taninos	-	[57]
	Alcaloides	-	[57]
	Flavonoides	Narigenina **(43)**	[57, 67]
	Saponinas	-	[57]
	Taninos	-	[57]
Sementes	Terpenos	2α-Hydroxyjatrophone **(58)** 2β-Hydroxyjatrophone **(59)** 2β-Hydroxy-5,6-isojatrophone **(60)** Jatropholone A **(61)** Jatropholone B **(62)** Falodone **(63)** Citlalitrione **(6)**	[68–70]
	Alcaloides	-	[57]
	Flavonoides	-	[57]
	Taninos	-	[57]

[#] Apenas metabólitos secundários foram incluídos no quadro; peptídeos e metabólitos primários isolados não foram incluídos. [*]As estruturas químicas podem ser visualizadas no Apêndice.

Fonte: Próprio autor.

Com relação as atividades biológicas, alguns estudos avaliaram diferentes extratos de *Jatropha gossypiifolia*. Esses trabalhos fornecem evidências consistentes acerca do potencial farmacológico dessa espécie vegetal (Quadro 2). Entre as atividades já investigadas, destacam-se as

propriedades anti-inflamatória, antiofídica, anticoagulante, antioxidante, analgésica, antimicrobiana, anti-hipertensiva, cicatrizante, antidiabética e hepatoprotetora [14].

Quadro 2 - Atividades biológicas investigadas da espécie *Jatropha gossypiifolia* (Continua).

Parte da planta	Atividade biológica	Modelo	Referência
Planta inteira	Citotóxica	*Ex vivo* *In vitro*	[19]
	Gastroprotetora	*In vivo*	[71]
	Antioxidante	*In vitro*	[48]
Partes aéreas	Vasodilatadora	*In vivo*	[23]
	Hipotensora	*In vivo*	[23]
	Anti-inflamatório	*In vivo*	[72]
	Analgésica	*In vivo*	[72]
	Antiespasmódica	*In vivo*	[73]
	Hepatoprotetora	*In vivo*	[21]
	Antioxidante	*In vivo* *In vitro*	[21, 59]
Folhas	Antioxidante	*In vitro*	[15]
	Cicatrizante	*In vivo*	[15]
	Anti-inflamatória	*In vivo* *In vitro*	[18]
	Antiofídica	*In vitro* *In vivo*	[8, 9, 16, 74]
	Antidiabética	*In vitro* *In vivo*	[24, 59, 75]
	Citotóxica	*In vitro* *Ex vivo*	[61]
	Antimicrobiana	*In vitro*	[58, 76, 77]
	Analgésica	*In vivo*	[78]

Quadro 2 - Atividades biológicas investigadas da espécie *Jatropha gossypiifolia* (Conclusão).

Folhas	Antidiarreica	*In vivo*	[78]
	Sedativa	*In vivo*	[78]
	Anticolinesterase	*In vitro*	[79]
	Contraceptiva	*In vivo*	[80]
	Anticonvulsivante	*In vivo*	[81]
	Hepatoprotetora	*In vivo*	[82]
Inflorescências	Antimicrobiana	*In vitro* *In sílico*	[20]
Raízes	Antimicrobiana	*In vitro*	[67]
	Citotóxica	*In vitro*	[70]
	Anticonvulsivante	*In vivo*	[81]
Látex	Antimicrobiana	*In vitro*	[83]
	Anticolinesterase	*In vivo*	[84]
Frutos	Antidepressiva	*In vivo* *In sílico*	[85]
	Ansiolíticas	*In vivo* *In sílico*	[85]
	Anti-helmínticas	*In vivo* *In sílico*	[85]

Fonte: Próprio autor.

Entre as atividades estudadas, o potencial antiofídico tem recebido atenção especial devido ao seu uso etnofarmacológico e algumas comprovações científicas. Investigações realizadas com o extrato aquoso das folhas demonstraram sua capacidade de inibir os efeitos enzimáticos e biológicos causados pelos venenos de *Bothrops jararaca* e *Bothrops erythromelas,* tanto *in vitro* quanto *in vivo* em modelos animais [8, 9, 16]. Outros autores verificaram que extratos provenientes das folhas, raízes e galhos da planta apresentam um importante efeito inibitório *in vitro* sobre fosfolipases A_2 presentes na peçonha de *Naja naja* [74]. Esses achados sugerem que *J. gossypiifolia* representa uma

fonte promissora de moléculas com potencial para o desenvolvimento de inibidores de toxinas ofídicas.

1.3 Epidemiologia dos acidentes ofídicos

Estima-se que, anualmente, ocorram entre 81.410 e 137.880 mortes por picadas de serpente em todo o mundo, além de um número cerca de três vezes maior de amputações e outras sequelas permanentes. Dado o número elevado de casos, em junho de 2017, a OMS incluiu o envenenamento por picada de serpente na lista das doenças tropicais negligenciadas (DTNs), reconhecendo que, embora os dados disponíveis sejam incompletos, a mortalidade e a morbidade associadas a esses agravos, sobretudo em regiões tropicais e subtropicais, vêm sendo subestimadas e que uma resposta internacional coordenada é urgente [1]. Trata-se, portanto, de uma grave crise de saúde pública global, agravada pela escassez de antivenenos eficazes para o tratamento das picadas de espécies clinicamente relevantes, predominantes principalmente na África, Ásia e América Latina [86].

No Brasil, no período de 2021 a 2025 foram registrados mais de 1.450.000 casos de acidentes por picadas de serpentes, os quais resultaram em um total de 2.155 mortes diretas e indiretas [2] (Tabela 1).

Tabela 1 - Dados de acidentes envolvendo espécies de serpentes no Brasil entre 2021 e 2025, com base no SINAN.

Gênero da serpente	Total de acidentes	Curados	Óbitos diretos	Óbitos indiretos
Bothrops	100.795	100.337	412	46
Crotalus	12.549	12.355	128	66
Micrurus	1.716	1.714	2	-
Lachesis	1.625	1.609	16	-
Não peçonhenta	12.686	12.674	10	2
Não identificado	1.323.399	1.321.866	1.342	191
Total	1.452.770	1.450.555	1.910	245

Fonte: Adaptado de SINAN, 2025 [2].

No contexto da herpetofauna de interesse médico no Brasil, destacam-se os gêneros *Bothrops*, *Crotalus*, *Lachesis* e *Micrurus*, tradicionalmente reconhecidos pela relevância clínica dos acidentes ofídicos a eles associados. Esses grupos são popularmente representados pelas espécies conhecidas como jararaca (*Bothrops* spp.), cascavel (*Crotalus* spp.), surucucu (*Lachesis* spp.) e coral-verdadeira (*Micrurus* spp.), que ocupam diferentes nichos ecológicos e apresentam distintas características biológicas e epidemiológicas [87].

Entre esses gêneros, o gênero *Bothrops* se sobressai pela elevada frequência de envenenamentos registrados em território nacional, sendo responsável pela maior parcela de casos notificados e também pelo maior número de óbitos decorrentes de acidentes ofídicos [88]. No âmbito clínico-epidemiológico, os acidentes de maior importância estão vinculados principalmente às espécies *Bothrops atrox*, *Bothrops jararaca*, *Bothrops moojen* e *Bothrops jararacussu*, que figuram entre as serpentes mais frequentemente associadas a acidentes graves em diferentes regiões do país. Tal predominância está relacionada à ampla distribuição geográfica das espécies do gênero, à sua alta densidade populacional e ao comportamento sinantrópico observado em algumas delas, fatores que aumentam significativamente as chances de interação com populações humanas [89, 90].

Vale ressaltar que as populações mais afetadas por esses incidentes são, em sua maioria, homens de 20 a 59 anos, residentes nas regiões Norte e Nordeste, com destaque para trabalhadores rurais e indivíduos em condições socioeconômicas mais vulneráveis. As picadas ocorrem predominantemente nos pés e nas pernas, o que reflete o contato direto com o ambiente de trabalho e de subsistência. O maior número de óbitos também se concentra nesse perfil populacional e geográfico, evidenciando um problema crônico relacionado não apenas à elevada incidência de acidentes, mas também às desigualdades estruturais dessas regiões [91].

1.4 *Bothrops jararacussu*

A espécie *Bothrops jararacussu*, popularmente conhecida como *jararacuçu, surucucu-dourada* ou *jaçu*, é uma das maiores espécies do gênero *Bothrops*, podendo atingir até 2,2 metros de comprimento; logo, está entre os

maiores viperídeos do Brasil. Apresenta dimorfismo sexual, sendo as fêmeas geralmente maiores que os machos, característica associada à maior produção de filhotes. A espécie possui padrões de coloração marcantes: a região frontal da cabeça é negra, contrastando com as laterais amareladas. O dorso apresenta fundo escuro, intercalado por faixas oblíquas de amarelo intenso, enquanto o ventre é predominantemente amarelo (Figura 3). Essa combinação, somada às manchas dorsais irregulares, que podem se fundir, garante uma camuflagem eficiente em ambientes florestais [89, 92].

Figura 3 – Fotografia da espécie *Bothrops jararacussu* em habitat florestal.



Fonte: Retirado de iNaturalist [93].

Sua distribuição geográfica abrange o Sudeste, o Sul e parte do Centro-Oeste do Brasil, estendendo-se também ao Paraguai, à Bolívia e à Argentina. No território brasileiro, ocorre em fragmentos da Mata Atlântica nos estados da Bahia, Minas Gerais, Espírito Santo, Rio de Janeiro, São Paulo, Paraná, Santa Catarina, Rio Grande do Sul e Mato Grosso do Sul, geralmente associada a áreas úmidas e com densa cobertura vegetal, como pântanos e rios (Figura 4). Do ponto de vista ecológico, a *B. jararacussu* é uma serpente terrestre, de

hábitos noturnos e atividade predominantemente crepuscular. Sua reprodução é vivípara, com ninhadas que podem variar de 13 a 70 filhotes, alimentando-se principalmente de mamíferos, anfíbios, lagartos, cobras e centopeias [94–96].

Figura 4 - Distribuição geográfica da espécie *B. jararacussu* no território brasileiro.



Fonte: Adaptado de: Aguiar*, et al*. 2020 [96].

Os sintomas clínicos decorrentes do envenenamento por *Bothrops jararacussu* variam em gravidade e são usualmente classificados em quadros leves, moderados e graves. De modo geral, a evolução clínica do envenenamento por *B. jararacussu* depende da quantidade de veneno inoculada, do tempo até o atendimento médico e da resposta individual do paciente [97].

Nos casos leves, predominam manifestações locais, como dor intensa no local da picada, edema, equimoses, formação de bolhas e pequenos sangramentos. Além disso, podem ocorrer alterações discretas na coagulação sanguínea, caracterizadas por incoagulabilidade parcial e fenômenos hemorrágicos leves, incluindo gengivorragia, hematúria e sangramentos em ferimentos pré-existentes. Nos quadros moderados, observa-se intensificação do edema e das equimoses, acompanhada de sangramentos mais evidentes e de distúrbios de coagulação mais acentuados. Por sua vez, os casos graves são

caracterizados por hemorragias extensas, hipotensão arterial, alterações hemodinâmicas significativas, como choque, e comprometimento da função renal, manifestado por anúria ou oligoanúria. Adicionalmente, podem ocorrer complicações secundárias, como infecção local, necrose tecidual, síndrome compartimental e déficits funcionais permanentes, decorrentes do dano tecidual e da intensa resposta inflamatória local [98].

1.4.1 Veneno botrópico

Os venenos de serpentes estão entre as secreções biológicas mais complexas conhecidas e constituem uma inovação evolutiva determinante. Essa adaptação possibilitou a transição de mecanismos de predação mecânicos, como a constrição, para mecanismos químicos mediados por toxinas, favorecendo a diversificação e o sucesso evolutivo do grupo [96].

Do ponto de vista bioquímico, os venenos consistem em misturas heterogêneas de proteínas e peptídeos bioativos, cuja composição varia amplamente entre espécies e até mesmo entre indivíduos da mesma espécie. Essa variabilidade pode estar associada a fatores filogenéticos, ontogenéticos, sexuais, geográficos e dietéticos. Contudo, a diversidade observada está relacionada principalmente às diferenças nos níveis de expressão relativa de cada classe de toxina, em vez da presença ou ausência de famílias proteicas principais [96, 99–103].

No caso específico de *Bothrops jararacussu* o veneno apresenta um perfil proteico caracterizado pela predominância de metaloproteinases de veneno de serpente (SVMPs), pertencentes às classes PI, P-II e P-III; fosfolipases A_2 (PLA_2); serinoproteinases de veneno de serpente (SVSPs); lectinas tipo C (CLECs) e proteínas semelhantes a lectinas tipo C (CLECLs); L-aminoácido oxidases (LAAOs); fator de crescimento nervoso (NGF); proteínas secretoras ricas em cisteína (CRISPs); e ecto-5'-nucleotidase (ECTO-NT) [103].

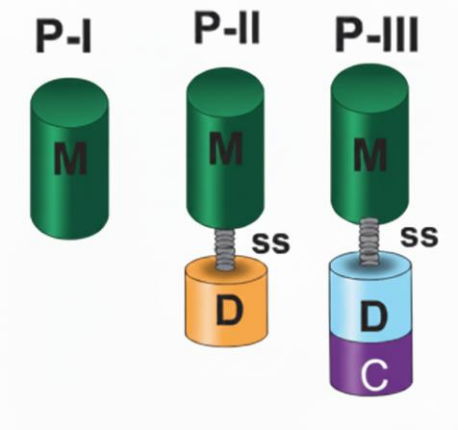
1.4.1.1 Metaloproteinases de veneno de serpente (SVMPs)

As SVMPs constituem uma família de proteínas multidomínio altamente representativa nos venenos de serpentes da família *Viperidae*. Essas enzimas são dependentes de zinco e exercem papel central na toxicidade do veneno,

particularmente nos processos de degradação da matriz extracelular e na indução de hemorragias [104].

Existem três classes principais de SVMPs, que se baseiam na presença ou na ausência de domínios estruturais específicos. Todas apresentam o domínio catalítico de metaloproteinase, porém diferem na composição dos domínios acessórios. As SVMPs da classe P-I, com massa molecular entre 20 e 30 kDa, contêm exclusivamente o domínio de metaloproteinase. As proteínas da classe P-II, com massa molecular entre 30 e 60 kDa, apresentam, adicionalmente, um domínio desintegrina e podem ser subdivididas em cinco subclasses: P-IIa, P-IIb, P-IIc, P-IId e P-IIe. Já as SVMPs da classe P-III, com massas entre 60 e 100 kDa, possuem um arranjo estrutural mais complexo, incluindo, além do domínio catalítico, um domínio do tipo desintegrina e um domínio C-terminal rico em cisteína, sendo classificadas em P-IIIa, P-IIIb, P-IIIc e P-IIId (Figura 5) [104–106].

Figura 5 - Representação das subclasses de SVMPs.



Fonte: Adaptado de: Olaoba, 2020 [104].

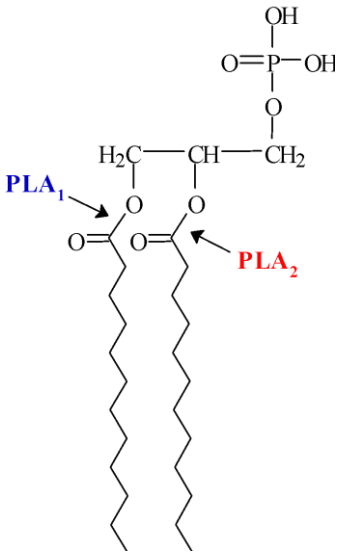
Dessa forma, a diversidade estrutural das SVMPs reflete sua complexidade funcional e explica a ampla gama de efeitos patológicos associados às diferentes classes. Entre os principais efeitos destacam-se as hemorragias locais e sistêmicas, resultantes da degradação de componentes da matriz extracelular, como colágeno, laminina e fibronectina, e da clivagem de proteínas da membrana basal dos capilares, o que compromete a integridade vascular [104, 107]. Além disso, essas enzimas estão envolvidas em processos

de necrose tecidual, decorrentes tanto da destruição da matriz, quanto da indução de inflamação exacerbada. Outro efeito relevante é a interferência na hemostasia, uma vez que muitas SVMPs atuam sobre fatores de coagulação e plaquetas, podendo provocar distúrbios como incoagulabilidade sanguínea, consumo de fibrinogênio e inibição da agregação plaquetária [108–111].

1.4.1.2 Fosfolipases A_2 (PLA_2s)

A superfamília PLA_2s é uma ampla classe de esterases caracterizadas por sua capacidade de catalisar a hidrólise de glicerofosfolipídios de membrana na posição *sn*-2 da cadeia principal de glicerol dos fosfolipídios (Figura 6) gerando ácidos graxos livres.

Figura 6 - Sítios de clivagem das fosfolipases em um fosfolipídeo de membrana.



Fonte: Adaptado de: Balboa, Balsinde; 2021 [112].

Essas enzimas apresentam baixa massa molecular (14 a 18 kDa), alto conteúdo de pontes dissulfetos e estrutura tridimensional similar entre si [113]. Atualmente, as PLA_2s são classificadas em famílias funcionalmente relacionadas, incluindo: PLA_2 secretora ($sPLA_2$), fosfolipase citosólica ($cPLA_2$), PLA_2 independente de Ca^{2+} ($iPLA_2$), PLA_2 lisossomal ($LPLA_2$), PLA/aciltransferase (PLAAT), PLA_2 do tecido adiposo (AdPLA), fator de ativação plaquetária acetil-hidrolase (PAF-AH), α/β hidrolase (ABHD) e a PLA_2 específica de glicosilfosfatidilinositol ($GPI\text{-}PLA_2$) [114].

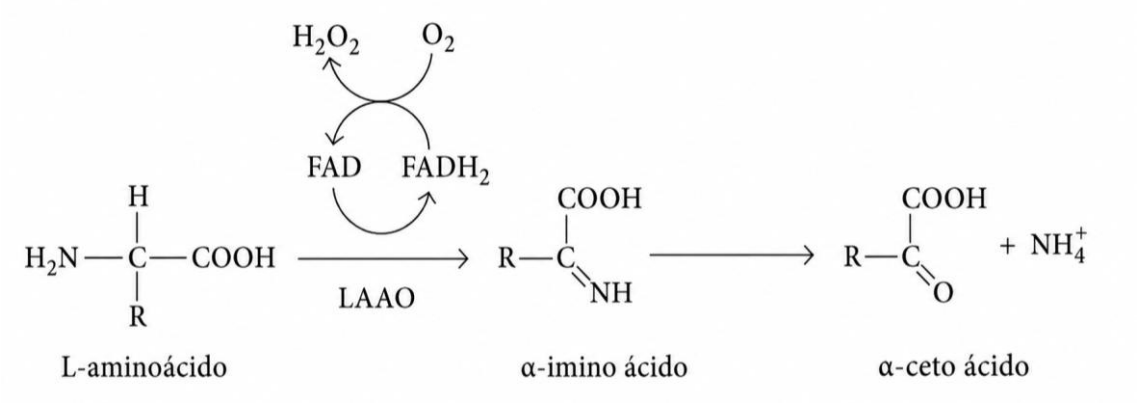
A reação catalisada pelas PLA_2s promove principalmente a permeabilização e a ruptura da integridade da membrana celular, o que resulta em um influxo descontrolado de íons Ca^{2+}, que desencadeiam um conjunto de eventos que levam à apoptose celular. Paralelamente, a reação induz a liberação de ácidos graxos livres, como o ácido araquidônico, que pode ser convertido em prostaglandinas e leucotrienos, contribuindo para a mediação de processos inflamatórios e dor, e lisofosfolipídios, que podem ser acetilados em fatores ativadores de plaquetas desencadeando processos coagulativos [114, 115].

Os efeitos fisiopatológicos decorrentes da ação dessas enzimas são amplos e incluem necrose aguda do músculo esquelético, hemorragias, reações inflamatórias locais (como edema, influxo de leucócitos e dor), paralisia flácida, cardiotoxicidade e neurotoxicidade. Tais manifestações tornam as PLA_2s componentes de elevada relevância na toxicidade dos venenos ofídicos, além de potenciais alvos terapêuticos e biomoleculares de interesse farmacológico [105].

1.4.1.3 L-aminoácidos oxidases (LAAOs)

As LAAOs são glicoproteínas homodiméricas dependentes de FAD, com massas moleculares entre 50 e 70 kDa. Essas enzimas pertencem à classe das flavoenzimas e catalisam a desaminação oxidativa estereoespecífica de L-aminoácidos, resultando na formação de α-cetoácidos, amônia e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (Figura 7) [116]. Cada monômero da LAAO presente nos venenos de serpentes (svLAAO) se associa não covalentemente a um mononucleotídeo de flavina (FAD). A presença dessas flavinas é responsável pela coloração amarelada característica de muitos venenos e desempenha um papel relevante na toxicidade dessas enzimas, principalmente por promover estresse oxidativo [117].

Figura 7 - Reação de desaminação oxidativa estereoespecífica de L-aminoácidos catalisada por svLAAO.



Fonte: Adaptado de: Izidoro, et al. 2014 [118].

O H_2O_2 gerado durante a reação catalítica é considerado o principal mediador dos efeitos citotóxicos das svLAAOs. Esse composto induz peroxidação lipídica, oxidação de proteínas e danos ao DNA, além de desencadear apoptose pela via mitocondrial intrínseca, resultando na perda do potencial mitocondrial e na parada do ciclo celular. Assim, as LAAOs exercem múltiplos efeitos citotóxicos e citostáticos mediados pelo estresse oxidativo [115].

A nível fisiológico, as L-aminoácido oxidases provocam uma ampla gama de efeitos. Localmente, essas enzimas induzem edema, dor, eritema e necrose, resultantes da ação direta sobre os tecidos, da lesão das células endoteliais e da ativação de processos inflamatórios. A ação oxidativa também pode comprometer a integridade dos vasos sanguíneos e da matriz extracelular, contribuindo para o aparecimento de hemorragias. Além disso, as LAAOs podem promover hemólise, decorrente do dano oxidativo às membranas das hemácias e causar modulação do sistema de coagulação, uma vez que essas enzimas interferem na agregação e função plaquetária, favorecendo sangramentos e desequilíbrios hemostáticos. Dessa forma, as LAAOs desempenham um papel significativo na gênese dos efeitos locais e sistêmicos observados nos envenenamentos [119–121].

1.4.2 Tratamento dos acidentes ofídicos

O tratamento do envenenamento causado por serpentes do gênero *Bothrops*, incluindo *Bothrops jararacussu*, baseia-se essencialmente na administração de antivenenos específicos. Esses imunobiológicos constituem a principal intervenção terapêutica capaz de neutralizar os componentes tóxicos do veneno e reduzir significativamente a morbimortalidade associada aos acidentes ofídicos. A soroterapia, ou tratamento com antiveneno, permanece até hoje como o único método comprovadamente eficaz para reverter os efeitos sistêmicos e locais do envenenamento botrópico, desde que administrada precocemente [122].

Os antivenenos são preparações de imunoglobulinas específicas obtidas a partir do plasma de animais de grande porte, geralmente cavalos, previamente hiperimunizados com venenos de interesse médico. Após o processo de imunização, o plasma coletado é submetido a etapas de purificação, nas quais são isoladas as imunoglobulinas responsáveis pela neutralização das toxinas [123].

Os antivenenos podem ser monoespecíficos, quando direcionados ao veneno de uma única espécie, ou poliespecíficos, quando desenvolvidos contra o veneno de diferentes espécies do mesmo gênero ou de gêneros próximos. Ambos os tipos demonstraram eficácia na neutralização dos efeitos letais e locais do envenenamento botrópico. Contudo, apesar de sua comprovada eficiência clínica, a administração e a disponibilidade desses produtos ainda enfrentam desafios logísticos, econômicos e estruturais, especialmente em regiões rurais e de difícil acesso, o que pode comprometer o sucesso terapêutico [124, 125].

A administração do antiveneno deve ser realizada exclusivamente por profissionais de saúde treinados, em ambientes hospitalares ou unidades de saúde com estrutura adequada para o manejo de possíveis reações adversas graves. Essas reações, cuja incidência pode variar conforme o tipo e a formulação do produto, vão de manifestações alérgicas leves a anafilaxia. Em áreas remotas, no entanto, o tempo de deslocamento entre o local da picada e o ponto de atendimento médico representa um obstáculo crítico. O atraso na

administração do antiveneno reduz significativamente sua eficácia e aumenta o risco de complicações locais e sistêmicas [126, 127]

Embora o antiveneno seja geralmente eficaz na neutralização das manifestações sistêmicas do envenenamento quando administrado precocemente, sua ação é limitada no controle dos efeitos locais, como dor, edema, necrose e destruição tecidual. Assim, mesmo após o tratamento, podem persistir sequelas permanentes, incluindo perda funcional de membros e deformidades, especialmente quando há atraso no início da terapêutica [126, 128].

Além das limitações farmacológicas, os antivenenos apresentam desafios relacionados à sua logística e acessibilidade. Trata-se de produtos de alto custo, cuja disponibilidade em países em desenvolvimento é frequentemente restrita por fatores econômicos, administrativos e de infraestrutura. A distribuição desses imunobiológicos para unidades de atenção primária é irregular e, muitas vezes, insuficiente, forçando pacientes a percorrer longas distâncias até centros de referência [129]. Adicionalmente, os antivenenos líquidos exigem condições adequadas de armazenamento e transporte, dependentes de uma cadeia de frio estável. Essa exigência é particularmente problemática em regiões tropicais e de infraestrutura precária, onde falhas no sistema de refrigeração comprometem a estabilidade e a distribuição dos produtos [130].

Portanto, embora os antivenenos representem o tratamento de escolha para acidentes botrópicos, sua eficácia global ainda é prejudicada por fatores como atraso no atendimento, baixa efetividade nas manifestações locais, limitações logísticas, variabilidade imunológica e restrições econômicas. Esses desafios reforçam a necessidade de estratégias complementares, incluindo o desenvolvimento de terapias adjuvantes e melhorias nos sistemas de distribuição e armazenamento, visando ampliar a eficácia e a acessibilidade do tratamento [131].

2 OBJETIVOS

2.4 Objetivo Geral

Avaliar o efeito antioxidante e o potencial de inibição enzimática da espécie *Jatropha gossypiifolia* L. frente as principais enzimas presentes no veneno de *Bothrops Jararacussu*.

