

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
DEPARTAMENTO DE ANÁLISES CLÍNICAS  
CURSO DE FARMÁCIA

Lucas Vinícius da Silva

**Efeito antiagregante de extratos brutos etanólicos de *Citrus sinensis*, *Litchi chinensis*,  
*Nephelium lappaceum* e *Platonia insignis***

Florianópolis

2022

Lucas Vinícius da Silva

**Efeito antiagregante de extratos brutos etanólicos de *Citrus sinensis*, *Litchi chinensis*,  
*Nephelium lappaceum* e *Platonia insignis***

Trabalho de Conclusão do Curso de Graduação em Farmácia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito para a obtenção do título de Farmacêutico.  
Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Ana Carolina Rabello de Moraes, Dr<sup>ª</sup>.

Florianópolis

2022

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,  
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Silva, Lucas Vinicius da  
Efeito antiagregante de extratos brutos etanólicos de  
Citrus sinensis, Litchi chinensis, Nephelium lappaceum e  
Platonia insignis / Lucas Vinicius da Silva ; orientadora,  
Ana Carolina Rabello de Moraes, 2022.  
55 p.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) -  
Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências  
da Saúde, Graduação em Farmácia, Florianópolis, 2022.

Inclui referências.

1. Farmácia. 2. Agregação plaquetária. 3. Coagulação. 4.  
Extratos brutos. I. Rabello de Moraes, Ana Carolina. II.  
Universidade Federal de Santa Catarina. Graduação em  
Farmácia. III. Título.

Lucas Vinícius da Silva

**Efeito antiagregante de extratos brutos etanólicos de *Citrus sinensis*, *Litchi chinensis*,  
*Nephelium lappaceum* e *Platonia insignis***

Este Trabalho Conclusão de Curso foi julgado adequado para obtenção do Título de “Farmacêutico” e aprovado em sua forma final pelo Curso de Graduação em Farmácia

Florianópolis, 28 de Julho de 2022.

---

Prof<sup>a</sup>. Liliete Canes de Souza, Dr<sup>a</sup>.  
Coordenadora do Curso

**Banca Examinadora:**

---

Prof<sup>a</sup>. Ana Carolina Rabello de Moraes, Dr<sup>a</sup>.  
Orientadora  
Universidade Federal de Santa Catarina

---

Prof<sup>a</sup>. Maria Cláudia Santos da Silva, Dr<sup>a</sup>.  
Avaliadora  
Universidade Federal de Santa Catarina

---

Prof. Marcos José Machado, Dr.  
Avaliador  
Universidade Federal de Santa Catarina

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, pelo dom da vida, por ter me dado forças e pelos privilégios e bênçãos derramados sobre mim para que eu pudesse chegar até aqui.

Aos meus amados pais, Marilene e Luiz, que não medem esforços para que eu possa alcançar meus sonhos, que foram os pilares dessa conquista, que me aceitam do jeito que sou, que torcem e se orgulham de cada passo da minha caminhada. Palavras não são suficientes para agradecer tudo o que já fizeram por mim, eu amo vocês.

Aos meus avós, Maria e Valdenir, por todo apoio e amor que têm por mim, principalmente a minha avó que sempre foi minha segunda mãe, amo vocês.

Ao meu tio, Marcos, que sempre foi quase um irmão mais velho, a quem admiro e me serve de inspiração.

Ao meu namorado, Gabriel, por toda paciência, compreensão e companheirismo durante esses 3 anos juntos. Muito obrigado pelo seu apoio, pelo seu amor, e por sempre estar ao meu lado, essa conquista também é dedicada a você, te amo.

Aos meus amigos de longa data, Simone, Rafaela, Gustavo e Lisandra, que acompanham minha trajetória muito antes de ser um universitário, que me viram crescer e evoluir, que me incentivam, me inspiram e me entendem, sou eternamente grato pela amizade de vocês que tornou todo o percurso muito mais leve.

As amigas que a universidade proporcionou, Nicolý, Luiza, Sarah, Fernanda e a minha dupla de estágios, Matheus. Obrigado pelos trabalhos em grupo, pelas noites de estudo, pelo esclarecimento de dúvidas e pelos momentos de risada, descontração e desabafo. Sem a ajuda de vocês eu não teria conseguido.

A professora Ana Carolina, que durante esse período foi mais do que uma orientadora, me aconselhando, me ajudando, tirando minhas dúvidas e estando disponível em todos os momentos que precisei. Ministrou aulas de hematologia com todo amor e dedicação, fazendo com que eu me apaixonasse mais ainda por essa disciplina.

Aos professores que compõem a banca, Iara, Marcos e Maria Cláudia, aos quais escolhi devido a grande admiração que tenho por vocês. Principalmente a professora Maria Cláudia que foi responsável pelo meu primeiro contato com a hematologia e que me orientou com grande carinho durante os estágios curriculares.

A Universidade Federal de Santa Catarina pelo ensino de qualidade e serviços de excelência prestados à comunidade.

Ao CNPq pelo apoio que permitiu a realização dessa pesquisa.