2.5 Objetivos Específicos

- Preparar os extratos brutos das folhas, inflorescência, galhos e raízes de *Jatropha gossypiifolia* L e avaliar o potencial antioxidante destes;
- Avaliar a atividade de inibição enzimática dos extratos brutos frente às metaloproteinases e fosfolipases A_2 do veneno de *Bothrops jararacussu*;
- Realizar o fracionamento bioguiado por meio da atividade de inibição enzimática frente às metaloproteinases e fosfolipases A_2 do veneno de *Bothrops jararacussu;*
- Analisar as frações mais ativas e isolar as substâncias responsáveis pela inibição enzimática empregando técnicas de cromatografia;
- Identificar as substâncias presentes na fração mais ativa por meio de espectroscopia de massas;
- Avaliar o potencial de inibição enzimática das substâncias isoladas frente às metaloproteinases e fosfolipases A_2 do veneno de *Bothrops jararacussu*.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.4 Materiais

Metanol, acetonitrila, ácido acético grau UV/HPLC, e ácido fórmico de grau analítico (85%, v/v) foram adquiridos da Dinâmica (Indaiatuba, São Paulo, Brasil). Hexano, diclorometano e acetato de etila grau analítico foram adquiridos da Neon (Suzano, São Paulo, Brasil). Água deionizada foi obtida a partir de um sistema de obtenção de água ultrapura (Gehaka®, 150-9001, Brasil). O reagente de Folin-Ciocalteu, o 2,2-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH), o sal de diamônio do ácido 2,2′-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico) (ABTS), a 2,4,6-tri(2-piridil)-s-triazina (TPTZ), o ácido gálico, a catequina e o ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano-2-carboxílico (Trolox) e a azocaseína foram adquiridos da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA). Todos os outros reagentes utilizados (ácido tricloroacetico, Tris(hidroximetil)aminometano, carbonato de cálcio, DMSO, cloreto de sódio, cloreto de potássio, fosfato de potássio bibasico, fosfato dibásico de sódio dihidratado, tricloreto de alumínio hexa-hidratado, hidróxido de sódio, carbonato de sódio anidro, ácido clorídrico, acetato de sódio, nitrito de sódio, cloreto férrico hexa-hidratado e sulfato ferroso hepta-hidratado) eram de grau analítico ou superior. O antídoto botrópico pentavalente foi adquirido do Instituto Butantã.

3.5 Obtenção do veneno de *Bothrops jararacussu* e do antídoto antibotrópico

O veneno bruto liofilizado de *Bothrops jararacussu* foi gentilmente fornecido pelo Prof. Dr. Alexandre Havt Bindá, do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal do Ceará. As amostras foram armazenadas a 4 °C até o momento da utilização nos ensaios biológicos.

Para a realização dos experimentos, uma alíquota fixa do veneno foi ressuspensa em tampão fosfato-salina (PBS, pH 7,4), no volume necessário para a execução dos ensaios.

O antídoto antibotrópico pentavalente foi cedido pelo prof. Dr. Rafael Ciro Marques Cavalcante do Departamento de Farmácia de Lagarto da Universidade Federal de Sergipe.

3.6 Material vegetal

Jatropha gossypiifolia L. foi coletado na cidade de Lagarto – SE (10°55'38.4"S 37°40'20.7"W). As amostras foram devidamente herborizadas e encontram-se depositadas no Herbário da Universidade Federal de Sergipe (ASE), sob o número de registro 44110. A espécie está registrada no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SISGEN), sob o número de cadastro A6D689A.

As diferentes partes da planta foram lavadas em água corrente, e secas em estufa de circulação de ar forçada (DeLeo®, A8AFD, Brasil) a 40 °C por 72 h (folhas e inflorescência) ou 168 h (galhos e raízes). A matéria-prima vegetal seca incluiu as folhas (100 g), inflorescência (90 g), galhos (30 g) e raízes da planta (50 g).

3.7 Obtenção do extrato

Para a obtenção do extrato, quantidades adequadas das diferentes partes secas da planta foram pesadas em balança semi analítica (Shimadzu®, ATX224, Japão). O processo de extração por decocção foi realizado utilizando água purificada, na proporção de 1:10 (material vegetal/água), por 15 minutos a 100 °C. A escolha do método de extração baseou-se em literatura prévia [8], que destaca a decocção como uma das principais formas de uso na medicina popular (preparo de chás) e em pesquisas anteriores já realizadas. Os extratos aquosos obtidos foram então filtrados a vácuo utilizando papel de filtro quantitativo, congelados a -80 °C, e liofilizados (LIOTOP®, L101, Brasil) a - 52 °C, sob pressão de 350 mmHg, por um período de 96 h. Em seguida, foram armazenados a -20 °C até o momento das análises.

3.8 Obtenção das frações e análises cromatográficas

Para a obtenção das frações, empregou-se a técnica de partição líquido-líquido a partir do extrato bruto das inflorescências. O extrato seco foi ressuspenso em água deionizada, na proporção de 1:15 (extrato seco/água), para a obtenção da fração aquosa (volume final de 150 mL). Em seguida, realizaram-se partições sequenciais com hexano (3 x 50 mL), diclorometano (3 x 50 mL) e acetato de etila (3 x 50 mL), em ordem crescente de polaridade. Após a partição, as frações foram coletadas, os solventes orgânicos foram removidos por rotaevaporação (Fisaton®, 801, Brasil) a pressão reduzida e a 40 °C, enquanto a fração aquosa foi congelada e posteriormente liofilizada para a eliminação da água.

Uma vez obtida, as frações foram analisadas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) (Shimadzu®, Japão) com detector de arranjo de diodos (DAD) SPD-M20A, equipado com desgaseificador 136 DGU-20A5R, bombas binárias LC-20AR, controladora CBM-20A e programa LC solution, usando uma coluna C_{18} Shim-Pack (250 x 4,6 mm, 10 µm). A fase móvel foi composta por metanol (A) e água (B), ambos acidificados com 0,1% de ácido acético glacial, empregando-se o seguinte gradiente de eluição: 30-100% de A em 40 minutos, seguido de 100% de A por 20 minutos. As análises foram conduzidas com temperatura de injeção de 21 °C, volume de injeção de 20 µL, comprimento de onda de detecção de 262 nm e vazão de 0,8 mL min^{-1}. Antes da injeção das amostras, a coluna foi condicionada com a fase móvel metanol/água 30:70 (v/v) por 16 min na vazão de 0,8 mL/min. As amostras (concentração de 1 mg mL^{-1}) foram solubilizadas em metanol (frações hexano, diclorometano e acetato de etila) e metanol/água ultrapura 1:1 (v/v) (fração aquosa), filtradas e centrifugadas antes da injeção. Os cromatogramas foram construídos no programa Origin® versão 10.1.

3.9 Obtenção das substâncias isoladas

Inicialmente, as condições de isolamento foram definidas em colunas analíticas, de modo a identificar a que melhor separasse as substâncias de interesse. Desse modo, foi utilizado uma coluna C_{18} Shim-Pack (250 mm x 4,6

mm, 10 µm), tendo como fase móvel metanol (A) e água (B), ambos acidificados com 1,0 % de ácido acético glacial, no modo isocrático, com 35% do metanol. As análises foram conduzidas com temperatura de injeção de 21 °C (ausência de forno), volume de injeção de 20 µL, comprimento de onda de detecção de 262 nm e vazão de 0,8 mL min^{-1}. As amostras, preparadas na concentração de 1 mg mL^{-1}, foram solubilizadas em metanol e centrifugadas antes da injeção. Adicionalmente, foi utilizado uma coluna de fenil-hexil (240 mm x 3,15 mm, 10 µm), fase móvel composta por acetonitrila (A) e água (B), ambos acidificados com 1,0 % de ácido acético glacial, em modo isocrático, com 13,5% de acetonitrila. As análises foram conduzidas com temperatura de injeção de 21 °C (ausência de forno), volume de injeção de 20 µL, comprimento de onda de detecção de 262 nm e vazão de 1,5 mL min^{-1}. As amostras, na concentração de 1 mg mL^{-1}, foram solubilizadas em metanol/água ultrapura 1:1 (v/v), filtradas em papel filtro quantitativo (0,45 µm) e centrifugadas antes da injeção para remoção do precipitado insolúvel formado.

Uma vez definidas as condições de analises, realizou-se o aumento de escala para o isolamento dessas substâncias em colunas semipreparativas. O escalonamento das condições analíticas foi realizado utilizando a equação abaixo:

$$S = \frac{R_p^2 * L_p}{R_a^2 * L_a} \qquad \text{Eq. 1}$$

Onde $\mathbf{R_p}$ e $\mathbf{R_a}$ são os raios da coluna preparativa e analítica, respectivamente, e $\mathbf{L_p}$ e $\mathbf{L_a}$, são os comprimentos das colunas preparativa e analítica, respectivamente.

As amostras foram injetadas a 50 mg mL^{-1} (1000 µL) e vazão de 18,9 mL min^{-1} na coluna C_{18} (250 mm x 20 mm, 10 µm) e a 25 mg mL^{-1} (700 µL) e vazão de 10,1 mL min^{-1} na coluna fenil-hexil (240 mm x 8,33 x 10 µm), seguindo as condições definidas no modo analítico. Após a separação e coleta, as frações foram rotaevaporadas a 40 °C e posteriormente liofilizadas até a remoção total dos solventes utilizados+.

3.10 Análises das substâncias isoladas por espectroscopia de massas

As substâncias isoladas foram analisadas em LC/Q-Orbitrap-MS, constituído por um cromatógrafo líquido UHPLC (Ultra-High Performance Liquid Chromatography (Vanquish®, ThermoFisher Scientific, EUA), acoplado a um espectrômetro de massas de alta resolução, com analisador de massas do tipo Orbitrap (Q-Orbitrap MS, Exploris 240, ThermoFisher Scientific, EUA), operando com ionização por eletronebulização aquecida (H-ESI – Heated Eletrospray Ionization).

A análise por UHPLC foi realizada utilizando uma coluna de fase reversa ZORBAX RRHD Eclipse Plus C_{18} (50 × 3,0 mm, 1,8 µm), mantida a 40°C, com volume de injeção da amostra de 5 µL. A separação cromatográfica ocorreu sob uma vazão de 0,5 µL min^{-1}, com sistema de eluição composto por água (fase A) e metanol (fase B), ambas as fases modificadas com 0,1% de ácido fórmico, no gradiente de eluição 0-0,5 min, 10-40% de B; 0,5-6 min 40% de B; 6-7 min 40-90% de B; 7-9 min 90% de B. Os compostos eluídos foram analisados por espectrometria de massas utilizando a fonte ionização H-ESI, operando no modo negativo sob temperatura de vaporização de 300 °C, fluxo do Sheath Gas de 40 ua (unidades arbitrárias), fluxo do Auxiliar Gas de 10 ua, temperatura do capilar de 300 °C, voltagem do capilar de −3500 V e RF da S-Lens de 70%. A aquisição dos dados ocorreu no modo Full MS/dd-MS^2 (Top N) abrangendo uma faixa de m/z 100 – 1000, com resolução de 240000 FWHM (Full Width at Half Maximum) com taxa de aquisição de 1 microscan por segundo. O modo dd-MS^2, operou no modo Data Dependent com aquisição de 20 scans, resolução de 15000 FWHM, energia de colisão 30 (Normalized Colision Energy) e janela de isolamento de ~2 u.m.a (unidade de massa atômica). Os dados obtidos foram processados no software FreeStyle (versão 1.5, ThermoFisher Scientific) e os compostos, após atribuição da fórmula molecular com erro menor a 5 ppm, foram identificados tentativamente, por meio da comparação dos espectros de fragmentação, com os disponíveis nas bases de dados GNPS2 (GNPS - Library Explorer) ou MassBank (MassBank).

3.11 Quantificação de Compostos Fenólicos Totais (CFT)

A quantificação dos fenólicos totais dos extratos foi realizada utilizando o reagente de Folin-Ciocalteu seguindo a metodologia descrita por Jesus *et al*. (2024). Para o ensaio, cada extrato foi dissolvido no respectivo solvente de extração na concentração de 0,5 mg mL^{-1} e então centrifugado para a retirada de possíveis particulados que pudessem interferir na análise. Na sequência, 25 µL do sobrenadante de cada extrato foram misturados com 50 µL do reagente de Folin-Ciocalteu (10%, v/v) em uma placa de 96 poços. Após 5 min, 100 µL de carbonato de sódio (7,5%, m/v) foram adicionados à mistura. Na sequência, a solução foi incubada durante 1 h a temperatura ambiente (25 ± 1 °C) sob proteção da luz. Após esse período a absorbância da mistura foi medida no comprimento de onda de 765 nm em uma leitora de microplaca (BioTek®, Synergy H1, EUA). Os CFT foram expressos como miligrama de equivalente de ácido gálico por grama de peso seco do extrato seco (mg EAG g^{-1} Es) empregando uma curva de calibração de ácido gálico (0–300 mg L^{-1}) (Eq. 2). Os experimentos foram realizados em triplicata e os resultados foram expressos como média ± desvio padrão.

Eq. 2

Em que, $\underline{Abs}_a$ corresponde ao valor da média do valor da absorbância obtido pela amostra, $\mathbf{n_{(AG)}}$ corresponde ao valor do coeficiente linear obtido na curva de ácido gálico, $\mathbf{mx_{(AG)}}$ correspondente ao valor do coeficiente angular obtido na curva de ácido gálico e [Es] corresponde a concentração (g) do extrato seco utilizado.

3.12 Quantificação de Flavonoides Totais (FT)

Os FT dos extratos foram avaliados por meio da reação de complexação empregando tricloreto de alumínio hexa-hidratado ($AlCl_3.6H_2O$) seguindo a metodologia descrita por Jesus *et al*. (2024). Preliminarmente, cada extrato foi dissolvido no respectivo solvente de extração na concentração de 0,5 mg mL^{-1} e então centrifugado para a retirada de possíveis particulados que pudessem

interferir na análise. Na sequência, 25 µL do sobrenadante de cada extrato foram misturados com 25 µL de uma solução aquosa de $NaNO_2$ (5%, m/v) em uma placa de 96 poços e deixado em repouso durante 5 min. Após esse tempo, 50 µL de uma solução aquosa de $AlCl_3.6H_2O$ (10%, m/v) foram adicionados à mistura e deixado em repouso. Após 5 min, foram adicionados 200 µL de uma solução aquosa de NaOH (5%, m/v) nos poços contendo a mistura reacional e incubados durante 20 min a temperatura ambiente (25 ± 1 °C) sob proteção da luz. A absorbância foi medida no comprimento de onda de 510 nm em uma leitora de microplaca. Os FT foram expressos como miligrama de equivalente de catequina por grama do extrato seco (mg EC g^{-1} Es), empregando uma curva de calibração de catequina (0–300 mg L^{-1}) (Eq. 3). Os experimentos foram realizados em triplicata e os resultados foram expressos como média ± desvio padrão.

Eq. 3

Em que, $\underline{Abs_a}$ corresponde ao valor da média da absorbância obtido pela amostra, $\mathbf{n_{(C)}}$ corresponde ao valor do coeficiente linear obtido na curva de ácido gálico, $\mathbf{mx_{(C)}}$ correspondente ao valor do coeficiente angular obtido na curva de catequina e [Es] corresponde a concentração (g) do extrato seco utilizado.

3.13 Atividade de captura do radical DPPH

Os ensaios de atividades antioxidantes, pelo método da inibição do radical DPPH, foram realizados seguindo metodologias descritas na literatura [132]. Inicialmente, cada extrato foi dissolvido no respectivo solvente de extração na concentração de 0,5 mg mL^{-1} e então centrifugado para a retirada de possíveis particulados que pudessem interferir na análise. Na sequência, 25 µL de cada extrato foi misturado com 150 µL de solução de DPPH (400 µmol L^{-1}) em uma microplaca de 96 poços. Após o período de incubação (30 min sob proteção da luz), a temperatura ambiente (25 ± 1 °C), a absorbância de cada amostra foi medida no comprimento de onda de 517 nm utilizando uma leitora de microplaca. A capacidade antioxidante de cada extrato foi expressa como micromol de equivalente de trolox por grama de extrato seco (µmol TE g^{-1} Es) empregando

uma curva analítica de trolox (0–1000 μmol L^{-1}) (Eq. 4). Os experimentos foram realizados em triplicata e os resultados foram expressos como média ± desvio padrão.

Eq. 4

Em que, $\underline{Abs_a}$ corresponde ao valor da absorbância obtido pela amostra, **$n_{(AG)}$** corresponde ao valor do coeficiente linear obtido na curva de trolox, **$mx_{(AG)}$** correspondente ao valor do coeficiente angular obtido na curva de trolox e **[Es]** corresponde a concentração (g) do extrato seco utilizado.

3.14 Atividade de redução do ferro (FRAP)

Os ensaios de atividade antioxidante, pelo método de redução do ferro (FRAP), foram realizados de acordo com metodologias previamente descritas na literatura com algumas modificações [132]. A solução reagente de FRAP foi preparada a partir da mistura de tampão acetato (0,3 mol L^{-1}), solução de TPTZ (10 mmol L^{-1}) e solução de cloreto férrico (20 mmol L^{-1}), na proporção de 10:1:1. Para cada ensaio, 9 μL do extrato foram adicionados a 27 μL de água destilada e 270 μL do reagente de FRAP, nesta ordem, em microplaca de 96 poços. A mistura foi mantida em repouso por 30 minutos a 37 °C, protegida da luz, e, em seguida, a absorbância foi medida a 595 nm em leitor de microplacas. O poder antioxidante redutor férrico de cada extrato foi expresso em micromol de equivalentes de trolox por grama de extrato seco (μmol TE g^{-1} Es), com base em curva padrão (0–1000 μmol L^{-1}) (Eq. 5). Todos os experimentos foram realizados em triplicata e os resultados expressos como média ± desvio padrão.

Eq. 5

Em que, $\underline{Abs_a}$ corresponde ao valor da média da absorbância obtido pela amostra, **$n_{(AG)}$** corresponde ao valor do coeficiente linear obtido na curva de trolox, **$mx_{(AG)}$** correspondente ao valor do coeficiente angular obtido na curva de trolox e **[Es]** corresponde a concentração (g) do extrato seco utilizado.

3.15 Inibição da atividade proteolítica

A atividade proteolítica do veneno foi determinada colorimetricamente utilizando azocaseína como substrato, conforme descrito previamente na literatura, com algumas adaptações [9]. O veneno reconstituído em tampão PBS foi pré-incubado por 30 minutos a 37 °C com diferentes concentrações dos extratos, frações ou subfrações na proporção 95 µL de veneno para 5 µL da substância de análise. Os extratos foram solubilizados em PBS, enquanto as frações e subfrações foram solubilizadas em DMSO de modo que a concentração final do DMSO fosse de 5%. Em seguida, em cada tubo, foram adicionados 100 µL de azocaseína (10 µg mL^{-1} em tampão Tris-HCl pH 7,4) e incubados por 90 minutos a 37 °C (SHEL LAB®, SCO5W EUA). A reação enzimática foi interrompida pela adição de 100 µL de ácido tricloroacético a 5%. Após 30 minutos em temperatura ambiente, os tubos foram centrifugados a 15.000 g por 10 minutos a 22 °C. O sobrenadante (100 µL) foi coletado e misturado em partes iguais com 0,5 N de NaOH em uma microplaca de 96 poços (Multiskan GO®, 1.00.40, EUA). Após 10 minutos à temperatura ambiente, as amostras foram lidas a 440 nm em um leitor de microplacas. Os brancos para cada concentração foram preparados da mesma forma, exceto pela adição do substrato que ocorreu somente após a adição do ácido tricloroacético. O antídoto antibotrópico pentavalentena (250 µg mL^{-1}) foi utilizada como controle positivo.

A atividade proteolítica foi determinada com base na reação de hidrólise da azocaseína. O produto da hidrólise, de cor amarelada, foi detectado espectrofotometricamente a 440 nm. Os resultados foram expressos como porcentagem de inibição proteolítica, apresentados como média ± erro padrão, com n = 3 (Eq. 6).

Eq. 6

Em que $\underline{Abs}_a$ corresponde à média da absorbância da amostra contendo o extrato testado e $\underline{Abs}_{(C-)}$ representa a média da absorbância do controle negativo, no qual o veneno foi incubado apenas com o substrato (100% de atividade enzimática).

3.16 Inibição da atividade fosfolipásica

A atividade antifosfolipase A_2 contra o veneno foi determinada turbidimetricamente em microplacas de 96 poços usando uma suspensão de gema de ovo como substrato, como previamente descrito na literatura, com algumas adaptações [9].

Primeiro, a gema de ovo foi misturada com PBS pH 7,4 em uma proporção de 1:3 (v/v, gema de ovo/PBS) e, em seguida, centrifugada a 400 g por 2 min em temperatura ambiente. Após isso, o sobrenadante foi coletado e a sua absorbância foi padronizada a 0,900 utilizando tampão Tris-HCl pH 7,4 para o ajuste. As condições do experimento foram inicialmente determinadas por um estudo prévio no qual diferentes concentrações de substratos (determinadas a partir da leitura de suas absorbâncias) foram incubadas com o veneno por 40 minutos.

O veneno reconstituído em tampão PBS foi pré-incubado por 30 minutos a 37 °C com diferentes concentrações dos extratos, frações ou subfrações, na proporção 95 µL de veneno para 5 µL da substância de análise. Os extratos foram solubilizados em PBS, enquanto as frações e subfrações foram solubilizadas em DMSO de modo que a concentração final do DMSO fosse de 5%.Os brancos para cada concentração de extrato foram preparados de forma semelhante, exceto pela substituição do substrato por um volume igual de tampão de ensaio. A atividade antifosfolipásica foi avaliada com base na redução da absorbância medida a 925 nm, após incubação por 30 minutos a 37 °C, utilizando leitor de microplaca. A porcentagem de inibição da atividade da fosfolipase A_2 (PLA_2) foi calculada considerando a diminuição turbidimétrica do substrato em comparação com os controles (Eq. 7). Os resultados foram expressos como porcentagem de inibição da atividade antifosfolipásica, sendo apresentados como média ± erro padrão da média (n = 3). As amostras foram comparadas com o antídoto antibotrópico pentavalente na concentração de 500 µg mL^{-1}.

Eq. 7

Em que $\underline{Abs_a}$ corresponde à absorbância da reação contendo o extrato e o veneno, $\underline{Abs_{(C+)}}$ refere-se à absorbância da reação contendo apenas o veneno (100% da atividade enzimática) e $\underline{Abs_{(C-)}}$ representa o controle no qual apenas o substrato foi incubado (ausência de veneno e extrato).

3.17 Ensaio de citotoxicidade (atividade hemolítica)

O ensaio de atividade hemolítica foi realizado baseado na metodologia descrita por Robert *et al*., com pequenas modificações [26]. Inicialmente, 4 mL de sangue foram centrifugados a 2.500 rpm por 10 min e o plasma foi descartado. Os eritrócitos foram lavados 3 vezes em tampão PBS pH 7,4 e por fim ressuspendidos a 20% (v/v) em PBS. Para o ensaio, 495 µL da suspenção de eritrócitos foram incubadas a 37 °C por 60 min com 5 µL dos extratos ou das frações em diferentes concentrações. O sobrenadante obtido após centrifugação a 10.000 rpm por 2 minutos foi lido em espectofotometro a 540 nm. Triton X-100 a 1% (v/v) foi utilizado como controle positivo (100% de hemólise de eritrócitos) e PBS pH 7,4 foi utilizado como controle negativo (ausência de hemólise). A atividade citotóxica foi calculada baseado na quantidade de hemoglobina liberada no meio comparado ao controle positivo (Eq. 8). Os experimentos foram realizados em triplicata e os resultados foram expressos como média ± desvio padrão.

Eq. 8

Em que, $\underline{Abs_a}$ corresponde ao valor da absorbância obtido pela amostra, e $\underline{Abs_{(C+)}}$ representa a absorbância do controle positivo em que a suspenção de eritrócitos foi incubado junto ao Triton X-100.

3.18 Análises estatísticas

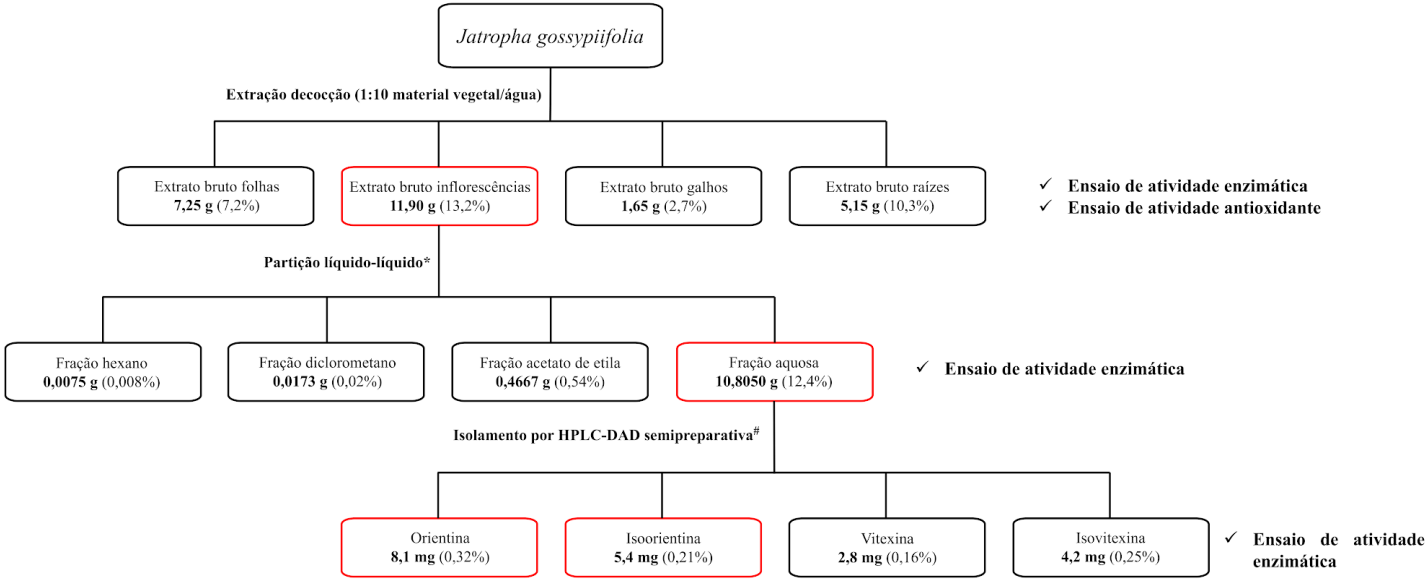
Os dados obtidos nos ensaios *in vitro* (atividades antioxidantes, enzimáticas e citotóxicas) foram tratados estatisticamente com o programa GraphPad Prism® 9.0, por meio de Análise de Variância (ANOVA) de via única,

seguido de pós Teste de Tukey. Para todas as análises estatísticas as diferenças com $p < 0,05$ foram consideradas significativas.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para facilitar a compreensão e a visualização do delineamento experimental, construiu-se um fluxograma do processo de isolamento bioguiado pelos ensaios de inibição enzimática (Figura 8).

Figura 8 - Fluxograma do isolamento bioguiado de substâncias de *Jatropha gossypiifolia*.



Nota: Os rendimentos de obtenção dos extratos, frações e substâncias isoladas foram determinados com base na massa de vegetal seco. * Massa do extrato bruto utilizada para a partição: 11,5 g. # Massa da fração aquosa utilizada para o isolamento: 0,3 g (Orientina e Isooreintina) e 0,2 g (Vitexina e isovitexina).

O fluxograma apresenta as etapas metodológicas, desde a obtenção dos extratos brutos até as fases subsequentes de fracionamento e isolamento, e avaliações da atividade de inibição enzimática (metaloproteases e fosfolipases), bem como o ensaio de atividade antioxidante desses extratos.