Sempre vai haver outra montanha, e eu sempre vou querer movê-la. Sempre será uma batalha difícil. Às vezes eu vou ter que perder... O importante não é o quão rápido eu vou chegar lá, o importante não é o que está me esperando do outro lado, mas sim, a escalada. (ALEXANDER, 2009)

## RESUMO

A hemostasia é o mecanismo que busca o equilíbrio dinâmico entre os fatores pró-trombóticos e antitrombóticos e ela exerce três principais funções: manter o sangue em um estado fluido na corrente sanguínea, cessar o sangramento após uma lesão vascular e restaurar a integridade dos vasos. Distúrbios da hemostasia podem gerar trombose, um evento diretamente relacionado com doenças cardiovasculares, uma das principais causas de morbimortalidade em todo o mundo. Fármacos antitrombóticos são utilizados para tratar e prevenir esses eventos tromboembólicos, entretanto, estes fármacos ainda estão associados a efeitos adversos que limitam o seu uso universal e dificultam a adesão ao tratamento. Nesse contexto, os fármacos de origem natural surgem como uma possibilidade para contornar tal problemática. Estudos prévios realizados pelo nosso grupo de pesquisa demonstraram o potencial antiagregante de uma série de extratos brutos de plantas. Diante disso, este trabalho teve como objetivo avaliar os efeitos de compostos de origem natural, na forma de extratos brutos, sobre a agregação plaquetária e determinar as suas concentrações inibitórias de 50% (CI<sub>50</sub>). Para os ensaios de agregação plaquetária, as amostras de plasma rico em plaquetas foram incubadas a 37°C por 5 minutos com os extratos brutos em diferentes concentrações ou com DMSO 0,5% (controle) e, posteriormente, a agregação foi estimulada pela adição de difosfato de adenosina (ADP; 10 µM) ou epinefrina (5 µg/mL). Na triagem, o extrato etanólico de bacuri (fruta) (800 µg/mL) inibiu significativamente a agregação plaquetária, contudo, essa inibição foi inferior a 50% e, portanto, a CI<sub>50</sub> não pode ser determinada. Para os compostos previamente avaliados pelo grupo de pesquisa, as CI<sub>50</sub> do extrato etanólico de laranja (coleta: 22/11/2017) e do extrato etanólico de laranja (coleta: 16/12/2017) para a epinefrina foram de 654,0 ± 21,0 µg/mL e de 482,2 ± 24,6 µg/mL, respectivamente. As CI<sub>50</sub> do extrato etanólico da semente de lichia para ADP e epinefrina foram, respectivamente, 211,8 ± 5,1 µg/mL e 128,8 ± 8,6 µg/mL, do extrato etanólico de bacuri (semente) 529,4 ± 172,2 µg/mL e 438,6 ± 7,1 µg/mL, e do extrato etanólico de rambutan (caule) 202,9 ± 7,9 µg/mL e 326,3 ± 11,9 µg/mL. A compilação dos resultados demonstrou que, com exceção do extrato etanólico de rambutan (caule), todos os extratos avaliados inibem mais fortemente a agregação induzida por epinefrina, e que o extrato etanólico da semente de lichia apresentou o melhor conjunto de CI<sub>50</sub>, portanto, considerado o extrato com melhor potencial antiagregante.

**Palavras-chave:** Agregação plaquetária, Coagulação, Extratos brutos.

## Effect of natural compounds on human hemostasis

Hemostasis is the mechanism that seeks a dynamic balance between pro-thrombotic and antithrombotic factors, and has three main functions: it keeps the blood in a fluid state in the bloodstream, stops bleeding after vascular injury, and restores vessel integrity. Disturbances in hemostasis can lead to thrombosis, an event directly related to cardiovascular diseases, one of the leading causes of morbidity and mortality worldwide. Antithrombotic drugs are used to treat and prevent these thromboembolic events, however, these drugs are still associated with adverse effects that limit their universal use and hinder treatment adherence. In this context, drugs of natural origin emerge as a possibility to circumvent this problem. Previous studies performed by our research group have demonstrated the antiaggregant potential of a series of crude plant extracts. In view of this, this work aimed to evaluate the effects of compounds of natural origin, in the form of crude extracts, on platelet aggregation and to determine their 50% inhibitory concentrations ( $IC_{50}$ ). For the platelet aggregation assays, platelet-rich plasma samples were incubated at 37°C for 5 min with the crude extracts at different concentrations or with 0.5% DMSO (control) and, subsequently, aggregation was stimulated by the addition of adenosine diphosphate (ADP; 10  $\mu$ M) or epinephrine (5  $\mu$ g/mL). In screening, bacuri ethanol extract (fruit) (800  $\mu$ g/mL) significantly inhibited platelet aggregation, however, this inhibition was less than 50% and therefore the  $IC_{50}$  cannot be determined. For the compounds previously evaluated by the research group, the  $IC_{50}$  of orange ethanol extract (collected: 11/22/2017) and orange ethanol extract (collected: 12/16/2017) for epinephrine were  $654.0 \pm 21.0$   $\mu$ g/mL and  $482.2 \pm 24.6$   $\mu$ g/mL, respectively. The  $IC_{50}$  of lychee seed ethanol extract for ADP and epinephrine were, respectively,  $211.8 \pm 5.1$   $\mu$ g/mL and  $128.8 \pm 8.6$   $\mu$ g/mL, of bacuri ethanol extract (seed)  $529.4 \pm 172.2$   $\mu$ g/mL and  $438.6 \pm 7.1$   $\mu$ g/mL, and of rambutan ethanolic extract (stem)  $202.9 \pm 7.9$   $\mu$ g/mL and  $326.3 \pm 11.9$   $\mu$ g/mL. The compilation of the results demonstrated that, with the exception of the rambutan ethanolic extract (stem), all evaluated extracts inhibit more strongly the aggregation induced by epinephrine, and that the lychee seed ethanol extract presented the best set of  $IC_{50}$  being, therefore, considered the extract with the best antiaggregant potential.