4.4 Extratos brutos de *J. gossypiifolia*

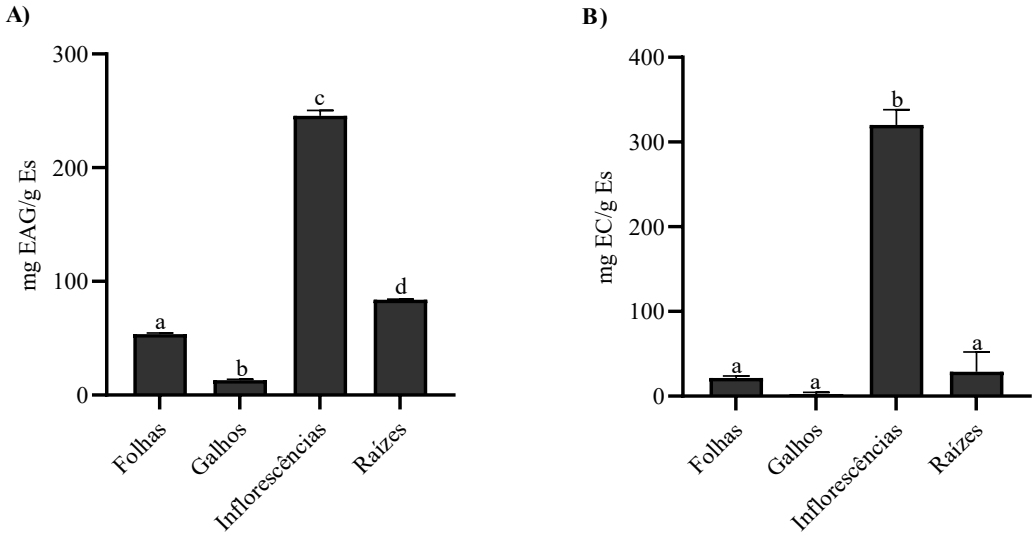
Os resultados de rendimento dos extratos brutos demonstraram uma variação entre as diferentes partes de *Jatropha gossypiifolia*. O extrato bruto das inflorescências apresentou o maior rendimento entre as partes vegetais avaliadas, totalizando 11,9 g (13,2%), seguido pelos extratos das raízes, com 5,15 g (10,3%), das folhas, com 7,25 g (7,2%), e dos galhos, que apresentaram o menor rendimento, correspondendo a 1,65 g (2,7%). A partir deles, foram realizados os ensaios de triagem e inibição enzimática.

4.4.1 Quantificação de compostos fenólicos totais e flavonoides totais

Os compostos fenólicos e os flavonoides constituem uma ampla classe de metabólitos secundários que desempenham funções essenciais para o desenvolvimento e a sobrevivência das plantas, sendo necessários no processo de crescimento, atração de polinizadores e defesa contra doenças e pragas. Em razão de suas diversas atividades biológicas, a triagem fitoquímica e a quantificação desses metabólitos figuram entre as principais abordagens empregadas na prospecção do potencial terapêutico e farmacológico de espécies vegetais [133].

Desse modo, o teor de compostos fenólicos e flavonoides totais foi determinado nos extratos brutos das diferentes partes da espécie *J. gosyspiifolia.* Observou-se a maior concentração nas inflorescências, com 245,7 ± 4,73 mg EAG g^{-1}, seguido pelas raízes (83,9 ± 0,56 mg EAG g^{-1}), galhos (53,6 ± 0,96 mg EAG g^{-1}) e folhas (13,2 ± 0,63 mg EAG g^{-1}). No que se refere ao teor de flavonoides totais, as inflorescências também apresentaram a maior concentração, com 320,1 ± 17,9 mg EC g^{-1}, seguido das raízes (28,9 ± 23,46 mg EC g^{-1}), galhos (21,4 ± 2,6 mg EC g^{-1}) e folhas (2,6 ± 1,9 mg EC g^{-1}) (Figura 9) que foram estatisticamente iguais ente si.

Figura 9 - Quantificação de compostos fenólicos totais (A) e flavonoides totais (B) dos extratos brutos das folhas, inflorescência, galhos e raízes de *Jatropha gossypiifolia***.**



Fonte: Próprio autor.

Nota: Letras diferentes representam diferenças estatísticas significativas entre as amostras ($p<0,05$).

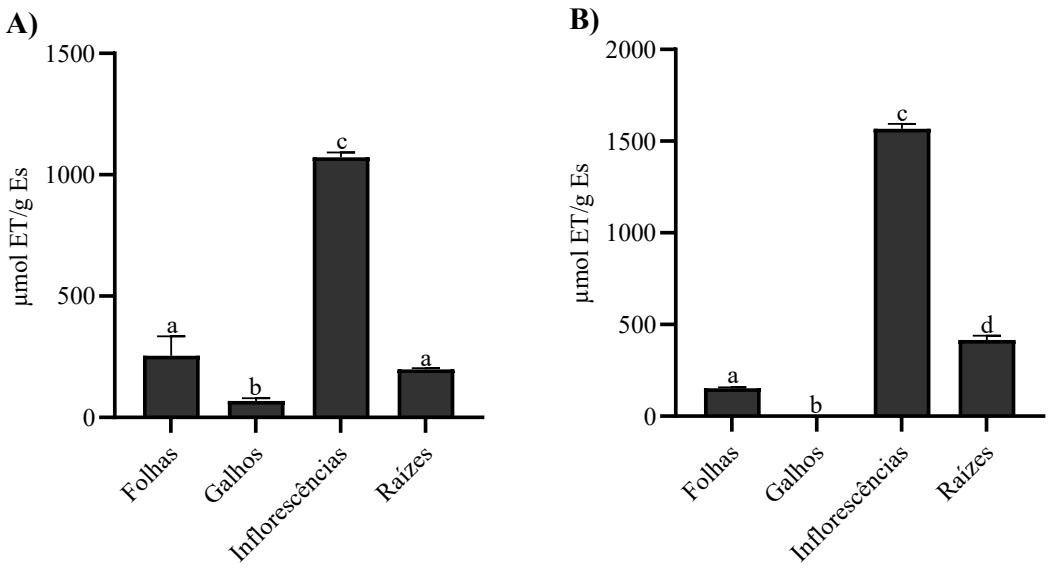
Nas plantas, a distribuição de metabólitos secundários tende a ser específica de determinada espécie, do órgão, do tecido e do estágio de desenvolvimento. Mesmo dentro de uma mesma espécie, diferentes partes da planta podem apresentar variações substanciais tanto nos tipos, quanto nas quantidades desses metabólitos [134]. Ma e colaboradores (2024), em sua revisão, analisaram o padrão de acúmulo de compostos fenólicos e flavonoides em diferentes espécies vegetais e destacaram que o teor dessas substâncias não é uniforme entre os órgãos da planta. De modo geral, observou-se maior concentração nas partes aéreas, especialmente em folhas e inflorescencias, o que se justifica pelo papel desses metabólitos como agentes antioxidantes, fotoprotetores e agentes de defesa contra patógenos e herbívoros. Nas flores, esse acúmulo apresenta ainda mais relevância, uma vez que muitos compostos fenólicos e flavonoides atuam na produção de cor e aroma, contribuindo para a atração de polinizadores [135]. Isso pode explicar a maior concentração encontrada desses metabolitos nas inflorescências da *J. gossypiifolia* em detrimento das outras partes da planta.

Vale destacar que esses metabólitos são conhecidos por suas diferentes atividades biológicas, a exemplo de atividades antimicrobianas, anticancerígenas, ansiolíticas, antidiabéticas, antiofídicas e vasodilatadoras, tendo como principal atividade biológica atribuídas a eles a atividade antioxidante, isso destaca o possível potencial biológico da espécie [136, 137].

4.4.2 Atividade antioxidante

Os extratos brutos de *J. gossypiifolia* apresentaram atividade antioxidante pela captura do radical DPPH e pela redução do radical férrico, como pode ser observado na Figura 10. No ensaio DPPH, o extrato das inflorescências apresentou a maior atividade antioxidante (1094 ± 20,4 µmol ET g^{-1}), seguido pelas folhas (254 ± 10,7 µmol ET g^{-1}) e raízes (198,4 ± 5,1 µmol ET g^{-1}) que foram equivalentes. O extrato dos galhos apresentou a menor atividade de captura do radical DPPH (68,4 ± 10,7 µmol ET g^{-1}). No ensaio FRAP, as inflorescências apresentaram a maior atividade antioxidante (1.567,9 ± 26,6 µmol ET g^{-1}), seguidas pelas raízes (415,9 ± 23,1 µmol ET g^{-1}) e pelas folhas (151,9 ± 6,1 µmol ET g^{-1}). A fração proveniente dos galhos não exibiu atividade redutora detectável.

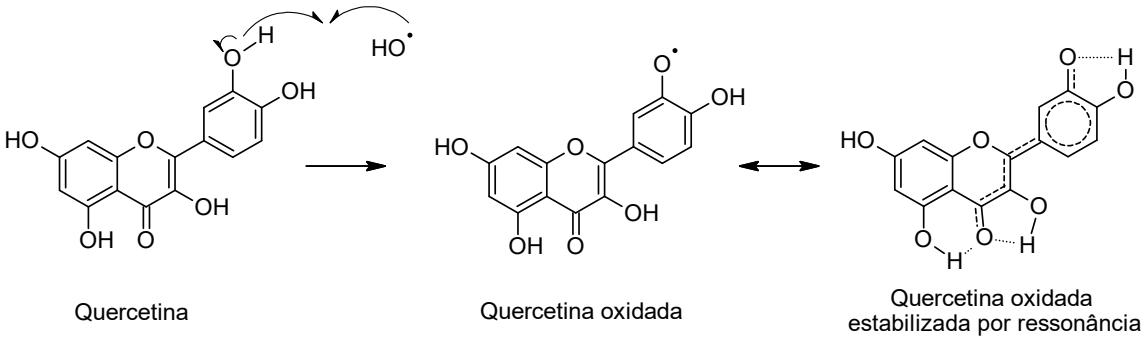
Figura 10 - Atividade antioxidante dos extratos brutos de *Jatropha gossypiifolia* pelos ensaios de DPPH (A) e FRAP (B).



Fonte: Próprio autor.

Em ambos os métodos, os extratos das inflorescências destacaram-se pelo maior potencial antioxidante. Essa maior atividade pode estar relacionada a maior presença de compostos fenólicos e de flavonoides nesse extrato. Os compostos fenólicos, especialmente os flavonoides, apresentam reconhecida capacidade antioxidante devido a suas características estruturais. Essa atividade está relacionada à presença de grupos hidroxila ligados a anéis aromáticos, o que lhes confere alta capacidade de doar elétrons ou átomos de hidrogênio para radicais livres (Figura 11). Ao realizar essa doação, o radical livre é neutralizado, formando um radical fenólico mais estável. Essa estabilidade é possível graças à ressonância eletrônica presente na estrutura aromática desses compostos, interrompendo reações em cadeia responsáveis por danos oxidativos a lipídios, proteínas e material genético. Nos flavonoides, essa eficiência antioxidante é ainda maior, pois sua estrutura, composta por dois anéis benzênicos conectados por um heterociclo, aumenta o grau de deslocalização eletrônica e estabilização do radical formado [138].

Figura 11 - Exemplo de flavonoide (quercetina) estabilizando um radical por meio de sua estrutura de ressonância.



Fonte: Próprio autor.

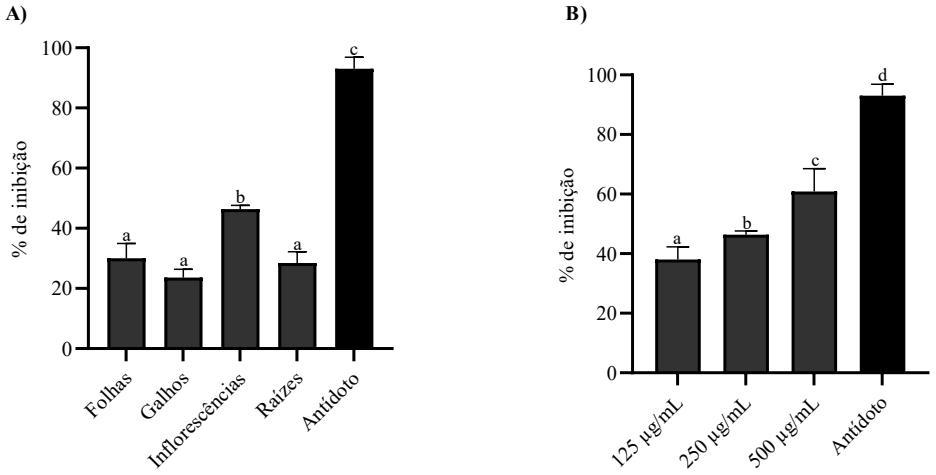
Isso indica que os compostos presentes nos extratos de *J. gossypiifolia* possuem capacidade antioxidante decorrente de múltiplos mecanismos de ação, o que reflete a diversidade estrutural dos compostos fenólicos e flavonoides da planta. Considerando que os extratos avaliados apresentam atividade antioxidante, observa-se potencial farmacológico para o tratamento de envenenamentos causados pela picada de *B. jararacussu*, haja vista que, entre os efeitos induzidos pela peçonha, destaca-se a formação de espécies reativas de oxigênio (EROs), processo frequentemente associado à ação das LAAOs.

Essas EROs contribuem para a citotoxicidade local, sobretudo por meio da oxidação de proteínas e pela indução de danos ao DNA celular. Dessa forma, os resultados sugerem que os extratos vegetais, ao atuarem na neutralização dessas espécies reativas, podem representar agentes com potencial capacidade de atenuar os efeitos oxidativos desencadeados pelo veneno [115].

4.4.3 Inibição da atividade proteolítica do veneno

Inicialmente, avaliou-se o potencial de inibição de metaloproteases com os extratos de *J. gossypiifolia* (250 µg mL^{-1}). As inflorescências apresentaram o maior valor de inibição enzimática (46,4 ± 1,3%), seguido das folhas (30,1 ± 4,9%), galhos (27,5 ± 2,7%) e raízes (32,2 ± 3,7%), com os três últimos não apresentando diferença entre si (Figura 12). Considerando que o extrato das inflorescências apresentou maior inibição, avaliou-se também se essa resposta ocorria de forma concentração-dependente, ou seja, se o aumento progressivo da concentração do extrato era capaz de intensificar proporcionalmente o efeito observado. Para isso o extrato foi avaliado em diferentes concentrações (500, 250 e 125 µg mL^{-1}). A concentração de 500 µg mL^{-1} resultou em uma inibição de 60,8 ± 7,6%, enquanto na concentração de 250 µg mL^{-1} e 125 µg mL^{-1} houve inibição de 46,4 ± 1,3% e 38,0 ± 4,3% da atividade, respectivamente.

Figura 12 – Inibição da atividade proteolítica do veneno de *Bothrops jararacussu* pelos extratos brutos das folhas, inflorescências, galhos e raízes de *Jatropha gossypiifolia* e do antídoto na concentração de 250 µg mL^{-1} (A). Avaliação da resposta concentração/atividade para o extrato bruto das inflorescências (B).



Fonte: Próprio autor.

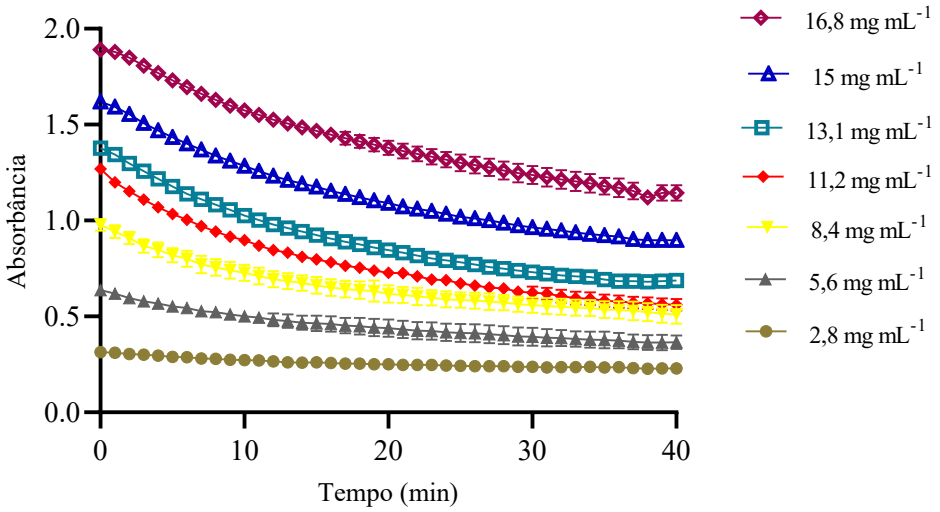
Os resultados de inibição observados mostram-se relevantes, uma vez que, no contexto do envenenamento por serpentes, muitos dos quadros clínicos graves estão diretamente associados à ação de metaloproteases ofídicas, responsáveis por desencadear hemorragias, processos inflamatórios e miotoxicidade. Assim, a capacidade inibitória demonstrada contribui para ampliar a compreensão do modo de atuação do extrato de *Jatropha gossypiifolia* frente as enzimas presentes no veneno, evidenciando seu potencial como agente modulador dos efeitos tóxicos induzidos por *Bothrops jararacussu* [104, 107].

Além disso, como observado na figura 12B, à medida que a concentração do extrato foi aumentada, verificou-se um aumento na capacidade de inibição da atividade enzimática, sugerindo um perfil de resposta possivelmente dependente da concentração. Resultados semelhantes foram descritos por Felix-Silva *et al.* (2014; 2017), ao avaliarem o extrato bruto das folhas de *J. gossypiifolia* frente aos venenos de *Bothrops jararaca* e *Bothrops erythromelas*. Os autores relataram que o incremento na razão extrato/veneno e, consequentemente, na concentração do extrato no meio reacional, intensificou o efeito inibitório sobre a atividade proteolítica, alcançando níveis de inibição de 80% e 100%, respectivamente, na maior proporção testada (100:1, v/v) [8, 9].

4.4.4 Determinação das condições para a atividade fosfolipásica

Para a determinação das melhores condições da atividade fosfolipásica, avaliou-se a cinética da reação por 40 minutos em diferentes concentrações de substrato. Observou-se que a maior diminuição da absorbância, referente a hidrólise dos fosfolipídeos presentes na gema do ovo, aconteceu nos minutos iniciais da reação. A partir de 30 minutos as curvas apresentaram tendência de platô, com uma redução discreta de suas absorbâncias, indicando um consumo quase total do substrato. Desse modo, o tempo de reação utilizado nos experimentos de inibição das fosfolipases foi 30 minutos. Já em relação à concentração do substrato, observou-se que a concentração de 8,4 mg mL^{-1}, referente a absorbância inicial de 0,900 foi adotada por se situar na faixa linear de resposta descrita pela lei de Lambert-beer (Figura 13).

Figura 13 – Avaliação do consumo de diferentes concentrações de substrato para a atividade fosfolipásica das enzimas do veneno de *B. Jararacussu*.

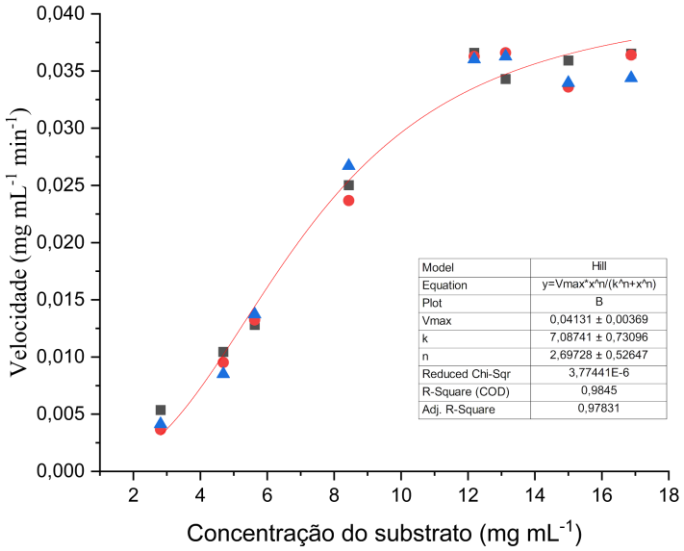


Fonte: Próprio autor.

Valores de absorbância próximos de 1,0 são normalmente utilizados em métodos espectrofotométricos por fornecerem boa sensibilidade analítica, mantendo uma boa relação sinal-ruído e reduzindo desvios de linearidade que podem ocorrer em absorbâncias mais elevadas. Além disso, essa concentração proporcionou uma variação suficientemente ampla do sinal ao longo da reação enzimática, permitindo monitorar o consumo do substrato sem atingir rapidamente a depleção do sistema em decorrência do consumo total de substrato [139].

Após o tratamento desses dados foi possível determinar a velocidade máxima aparente ($V_{max\ app}$) e a constante de Michaelis-Menten aparente ($K_{m\ app}$) das fosfolipases presentes no veneno de *B. jararacussu* (Figura 14).

Figura 14 – Cinética enzimática das fosfolipases em diferentes concentrações estimadas de substrato.



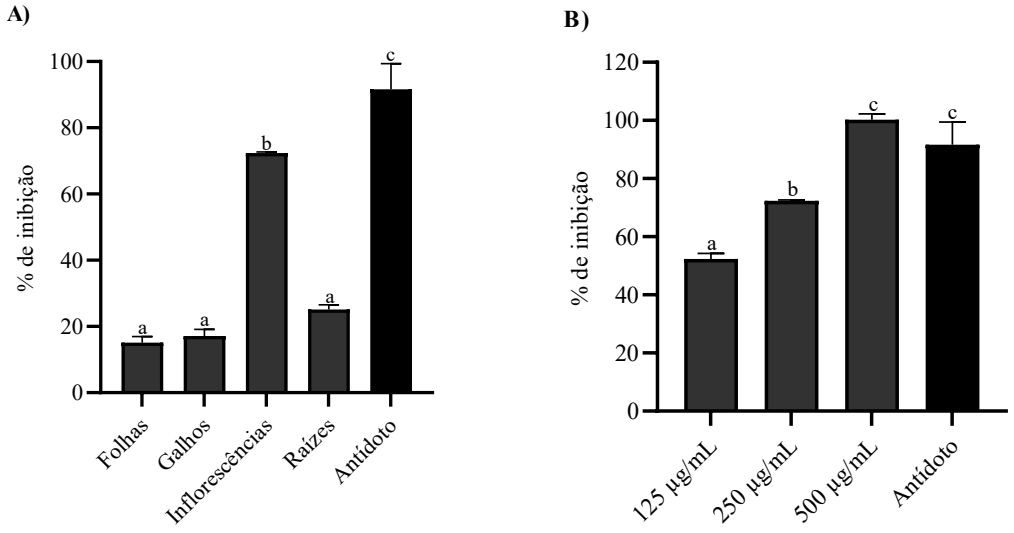
Esses parâmetros indicam a eficiência da enzima em catalisar a reação e a afinidade da enzima pelo substrato, respectivamente. Essas informações são essenciais para entender como inibidores podem afetar a cinética enzimática e a eficiência da enzima em diferentes condições. Conforme demonstrado na figura, o coeficiente de determinação obtido (R^2 = 0,9845) evidencia um bom ajuste dos dados ao modelo adotado, corroborando a adequação da metodologia empregada com as condições experimentais estabelecidas para a avaliação da atividade enzimática.

4.4.5 Inibição da atividade fosfolipásica

Uma vez determinada as condições, o ensaio foi realizado na presença dos possíveis inibidores. O extrato das inflorescências (250 µg mL^{-1}) apresentaram inibição de 72,4 ± 0,3%, seguido pelas raízes (25,1 ± 1,5% de inibição), folhas (15,2 ± 1,8% de inibição) e galhos (17,1 ± 2,0% de inibição) que foram iguais entre si. Diante disso, avaliou-se também se a atividade do extrato das inflorescências apresenta comportamento concentração-dependente, sendo testadas as concentrações de 500, 250 e 125 µg mL^{-1}. Assim, a concentração de 500 µg mL^{-1} alcançou um valor de inibição de 100,2 ± 2,0%, estatisticamente igual ao do antídoto, enquanto as concentrações de 250 µg mL^{-1} e 125 µg mL^{-1}

resultaram em inibição de 72,4 ± 0,3% e 38,6 ± 4,1%, respectivamente, como pode ser observado na Figura 15.

Figura 15 – Inibição da atividade fosfolipásica do veneno de *Bothrops jararacussu* pelos diferentes extratos brutos de *Jatropha gossypiifolia* na concentração de 250 µg mL^{-1} e antídoto na concentração de 500 µg mL (A). Avaliação da resposta concentração/atividade para o extrato bruto das inflorescências (B).



Fonte: Próprio autor.

A inibição de enzimas fosfolipásicas é um indicador importante do potencial antiofídico de um composto, pois atua sobre uma das enzimas-chave envolvidas na toxicidade do veneno incluindo efeitos neurotóxicos, miotóxicos e inflamatórios. Assim, quanto maior a capacidade de inibição das PLA_2, maior tende a ser o potencial do agente testado em atenuar quadros inflamatórios, dolorosos e necróticos associados ao envenenamento [140].

Nesse contexto, Felix-Silva et al. (2014; 2017) também avaliaram o potencial do extrato bruto das folhas de *J. gossypiifolia* frente às enzimas fosfolipásicas dos venenos de *Bothrops jararaca* e *Bothrops erythromelas*. Os autores observaram que o aumento da proporção extrato/veneno foi efetivo apenas contra o veneno de *B. erythromelas*, alcançando 100% de inibição na maior proporção testada (100:1, v/v). Em contraste, o extrato não apresentou efeito significativo sobre a atividade fosfolipásica do veneno de *B. jararaca, mesmo na proporção de* 200:1 (v/v). De acordo com os autores, essa diferença pode estar relacionada à variação estrutural entre os subtipos de PLA_2 presentes

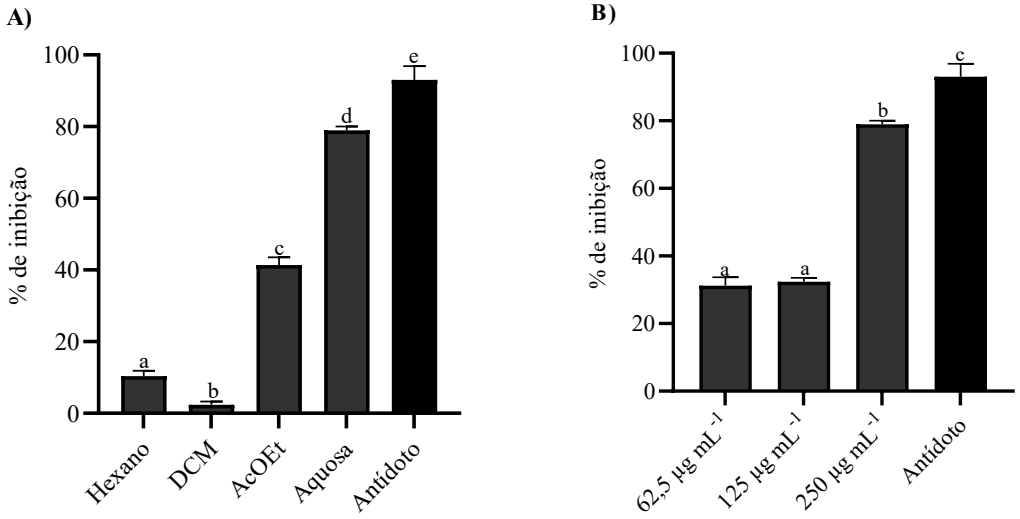
em cada veneno, o que influencia diretamente a interação química com os compostos do extrato [8, 9]. Assim, os dados obtidos no presente estudo sugerem que o extrato analisado possui potencial inibitório expressivo frente às PLA_2 do veneno de *B. jararacussu*, reforçando sua possível utilização como agente antiofídico frente a esse veneno.

4.5 Frações de *J. gossypiifolia*

4.5.1 Inibição da atividade proteolítica

Dentre as frações testadas, a fração aquosa (250 µg mL^{-1}) foi a que apresentou maior atividade inibitória (78,9 ± 1,1%), seguido da fração acetato de etila (41,3 ± 2,2%), fração hexano (10,4 ± 1,5%) e fração diclorometano (2,4 ± 0,9%). Para a avaliação do comportamento concentração-atividade da fração mais ativa (aquosa), foram avaliadas as concentrações de 250, 125 e 62,5 µg mL^{-1}. Na concentração de 250 µg mL^{-1} a fração apresentou uma inibição de 78,9 ± 1,1%. Já nas concentrações de 125 µg mL^{-1}, a inibição foi de 32,3 ± 1,2%, valor estatisticamente igual ao obtido para a concentração de 62,5 µg mL^{-1} (31,2 ± 2,5%), como demonstrado na Figura 16.

Figura 16 – Inibição da atividade proteolítica do veneno de *Bothrops jararacussu* com as frações obtidas do extrato das inflorescências de *Jatropha gossypiifolia* na concentração de 250 µg mL^{-1} (A). Avaliação da resposta concentração/atividade para a fração aquosa das inflorescências (B).



Fonte: Próprio autor.

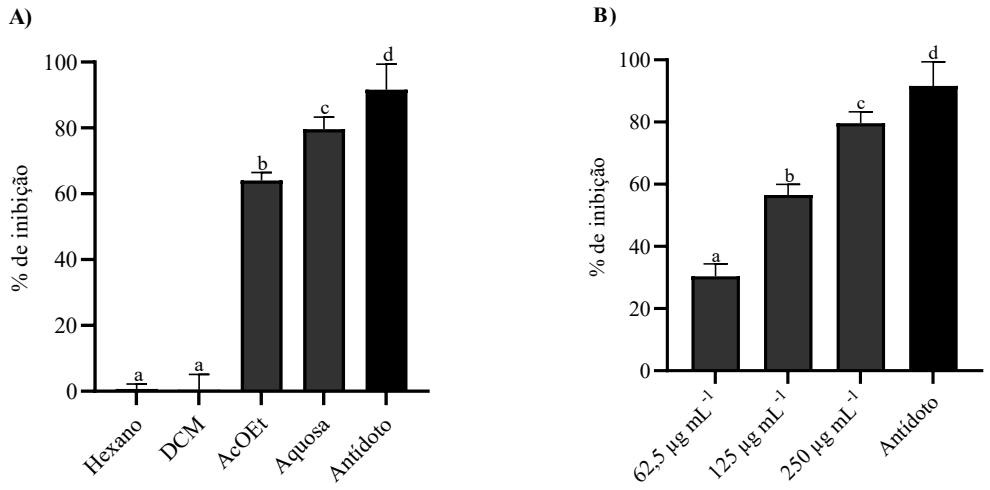
A variação observada na atividade entre as frações pode estar diretamente relacionada às diferenças qualitativas e quantitativas dos compostos presentes em cada uma delas. Durante o processo de partição, substâncias com distintas polaridades são distribuídas conforme sua afinidade pelos solventes utilizados, resultando na concentração de compostos mais apolares nas frações de hexano e diclorometano, enquanto aqueles mais polares se acumulam nas frações acetato de etila e aquosa. Assim, a variação observada entre as atividades pode estar relacionada aos perfis químicos específicos de cada fração, uma vez que a resposta biológica parece estar ligada, principalmente, à presença de compostos de caráter mais polar [141].

Como pode ser observado, a maior concentração da fração apresentou inibição significativamente superior às demais, enquanto as concentrações média e baixa resultaram em valores estatisticamente iguais. Esse padrão pode ser compreendido pela ocorrência de um platô na região inferior da curva concentração-resposta. Em extratos complexos, o aumento inicial da dose eleva rapidamente o efeito até determinado ponto, após o qual a resposta pode se estabilizar mesmo com o aumento da concentração, o que pode ocorrer devido à ocupação completa dos sítios enzimáticos de maior afinidade. Somente concentrações mais elevadas superam esse limite, promovendo um aumento efetivo da inibição enzimática, uma vez que com o aumento da concentração, outros sítios de ação menos afins passam a ser ocupados, ocorrendo uma inibição mais completa das enzimas-alvo [142].

4.5.2 Inibição da atividade fosfolipásica

Assim como no ensaio de inibição proteolítica, a fração aquosa apresentou a maior atividade de inibição fosfolipásica, com inibição de 79,6 ± 3,7%, seguido da fração acetato de etila (64,1 ± 2,3%). A fração hexano (0,7 ± 1,5%) e diclorometano (0,4 ± 4,7%) foram estatisticamente iguais e não demonstraram atividade inibitória. Novamente, para a avaliação do comportamento concentração-dependente da fração aquosa, foram avaliadas as concentrações de 250, 125 e 62,5 µg mL^{-1}, tendo valores de inibição de 79,6 ± 3,7%, 56,5 ± 3,4% e 30,4 ± 4,0% respectivamente, evidenciando que a atividade é dependente da concentração usada (Figura 17).

Figura 17 – Inibição da atividade fosfolipásica do veneno de *Bothrops jararacussu* pelas frações hexano, diclorometano, acetato de etila e aquosa das inflorescências de *Jatropha gossypiifolia* na concentração de 250 µg mL^{-1} (A). Avaliação da resposta concentração/atividade para a fração aquosa das inflorescências (B).



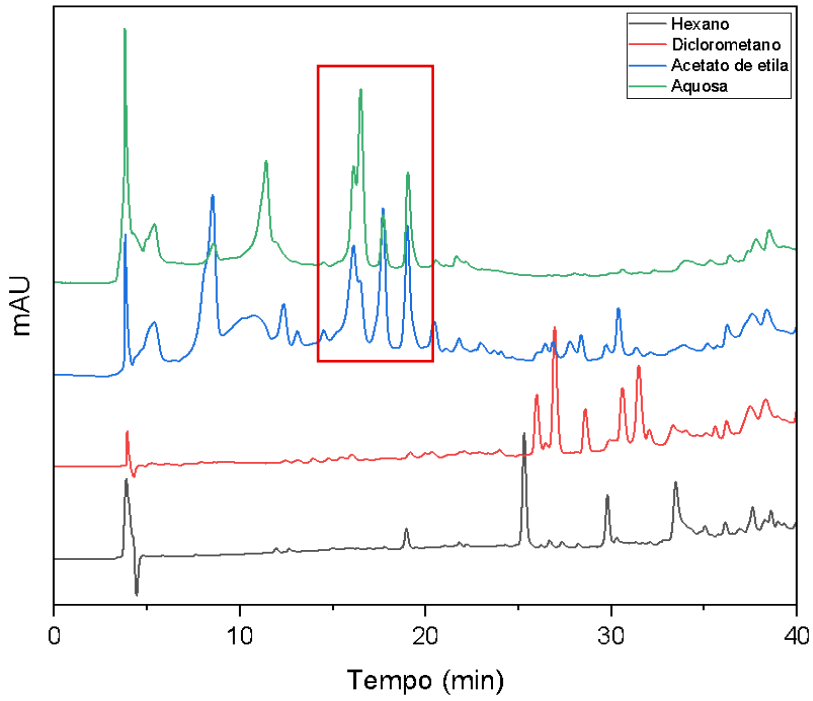
Fonte: Próprio autor.

De modo semelhante ao ensaio antiproteolítico, os resultados parecem indicar que a atividade das frações diante do ensaio enzimático parece estar associada aos compostos mais polares presentes na planta, de modo que as frações hexano e diclorometano não apresentaram atividades. Contudo, diferentemente da atividade de inibição proteolítica, a atividade antifosfolipásica se mostrou concentração-dependente, demonstrando que a atividade da fração parece estar relacionada à concentração dos metabólitos secundários presente.

4.5.3 Análise cromatográfica das frações

As análises cromatográficas foram conduzidas com as frações hexano, diclorometano, acetato de etila e aquosa. Conforme apresentado na Figura 18, os perfis cromatográficos dessas frações mostram-se distintos, o que indica que o processo de fracionamento foi eficaz na separação dos compostos presentes no extrato bruto. Contudo, observa-se que as frações acetato de etila e a aquosa exibem um conjunto de picos semelhantes, sobretudo nos primeiros 25 minutos de corrida, que estão ausentes nas frações hexano e diclorometano.

Figura 18 - Cromatograma comparativo das frações hexano, diclorometano, acetato de etila e aquosa das inflorescências de *Jatropha gossypiifolia,* obtidos por CLAE-DAD, em modo analítico.



Fonte: Próprio autor.

Nota: Pode-se observar em destaque (retângulo vermelho) os picos comuns entre as frações acetato de etila e hexano. Coluna utilizada C_{18} Shim-Pack (250 x 4,6 mm, 10 µm), fase móvel composta por metanol (A) e água (B), acidificados a 0,1% de ácido acético, empregando-se o gradiente de eluição: 30-100% de A em 40 minutos, temperatura de injeção de 21 °C, volume de injeção de 20 µL, comprimento detecção UV-VIS a 262 nm e vazão de 0,8 mL min^{-1}.

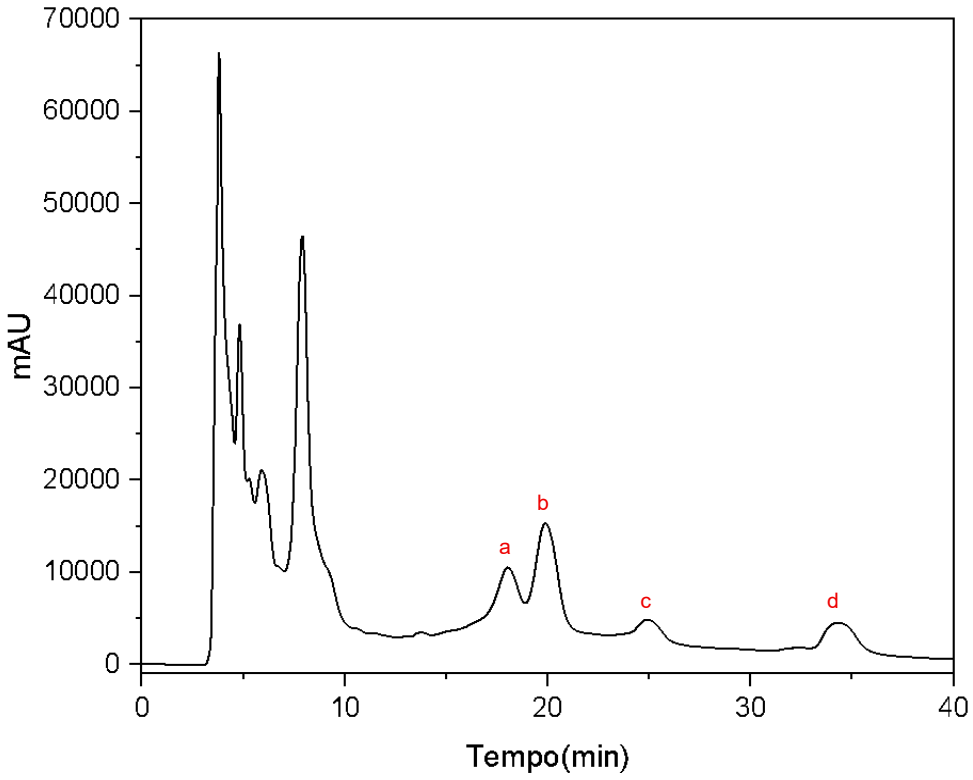
A semelhança do perfil cromatográfico entre as frações acetato de etila e aquosa sugere que ambas as frações compartilham determinados compostos. Considerando que essas substâncias não foram detectadas nas frações hexano e diclorometano (inativa enzimaticamente), é possível supor que esses compostos possam estar envolvidos na inibição das metaloproteases e fosfolipases. Além disso, a presença de picos exclusivos em cada fração e as diferenças de intensidade entre os picos comuns indicam que, embora semelhantes, a fração acetato de etila e a aquosa não são idênticas, e essa distinção na composição pode explicar as diferenças nas atividades observadas.

4.6 Substâncias isoladas

4.6.1 Isolamento cromatográfico

Inicialmente, foi realizado um estudo para determinar as melhores condições de isolamento. Nesse processo, utilizou-se uma coluna C_{18} variando alguns parâmetros cromatográficos (fase móvel, proporção dos solventes, adição de modificador orgânico e vazão), buscando obter uma separação adequada dos compostos presentes na amostra. A condição cromatográfica que apresentou melhor desempenho na coluna foi aquela empregando vazão de 0,8 mL min^{-1} e 35 % de metanol na fase móvel. Nessas condições, observou-se uma baixa resolução cromatográfica entre os picos **a** e **b**, enquanto os picos **c** e **d** apresentaram separação bem definida (Figura 19). Desse modo essa condição foi a selecionada para o escalonamento e isolamento das substâncias **c** e **d**.

Figura 19 – Cromatograma analítico (coluna C_{18}) da fração aquosa das inflorescências de *J. gossypiifolia,* com destaque para os picos de interesse **a** (t = 18,0 min) **b** (t = 19,9 min), **c** (t = 24,9 min), **d** (t = 34,3 min).

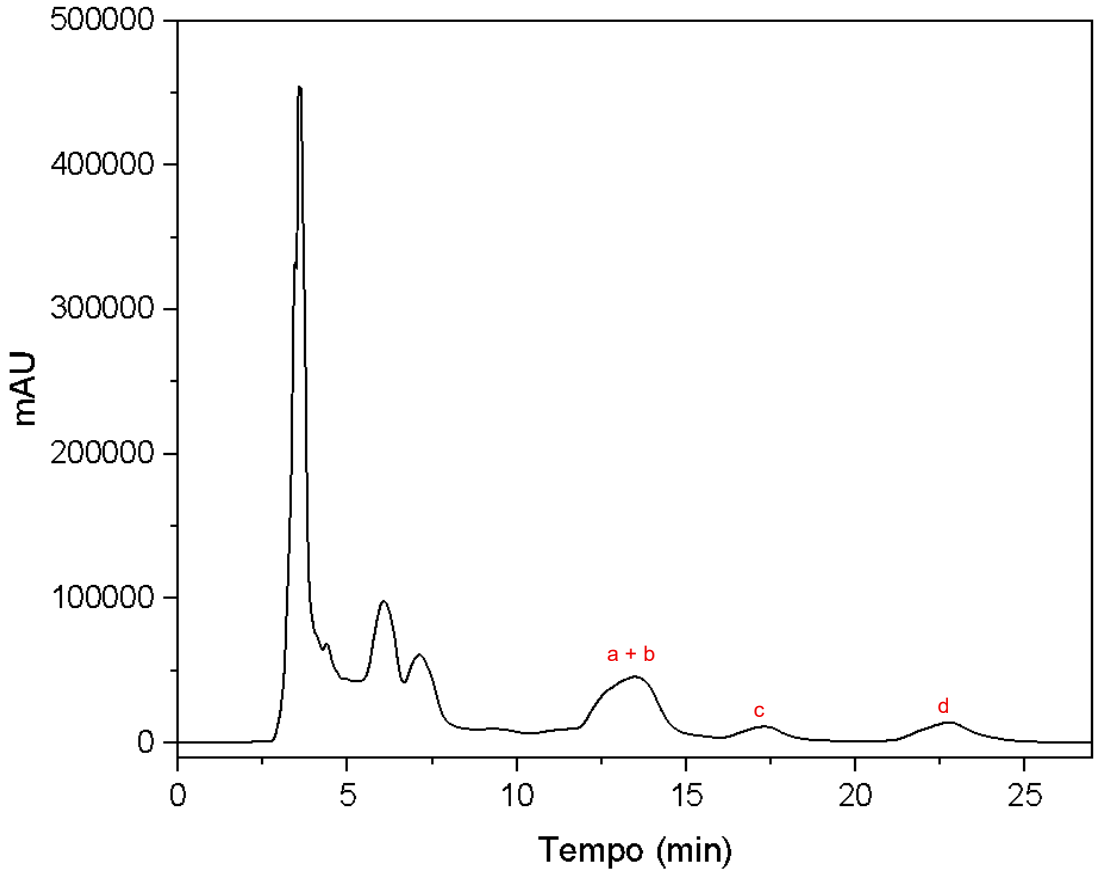


Fonte: Próprio autor.

Nota: Coluna utilizada C_{18} Shim-Pack (250 x 4,6 mm, 10 µm), fase móvel composta por metanol (A) e água (B), acidificados a 1,0% de ácido acético, empregando-se modo isocrático, a 35% do eluente A por 40 min, temperatura de injeção de 21 °C, volume de injeção de 20 µL, comprimento detecção UV-VIS a 262 nm e vazão de 0,8 mL min^{-1}.

Após o escalonamento para uma coluna semipreparativa, foi observada a coeluição dos picos **a** e **b**, indicando perda de resolução entre eles. Isso provavelmente ocorreu devido às mudanças inerentes ao aumento de escala. Por outro lado, os picos **c** e **d** mantiveram boa separação, permitindo o isolamento desses compostos de interesse (Figura 20).

Figura 20 - Cromatograma semipreparativo (coluna C_{18}) obtido da fração aquosa das inflorescências de *J. gossypiifolia,* com destaque para os picos de interesse **a** (t = 12,8 min), **b** (t = 13,6 min), **c** (t = 17,2 min), **d** (t = 22,7 min).



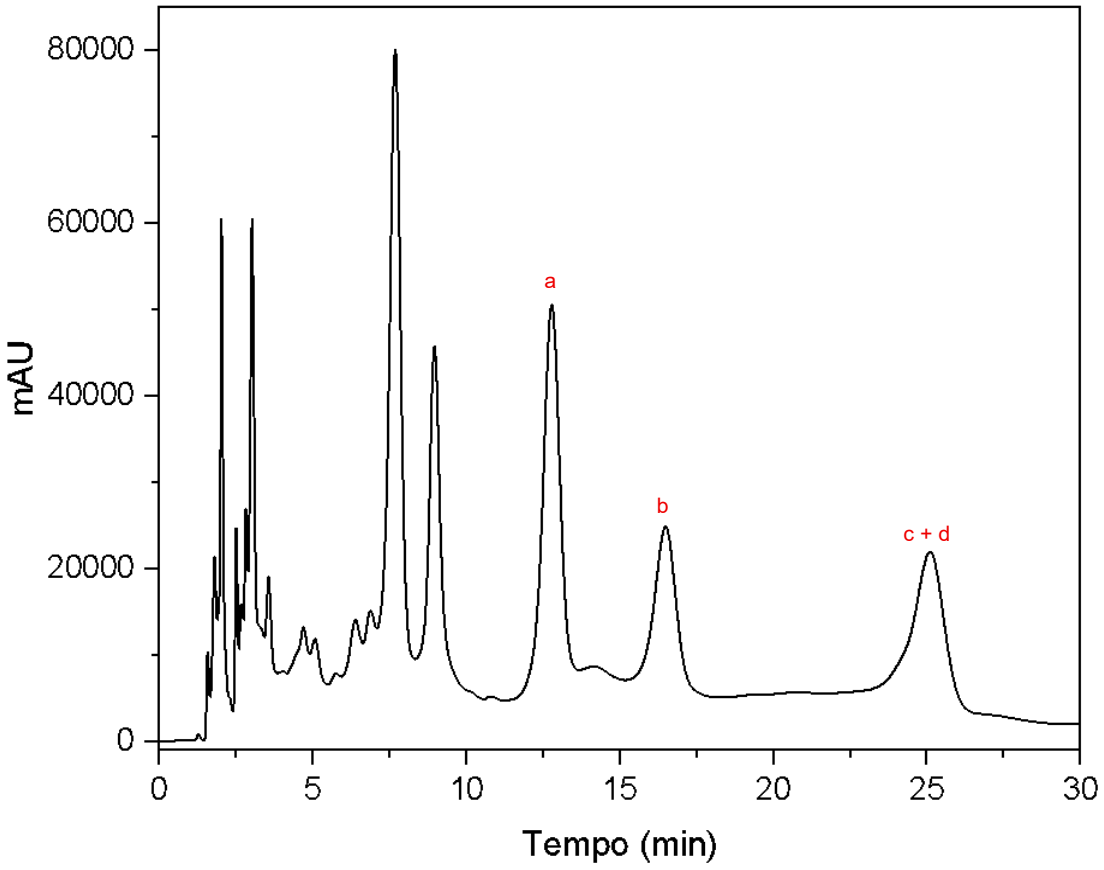
Fonte: Próprio autor.

Nota: Coluna utilizada C_{18} Shim-Pack (250 x 20 mm, 10 µm), fase móvel composta por metanol (A) e água (B), acidificados a 1,0% de ácido acético, empregando-se modo isocrático, a 35% do eluente A por 40 min, temperatura de injeção de 21 °C, volume de injeção de 1000 µL, comprimento detecção UV-VIS a 262 nm e vazão de 18,9 mL min^{-1}.

Diante disso, como não foi possível isolar os compostos dos picos **a** e **b** nessas condições, partiu-se para uma nova tentativa, utilizando uma segunda coluna, com o objetivo de melhorar a separação desses picos. Desse modo,

optou-se pela troca para uma coluna fenil-hexil, que realiza interações do tipo π-π entre os grupos benzeno, buscando melhorar a seletividade do método. Após a realização das análises, as melhores condições de isolamento foram aquelas em que se empregou acetonitrila/água (13,5/86,5 v/v) como fase móvel e vazão de 1,5 mL min^{-1}. Nessas condições, foi possível observar uma melhora significativa na separação dos picos de interesse **a** e **b**, permitindo, assim, o avanço no processo de isolamento desses outros compostos (Figura 21).

Figura 21 - Cromatograma analítico (coluna fenil-hexil) da fração aquosa das inflorescências de *J. gossypiifolia,* com destaque para os picos de interesse **a** (t = 12,8 min), **b** (t = 16,5 min), **c** + **d** (t = 25,1 min).



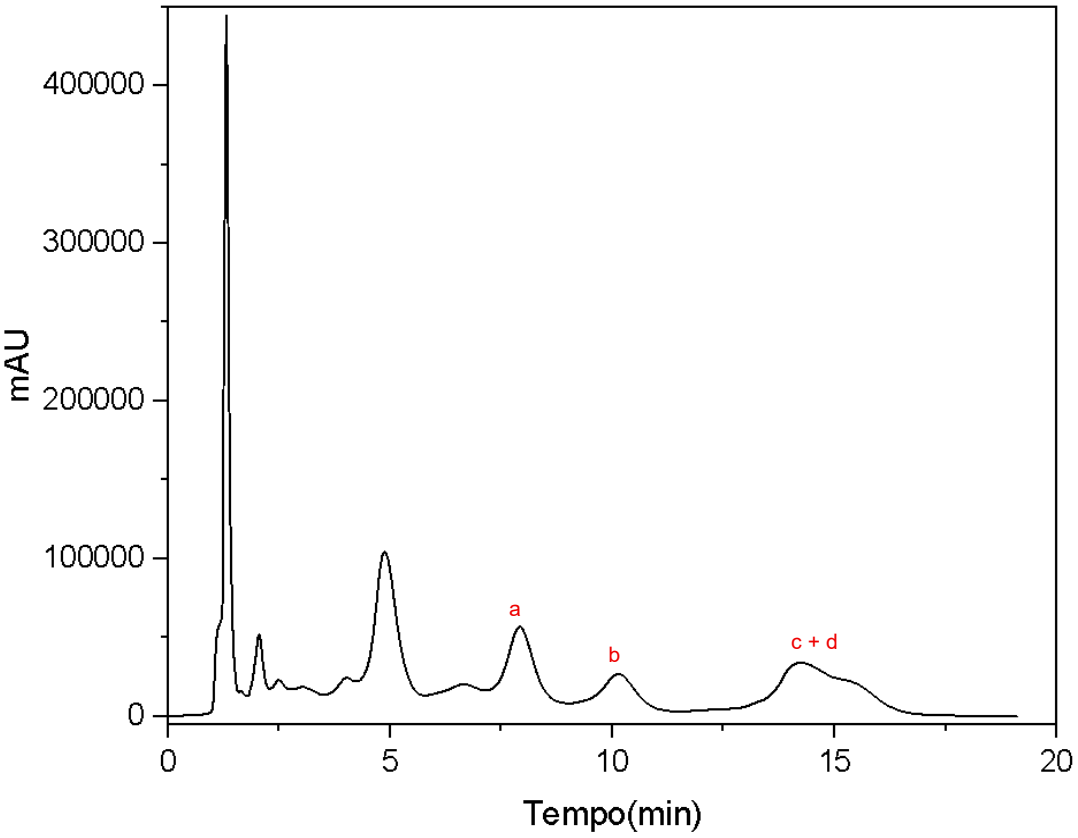
Fonte: Próprio autor.

Nota: Coluna utilizada Fenil-hexil (240 mm x 3,15 mm, 10 µm), fase móvel composta por acetonitrila (A) e água (B), acidificados a 1,0% de ácido acético, empregando-se modo isocrático, a 13,5% do eluente A por 30 min, temperatura de injeção de 21 °C, volume de injeção de 20 µL, comprimento detecção UV-VIS a 262 nm e vazão de 1,5 mL min^{-1}.

Utilizando a coluna fenil-hexil, foi possível observar uma melhora na resolução entre os picos **a** e **b**, indicando uma separação mais eficiente em comparação à coluna anterior. Com isso, tornou-se possível o isolamento das

duas substâncias, evidenciando a maior seletividade dessa fase estacionária para esses compostos (Figura 22). Os picos **c** e **d** não puderam ser isolados utilizando essa coluna devido a coeluição de ambos.

Figura 22 - Cromatograma semipreparativo (coluna fenil-hexil) da fração aquosa das inflorescências de *J. gossypiifolia,* com destaque para os picos de interesse **a** (t = 7,8 min), **b** (t = 10,2 min), **c** (t = 14,2 min), **d** (t = 15,4 min).