Keywords: Platelet aggregation, Coagulation, Crude extracts.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Hemostasia primária.....	18
Figura 2 – Modelo clássico da cascata de coagulação.....	20
Figura 3 – Fibrinólise.....	23
Figura 4 – Árvore frutífera ( <i>Citrus sinensis</i> ).....	25
Figura 5 – Frutas da lichia ( <i>Litchi chinensis</i> ).....	26
Figura 6 – <i>Platonia insignis</i> .....	27
Figura 7 – <i>Nephelium lappaceum</i> .....	28
Figura 8 – Efeito do extrato da semente de bacuri (EEBS) sobre a agregação plaquetária induzida por ADP e epinefrina.....	33
Figura 9 – Curvas concentração – resposta dos extratos de laranja (EELa1 e EELa2).....	35
Figura 10 – Curvas concentração – resposta dos extratos de semente de lichia (EELi), de fruto de bacuri (EEBF) e do caule de rambutan (EER) sobre a agregação plaquetária induzida por ADP e epinefrina.....	37
Figura 11 – Efeito dos extratos das plantas sobre a agregação plaquetária induzida por ADP.....	41
Figura 12 – Efeito dos extratos das plantas sobre a agregação plaquetária induzida por epinefrina.....	42

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Codificação de extratos testados durante a execução do estudo .....	31
Tabela 2 – $CI_{50}$ calculada do efeito dos extratos de laranja (EELa1 e EELa2) sobre a agregação plaquetária induzida por epinefrina.....	36
Tabela 3 – $CI_{50}$ calculada do efeito dos extratos EELi, EEBF e EER sobre a agregação plaquetária induzida por ADP e epinefrina .....	37

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AAS - Ácido acetilsalicílico  
ADP - Difosfato de adenosina  
AT - Antitrombina  
ATP - Trifosfato de adenosina  
AVC - Acidente vascular cerebral  
CI<sub>50</sub> - Concentração inibitória de 50%  
DCV - Doenças cardiovasculares  
DMSO - Dimetilssulfóxido  
DP - Desvio padrão  
EEBF - Extrato etanólico de bacuri (fruta) (*Platonia insignis*)  
EEBS - Extrato etanólico de bacuri (semente) (*Platonia insignis*)  
EELa1 - Extrato etanólico de laranja (*Citrus sinensis*). Coleta: 22/11/2017  
EELa2 - Extrato etanólico de laranja (*Citrus sinensis*). Coleta: 16/12/2017  
EELi - Extrato etanólico da semente de lichia (*Litchi chinensis*)  
EER - Extrato etanólico de rambutan (caule) (*Nephelium lappaceum*)  
FDA - *Food and Drug Administration*  
FI - Fibrinogênio  
FIa - Fibrina  
FII - Protrombina  
FIIa - Trombina  
FVa - Fator V ativado  
FVIIa - Fator VII ativado  
FVIIIa - Fator VIII ativado  
FIXa - Fator X ativado  
FX - Fator X  
FXa - Fator X ativado  
FXIa - Fator XI ativado  
FXIIa - Fator XII ativado  
FT - Fator tecidual  
FvW - Fator de von Willebrand  
GP - Glicoproteína  
IAM - Infarto agudo do miocárdio

PBS - Tampão fosfato-salino

PC - Proteína C

PLG - Plasminogênio

PPP - Plasma pobre em plaquetas

PRP - Plasma rico em plaquetas

PS - Proteína S

TCLE - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

TEV - Tromboembolismo venoso

TFPI - Inibidor da Via do Fator Tecidual

tPA - Ativador de plasminogênio do tipo tecidual

TXA2 - Tromboxano A2

u-PA - Ativador de plasminogênio do tipo urocinase

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>14</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	<b>17</b>
2.1	HEMOSTASIA .....	17
<b>2.1.1</b>	<b>Hemostasia primária</b> .....	<b>17</b>
<b>2.1.2</b>	<b>Hemostasia secundária</b> .....	<b>19</b>
2.1.2.1	<i>Modelo clássico da cascata de coagulação</i> .....	19
2.1.2.2	<i>Modelo de coagulação baseado em superfícies celulares</i> .....	20
2.1.2.2.1	Fase de iniciação.....	21
2.1.2.2.2	Fase de amplificação.....	21
2.1.2.2.3	Fase de propagação.....	22
2.1.2.2.4	Fase de finalização.....	22
<b>2.1.3</b>	<b>Fibrinólise</b> .....	<b>23</b>
2.2	PLANTAS MEDICINAIS .....	24
<b>2.2.1</b>	<b>Laranjeira</b> .....	<b>24</b>
<b>2.2.2</b>	<b>Lichia</b> .....	<b>25</b>
<b>2.2.3</b>	<b>Bacuri</b> .....	<b>26</b>
<b>2.2.4</b>	<b>Rambutan</b> .....	<b>27</b>
<b>3</b>	<b>OBJETIVO</b> .....	<b>29</b>
3.1	OBJETIVO GERAL .....	29
3.2	OBJETIVO ESPECÍFICO .....	29
<b>4</b>	<b>METODOLOGIA</b> .....	<b>30</b>
4.1	SELEÇÃO DE PARTICIPANTES E COLETA DA AMOSTRA.....	30
4.2	COMPOSTOS NATURAIS.....	30
4.3	AVALIAÇÃO DO EFEITO DOS EXTRATOS SOBRE A AGREGAÇÃO PLAQUETÁRIA .....	31
4.4	DETERMINAÇÃO DE CI <sub>50</sub> DOS EXTRATOS BRUTOS .....	32
4.5	ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	32

<b>5</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>33</b>
5.1	TRIAGEM DO EFEITO DO EXTRATO BRUTO DA SEMENTE DE BACURI ( <i>Platonia insignis</i> ) SOBRE A AGREGAÇÃO PLAQUETÁRIA .....	33
5.2	DETERMINAÇÃO DA CI <sub>50</sub> DOS EXTRATOS BRUTOS.....	35
5.3	EFEITO DOS EXTRATOS SOBRE O PERFIL DA CURVA DE AGREGAÇÃO PLAQUETÁRIA .....	40
<b>6</b>	<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>44</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>45</b>
	<b>ANEXO A – PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP.....</b>	<b>51</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Uma das funções básicas do sangue é o transporte de elementos e substâncias, dentre elas: células, nutrientes e catabólitos. Por esse motivo, o sangue deve permanecer em um estado fluido dentro dos vasos. Quando ocorre uma lesão vascular, o sangue altera sua fluidez para diminuir a perda sanguínea. Essa alteração da fluidez consiste na formação de um trombo “branco” e de uma malha de fibrina por meio da agregação plaquetária e da coagulação sanguínea, respectivamente. Após desempenhar sua função de impedir a perda sanguínea, o tampão hemostático (trombo plaquetário + malha de fibrina) deve ser removido para que a luz do vaso e o fluxo de sangue retornem aos seus estados normais (LORENZI, 2006). Esse conjunto de mecanismos é denominado hemostasia e pode ser definido, portanto, como um evento biológico que ocorre em imediata resposta à lesão de um vaso sanguíneo e que busca pelo equilíbrio dinâmico entre os fatores pró-trombóticos e antitrombóticos (AUSTIN, 2017; JOBLING; EYRE, 2013; CAGNOLATI et al., 2017). Nesse contexto, ressalta-se que a resposta hemostática é um dos vários mecanismos homeostáticos que previnem alterações agudas no volume e pressão sanguínea e que permitem que um organismo mantenha a perfusão normal do tecido (MOHAMMED et al., 2020).

A formação do tampão hemostático envolve uma série de interações entre os constituintes celulares e plasmáticos do sangue e os componentes celulares e extracelulares dos vasos sanguíneos (MOHAMMED et al., 2020). Os mecanismos envolvidos na formação do tampão devem ser regulados para que simultaneamente evitem tanto a perda excessiva de sangue (hemorragia), quanto a formação de trombos intravasculares indevidos (trombose), decorrentes de formação excessiva de fibrina. Nesse contexto, pode-se dizer que a hemostasia é um processo que envolve sangramento e trombose como dois desfechos indesejados e resultantes de anormalidades (AKAY, 2018).

A trombose é o processo patológico que resulta da ativação e propagação inapropriada da resposta hemostática normal do organismo, e pode envolver tanto a circulação venosa quanto a arterial. Os trombos arteriais são ricos em plaquetas e se depositam nas laterais ou ao redor de placas ateroscleróticas rompidas. Os trombos venosos, por sua vez, são ricos em fibrina e eritrócitos, e podem se desenvolver em uma parede endotelial intacta. Portanto, a trombose arterial está relacionada ao infarto agudo do miocárdio (IAM) e o acidente vascular cerebral (AVC), enquanto a trombose venosa é a causa do

tromboembolismo venoso (TEV), da embolia pulmonar e de síndromes coronarianas agudas (KROUPENOVA et al., 2017).

As anormalidades na hemostasia são a principal causa de morte em todo o mundo (PATEL; KARCH, 2020), conseqüentemente, a morbidade por doenças cardiovasculares (DCV) ganha cada vez mais destaque nos últimos anos. Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), observa-se um aumento recente na incidência de DCV, principalmente em países de baixa e média renda, reflexo do aumento da expectativa de vida. No Brasil, as DCV são responsáveis por 27,7% dos óbitos totais ou 31,8% dos óbitos por causas naturais, portanto, são consideradas a principal causa de morte no país. As DCV também são consideradas o fator de maior impacto no custo das internações hospitalares no país. Em 2017, 10,1% das internações no Brasil foram causadas por doenças do aparelho circulatório (MASSA et al., 2019, FONSECA, 2018).

Estima-se que 1 a cada 4 pessoas morrem no mundo por doenças causadas pela trombose e, ainda, que 1-2 a cada 100 mil habitantes necessitem de alguma terapia medicamentosa para tratar ou prevenir situações trombóticas (WTD, 2021). Os principais fármacos utilizados na prevenção ou tratamento da trombose venosa são os anticoagulantes orais e injetáveis, representados pelos varfarínicos e os inibidores diretos e indiretos de FIIa e FXa (PRESTI, et al., 2015). Já os principais fármacos utilizados para o tratamento e prevenção da trombose arterial consistem nos antiagregantes como o ácido acetilsalicílico (AAS) e o clopidogrel (KOW; HASAN, 2021). Esses fármacos têm utilização clínica e eficácia comprovada no tratamento e prevenção de fenômenos tromboembólicos, no entanto, alguns problemas associados ao seu consumo ainda limitam sua utilização universal como uma janela terapêutica estreita, imprevisibilidade de sua dose-resposta, importantes interações medicamentosas e alimentares, necessidade de monitorização laboratorial frequente, plaquetopenia, resistência ao tratamento, inexistência de antídoto e, paradoxalmente, indução de estados de hipercoagulabilidade. Por conseguinte, ainda se faz necessário o desenvolvimento de novos fármacos antitrombóticos e anticoagulantes que sejam efetivos, permitam administração oral, tenham posologia simplificada, farmacocinética e farmacodinâmica previsíveis e menor monitorização laboratorial (AMIROU et al., 2018; STRUIJK et al., 2014).