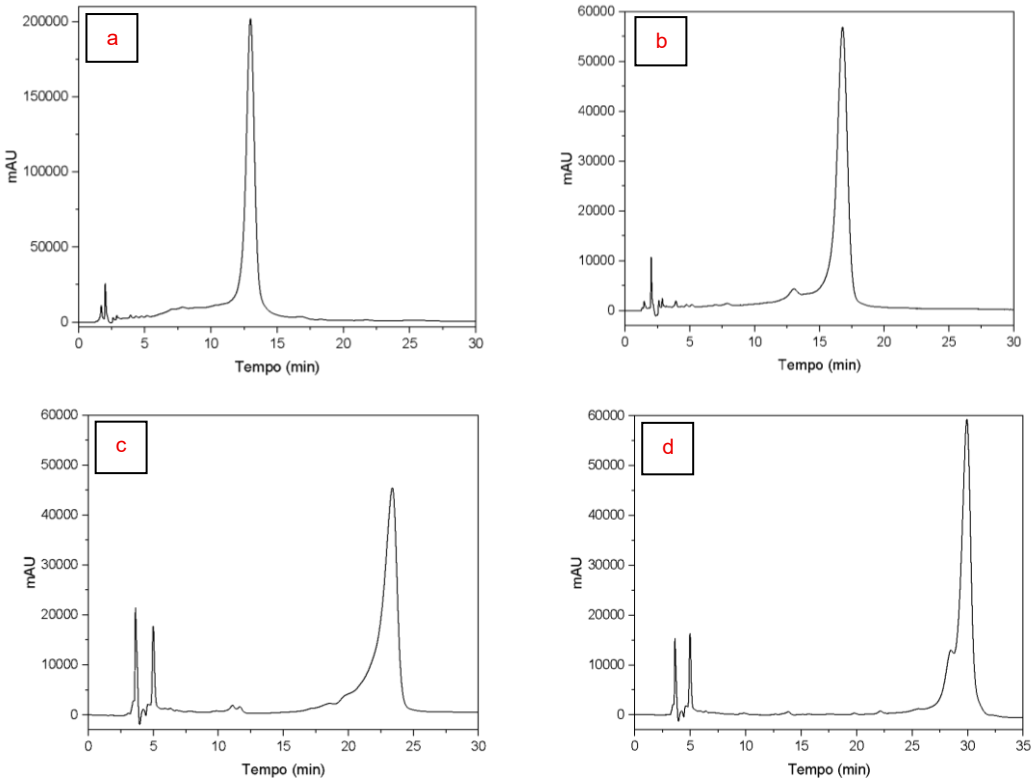


Fonte: Próprio autor.

Nota: Coluna utilizada Fenil-hexil (240 mm x 8,33 mm, 10 µm), fase móvel composta por acetonitrila (A) e água (B), acidificados a 1,0% de ácido acético, empregando-se modo isocrático, a 13,5% do eluente A por 30 min, temperatura de injeção de 21 °C, volume de injeção de 700 µL, comprimento detecção UV-VIS a 262 nm e vazão de 10,2 mL min^{-1}.

Após o isolamento, as amostras foram reinjetadas nas mesmas condições cromatográficas, com o objetivo de confirmar a eficiência do isolamento e avaliar o teor de pureza aproximado das substâncias obtidas (Figura 23).

Figura 23 - Cromatograma das substâncias **a**, **b**, **c** e **d** isoladas.



Fonte: Próprio autor.

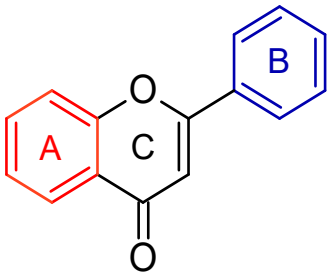
Após as estimativas determinadas por CLAE/DAD e a pesagem das substâncias, chegaram-se às seguintes purezas e rendimentos, respectivamente: pico **a**, 98,9 % e 8,1 mg (rendimento de 0,32%); pico **b**, 96,8 % e 5,4 mg (rendimento de 0,21%); pico **c**, 98,6 % e 2,8 mg (rendimento de 0,16%); e pico **d**, 84,9 % e 4,2 mg (rendimento de 0,25%).

4.6.2 Análise dos espectros de absorbância as substâncias isoladas

Os espectros de absorção UV das substâncias isoladas foram adquiridos e analisados para iniciar a sua caracterização química. A análise desses espectros é essencial, pois diferentes classes químicas podem apresentar faixas específicas de absorção. De modo geral, moléculas que absorvem radiação no UV exibem espectros entre 180 e 400 nm, enquanto absorções na região visível ocorrem entre 400 e 780 nm. Assim, a determinação da faixa de absorção contribui diretamente para inferências preliminares sobre a natureza estrutural das substâncias isoladas [143].

Nesse contexto, destaca-se que a classe dos flavonoides apresenta bandas de absorção características entre 240 e 400 nm, o que permite utilizar o perfil UV como uma ferramenta de triagem para essa classe de metabólitos. Dentro dessa faixa, ocorrem duas bandas principais: a banda I, situada entre 300 e 390 nm, associada ao sistema cromóforo do anel B (radical cinamoila), e a banda II, entre 240 e 280 nm, relacionada ao anel A (radical benzoila) como observado na Figura 24. A presença, a intensidade e a posição dessas bandas fornecem informações importantes sobre o padrão de conjugação e possíveis substituições na estrutura flavonoídica, auxiliando a comparação entre compostos detectados nas diferentes frações [144].

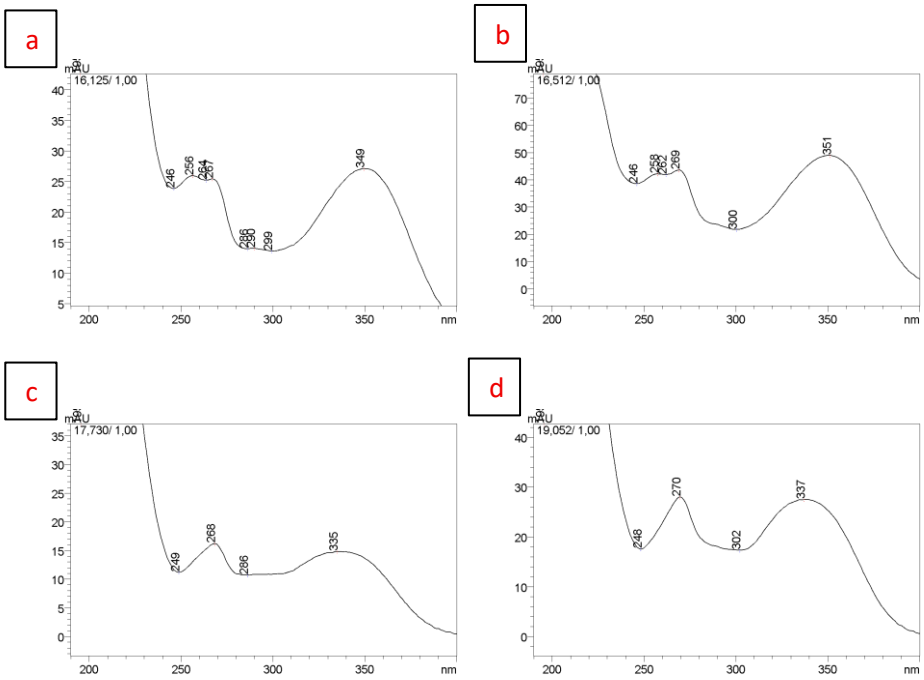
Figura 24 - Estrutura padrão dos flavonoides, destacando os anéis A, B e C.



Fonte: Próprio autor.

Ao analisar os espectros UV das quatro substâncias (Figura 25), observa-se a presença de bandas intensas nas regiões típicas de flavonoides, o que reforça a hipótese de que esses compostos pertencem a essa classe. Além disso, os perfis espectrais das substâncias **a** e **b** mostram grande similaridade entre si, assim como ocorre com as substâncias **c** e **d**.

Figura 25 - Espectros UV das substâncias **a**, **b**, **c** e **d**.



Fonte: Próprio autor.

Essa semelhança sugere que cada par pode corresponder a moléculas estruturalmente relacionadas, indicando que são compostos oriundos do mesmo esqueleto flavonoide.

4.6.3 Identificação das substâncias isoladas por espetroscopia de massas

A identificação de metabólitos secundários por espectrometria de massas acoplada à cromatografia líquida (CLAE-EM/EM) constitui uma das principais abordagens analíticas empregadas em estudos de produtos naturais e metabolômica. Essa estratégia baseia-se, fundamentalmente, na obtenção de espectros de fragmentação (MS/MS), os quais fornecem informações estruturais relevantes a partir dos padrões de fragmentação das moléculas ionizadas [145].

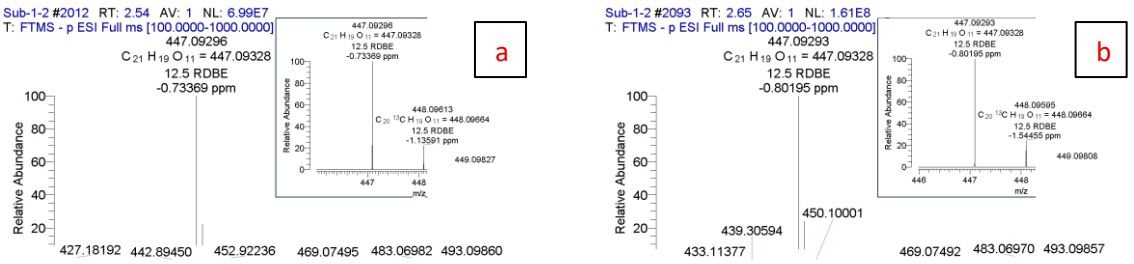
Nesse contexto, inicialmente a massa dos íons foi determinada com base no padrão isótopo. A formação do padrão isotópico está diretamente relacionada à abundância natural dos isótopos de carbono, sendo o ^{12}C predominante (~98,9%) e o ^{13}C presente em menor proporção (~1,1%). A presença de ^{13}C origina o pico M+1, enquanto espécies contendo múltiplos átomos desse isótopo geram picos M+2, M+3. A intensidade relativa do pico M+1 é aproximadamente

proporcional ao número de átomos de carbono na molécula, permitindo sua estimativa com base na relação entre os picos M e M+1 [146].

Com base na fórmula molecular atribuída ao íon desprotonado $[M–H]^-$, as estruturas químicas foram propostas por meio da comparação do padrão de fragmentação obtido com os padrões descritos na base de dados GNPS2. Para isso, foram analisadas as regiões de m/z entre 100 e 500, permitindo a identificação de fragmentos característicos e auxiliando na elucidação estrutural dos compostos. Dessa forma, foi possível propor as estruturas dos quatro flavonoides isolados.

Os compostos **a** e **b** apresentaram íon precursor em m/z 447 ($[M–H]^-$), definido com base no seu padrão isotópico, e fórmula molecular calculada $C_{21}H_{19}O_{11}$ (Figura 26). A partir disso, foi possível delimitar que se tratavam de compostos isômeros.

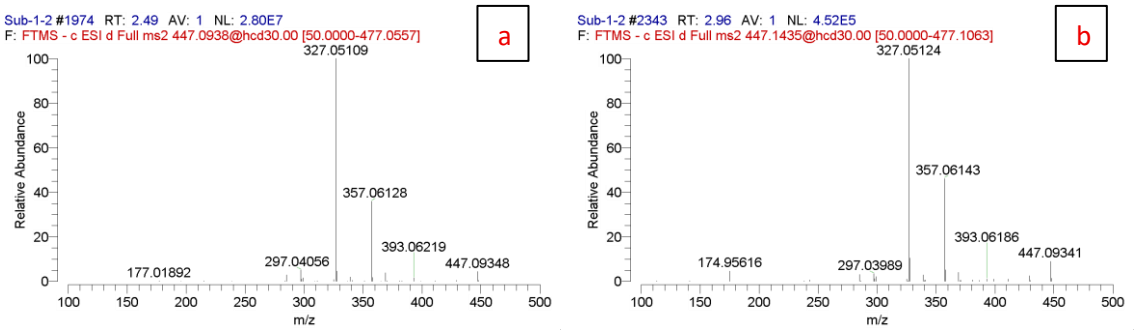
Figura 26 - Região expandida dos espectros MS/MS das substâncias **a** e **b**, evidenciando os padrões isotópicos dos íons fragmento empregados na confirmação da massa dos compostos.



Fonte: Próprio autor.

No caso específico dos flavonoides, a elucidação estrutural é frequentemente auxiliada pela observação de fragmentos característicos e perdas neutras. Dentre essas, destacam-se fragmentações associadas a unidades de açúcares (Figura 27). No caso de flavonoides C-glicosilados, observa-se predominantemente fragmentações na unidade de glicose em vez da perda direta da unidade intacta (162 Da) típica de O-glicosídeos, uma vez que a ligação C–C confere maior estabilidade e impede a perda [147, 148].

Figura 27 - Espectros MS/MS das substâncias **a** e **b** obtidos em modo de ionização negativa ([M–H]⁻).

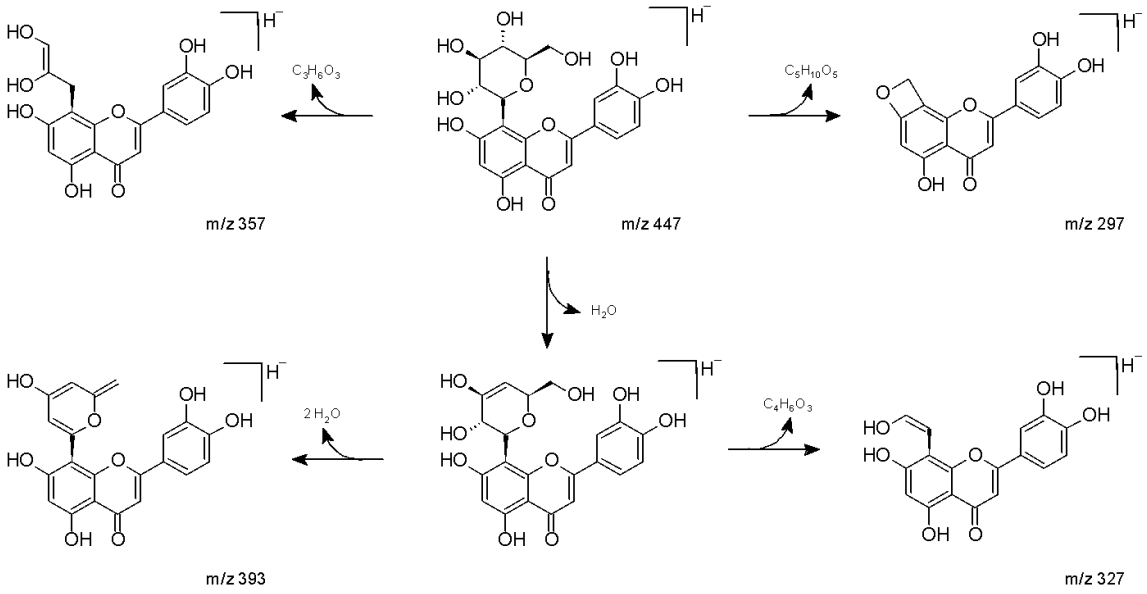


Fonte: Próprio autor.

Nesse cenário, uma das principais fragmentações observadas é a perda de 120 Da, considerada um marcador para flavonoides C-glicosilados [147]. Essa perda está associada à eliminação de uma fração da unidade de glicose, com fórmula $C_4H_8O_4$, resultando na formação do fragmento em m/z 327. Esse íon foi o mais intenso em ambos os espectros, indicando estabilidade relativa após essa clivagem, o que é consistente com a literatura para flavonoides dessa classe. Outro fragmento relevante foi observado com m/z 357, correspondente a perda de 90 Da em relação ao íon precursor. Essa perda pode ser atribuída à eliminação de uma unidade neutra com fórmula aproximada $C_3H_6O_3$, também derivada da quebra da glicose. Adicionalmente, foi observado o fragmento em m/z 297, que pode ser interpretado como resultado de fragmentações sucessivas da unidade de açúcar seguido de possíveis rearranjos internos da glicose ligados à estrutura do flavonoide (Figura 27).

Com base nesses valores, foi possível montar as estruturas teóricas de fragmentação formada para ambos os compostos (Figura 28).

Figura 28 - Perfil de fragmentação proposto para a substância **a,** baseada nos dados de MS/MS.

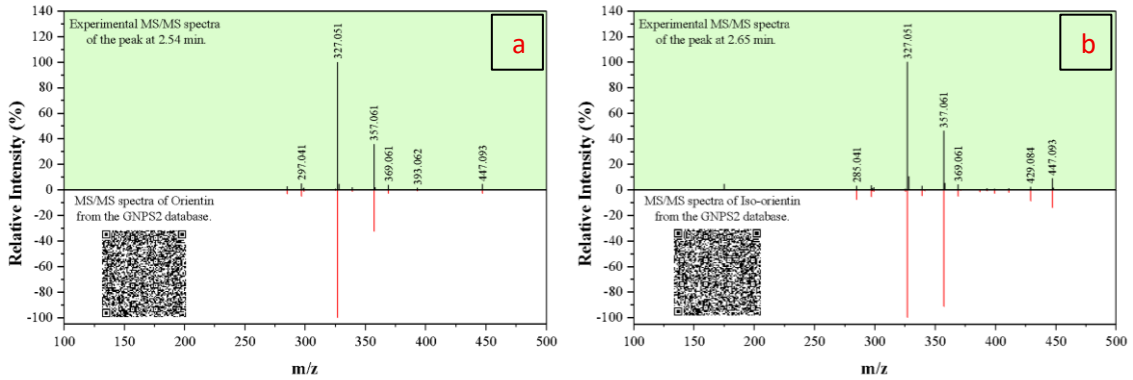


Fonte: Próprio autor.

Nota: As substâncias **a** e **b** apresentam perfis de fragmentação MS/MS equivalentes, sendo isômeros posicionais que diferem na posição da unidade C-glicosídica no núcleo flavonoídico.

A comparação dos espectros de fragmentação MS/MS obtidos para as amostras com aqueles disponíveis na GNPS2 permitiu inferir que os compostos **a** e **b** correspondem, respectivamente, a orientina (luteolina-8-C-glicosídeo) e a isoorientina (luteolina-6-C-glicosídeo) (Figura 29). Essa atribuição foi baseada na alta similaridade espectral, considerando a distribuição dos íons fragmento, perdas neutras características e intensidade relativa dos picos, que permitiram diferenciar os isomeros. Todos esses dados são consistentes com os perfis dos flavonoides C-glicosilados.

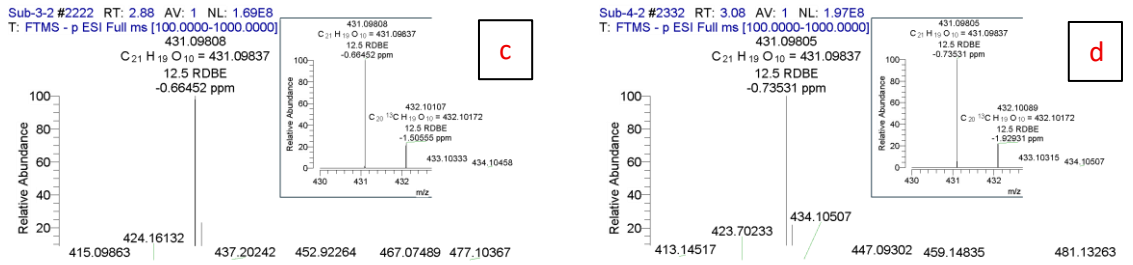
Figura 29 - Comparação dos espectros MS/MS das substâncias **a** e **b** com os espectros disponíveis na base de dados GNPS2.



Fonte: Próprio autor.

Para os compostos **c** e **d** o íon precursor foi definido em m/z 431 ($[M-H]^-$), confirmado pelos seus padrões isotópicos. Ambos tiveram sua fórmula molecular calculada em $C_{21}H_{19}O_{10}$, se tratando de isômeros (Figura 30).

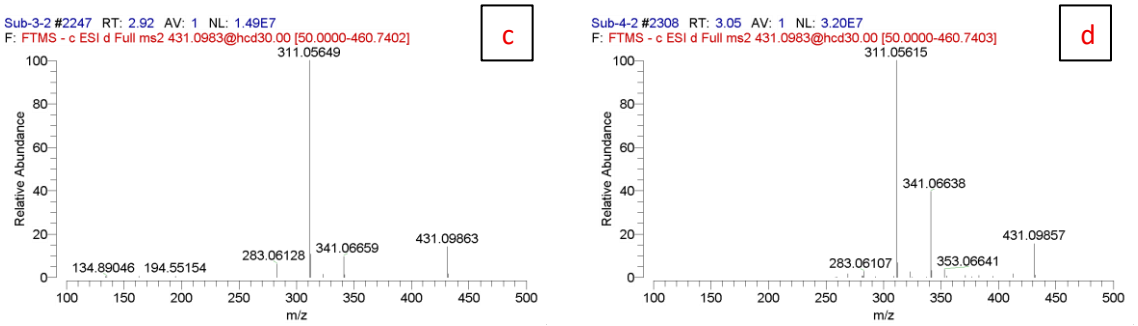
Figura 30 - Região expandida dos espectros MS/MS das substâncias **c** e **d**, evidenciando os padrões isotópicos dos íons fragmento empregados na confirmação da massa dos compostos.



Fonte: Próprio autor.

Considerando o perfil de fragmentação, também foi observado a perda de 120 Da consistentes para flavonoides C-glicosilados, resultando na formação do fragmento com m/z 311, sendo esse o pico de maior intensidade para ambas as subtâncias. Outro fragmento relevante foi observado em m/z 341, correspondente a perda de 90 Da em relação ao íon precursor, podendo ser atribuída à quebra parcial da unidade de glicose. Adicionalmente, foi observado o fragmento em m/z 283, que pode ser interpretado como resultado de perda quase completa da glicose (Figura 31).

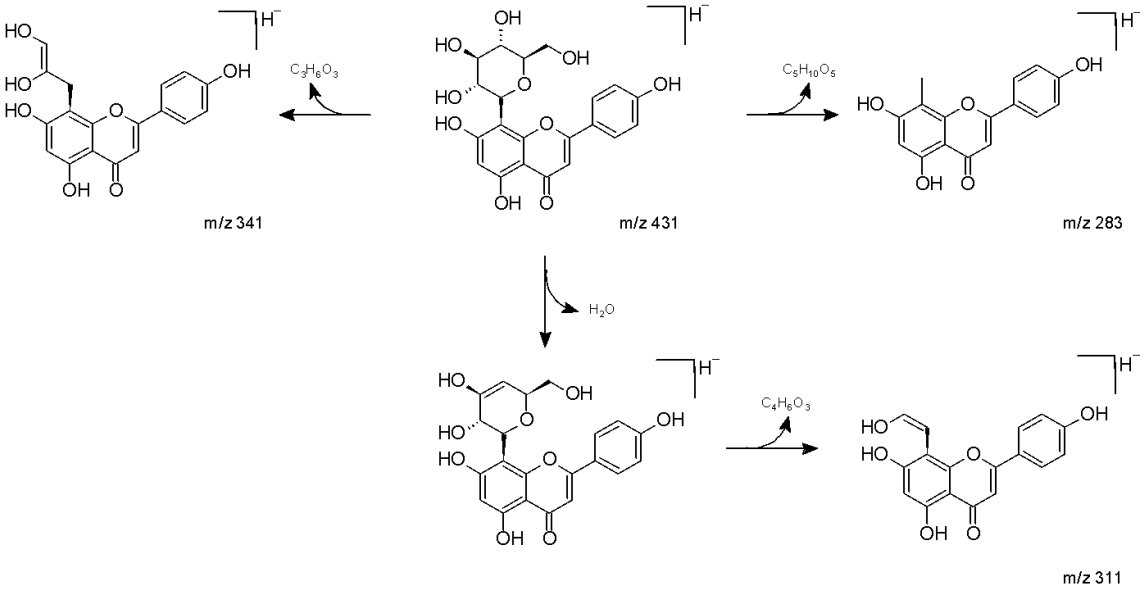
Figura 31 - Espectros MS/MS das substâncias **c** e **d** obtidos em modo de ionização negativa ([M–H]⁻).



Fonte: Próprio autor.

A partir disso, foi então proposto os possíveis fragmentos gerados a partir da fragmentação das moléculas **c** e **d** (Figura 32).

Figura 32 - Perfil de fragmentação proposto para a substância **c** baseada nos dados de MS/MS.

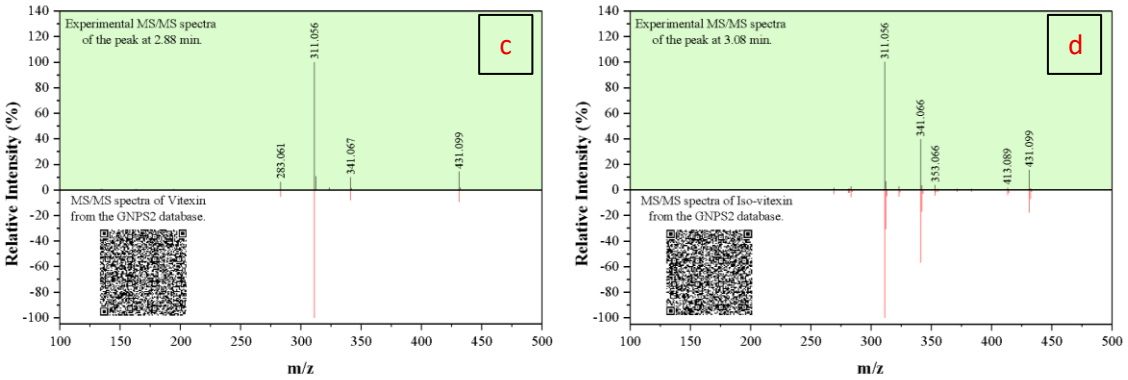


Fonte: Próprio autor.

Nota: As substâncias **c** e **d** apresentam perfis de fragmentação MS/MS equivalentes, sendo isômeros posicionais que diferem na posição da unidade C-glicosídica no núcleo flavonoídico.

Foi utilizado a comparação dos espectros de fragmentação obtidos com aqueles disponíveis na GNPS2 e os compostos **c** e **d** foram identificados como, respectivamente, vitexina (apigenina-8-C-glicosídeo) e isovitexina (apigenina-6-C-glicosídeo) (Figura 33). Essa atribuição foi baseada na alta similaridade espectral e intensidade relativa dos picos.

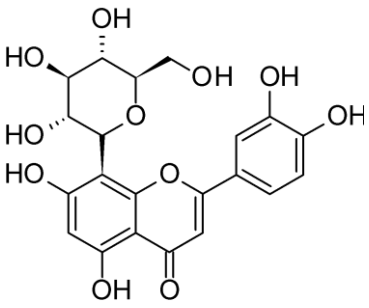
Figura 33 - Comparação dos espectros MS/MS das substâncias **c** e **d** com os espectros disponíveis na base de dados GNPS2.