Nesse contexto, os produtos naturais e/ou suas novas estruturas ainda hoje são amplamente utilizados com o intuito de descobrir e desenvolver novas entidades farmacêuticas. Entre os anos de 1981 e 2019, dos 1.602 novos fármacos aprovados pelo *Food*

*and Drug Administration* (FDA) dos Estados Unidos da América (ou organizações similares), aproximadamente 45% eram de origem natural, derivados de produtos naturais, derivado de produto natural com modificação semisintética ou que utilizavam um produto natural como farmacóforo. No âmbito da hemostasia, dos 23 anticoagulantes e dos 30 antitrombóticos aprovados na mesma época, 17 e 15, respectivamente, eram de origem natural ou inspirados em moléculas de origem natural. Em relação aos antiagregantes, todos os quatro fármacos aprovados no período de 1981 a 2019 eram derivados de produtos naturais ou sintéticos de forma a mimetizar um produto natural (NEWMAN; CRAGG, 2020).

## **2 REVISÃO DA LITERATURA**

### **2.1 HEMOSTASIA**

Em linhas gerais, a hemostasia exerce três principais funções, que são: manter o sangue em um estado fluido na corrente sanguínea, cessar o sangramento após uma lesão vascular e restaurar a integridade do vaso (AUSTIN, 2017; JOBLING; EYRE, 2013; CAGNOLATI et al., 2017). Didaticamente, a hemostasia pode ser dividida em três processos ou fases: a hemostasia primária, que envolve os processos relacionados à agregação plaquetária e formação do trombo “branco”; a hemostasia secundária, relacionada com a ativação da coagulação e formação da malha de fibrina; e a hemostasia terciária ou fibrinólise, que se refere aos mecanismos de remoção do tampão hemostático (LORENZI, 2006).

Pode ser citado como principais componentes da hemostasia: as células endoteliais dos vasos sanguíneos, as plaquetas, os fatores plasmáticos da coagulação, os inibidores da coagulação e as proteínas do sistema fibrinolítico. Em condições normais, quando o endotélio está íntegro, suas propriedades são antitrombóticas e as plaquetas e os fatores da coagulação circulam livremente na forma inativa. Após uma lesão, o endotélio passa a liberar substâncias com propriedades pró-trombóticas e as plaquetas e os fatores da coagulação, portanto, são ativados (RODRIGUES; CASTILHO-FERNANDES; FONTES, 2012).

#### **2.1.1 Hemostasia primária**

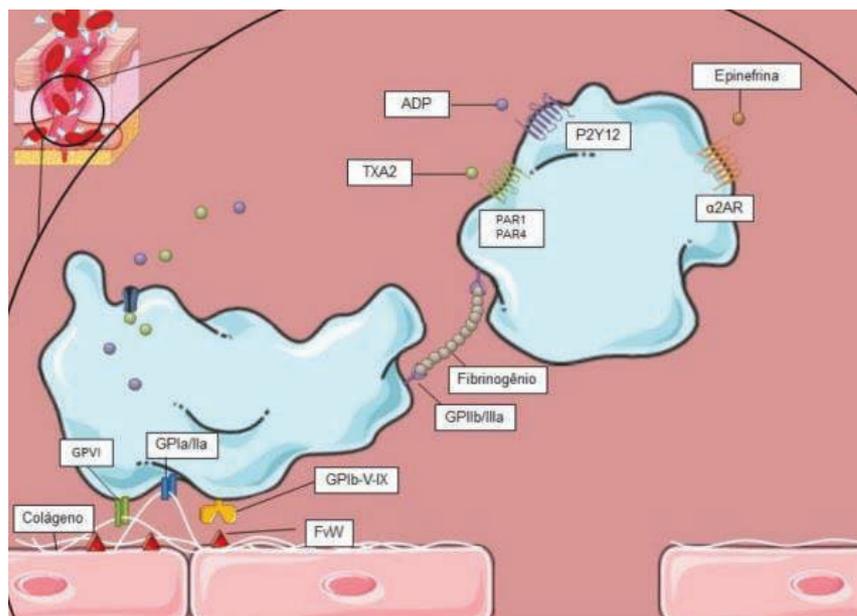
Os principais participantes da hemostasia primária são as células endoteliais, os vasos sanguíneos, as plaquetas, o fator de von Willebrand (FvW) e o fibrinogênio (FI) (RODRIGUES; CASTILHO-FERNANDES; FONTES, 2012). Como já mencionado, em situações normais, o endotélio é responsável pelo estado não trombogênica e isso ocorre devido à produção de inibidores da ativação plaquetária (a prostaciclina e o óxido nítrico), inibidores da coagulação e ativadores da fibrinólise (JOBLING; EYRE, 2013; KAZMI; BOYCE S; LWALEED, 2015; PALTA; SAROA; PALTA, 2014).

Após ser lesionado, o endotélio libera substâncias com propriedades vasoconstritoras (como a endotelina) com o intuito de diminuir o fluxo sanguíneo no local da lesão e facilitar a adesão das plaquetas ao subendotélio para diminuir o extravasamento de sangue. A camada subendotelial, que é altamente trombogênica e foi exposta pela lesão, passa a liberar colágeno,

FvW e fator tecidual (FT), para que sejam expressos na superfície das células endoteliais (JOBILING; EYRE, 2013; KAZMI; BOYCE S; LWALEED, 2015; PALTA; SAROA; PALTA, 2014).

O FvW se adere ao subendotélio por meio do colágeno exposto, a adesão das plaquetas ao endotélio acontece por meio de glicoproteínas (GP) de membrana, como a GPIb/IX/V e a GPVI, que interagem com o FvW e o colágeno subendotelial, respectivamente (Figura 1). A plaqueta será ativada pela adesão ao subendotélio e, nesse processo de ativação, sua conformação irá alterar de uma forma discoide para uma forma esférica e com pseudópodes. Essa mudança de forma das plaquetas acontece devido ao sistema actina miosina. Também devido ao processo de ativação, as plaquetas liberam o conteúdo dos grânulos alfa (fibrinogênio, FvW, fibronectina, trombospondina, antitrombina, proteína S, fatores V, IX e XII e inibidor 1 do ativador de plasminogênio) e densos (difosfato de adenosina - ADP, trifosfato de adenosina - ATP, cálcio e serotonina), essas substâncias liberadas são chamadas de mediadores de ativação plaquetária e são capazes de recrutar outras plaquetas circulantes para participar do processo de formação do trombo (MATUS et al., 2018; KOUPENOVA-ZAMOR et al., 2017; TOMAIUOLO; BRASS; STALKER, 2017; RODRIGUES; CASTILHO-FERNANDES; FONTES, 2012).

Figura 1 – Hemostasia primária.



Fator de von Willebrand (FvW); Tromboxano A2 (TXA2); Difosfato de adenosina (ADP); Receptor GPIIb/IIIa (GPIIb/IIIa); Receptor GPIb/V/IX (GPIb-V-IX); Receptor PAR1/PARA4 (PAR1/PAR4); Receptor P2Y12 (P2Y12). Fonte: adaptado de LEUNG, 2012.

Simultaneamente, ocorre também um aumento da afinidade da glicoproteína de membrana GPIIb/IIIa pelo fibrinogênio (FI). O FI possui dois sítios de ligação a esse receptor e, com isso, pode mediar as interações entre as plaquetas por se ligar a receptores de duas plaquetas diferentes, essa ligação plaqueta-plaqueta via GPIIb/IIIa é a responsável por formar o agregado plaquetário. Todo esse processo acima descrito, que ocorre durante a hemostasia primária, dá origem ao tampão plaquetário primário que é instável e precisa ser estabilizado (MATUS et al., 2018; KOUPENOVA-ZAMOR et al., 2017; TOMAIUOLO; BRASS; STALKER, 2017; RODRIGUES; CASTILHO-FERNANDES; FONTES, 2012).

### **2.1.2 Hemostasia secundária**

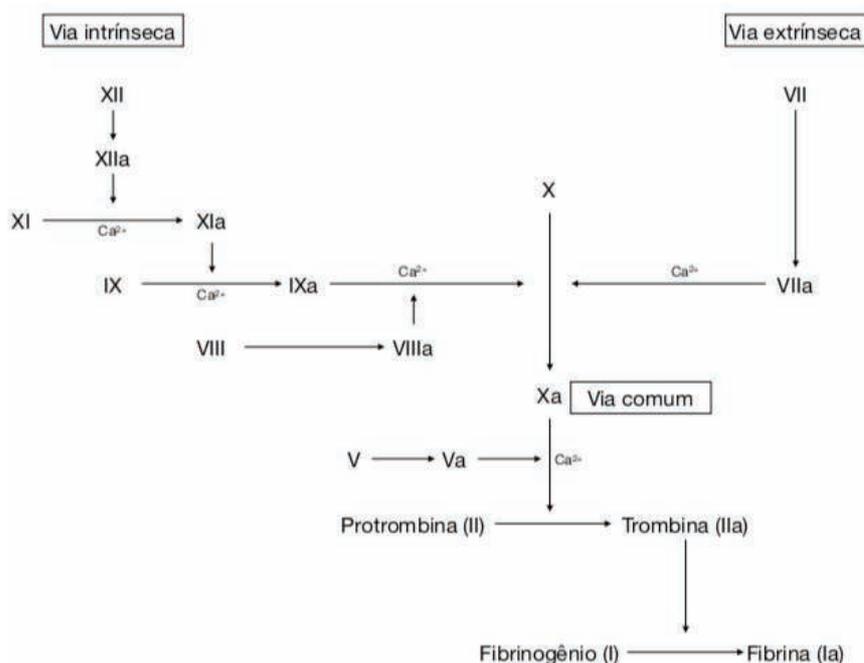
As ligações entre as plaquetas mediadas pelo fibrinogênio são fracas, para que o tampão plaquetário seja estabilizado, um conjunto de proteínas plasmáticas (fatores da coagulação) sintetizadas majoritariamente no fígado e que circulam no sangue na forma de zimogênio precisam ser ativadas para que haja a formação de uma “rede” de fibrina que irá estabilizar o tampão. Este processo chama-se hemostasia secundária e compreende a cascata de coagulação que, juntamente com a agregação plaquetária, ajudará a restaurar a lesão do vaso (RODRIGUES; CASTILHO-FERNANDES; FONTES, 2012; TEN CATE et al., 2017). Existem 11 fatores envolvidos nessa etapa da hemostasia e esses são numerados na ordem em que foram descobertos do FI ao FXIII com exceção do IV, que posteriormente descobriu-se tratar-se do cálcio, e do VI, que foi utilizado para designar um produto intermediário na formação da tromboplastina e que, portanto, não é um fator (ZAGO; FALCÃO; PASQUINI, 2013).

#### *2.1.2.1 Modelo clássico da cascata de coagulação*

O modelo clássico da cascata de coagulação (Figura 2) é dividido em via extrínseca, intrínseca e comum. Posteriormente ao dano tecidual, a via extrínseca é iniciada pela liberação de FT pelo endotélio que, na presença do cálcio e de fator VII ativado (FVIIa) presentes na circulação, formará um complexo capaz de ativar uma maior quantidade de fator VII, e realizará uma retroalimentação da cascata. Ele também converte o fator X (FX) em fator X ativado (FXa), o que iniciará, assim, a via comum da cascata de coagulação. O FXa, na presença de cálcio e de fator Va (FVa), irá converter a protrombina (FII) em trombina

(FIIa) que transformará o FI em fibrina (FIa). A polimerização dessa fibrina recém-formada resultará no coágulo (RODRIGUES; CASTILHO-FERNANDES; FONTES, 2012).