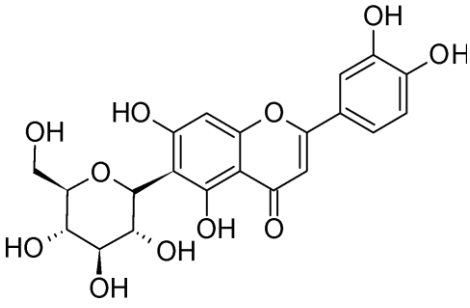
Fonte: Próprio autor.

Com base nos dados obtidos, foi possível atribuir os compostos **a**, **b**, **c** e **d**, às flavonas C-glicosiladas orientina, isoorientina, vitexina e isovitexina (Figura 34). Vitexina e isovitexina já haviam sido previamente isolados das inflorescências de *Jatropha gossypiifolia* [20], mas, por outro lado, este foi o primeiro estudo a realizar o isolamento de orientina e isoorientina a partir das inflorescências dessa espécie. Esses compostos haviam sido descritos apenas em extratos das folhas, até o momento [60].

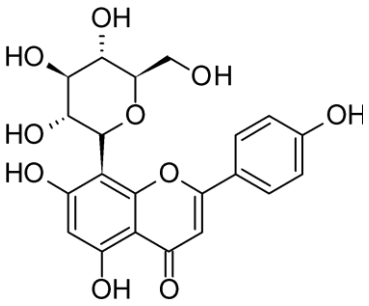
Figura 34 - Estrutura química dos flavonoides isolados, orientina, isoorientina, vitexina e isovitexina.



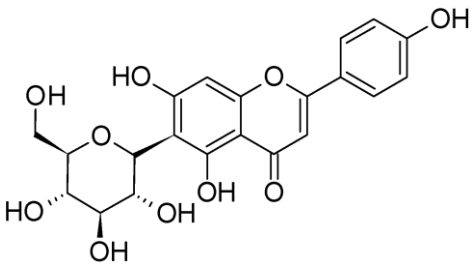
Orientina



Isoorientina



Vitexina



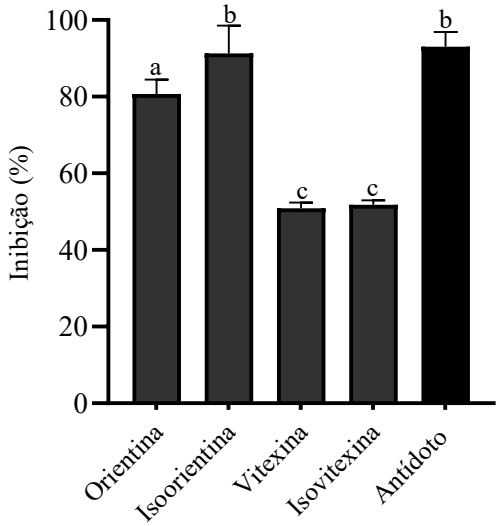
Isovitexina

Fonte: Próprio autor.

4.6.4 Inibição da atividade proteolítica

Após o isolamento das substâncias, o potencial de inibição da atividade proteolítica foi avaliado para cada uma delas. Na concentração de 250 µg mL^{-1} a isoorientina foi a que apresentou o melhor efeito inibitório (91,3 ± 7,2%), seguido da orientina (80,7 ± 3,8%), vitexina (50,8 ± 1,5%) e isovitexina (51,8 ± 1,2%). Estas duas últimas não apresentaram diferenças significativas entre si. Cabe destacar que a isoorientina apresentou capacidade de inibição equivalente à do antídoto (concentração de 500 µg mL^{-1}). Os valores de IC_{50} foram determinados para as 4 substâncias, conforme observado na Figura 35.

Figura 35 - Inibição da atividade proteolítica do veneno de *Bothrops jararacussu* pelas substâncias isoladas na concentração de 250 µg mL^{-1} e respectivos IC_{50}.



IC_{50} calculado:

Orientina: 209,7 ± 9,0 µM

Isoorientina: 168,0 ± 12,3 µM

Vitexina: 562,7 ±

Fonte: Próprio autor.

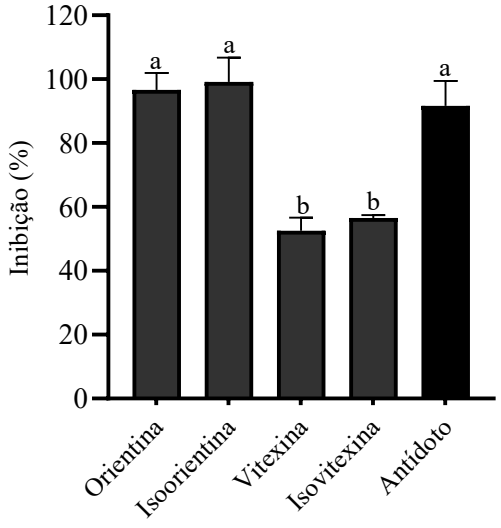
Esse foi o primeiro estudo a avaliar o potencial dos flavonoides orientina, isoorientina, vitexina e isovitexina frente ao veneno de *B. jararacussu*. Entretanto, outros flavonoides já foram testados contra metaloproteinases presentes em venenos. Preciado, *et al*. avaliou os flavonoides apigenina, luteolina, kaempferol, quercetina, miricetina, genisteína, hesperidina, naringina, catequina e epicatequina frente aos SVMP de *B. atrox* por meio de ensaio fluorimétrico, e observou que todos eles apresentaram atividade inibitória. Dentre esses compostos, destacaram-se apigenina, epicatequina e miricetina, com esta última apresentando IC_{50} de 49,3 µM. Vale ressaltar que a metodologia adotada para a avaliação foi diferente, contudo, em ambos os experimentos foi possível observar o potencial de inibição dos flavonoides [149].

Castro et al. sugerem que a atividade antiproteolítica dos flavonoides está diretamente relacionada à sua capacidade de quelação de metais, incluindo o zinco, essencial à atividade catalítica das metaloproteinases presentes no veneno [150]. Além disso, estudos de acoplamento molecular demonstram que os flavonoides podem interagir com resíduos de aminoácidos da enzima por meio de ligações de hidrogênio, especialmente aqueles com hidroxilas no anel B. Esse padrão de interação pode explicar a maior atividade observada para a isoorientina e a orientina (hidroxilas na posição 3’ e 4’) em comparação com a vitexina e a isovitexina (hidroxila na posição 3’) [149]. Adicionalmente, interações hidrofóbicas mediadas por anéis aromáticos devem ser consideradas. Assim, é provável que o mecanismo de ação envolva múltiplos tipos de interação atuando de forma complementar [151, 152].

4.6.5 Inibição da atividade fosfolipásica

A atividade anti-fosfolipásica para as substâncias foi calculada, com a isoorientina (99,1 ± 5,3%) e a orientina (96,6 ± 7,6%) apresentando os maiores efeitos inibitórios. Além disso, suas inibições foram estatisticamente iguais ao antídoto (concentração de 500 µg mL^{-1}). A vitexina e isovitexina apresentaram inibição de 52,5 ± 4,1% e 56,5 ± 0,8%, respectivamente, e estatisticamente iguais entre si. O IC_{50} para as substâncias foi calculado, com a orientina apresentando o melhor resultado, seguido da isoorientina (Figura 36).

Figura 36 - Inibição da atividade proteolítica do veneno de *Bothrops jararacussu* pelas substâncias isoladas na concentração de 250 µg mL^{-1} e respectivos IC_{50}.



IC_{50} calculado:

Orientina: 110,2 ± 2,6 µM

Isoorientina: 112,6 ± 4,0 µM

Vitexina: 544,8 ±

Fonte: Próprio autor.

Pereañez et al. demonstraram que a morelloflavona foi capaz de inibir a atividade enzimática da PLA_2 do veneno de *Crotalus durissus cumanensis*, apresentando IC_{50} de 480 µM. **[153]**. Por sua vez, Lindahl e Tagesson observaram que os flavonoides rutina, quercetina, miricetina, apigenina, hesperetina, fisetina, catequina e taxifolina exibiram atividade inibitória frente à PLA_2 de *Crotalus atrox*. Dentre esses compostos, destacou-se a rutina, que apresentou inibição para as PLA_2 tanto para *Crotalus atrox* quanto para *Vipera russelli*, com IC_{50} aproximado de 250 µM. Dessa forma, os resultados obtidos no presente estudo, nos quais orientina e isoorientina também demonstraram atividade inibitória, corroboram com a literatura ao evidenciar o potencial dos flavonoides como inibidores de fosfolipases A_2 de venenos ofídicos **[154]**. Vale destacar que esse foi o primeiro estudo a avaliar inibidores frente ao veneno de *B. jararacussu* e os resultados foram superiores aos demais flavonoides testados em outros venenos.

Foi demonstrado através de estudos de acoplamento molecular que os flavonoides podem se ligar nas proximidades do resíduo His48 da fosfolipase A_2, resultando na inibição da atividade enzimática. Esse resíduo integra o sítio catalítico e participa diretamente da etapa inicial do mecanismo enzimático, de modo que sua interação com o flavonoide pode interferir na

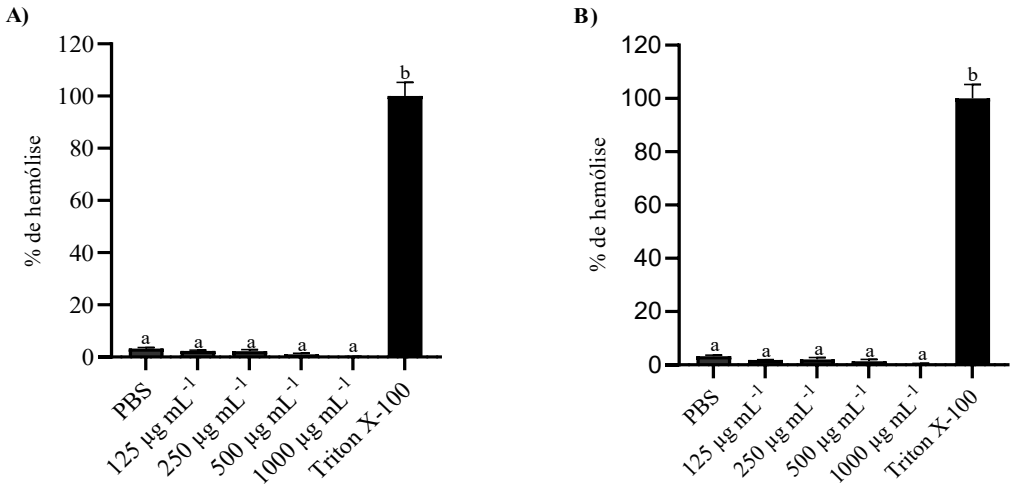
coordenação do Ca^{2+}, cofator essencial para a catálise enzimática. Além disso, há evidências de que esses compostos também atuam por impedimento estérico, bloqueando o acesso do substrato ao sítio ativo da enzima. No caso da morelloflavona, por exemplo, os anéis A e C demonstraram ocupar parcialmente o canal hidrofóbico de ligação ao substrato, estabelecendo interações do tipo π–π com resíduos aromáticos da enzima. Essa combinação de mecanismos contribui para explicar a atividade inibitória dos flavonoides sobre a PLA_2 **[153, 155]**. Adicionalmente, segundo Lindahl e Tagesson, a presença de hidroxilas nas posições 3' e 4' do anel B parece ser um fator determinante para o aumento da atividade inibitória de flavonoides frente à PLA_2, o que pode explicar, ao menos em parte, o melhor desempenho observado para orientina e isoorientina **[154]**.

4.7 *Avaliação de citotoxicidade*

A literatura reconhece que as espécies do gênero *Jatropha* apresentam potencial toxicológico. Os quadros de intoxicação associados aos seus extratos são, em geral, caracterizados por sintomas gastrointestinais, como dor abdominal, vômito e diarreia, podendo, em casos mais severos, progredir para manifestações neurológicas, hepáticas e renais [13]. Considerando esse risco, foi conduzida a avaliação do potencial citotóxico dos extratos por meio do ensaio de hemólise. Como o extrato e a fração aquosa proveniente das inflorescências demonstraram maior atividade biológica nos ensaios, essas amostras foram selecionadas para a investigação de sua toxicidade.

No modelo experimental utilizado, nenhuma das amostras avaliadas apresentou atividade hemolítica, mostrando-se estatisticamente equivalente ao controle negativo (PBS) (Figura 37).

Figura 37 - Ensaio de citotoxicidade hemolítica do extrato bruto (A) e da fração aquosa das inflorescências (B).



Fonte: Próprio autor.

Esses resultados indicam que tanto o extrato bruto quanto a fração aquosa não apresentam potencial hemolítico nas concentrações analisadas. No entanto, é importante ressaltar que a ausência de hemólise não exclui a possibilidade de outros efeitos tóxicos associados às inflorescências, o que torna necessários estudos adicionais que avaliem diferentes mecanismos de toxicidade, a fim de garantir a segurança do seu uso.

5 CONCLUSÕES

A *Jatropha gossypiifolia* apresentou substâncias capazes de interferir em atividades enzimáticas-chave do veneno de *Bothrops jararacussu*, evidenciando seu potencial como fonte de compostos bioativos com aplicação antiofídica.

Entre os extratos avaliados, o extrato das inflorescências destacou-se por apresentar os melhores resultados de inibição das fosfolipases e metaloproteases do veneno. A triagem fitoquímica indicou que esse extrato também apresentava os maiores teores totais de flavonoides, além da maior atividade antioxidante, sugerindo uma possível relação entre esses metabólitos e os efeitos biológicos observados. Dentre as frações obtidas a partir do extrato das inflorescências, a fração aquosa foi a que apresentou maior potencial inibitório sobre as enzimas avaliadas e a maior presença de flavonoides em sua composição. Quatro flavonoides C-glicosilados foram isolados dessa fração: orientina, isoorientina, vitexina e isovitexina. Todos eles apresentaram capacidade de inibição frente ao veneno, com destaque para a orientina e a isoorientina, que obtiveram resultados de inibição estatisticamente iguais aos do antídoto antibotrópico. Esses resultados sugerem que a atividade da planta possa estar diretamente ligada aos flavonoides presentes nela. A avaliação da toxicidade do extrato bruto e da fração aquosa, por meio do ensaio de citotoxicidade de hemácias, demonstrou que ambas as amostras foram seguras, não causando lise celular em nenhuma das concentrações avaliadas.

Esses resultados reforçam o potencial farmacológico de *Jatropha gossypiifolia* e contribuem para o conhecimento químico e biológico da espécie, abrindo perspectivas para futuros estudos voltados ao desenvolvimento de agentes auxiliares no tratamento de acidentes ofídicos. Entretanto, torna-se necessária a realização de estudos mais aprofundados, especialmente ensaios *in vivo*, a fim de confirmar a eficácia, a segurança e a aplicabilidade terapêutica das substâncias isoladas e dos extratos avaliados.

6 PERSPECTIVAS DO TRABALHO

Como perspectivas, destaca-se a necessidade de realizar estudos *in vivo* para avaliar a eficácia antiofídica das substâncias isoladas frente aos efeitos locais e sistêmicos provocados pelo veneno de *Bothrops jararacussu*,

a fim de determinar seu real potencial de atividade. Além disso, estudos de toxicidade aguda e crônica poderiam ser conduzidos para avaliar a segurança farmacológica dos extratos brutos e frações obtidas. Também se faz necessária a investigação dos mecanismos moleculares envolvidos na inibição das enzimas fosfolipásicas e proteolíticas do veneno, bem como a avaliação da possível ação sinérgica entre os flavonoides isolados e a soroterapia convencional.

REFERÊNCIAS

[1] World Health Organization. *Snakebite envenoming*. https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/snakebite-envenoming.

[2] Brasil. *Acidentes por animais peçonhentos - Notificações registradas no Sistema de Informação de Agravos de Notificação.* http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?sinannet/cnv/animaisbr.def.

[3] Barreto, Y. M. S.; Sousa, V. C. M. de; Bachur, T. P. R. Manifestações clínicas decorrentes de acidentes ofídicos com o gênero *Bothrops*. *Revista Intertox de Toxicologia, Risco Ambiental e Sociedade* **2024**, *17*(2), 66–80.

[4] Dias, J. A.; Vasconcelos, R. M.; Dumont, M. F.; Souza, I. F. de; Nascimento, M. D.; Mappa, L. S. A. B.; et al. Acidentes por animais ofídicos: repercussões sistêmicas e prognóstico. *Brazilian Journal of Health Review* **2023**, *6*(3), 12520–12531.

[5] Brasil. *Manual de diagnóstico e tratamento de acidentes por animais peçonhentos*; 2°.; FUNASA, Ed.; Brasília , **2001**; Vol. 1.

[6] Castro-Pinheiro, C.; Junior, L. C. S. P.; Sanchez, E. F.; da Silva, A. C. R.; Dwan, C. A.; Karpiniec, S. S.; et al. Effect of seaweed-derived fucoidans *from Undaria pinnatifida* and *Fucus vesiculosus* on coagulant, proteolytic, and phospholipase A2 activities of snake *Bothrops jararaca*, *B. jararacussu*, and *B. neuwiedi* venom. *Toxins (Basel).* **2024**, *16*(4), 188.

[7] Moura, V. M. de; Sousa, L. A. F. de; Santos, M. C. Dos; Raposo, J. D. A.; Lima, A. E.; Silva, M. N. da; et al. Plants used to treat snakebites in Santarém, western Pará, Brazil: An assessment of their effectiveness in inhibiting hemorrhagic activity induced by *Bothrops jararaca* venom. *J. Ethnopharmacol.* **2015**, *161*, 224–232.

[8] Félix-Silva, J.; Souza, T.; Menezes, Y. A. S. de; Cabral, B.; Câmara, R. B. G.; Silva-Junior, A. A.; et al. Aqueous leaf extract of *Jatropha gossypiifolia* L. (Euphorbiaceae) inhibits enzymatic and biological actions of *Bothrops jararaca* snake venom. *PLoS One* **2014**, *9*(8), e104952.

[9] Félix-Silva, J.; Gomes, J. A. S.; Xavier-Santos, J. B.; Passos, J. G. R.; Silva-Junior, A. A.; Tambourgi, D. V.; et al. Inhibition of local effects induced by *Bothrops erythromelas* snake venom: Assessment of the effectiveness of Brazilian polyvalent bothropic antivenom and aqueous leaf extract of *Jatropha gossypiifolia*. *Toxicon* **2017**, *125*, 74–83.

[10] Rodríguez, I. I. G.; Francisco, A. F.; Moreira-Dill, L. S.; Quintero, A.; Guimarães, C. L. da S.; Fernandes, C. A. H.; et al. Isolation and structural characterization of bioactive compound from *Aristolochia sprucei* aqueous extract with anti-myotoxic activity. *Toxicon X* **2020**, *7*, 100049.

[11] Ramos, R. S.; Collaço, R. C.; Cogo, J. C.; Dal-Belo, C. A.; Simioni, L. R.; Rocha, T.; et al. *Cordia salicifolia* and *Lafoensia pacari* plant extracts against the local effects of *Bothrops jararacussu* and *Philodryas olfersii* snake venoms. *J. Venom Res.* **2020**, *10*, 32–37.

[12] Xavier-Santos, J. B.; Passos, J. G. R.; Gomes, J. A. S.; Cruz, J. V. C.; Alves, J. S. F.; Garcia, V. B.; et al. Topical gel containing phenolic-rich extract

from *Ipomoea pes-capre* leaf (Convolvulaceae) has anti-inflammatory, wound healing, and antiophidic properties. *Biomedicine & Pharmacotherapy* **2022**, *149*, 112921.

[13] Mariz, S. R.; Borges, A. C. R.; Melo-Diniz, M. de F. F.; Medeiros, I. A. de. Possibilidades terapêuticas e risco toxicológico de *Jatropha gossypiifolia* L.: uma revisão narrativa. *Revista Brasileira de Plantas Medicinais* **2010**, *12*(3), 346–357.

[14] Félix-Silva, J.; Giordani, R. B.; Silva-Jr, A. A. da; Zucolotto, S. M.; Fernandes-Pedrosa, M. de F. *Jatropha gossypiifolia* L. (Euphorbiaceae): A Review of Traditional Uses, Phytochemistry, Pharmacology, and Toxicology of This Medicinal Plant. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* **2014**, *2014*(1).

[15] Batista, B. K. da C.; Silva, J. F. O. da; Passos, J. G. R.; Ferreira, M. R. A.; Soares, L. A. L.; Rocha, H. A. de O.; et al. Nanoemulsion containing *Jatropha gossypiifolia* leaf extract reduces dermonecrosis induced by *Bothrops erythromelas* venom and accelerates wound closure. *J. Ethnopharmacol.* **2024**, *330*, 118188.

[16] Félix-Silva, J.; Gomes, J. A. dos S.; Fernandes, J. M.; Moura, A. K. C.; Menezes, Y. A. S. de; Santos, E. C. G. dos; et al. Comparison of two *Jatropha* species (Euphorbiaceae) used popularly to treat snakebites in Northeastern Brazil: Chemical profile, inhibitory activity against *Bothrops erythromelas* venom and antibacterial activity. *J. Ethnopharmacol.* **2018**, *213*, 12–20.

[17] Nagaharika, Y.; Kalyani, V.; Rasheed, S.; Ramadosskarthikeyan. Anti-inflammatory activity of leaves of *Jatropha gossypifolia* L. by hrbc membrane stabilization method. *Journal of Acute Disease* **2013**, *2*(2), 156–158.

[18] Xavier-Santos, J. B.; Félix-Silva, J.; Passos, J. G. R.; Gomes, J. A. S.; Fernandes, J. M.; Garcia, V. B.; et al. Development of an effective and safe topical anti-inflammatory gel containing *Jatropha gossypiifolia* leaf extract: Results from a pre-clinical trial in mice. *J. Ethnopharmacol.* **2018**, *227*, 268–278.

[19] Zhang, C.-Y.; Pan, R.-R.; Zhang, X.-D.; Zhou, Y.; Ye, Y.; Xia, J.; et al. New tetracyclic triterpenoids from *Jatropha gossypiifolia* induce cell-cycle arrest and apoptosis in RKO cells. *Fitoterapia* **2018**, *130*, 145–151.

[20] Khalifa, S. M.; Harras, M. F.; Badawy, M. S. E. M. Antibacterial, antibiofilm activities of *Jatropha gossypiifolia* L. floral extracts and molecular docking study of the major compound. *Nat. Prod. Res.* **2025**, 1–6.

[21] Jain, S.; Choudhary, G. P.; Jain, D. Antioxidant and Hepatoprotective Potential of Ethanolic Leaves Extract of *Jatropha gossypifolia*. *International Journal of Plant Science and Ecology* **2015**, *1*(5), 190–195.

[22] Taqui, R.; Debnath, M.; Ahmed, S.; Ghosh, A. Advances on plant extracts and phytocompounds with acetylcholinesterase inhibition activity for possible treatment of Alzheimer's disease. *Phytomedicine Plus* **2022**, *2*(1), 100184.

[23] Abreu, I. C.; Marinho, A. S. S.; Paes, A. M. de A.; Freire, S. M. de F.; Olea, R. S. G.; Borges, M. O. da R.; et al. Hypotensive and vasorelaxant effects of ethanolic extract from *Jatropha gossypiifolia* L. in rats. *Fitoterapia* **2003**, *74*(7–8), 650–657.

[24] Kumar, I. P.; Snega Priya, P.; Meenatchi, R.; Oyouni, A. A. A.; Al-Amer, O. M.; Aljohani, S. A. S.; et al. Potential mechanism of *Jatropha gossypifolia* phenolic derivatives in enhancing insulin-signalling cascades GLUT 4, IRβ and GSK-3β in streptozotocin nicotinamide induced type II diabetic in wistar rat model. *J. King Saud Univ. Sci.* **2022**, *34*(7), 102223.

[25] Hernandez-Hernandez, A. B.; Alarcon-Aguilar, F. J.; Garcia-Lorenzana, M.; Rodriguez-Monroy, M. A.; Canales-Martinez, M. M. *Jatropha Neopauciflora Pax* Latex Exhibits Wound-Healing Effect in Normal and Diabetic Mice. *J. Evid. Based. Integr. Med.* **2021**, *26*.

[26] Robert, S.; Baccelli, C.; Devel, P.; Dogné, J.-M.; Quetin-Leclercq, J. Effects of leaf extracts from *Croton zambesicus Müell*. Arg. on hemostasis. *J. Ethnopharmacol.* **2010**, *128*(3), 641–648.

[27] Cavalcante, N. B.; Santos, A. D. da C.; Almeida, J. R. G. da S. The genus Jatropha (Euphorbiaceae): A review on secondary chemical metabolites and biological aspects. *Chem. Biol. Interact.* **2020**, *318*, 108976.

[28] Dehgan, B.; Webster, G. L. Morphology and Infrageneric Relationships of the Genus *Jatropha* (Euphorbiaceae); University of California, Ed.; University of California Press: Berkeley, **1979**; Vol. 36.

[29] Laviola, B. G.; Rodrigues, E. V.; Teodoro, P. E.; Peixoto, L. de A.; Bhering, L. L. Biometric and biotechnology strategies in *Jatropha* genetic breeding for biodiesel production. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* **2017**, *76*, 894–904.

[30] Achten, W. M. J.; Nielsen, L. R.; Aerts, R.; Lengkeek, A. G.; Kjær, E. D.; Trabucco, A.; et al. Towards domestication of *Jatropha curcas*. *Biofuels* **2010**, *1*(1), 91–107.

[31] Sabandar, C. W.; Ahmat, N.; Jaafar, F. M.; Sahidin, I. Medicinal property, phytochemistry and pharmacology of several *Jatropha* species (Euphorbiaceae): A review. *Phytochemistry* **2013**, *85*, 7–29.

[32] Kumar, A.; Sharma, S. An evaluation of multipurpose oil seed crop for industrial uses (*Jatropha curcas* L.): A review. *Ind. Crops Prod.* **2008**, *28*(1), 1–10.

[33] Randall, A.; Campbell, S.; Vogler, W.; Bebawi, F.; Madigan, B. *Bellyache bush (Jatropha gossypiifolia) management manual : control options and management case studies from across Australia*; 1°.; Tropical Weeds Research

Centre, Ed.; Dept. of Employment, Economic Development and Innovation, **2009**.

[34] Moshobane, M. C.; Mudereri, B. T.; Mukundamago, M.; Chitata, T. Predicting future distribution patterns of *Jatropha gossypiifolia* L. in South Africa in response to climate change. *South African Journal of Botany* **2022**, *146*, 417–425.

[35] West African Health Organisation. *West African Herbal Pharmacopeia* ; 1st ed.; Bobo Dioulasso, **2020**; Vol. 1.

[36] Cartaxo, S. L.; Souza, M. M. de A.; Albuquerque, U. P. de. Medicinal plants with bioprospecting potential used in semi-arid northeastern Brazil. *J. Ethnopharmacol.* **2010**, *131*(2), 326–342.

[37] Santos, J. de F. L.; Pagani, E.; Ramos, J.; Rodrigues, E. Observations on the therapeutic practices of riverine communities of the Unini River, AM, Brazil. *J. Ethnopharmacol.* **2012**, *142*(2), 503–515.

[38] Paz, M. N.; Santos, R. L. R.; Silva, I. V. L. da; Pimentel, E. N. A.; Santos, W. *Jatropha gossypiifolia* (pinhão-roxo): Um estudo sobre usos terapêuticos, atividade farmacológica e toxicologia. *Diversitas Journal* **2024**, *9*(3).

[39] Yetein, M. H.; Houessou, L. G.; Lougbégnon, T. O.; Teka, O.; Tente, B. Ethnobotanical study of medicinal plants used for the treatment of malaria in plateau of Allada, Benin (West Africa). *J. Ethnopharmacol.* **2013**, *146*(1), 154–163.

[40] Diallo, A.; Traore, M. S.; Keita, S. M.; Balde, M. A.; Keita, A.; Camara, M.; et al. Management of diabetes in Guinean traditional medicine: An ethnobotanical investigation in the coastal lowlands. *J. Ethnopharmacol.* **2012**, *144*(2), 353–361.

[41] Hussain, S. S.; Kingsley, D. Ethnomedicinal breakthroughs in snake bite therapy: From folklore to forefront. *Toxicol. Rep.* **2024**, *13*, 101795.

[42] Molander, M.; Saslis-Lagoudakis, C. H.; Jäger, A. K.; Rønsted, N. Cross-cultural comparison of medicinal floras used against snakebites. *J. Ethnopharmacol.* **2012**, *139*(3), 863–872.

[43] Falodun, A.; Kragl, U.; Touem, S.-M. T.; Villinger, A.; Fahrenwaldt, T.; Langer, P. A novel anticancer diterpenoid from *Jatropha gossypifolia*. *Nat. Prod. Commun.* **2012**, *7*(2), 151–152.

[44] Wu, Q.; Patocka, J.; Nepovimova, E.; Kuca, K. *Jatropha gossypiifolia* L. and its biologically active metabolites: A mini review. *J. Ethnopharmacol.* **2019**, *234*, 197–203.

[45] Fatokun, O.; Liberty, O.; Esievo, K.; Okhale, S.; Kunle, O. Phytochemistry, Ethnomedicine and Pharmacology of *Jatropha gossypiifolia* L: A Review. *Archives of Current Research International* **2016**, *5*(3), 1–21.

[46] Das, B.; Venkataiah, B. A minor coumarino-lignoid from *Jatropha gossypifolia*. *Biochem. Syst. Ecol.* **2001**, *29*(2), 213–214.

[47] Das, B.; Venkataiah, B.; Kashinatham, A. Venkatasin, A New Coumarino-Lignoid From *Jatropha gossypifolia*. *Nat. Prod. Lett.* **1999**, *13*(4), 293–297.

[48] Durre, S.; Shafiq ur, R.; Naeem, A.; Sami, U.; Muhammad, A. R. Antioxidant activities of the selected plants from the family Euphorbiaceae, *Lauraceae, Malvaceae* and *Balsaminaceae*. *Afr. J. Biotechnol.* **2010**, *9*(7), 1086–1096.

[49] Das, B.; Banerji, J. Arylnaphthalene lignan from *Jatropha gossypifolia*. *Phytochemistry* **1988**, *27*(11), 3684–3686.

[50] Banerji, J.; Das, B.; Chatterjee, A.; Shoolery, J. N. Gadain, a lignan from *Jatropha gossypifolia*. *Phytochemistry* **1984**, *23*(10), 2323–2327.

[51] Chatterjee, A.; Das, B.; Pascard, C.; Prange, T. Crystal structure of a lignan from *Jatropha gossypifolia*. *Phytochemistry* **1981**, *20*(8), 2047–2048.

[52] Das, B.; Venkataiah, B. A rare diterpene from *Jatropha gossypifolia*. *Biochem. Syst. Ecol.* **1999**, *27*(7), 759–760.

[53] Ravindranath, N.; Venkataiah, B.; Ramesh, C.; Jayaprakash, P.; Das, B. Jatrophenone, a novel macrocyclic bioactive diterpene from *Jatropha gossypifolia*. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo).* **2003**, *51*(7), 870–871.

[54] Das, R.; Das, B.; Kashinatham, A. Gossypiline, a new lignan from *Jatropha gossypifolia*. *Natural Product Sciences* **1998**, *4*(4), 238–240.

[55] Das, B.; Das (née Chakrabarti), R. Gossypifan, a lignan from *Jatropha gossypifolia*. *Phytochemistry* **1995**, *40*(3), 931–932.

[56] Bullangpoti, V.; Khumrungsee, N.; Pluempanupat, W.; Kainoh, Y.; Saguanpong, U. Toxicity of ethyl acetate extract and ricinine from *Jatropha gossypifolia* senescent leaves against *Spodoptera exigua Hubner* (Lepidoptera: Noctuidae). *J. Pestic. Sci.* **2011**, *36*(2), 260–263.

[57] Nwokocha, A.; Blessing, O. A.; Okoli, B. E. Comparative phytochemical screening of *Jatropha* L. Species in the Niger Delta. *Research Journal of Phytochemistry* **2011**, *5*(2), 107–114.

[58] Ogundare, A. O. Antimicrobial effect of *Tithonia diversifolia* and *Jatropha gossypifolia* leaf extracts. *Trends Appl. Sci. Res.* **2007**, *2*(2), 145–150.

[59] Zengin, G.; Mahomoodally, M. F.; Sinan, K. I.; Ak, G.; Etienne, O. K.; Sharmeen, J. B.; et al. Chemical composition and biological properties of two *Jatropha* Species: Different parts and different extraction methods. *Antioxidants (Basel)* **2021**, *10*(5).

[60] Pilon, A. C.; Carneiro, R. L.; Neto, F. C.; Bolzani, V. da S.; Castro-Gamboa, I. Interval multivariate curve resolution in the pereplication of HPLC–DAD data from *Jatropha gossypifolia*. *Phytochemical Analysis* **2013**, *24*(4), 401–406.

[61] Li, W.; Tang, Y.-Q.; Sang, J.; Fan, R.-Z.; Tang, G.-H.; Yin, S. Jatrofolianes A and B: two highly modified lathyrane diterpenoids from *Jatropha gossypiifolia*. *Org. Lett.* **2020**, *22*(1), 106–109.

[62] Tinto, W. F.; John, L. M. D.; Reynolds, W. F.; McLean, S. Triterpenoids of *Jatropha gossypiifolia*. *J. Nat. Prod.* **1992**, *55*(6), 807–809.

[63] Das, B.; Kashinatham, A.; Venkataiah, B.; Srinivas, K. V. N. S.; Mahender, G.; Ravinder Reddy, M. Cleomiscosin A, a coumarino-lignoid from *Jatropha gossypifolia*. *Biochem. Syst. Ecol.* **2003**, *31*(10), 1189–1191.

[64] Das, B.; Anjani, G. Gossypidien, a lignan from stems of *Jatropha gossypifolia*. *Phytochemistry* **1999**, *51*(1), 115–117.

[65] Das, B.; Rao, S. P.; Srinivas, K. V. N. S. Isolation of Isogadain from *Jatropha gossypifolia*. *Planta Med.* **1996**, *62*(01), 90–90.

[66] Das, B.; Rao, S. P.; Srinivas, K. V. N. S.; Das, R. Jatrodien, a lignan from stems of *Jatropha gossypifolia*. *Phytochemistry* **1996**, *41*(3), 985–987.

[67] Mutheeswaran, S.; Pachaiyappan, S. K.; Yuvaraj, P.; Duraipandiyan, V.; Al-Dhabi, N. A.; Balakrishna, K.; et al. Screening of some medicinal plants for anticariogenic activity: An investigation on bioactive constituents from *Jatropha gossypifolia* (L.) root. *Biocatal. Agric. Biotechnol.* **2017**, *10*, 161–166.

[68] Purushothaman, K. K.; Sundaram, C.; Cameron, A. F.; Connolly, J. D.; Labbé, C.; Maltz, A.; et al. Jatropholones A and B, new diterpenoids from the roots of (euphorbiaceae) - crystal structure analysis of Jatropholone B. *Tetrahedron Lett.* **1979**, *20*(11), 979–980.

[69] Falodun, A.; Sheng-Xiang, Q.; Parkinson, G.; Gibbons, S. Isolation and characterization of a new anticancer diterpenoid from *Jatropha gossypifolia*. *Pharm. Chem. J.* **2012**, *45*(10), 636–639.

[70] Taylor, M. D.; Smith III, A. B.; Furst, G. T.; Gunasekara, S. P.; Bevelle, C. A.; Cordell, G. A. New Antileukemic Jatrophone Derivatives from *Jatropha gossypiifolia*: Structural and Stereochemical Assignment through Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy. *Journal american chemical society* **1983**, No. 105, 3177–3183.

[71] Vijayakumar, A. R.; Daniel, E. P.; Ilavarasan, R.; Venkataraman, S.; Vijayakumar, S. Ulcer Protective Activity of *Jatropha gossypiifolia* Linn. in Wistar Rats. *Pharmacognosy Res.* **2016**, *8*(Suppl 1), S61-6.

[72] Panda, Bipin. B.; Gaur, K.; Kori, M. L.; Tyagi, R. K.; Nema, R. K.; Sharma, C. S.; et al. Anti-inflammatory and analgesic activity *of Jatropha gossypifolia* in Experimental Animal Models. *Global Journal of Pharmacology* **2009**, *3*(1).

[73] Silva, S. do N.; Abreu, I. C.; Freire, S. M. de F.; Cartágenes, M. do S. de S.; Ribeiro, R. M.; Castro, A. S. de; et al. Antispasmodic effect of *Jatropha gossypiifolia* is mediated through dual blockade of muscarinic receptors and Ca^{2+} channels. *Revista Brasileira de Farmacognosia* **2011**, *21*(4), 715–720.

[74] Reddi, K. V. N. R.; Rajesh, S. S.; Narendra, K.; Jangala, S.; Reddy, P. C. O.; Satya, A. K.; et al. *In vitro* anti-venom potential of various *Jatropha* extracts on neutralizing cytotoxic effect induced by phospholipase A2 of crude venom from Indian cobra (*Naja naja*). *Bangladesh J. Pharmacol.* **2014**, *9*(1).

[75] Granados, S.; Balcázar, N.; Guillén, A.; Echeverri, F. Evaluation of the hypoglycemic effects of flavonoids and extracts from *Jatropha gossypifolia* L. *Molecules* **2015**, *20*(4), 6181–6193.

[76] Seth, R.; Sarin, R. Analysis of the phytochemical content and anti-microbial activity of *Jatropha gossypifolia* L. . *Scholars Research Library* **2010**, *2*(5), 285–291.

[77] El-Din, M. I. G.; Youssef, F. S.; Altyar, A. E.; Ashour, M. L. GC/MS Analyses of the essential oils obtained from different *Jatropha* Species, their discrimination using chemometric analysis and assessment of their antibacterial and anti-biofilm activities. *Plants* **2022**, *11*(9), 1268.

[78] Apu, A. S.; Ireen, K.; Bhuyan, S. H.; Matin, M.; Hossain, Md. F.; Rizwan, F. Evaluation of analgesic, neuropharmacological and anti-diarrheal potential of *Jatropha gossypifolia* (Linn.) Leaves in Mice. *Journal of Medical Sciences* **2012**, *12*(8), 274–279.

[79] Feitosa, C. M.; Freitas, R. M.; Luz, N. N. N.; Bezerra, M. Z. B.; Trevisan, M. T. S. Acetylcholinesterase inhibition by somes promising Brazilian medicinal plants. *Brazilian Journal of Biology* **2011**, *71*(3), 783–789.

[80] Jain, S.; Choudhary, G. P.; Jain, D. K. Pharmacological evaluation of anti–fertility activity of ethanolic extract of *Jatropha gossypifolia* leaf in female albino mice. *Asian Pac. J. Trop. Biomed.* **2012**, *2*(3), S1671–S1674.

[81] Drafor, G.; Duah, E.; Ankamah, N. A.; Kpene, G. E.; Mante, P. K. Investigating the anticonvulsant properties of aqueous ethanolic extracts of the leaves, roots, and fruits of *Jatropha gossypifolia* L. (Euphorbiaceae). *Adv. Pharmacol. Pharm. Sci.* **2021**, *2021*, 5547353.

[82] Temdie, R. J. G.; Vouffo, E. Y. C.; Galani, B. R. T.; Ladane, B. D.; Bianzoumbe, J.; Minoue, M. G. K.; et al. Potential curative effects of aqueous extracts of *Cissus quadrangularis* (Vitaceae) and *Jatropha gossypiifolia* (Euphorbiaceae) on acetaminophen-induced liver injury in mice. *Current Therapeutic Research* **2023**, *99*, 100716.

[83] Rocha, F. A. G. da; Dantas, L. Í. S. Atividade antimicrobiana in vitro do látex do aveloz (*Euphorbia tirucalli* L.), pinhão bravo (*Jatropha mollissima* L.) e pinhão-roxo (*Jatropha gossypiifolia* L.) sobre microorganismos patogênicos. . *HOLOS* **2010**, *4*, 3.

[84] Singh, D.; Singh, A. The toxicity of four native Indian plants: Effect on AChE and acid/alkaline phosphatase level in fish *Channa marulius*. *Chemosphere* **2005**, *60*(1), 135–140.

[85] Arafat, M.; Moon, N. J.; Mohammad, M.; Mamun, M. J. I.; Meem, J. N.; Rasel, M. H.; et al. Comprehensive evaluation of methanolic fruits extract of *Jatropha gossypifolia* L.: Neuropharmacological, cytotoxic, anthelmintic, GC-MS profiling, and molecular docking studies. *Pharmacol. Res. Perspect.* **2025**, *13*(6), e70185.

[86] Uko, S. O.; Malami, I.; Ibrahim, K. G.; Lawal, N.; Bello, M. B.; Abubakar, M. B.; et al. Revolutionizing snakebite care with novel antivenoms: Breakthroughs and barriers. *Heliyon* **2024**, *10*(3), e25531.

[87] Paiva, D. D. A. M. R. De. Serpentes de interesse em saúde. *Revista Científica Multidisciplinar Núcleo do Conhecimento* **2020**, 144–170.

[88] Konrath, E. L.; Strauch, I.; Boeff, D. D.; Arbo, M. D. The potential of Brazilian native plant species used in the therapy for snakebites: A literature review. *Toxicon* **2022**, *217*, 17–40.

[89] Brasil. *GUIA DE ANIMAIS PEÇONHENTOS DO BRASIL*; 1°.; Ministério da Saúde, Ed.; Brasília, **2024**.

[90] Castro, L. R. de; Lanna, C. C. e; Paiva, L. R. de; Motta, O. J. R. da. Acidentes botrópicos no Brasil: uma breve revisão sistemática. *Cuadernos de Educación y Desarrollo* **2024**, *16*(8), e5061.

[91] Silva, W. R. G. B. da; Santos, L. de S.; Lira, D.; Luna, K. P. de O.; Fook, S. M. L.; Alves, R. R. N. Who are the most affected by *Bothrops* snakebite envenoming in Brazil? A Clinical-epidemiological profile study among the regions of the country. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2023**, *17*(10), e0011708.

[92] Silva, K. M. P.; Braz, H. B.; Kasperoviczus, K. N.; Marques, O. A. V.; Almeida-Santos, S. M. Reproduction in the pitviper *Bothrops jararacussu*: large females increase their reproductive output while small males increase their potential to mate. *Zoology* **2020**, *142*, 125816.

[93] Marques, juliano. *Jararacuçu (Bothrops jararacussu)*. Inaturalist.

[94] Muscat, E.; Mitsuo, R.; Menegucci, R.; Moroti, M. de T.; Pedrozo, M.; Rotenberg, E.; et al. Natural history of the large pit viper *Bothrops jararacussu*: Habitat use, movement patterns, and home range. *Herpetol. Conserv. Biol.* **2021**, *16*(2), 313–324.

[95] Costa, H. C.; Pantoja, D. L.; Pontes, J. L.; Feio, R. N. Serpentes do Município de Viçosa, Mata Atlântica do Sudeste do Brasil. *Biota Neotrop.* **2010**, *10*(3), 352–378.

[96] Aguiar, W. da S.; Galizio, N. da C.; Sant'Anna, S. S.; Silveira, G. P. M.; Rodrigues, F. de S.; Grego, K. F.; et al. Ontogenetic study of *Bothrops jararacussu* venom composition reveals distinct profiles. *Toxicon* **2020**, *186*, 67–77.

[97] Mise, Y.; Lira-da-Silva, R.; Carvalho, F. Time to treatment and severity of snake envenoming in Brazil. *Revista Panamericana de Salud Pública* **2018**, 1–6.

[98] Brasil. *PORTARIA SECTICS/MS Nº 83, DE 7 DE OUTUBRO DE 2025*; A secretária de ciência, tecnologia e inovação e do complexo econômico-industrial da saúde do ministério da saúde: Brasil, **2025**.

[99] Ferreira-Rodrigues, S. C.; Silva, R. C. C.; Trevisan, M.; Rodrigues, P. S. M.; Del-Rei, T. H. M.; Sousa, L. F.; et al. Ontogenetic and sexual differences in the venom of *Bothrops moojeni*: insights from a litter and its mother. *Brazilian Journal of Biology* **2024**, *84*.

[100] Freitas-de-Sousa, L. A.; Nachtigall, P. G.; Portes-Junior, J. A.; Holding, M. L.; Nystrom, G. S.; Ellsworth, S. A.; et al. Size Matters: An evaluation of the molecular basis of ontogenetic modifications in the composition of *Bothrops jararacussu* Snake Venom. *Toxins (Basel).* **2020**, *12*(12), 791.

[101] Zheng, H.; Wang, J.; Fan, H.; Wang, S.; Ye, R.; Li, L.; et al. Comparative venom multiomics reveal the molecular mechanisms driving adaptation to diverse predator–prey ecosystems in closely related sea snakes. *Mol. Biol. Evol.* **2023**, *40*(6).

[102] Lakušić, M.; Damm, M.; Bjelica, V.; Anđelković, M.; Tomović, L.; Bonnet, X.; et al. Ontogeny, not prey availability, underlies allopatric venom variability in insular and mainland populations of *Vipera ammodytes*. *J. Proteomics* **2025**, *310*, 105320.

[103] Sousa, L. F.; Nicolau, C. A.; Peixoto, P. S.; Bernardoni, J. L.; Oliveira, S. S.; Portes-Junior, J. A.; et al. Comparison of phylogeny, venom composition and neutralization by antivenom in diverse species of *Bothrops* complex. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2013**, *7*(9), e2442.

[104] Olaoba, O. T.; Santos, P. K. dos; Selistre-de-Araujo, H. S.; Souza, D. H. F. de. Snake venom metalloproteinases (SVMPs): A structure-function update. *Toxicon X* **2020**, *7*, 100052.

[105] Oliveira, A. L.; Viegas, M. F.; Silva, S. L. da; Soares, A. M.; Ramos, M. J.; Fernandes, P. A. The chemistry of snake venom and its medicinal potential. *Nat. Rev. Chem.* **2022**, *6*(7), 451–469.

[106] Giorgianni, M. W.; Dowell, N. L.; Griffin, S.; Kassner, V. A.; Selegue, J. E.; Carroll, S. B. The origin and diversification of a novel protein family in venomous snakes. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2020**, *117*(20), 10911–10920.

[107] Herrera, C.; Escalante, T.; Voisin, M.-B.; Rucavado, A.; Morazán, D.; Macêdo, J. K. A.; et al. Tissue localization and extracellular matrix degradation by PI, PII and PIII snake venom metalloproteinases: Clues on the mechanisms of venom-induced hemorrhage. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2015**, *9*(4), e0003731.

[108] Schluga, P. H. de C.; Larangote, D.; Melo, A. M. de; Lobermayer, G. K.; Torrejón, D.; Oliveira, L. S. de; et al. A novel P-III metalloproteinase from *Bothrops barnetti* venom degrades extracellular matrix proteins, inhibits platelet sggregation, and disrupts endothelial cell adhesion via α5β1 integrin receptors to Arginine-Glycin-Aspartic Acid (RGD) containing molecules. *Toxins (Basel).* **2024**, *16*(11), 486.

[109] Wei, Y.; Lu, Q.-Y.; Zhong, X.-J.; Guo, L.; Zeng, F.-Y.; Sun, Q.-Y. Cobra venom P-III class metalloproteinase atrase A induces inflammatory response and cell apoptosis in endothelial cells via its metalloproteinase domain. *Toxicon* **2023**, *232*, 107210.

[110] Baldo, C.; Jamora, C.; Yamanouye, N.; Zorn, T. M.; Moura-da-Silva, A. M. Mechanisms of vascular damage by hemorrhagic snake venom metalloproteinases: Tissue distribution and *in situ* hydrolysis. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2010**, *4*(6), e727.

[111] Gutiérrez, J.; Escalante, T.; Rucavado, A.; Herrera, C.; Fox, J. A comprehensive view of the structural and functional alterations of extracellular matrix by snake venom metalloproteinases (SVMPs): Novel perspectives on the pathophysiology of envenoming. *Toxins (Basel).* **2016**, *8*(10), 304.

[112] Balboa, M. A.; Balsinde, J. Phospholipases: From structure to biological function. *Biomolecules* **2021**, *11*(3), 428.

[113] Castro-Amorim, J.; Oliveira, A. N. de; Silva, S. L. da; Soares, A. M.; Mukherjee, A. K.; Ramos, M. J.; et al. Catalytically active snake venom PLA_2 enzymes: an overview of Its lusive mechanisms of reaction. *J. Med. Chem.* **2023**, *66*(8), 5364–5376.

[114] Moreira, V.; Leiguez, E.; Janovits, P. M.; Maia-Marques, R.; Fernandes, C. M.; Teixeira, C. Inflammatory effects of *Bothrops* phospholipases A_2: Mechanisms involved in biosynthesis of lipid mediators and lipid accumulation. *Toxins (Basel).* **2021**, *13*(12), 868.

[115] Bittenbinder, M. A.; Thiel, J. van; Cardoso, F. C.; Casewell, N. R.; Gutiérrez, J.-M.; Kool, J.; et al. Tissue damaging toxins in snake venoms: mechanisms of action, pathophysiology and treatment strategies. *Commun. Biol.* **2024**, *7*(1), 358.

[116] Cheng, C.-H. A summary of L-amino acid oxidases: Biochemical properties, functions, and applications – A narrative review. *Tungs' Medical Journal* **2025**, *19*(Suppl 1), S1–S10.

[117] Geevarghese, A. V.; Ranganathan, H.; Vishvanathan, R.; Benjamin, R. L-amino acid oxidases from snake venom: A review of their anticancer mechanisms and translational potential. *Pharmacological Research - Natural Products* **2025**, *9*, 100391.

[118] Izidoro, L. F. M.; Sobrinho, J. C.; Mendes, M. M.; Costa, T.; Grabner, A. N.; Rodrigues, V. M.; et al. Snake venom L-Amino acid oxidases: Trends in pharmacology and biochemistry. *Biomed Res. Int.* **2014**, *2014*, 1–19.

[119] Abdelkafi-Koubaa, Z.; ELBini-Dhouib, I.; Souid, S.; Jebali, J.; Doghri, R.; Srairi-Abid, N.; et al. Pharmacological investigation of CC-LAAO, an L-Amino Acid Oxidase from *Cerastes cerastes* Snake Venom. *Toxins (Basel).* **2021**, *13*(12), 904.

[120] Hiu, J. J.; Yap, M. K. K. Cytotoxicity of snake venom enzymatic toxins: phospholipase A_2 and - amino acid oxidase. *Biochem. Soc. Trans.* **2020**, *48*(2), 719–731.

[121] Resiere, D.; Mehdaoui, H.; Neviere, R. Inflammation and oxidative stress in snakebite envenomation: A Brief descriptive review and clinical implications. *Toxins (Basel).* **2022**, *14*(11), 802.

[122] Sarmiento, K.; Zambrano, J.; Galvis, C.; Molina-Olivares, Á.; Villadiego-Molinares, M. M.; Ramírez-Martínez, J. A.; et al. Immunochemical recognition of *Bothrops rhombeatus* venom by two polyvalent antivenoms. *Toxins (Basel).* **2024**, *16*(3), 152.

[123] Silva, W. D. da; Andrade, S. A. de; Megale, Â. A. A.; Souza, D. A. de; Sant'Anna, O. A.; Magnoli, F. C.; et al. Antibodies as snakebite antivenoms: Past and future. *Toxins (Basel).* **2022**, *14*(9), 606.

[124] Sánchez, A.; Durán, G.; Segura, Á.; Herrera, M.; Vargas, M.; Villalta, M.; et al. Comparison of the intrageneric neutralization scope of monospecific, bispecific/monogeneric and polyspecific/monogeneric antisera raised in horses immunized with sub-Saharan African snake venoms. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2024**, *18*(5), e0012187.

[125] Ratanabanangkoon, K. Polyvalent snake antivenoms: Production strategy and their therapeutic benefits. *Toxins (Basel).* **2023**, *15*(9), 517.

[126] León, G.; Herrera, M.; Segura, Á.; Villalta, M.; Vargas, M.; Gutiérrez, J. M. Pathogenic mechanisms underlying adverse reactions induced by intravenous administration of snake antivenoms. *Toxicon* **2013**, *76*, 63–76.

[127] Silva, H. A. de; Ryan, N. M.; Silva, H. J. de. Adverse reactions to snake antivenom, and their prevention and treatment. *Br. J. Clin. Pharmacol.* **2016**, *81*(3), 446–452.

[128] Gutiérrez, J. M.; Calvete, J. J.; Habib, A. G.; Harrison, R. A.; Williams, D. J.; Warrell, D. A. Snakebite envenoming. *Nat. Rev. Dis. Primers* **2017**, *3*(1), 17063.

[129] Potet, J.; Beran, D.; Ray, N.; Alcoba, G.; Habib, A. G.; Iliyasu, G.; et al. Access to antivenoms in the developing world: A multidisciplinary analysis. *Toxicon X* **2021**, *12*, 100086.

[130] World Health Organization (WHO). *Guidelines for the Production, Control and Regulation of Snake Antivenom Immunoglobulins*; 3°.; **2017**; Vol. 10.

[131] Gutiérrez, J. M.; Albulescu, L.-O.; Clare, R. H.; Casewell, N. R.; Abd El-Aziz, T. M.; Escalante, T.; et al. The search for natural and synthetic inhibitors that would complement antivenoms as therapeutics for snakebite envenoming. *Toxins (Basel).* **2021**, *13*(7), 451.

[132] Jesus, R. A. de; Silva, W. R. da; Wisniewski, A.; Nascimento, L. F. de A.; Blank, A. F.; Souza, D. A. de; et al. Microwave and ultrasound extraction of antioxidant phenolic compounds from Lantana camara Linn. leaves: Optimization, comparative study, and FT-Orbitrap MS analysis. *Phytochemical Analysis* **2024**, *35*(4), 889–902.

[133] Liu, W.; Zhang, Z.; Zhang, T.; Qiao, Q.; Hou, X. Phenolic profiles and antioxidant activity in different organs of Sinopodophyllum hexandrum. *Front. Plant Sci.* **2022**, *13*.