Figura 2 – Modelo clássico da cascata de coagulação.



Fatores I ao XII (I ao XII); Fator ativado (a); Cálcio ( $Ca^{2+}$ ). Fonte: MEDWAY, 2022.

A via intrínseca da coagulação inicia quando o fator XII (FXII) é convertido para fator XII ativado (FXIIa) pelo cininogênio de alto peso molecular e a pré-caliceína. O FXIIa ativa o fator XI (FXIa) que, por sua vez, ativa o fator IX (FIXa) e que, posteriormente, ativa o FX na presença de cálcio e de fator VIII ativado (FVIIIa). Da mesma forma que para a via extrínseca, o FXa formará o complexo protrombínico com o FVa e irá converter a protrombina em trombina e essa, por sua vez, converterá o fibrinogênio (solúvel) em fibrina (insolúvel), o que leva à formação do coágulo de fibrina. Devido a fase que prossegue a ativação do FX ser comum às duas vias, essa fase é chamada de via comum (RODRIGUES; CASTILHO-FERNANDES; FONTES, 2012).

#### 2.1.2.2 Modelo de coagulação baseado em superfícies celulares

O modelo clássico da cascata de coagulação, proposta em 1964, por Macfarlane, Davie e Ratnoff era aceito didaticamente, no entanto, possuía algumas limitações para a sua aplicação *in vivo*. Dessa forma, após alguns estudos clínicos e observações

experimentais demonstrarem que as reações de coagulação acontecem de maneira simultâneas nas superfícies celulares, surgiu a necessidade de uma revisão do modelo clássico da coagulação, já que o mesmo não conseguia responder várias questões relacionadas à clínica de pacientes portadores de certos distúrbios hemostáticos (SILVA; MELO, 2016; FERREIRA et al., 2010).

Diante disso, em 2001, Monroe e Hoffman propuseram um modelo para a hemostasia baseado em superfícies celulares que substitui e corrige o modelo clássico da cascata da coagulação (FLORES et al., 2015). Esse modelo inclui a interação dos fatores da coagulação com superfícies celulares específicas e o fator celular e, portanto, esclarece muitas questões que até então não eram entendidas (FERREIRA et al., 2010; FLORES et al., 2015). A atual teoria é dividida em quatro fases (iniciação, amplificação, propagação e finalização) e não apenas em duas vias como no modelo clássico (intrínseca e extrínseca), além de correlacionar processos físicos, celulares e bioquímicos (SILVA; MELO, 2016).

#### 2.1.2.2.1 Fase de iniciação

A fase de iniciação começa após ocorrer uma lesão vascular, o subendotélio é exposto e passa a expressar FT na superfície de suas células. O FT atua como receptor e cofator do FVII (presente na circulação sanguínea) que, ao ligar-se a ele, é ativado. O complexo FT/FVIIa resultante ativa pequenas quantidades dos fatores IX e X. Ambos os fatores possuem distintas funções, o FXa se liga ao seu cofator Va, forma uma protrombinase localizada na superfície da célula que expressa FT e converte pequenas quantidades de protrombina em trombina. A quantidade de trombina inicialmente gerada é insuficiente para a conversão do fibrinogênio em fibrina e formação do coágulo, mas é suficiente para fazer um *feedback* positivo da coagulação por meio da ativação dos fatores V, VIII e XI, e de receptores da superfície plaquetária. O FIXa atua na fase de propagação (SILVA; MELO, 2016; FERREIRA et al., 2010; FLORES et al., 2015).

#### 2.1.2.2.2 Fase de amplificação

Essa fase tem como objetivo a ativação máxima das plaquetas que possuam os cofatores Va e VIIIa ligados em sua superfície. A fase de amplificação inicia a partir da atuação da pequena quantidade de trombina formada na fase de iniciação sobre as plaquetas.

A trombina se liga aos seus receptores nas plaquetas e altera a permeabilidade das mesmas e permite, assim, o influxo de íons de cálcio e o efluxo de substâncias quimiotáticas e FVa. A trombina também irá efetuar a ativação do FVIII e dos fatores V plaquetários e plasmáticos ligados à plaqueta. A ativação do FVIII favorece sua dissociação do FvW, para que assim, fique com seu sítio ativo livre e forme um novo complexo na fase de propagação (SILVA; MELO, 2016; FLORES et al., 2015).

#### 2.1.2.2.3 Fase de propagação

Essa fase é responsável pelo recrutamento de um grande número de plaquetas para o sítio da lesão e pela produção dos complexos tenase e protrombinase na superfície das plaquetas ativadas. Durante essa fase, o FIXa e o FVIIIa formam um complexo tenase na superfície das plaquetas que ativa uma maior quantidade de FX. O FXa forma um complexo protrombinase ao se ligar ao FVa. Esse complexo protrombinase é responsável por produzir uma grande quantidade de trombina. A trombina cliva o fibrinogênio em fibrina, o que resulta na estabilização do tampão plaquetário inicial (SILVA; MELO, 2016; FLORES et al., 2015).

#### 2.1.2.2.4 Fase de finalização

Após a formação do coágulo de fibrina sobre a área lesionada, este deve ser autolimitado, a fim de evitar sua propagação exacerbada e resultar na oclusão do vaso por trombo. Para isso, quatro anticoagulantes naturais atuam nesta fase, o inibidor da via do fator tecidual (TFPI), a proteína C (PC), a proteína S (PS) e a antitrombina (AT) (FERREIRA et al., 2010; FLORES et al., 2015).