[134] Lv, H.; Guo, S. Comparative analysis of flavonoid metabolites from different parts of Hemerocallis citrina. *BMC Plant Biol.* **2023**, *23*(1), 491.

[135] Ma, D.; Guo, Y.; Ali, I.; Lin, J.; Xu, Y.; Yang, M. Accumulation characteristics of plant flavonoids and effects of cultivation measures on their biosynthesis: A review. *Plant Physiology and Biochemistry* **2024**, *215*, 108960.

[136] Ji, W.; Chen, F.; Chen, Z.; Jiang, H. Research in advances in the bioactivity of plant polyphenols. *Int. J. Food Sci. Technol.* **2024**, *59*(11), 8037–8044.

[137] Gómez-Betancur, I.; Gogineni, V.; Salazar-Ospina, A.; León, F. Perspective on the therapeutics of anti-snake venom. *Molecules* **2019**, *24*(18), 3276.

[138] Dai, J.; Mumper, R. J. Plant Phenolics: Extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. *Molecules* **2010**, *15*(10), 7313–7352.

[139] Oshina, I.; Spigulis, J. Beer–Lambert law for optical tissue diagnostics: current state of the art and the main limitations. *J. Biomed. Opt.* **2021**, *26*(10).

[140] Samy, R. P.; Gopalakrishnakone, P.; Chow, V. T. Therapeutic application of natural inhibitors against snake venom phospholipase A2. *Bioinformation* **2012**, *8*(1), 48–57.

[141] Nakamura, M.; Ra, J.-H.; Jee, Y.; Kim, J.-S. Impact of different partitioned solvents on chemical composition and bioavailability of *Sasa quelpaertensis Nakai* leaf extract. *J. Food Drug Anal.* **2017**, *25*(2), 316–326.

[142] Prinz, H. Hill coefficients, dose-response curves and allosteric mechanisms. *J. Chem. Biol.* **2010**, *3*(1), 37–44.

[143] More, S. S.; Kadam, S. P.; Redasani, V. K. A Comprehensive Review of UV-visible spectroscopy. *International Journal of Pharmaceutical Research and Applications* **2025**, *10*(3), 114–134.

[144] Butnariu, M. Physical Properties and Identification of flavonoids by Ultraviolet-Visible Spectroscopy. *International Journal of Biochemistry & Physiology* **2023**, *8*(2).

[145] Xiao, J. F.; Zhou, B.; Ressom, H. W. Metabolite identification and quantitation in LC-MS/MS-based metabolomics. *Trends in Analytical Chemistry* **2012**, *32*, 1–14.

[146] McLafferty, F. W.; Turecek, F. *Interpretation of Mass Spectra*; 4th ed.; University Science Books, Ed.; Sausalito, **1994**; Vol. 1.

[147] Guo, X.; Yue, Y.; Tang, F.; Wang, J.; Yao, X.; Sun, J. A comparison of C-glycosidic flavonoid isomers by electrospray ionization quadrupole time-of-flight tandem mass spectrometry in negative and positive ion mode. *Int. J. Mass Spectrom.* **2013**, *333*, 59–66.

[148] Benayad, Z.; Gómez-Cordovés, C.; Es-Safi, N. E. Identification and quantification of flavonoid glycosides from fenugreek (*Trigonella foenum-graecum*) germinated seeds by LC–DAD–ESI/MS analysis. *Journal of Food Composition and Analysis* **2014**, *35*(1), 21–29.

[149] Preciado, L.; Comer, J.; Núñez, V.; Rey-Súarez, P.; Pereañez, J. Inhibition of a snake venom metalloproteinase by the flavonoid myricetin. *Molecules* **2018**, *23*(10), 2662.

[150] Castro, O.; Gutiérrez, J. M.; Barrios, M.; Castro, I.; Romero, M.; Umaña, E. Neutralización del efecto hemorrágico inducido por veneno de *Bothrops asper* (Serpentes: Viperidae) por extractos de plantas tropicales. *Rev. Biol. Trop.* **1999**, *47*(3), 605–616.

[151] Cuccioloni, M.; Mozzicafreddo, M.; Bonfili, L.; Cecarini, V.; Eleuteri, A. M.; Angeletti, M. Natural occurring polyphenols as template for drug design. Focus on Serine Proteases. *Chem. Biol. Drug Des.* **2009**, *74*(1), 1–15.

[152] Patiño, A. C.; Benjumea, D. M.; Pereañez, J. A. Inhibition of venom serine proteinase and metalloproteinase activities by *Renealmia alpinia* (Zingiberaceae) extracts: Comparison of wild and *in vitro* propagated plants. *J. Ethnopharmacol.* **2013**, *149*(2), 590–596.

[153] Pereañez, J. A.; Patiño, A. C.; Núñez, V.; Osorio, E. The biflavonoid morelloflavone inhibits the enzymatic and biological activities of a snake venom phospholipase A_2. *Chem. Biol. Interact.* **2014**, *220*, 94–101.

[154] Lindahl, M.; Tagesson, C. Flavonoids as phospholipase A_2 Inhibitors: Importance of their structure for selective inhibition of group II Phospholipase A_2. *Inflammatin* **1997**, *21*(3), 347–356.

[155] Cotrim, C. A.; Oliveira, S. C. B. de; Filho, E. B. S. D.; Fonseca, F. V.; Baldissera, L.; Antunes, E.; et al. Quercetin as an inhibitor of snake venom secretory phospholipase A_2. *Chem. Biol. Interact.* **2011**, *189*(1–2), 9–16.

APÊNDICES

Figura 1A - Representação das estruturas químicas das substâncias isoladas da *J. gossypiifolia* descritas na literatura.

(Continua)

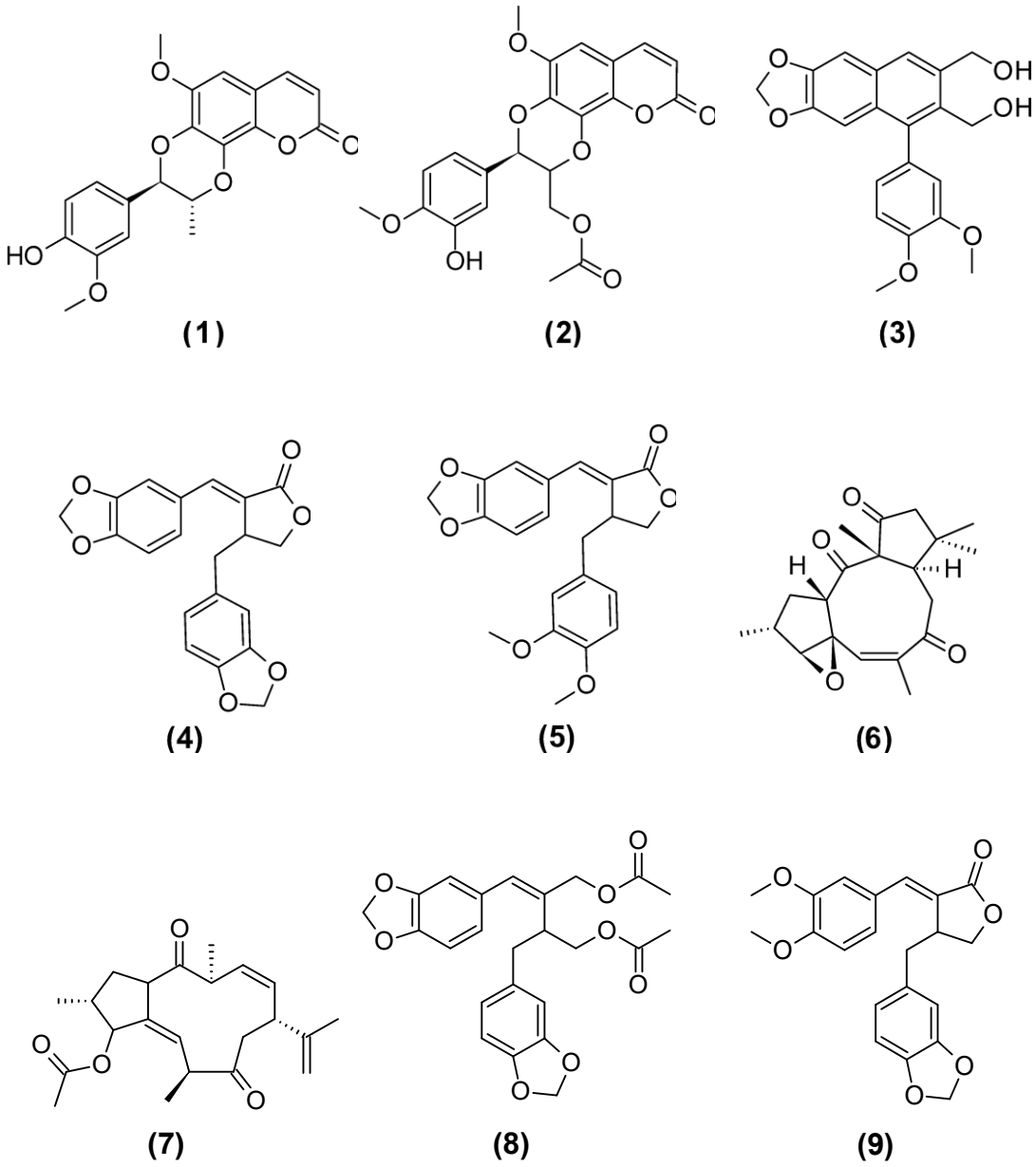
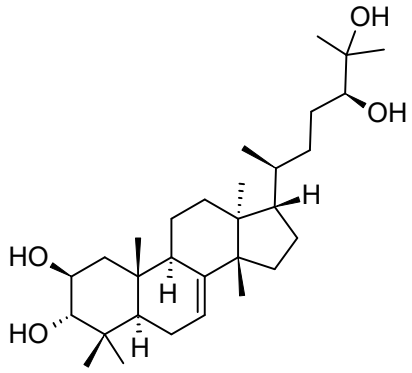
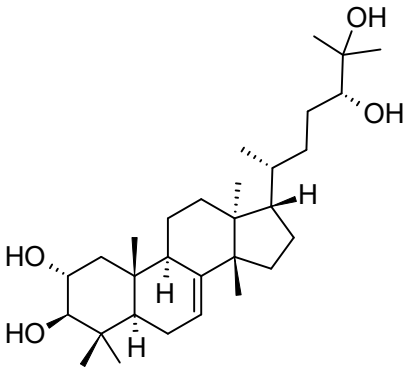


Figura 1A - Representação das estruturas químicas das substâncias isoladas da *J. gossypiifolia* descritas na literatura.

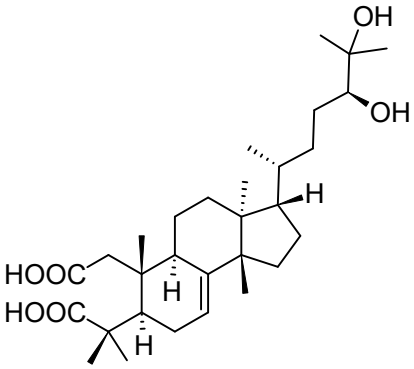
(Continuação)



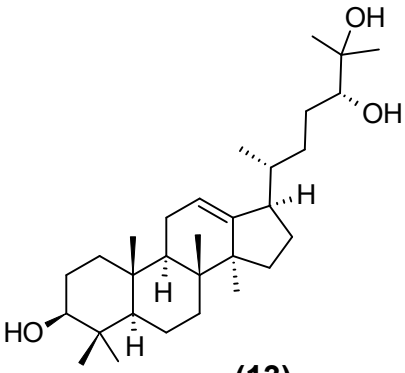
(10)



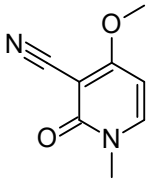
(11)



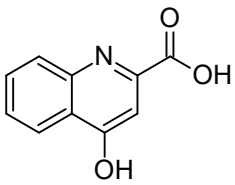
(12)



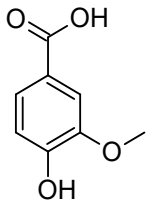
(13)



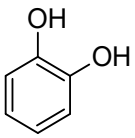
(14)



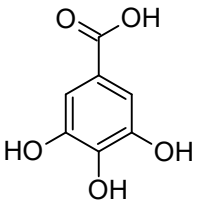
(15)



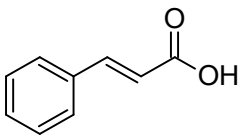
(16)



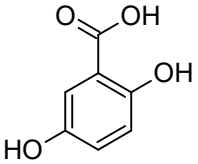
(17)



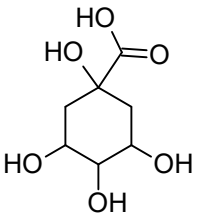
(18)



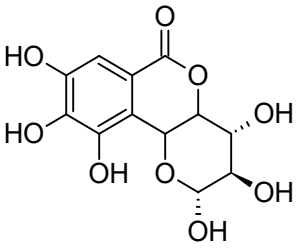
(19)



(20)



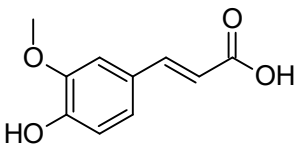
(21)



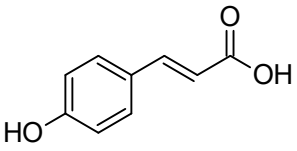
(22)

Figura 1A - Representação das estruturas químicas das substâncias isoladas da *J. gossypiifolia* descritas na literatura.

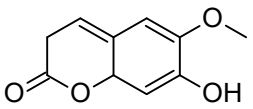
(Continuação)



(23)



(24)



(25)

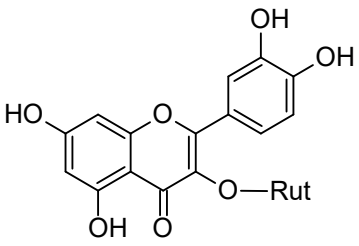
Substância	R_1	R_2	R_3	R_4	R_5	R_6
(26)	Gly	OH	H	H	OH	H
(27)	H	OH	Gly	H	OH	H
(28)	Gly	OH	H	H	OH	OH
(29)	H	OH	Gly	H	OH	OH
(30)	Gly	OH	Rha	H	OH	H
(31)	Rha	OH	Gly	H	OH	H
(32)	Gly	OH	H	OMe	OH	H
(33)	H	OH	Gly	OMe	OH	H
(34)	H	OH	H	H	OH	H
(35)	H	OH	H	OH	OH	H
(36)	H	O-Rut	H	H	OH	H

Figura 1A - Representação das estruturas químicas das substâncias isoladas da *J. gossypiifolia* descritas na literatura.

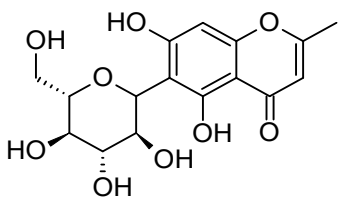
(Continuação)

Substância	R_1	R_2	R_3
(37)	OH	OH	β OH
(38)	OH	OH	α OH
(39)	OMe	H	H

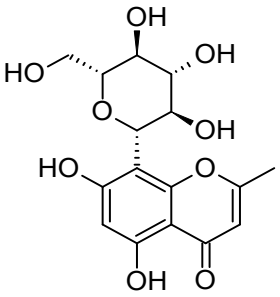
Substância	R_1	R_2	R_3	R_4
(40)	H	OH	H	β OH
(41)	H	OH	H	α OH
(42)	OH	OH	H	H
(43)	H	OH	H	H



(44)



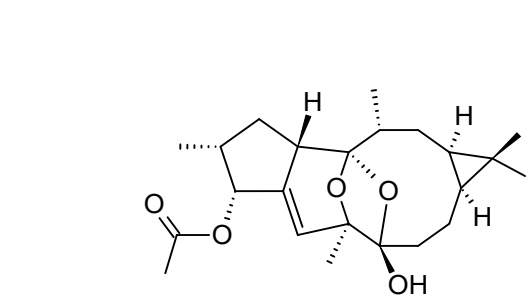
(45)



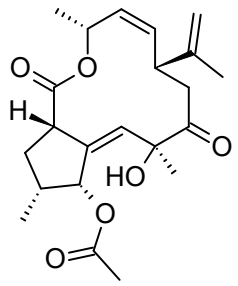
(46)

Figura 1A - Representação das estruturas químicas das substâncias isoladas da *J. gossypiifolia* descritas na literatura.

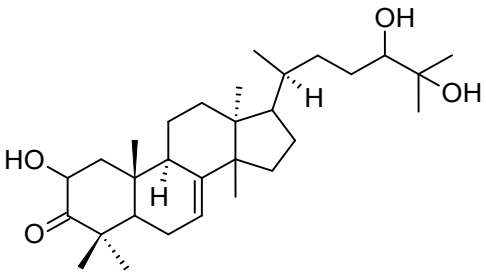
(Continuação)



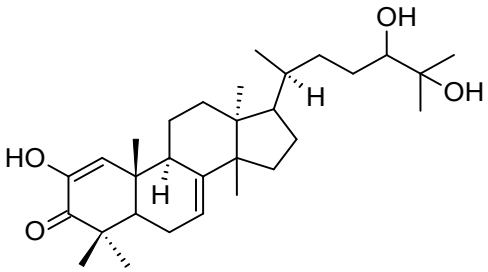
(47)



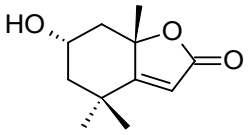
(48)



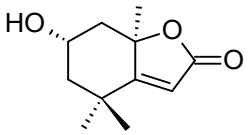
(49)



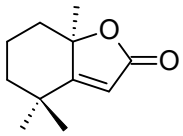
(50)



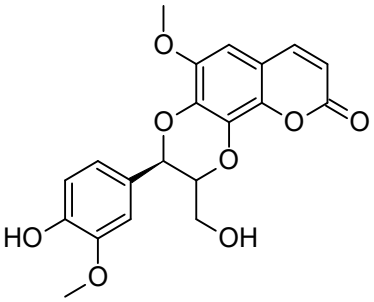
(51)



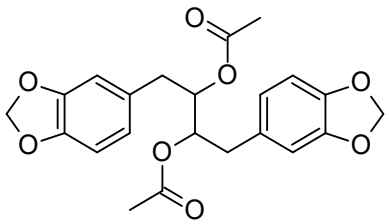
(52)



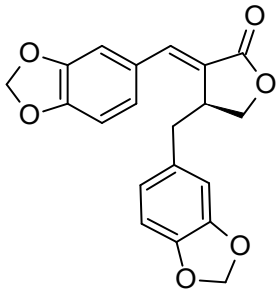
(53)



(54)



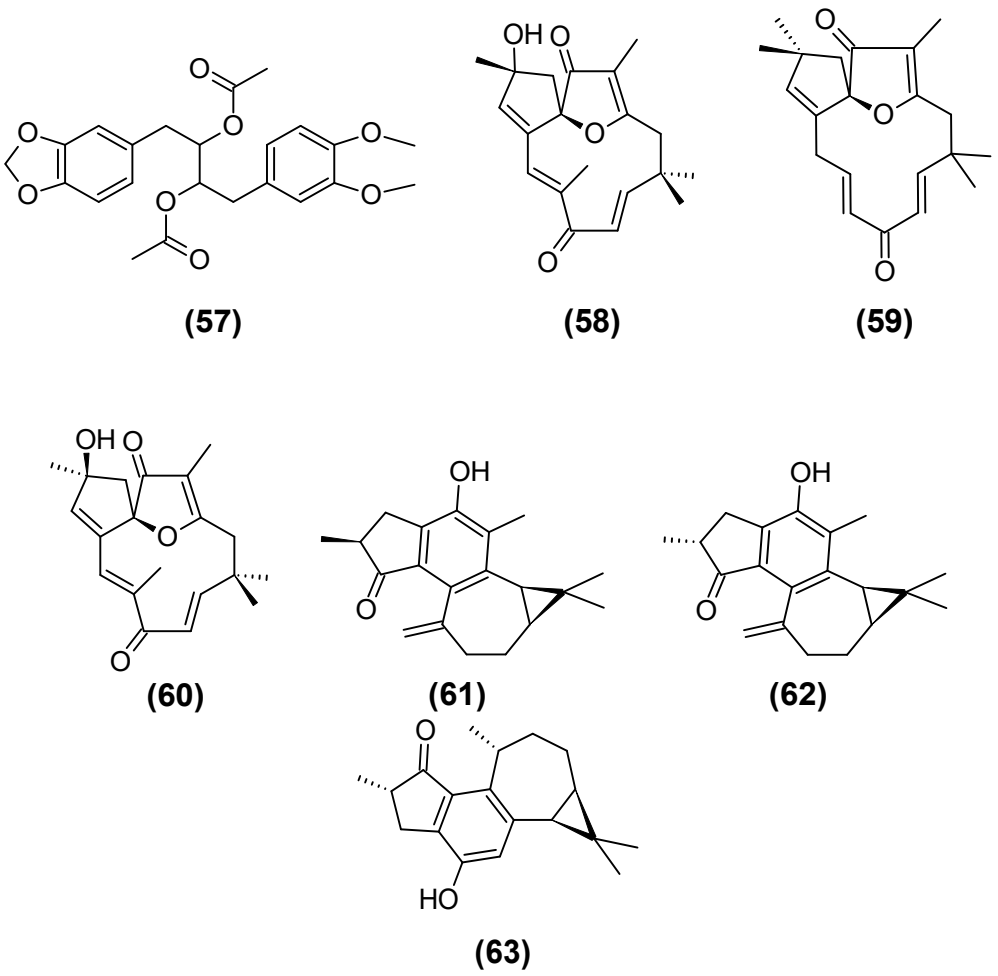
(55)



(56)

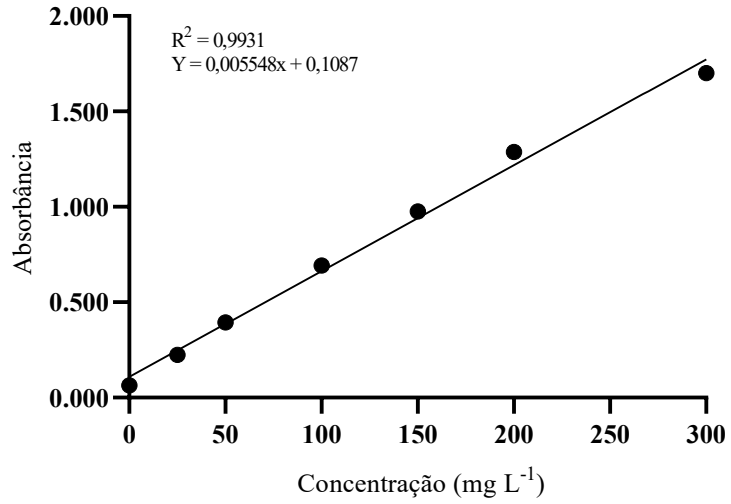
Figura 1A - Representação das estruturas químicas das substâncias isoladas da *J. gossypiifolia* descritas na literatura.

(Conclusão)



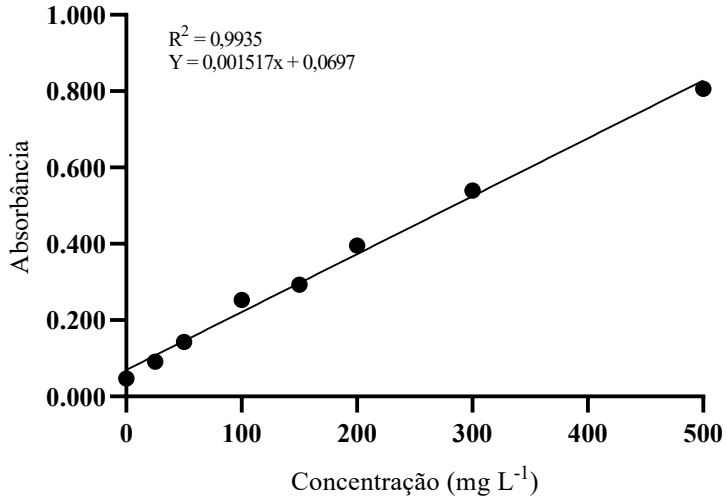
Fonte: Próprio autor.

Figura 2A - Curva de calibração do ácido gálico nas concentrações de 25-300 mg L^{-1} em água.



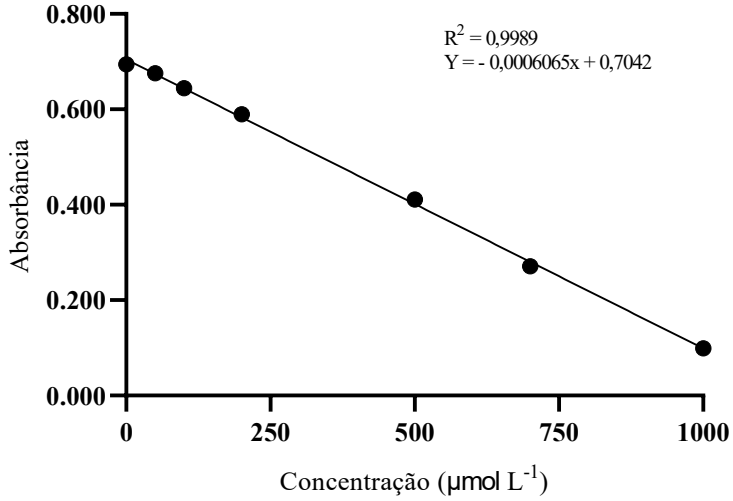
Fonte: Próprio autor.

Figura 3A - Curva de calibração da catequina nas concentrações de 25-500 mg L^{-1} em água.



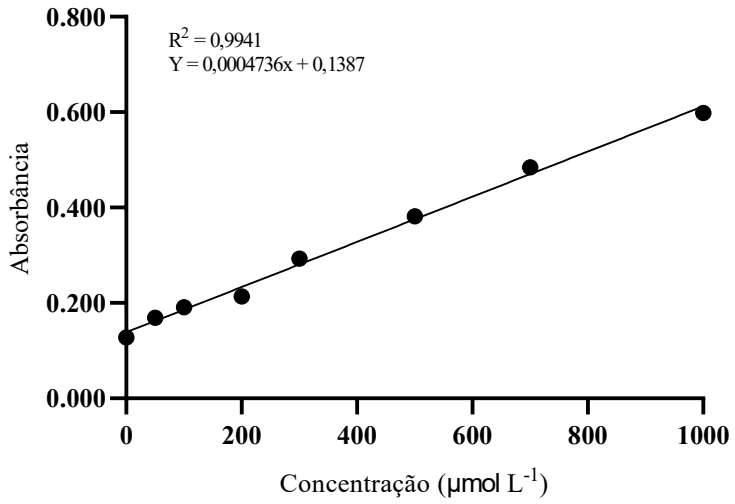
Fonte: Próprio autor.

Figura 4A - Curva analítica de inibição do radical DPPH usando trolox 50-1000 µmol L^{-1} em etanol.



Fonte: Próprio autor.

Figura 5A - Curva analítica de redução de íons ferro usando trolox 50-1000 µmol L^{-1} em etanol.



Fonte: Próprio autor.