O TFPI é secretado pelo endotélio e forma um complexo juntamente com o FT, o FVIIa e o FXa, ele é capaz de inativar os fatores ativados e pausar a coagulação. A PC e a PS possuem a capacidade de inativar os cofatores procoagulantes FVa e FVIIIa. A PC é ativada pela trombina que está ligada à proteína transmembrânica trombomodulina na superfície das células endoteliais intactas. A atividade da PC é aumentada por outro cofator inibidor que circula em sua forma livre no plasma humano, a PS (FERREIRA et al., 2010; FLORES et al., 2015).

A AT inibe a atividade da trombina e outras serino proteases como FIXa, FXa, FXIa e FXIIa. As células endoteliais produzem muitos glicosaminoglicanos, que servem como

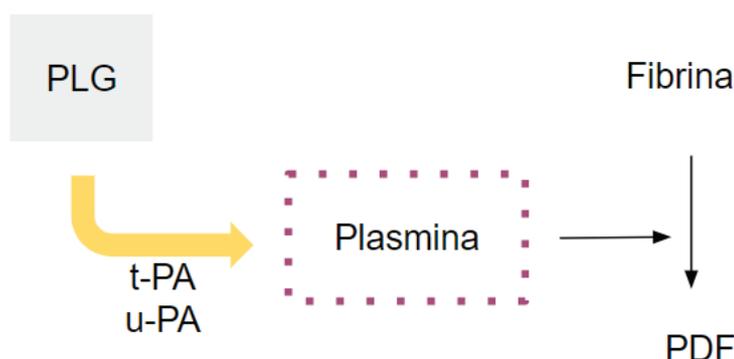
sítios de ligação de alta afinidade para a AT, e são cruciais para a inativação da trombina (FERREIRA et al., 2010; FLORES et al., 2015).

### 2.1.3 Fibrinólise

Após a completa restauração do vaso lesionado, o tampão hemostático não é mais necessário e inicia-se a fibrinólise, processo de dissolução do coágulo de fibrina que tem como objetivo evitar a formação de trombos indevidos, limitar o crescimento exacerbado de um trombo desejado e reestabelecer o fluxo sanguíneo normal. A estrutura do coágulo, as isoformas e polimorfismos de fibrinogênio, a taxa de geração de trombina e a reatividade de células associadas a trombos irão exercer grande influência sobre a eficiência dessa fase (REZENDE, 2013).

A fibrinólise inicia-se com a ativação do plasminogênio (PLG) e sua conversão em plasmina. O PLG circulante no sangue é aderido ao coágulo formado e, por meio do ativador de plasminogênio do tipo tecidual (tPA) e do ativador de plasminogênio do tipo urocinase (uPA), é convertido em plasmina (Figura 3). A plasmina é responsável por degradar o polímero de fibrina e, conseqüentemente, o coágulo em produtos de degradação da fibrina, dentre eles o dímero-D, que é um parâmetro laboratorial usado para o diagnóstico da trombose (RODRIGUES; CASTILHO-FERNANDES; FONTES, 2012; ZAGO; FALCÃO; PASQUINI, 2013).

Figura 3 – Fibrinólise.



PLG – plasminogênio; tPA - ativador de plasminogênio do tipo tecidual; uPA - ativador de plasminogênio do tipo urocinase; PDF - produtos de degradação da fibrina/fibrinogênio. Fonte: O autor.

## 2.2 PLANTAS MEDICINAIS

Estudos anteriores realizados pelo nosso grupo de pesquisa demonstraram que o extrato bruto do fruto de bacuri (*Platonia insignis* – EEBF) possuía promissor efeito antiagregante (GKIONIS, 2020). Por isso, levantou-se a hipótese de que o extrato bruto de sementes de bacuri (EEBS) também poderia apresentar atividade semelhante. Para verificar essa hipótese, no presente estudo, realizou-se uma triagem para determinar se o extrato EEBS era capaz de inibir a agregação plaquetária induzida por ADP e/ou epinefrina quando ele era utilizado em elevada concentração.

Adicionalmente, os estudos anteriores do grupo de pesquisa demonstraram que extratos brutos de laranja (*Citrus sinensis*; EELa1 e EELa2), de semente de lichia (*Litchi chinensis*; EELi), de fruto de bacuri (*Platonia insignis*; EEBF) e de caule de rambutan (*Nephelium lappaceum*; EER) apresentavam promissora atividade antiagregante (GKIONIS, 2020) e, por isso, deu-se continuidade aos estudos com esses extratos para determinação de suas  $CI_{50}$ .

### 2.2.1 Laranjeira

*Citrus sinensis* (Figura 4), popularmente conhecida como laranjeira, é uma árvore frutífera nativa da Ásia. Atualmente, é possível encontrar a árvore espalhada em várias regiões do mundo, principalmente em países tropicais. Devido ao seu valor nutritivo e importância econômica, este arbusto é responsável por cerca de 70% da produção anual total de espécies cítricas. A árvore possui altura média em torno de 10 metros, folhas persistentes e alternadas com pecíolos estreitos (emitem odor cítrico característico), flores axilares com cerca de 5 cm de largura e apresenta grande quantidade de espinhos. O fruto é esférico ou oval, é constituído por duas regiões, o pericarpo (casca) e o endocarpo (polpa) que é macio, contém feixes vasculares e vários segmentos com suco. A cor laranja ou amarela, indica quando o fruto está maduro (KAMMOUNA; ALTYARB; GAD, 2021; FENG et al., 2021; FAVELA-HERNÁNDEZ et al., 2016).

Figura 4 – Árvore frutífera *Citrus sinensis*.



Fonte: SÍTIO DA MATA BAMBUS, 2022.

*C. sinensis* é uma famosa fonte de vitamina C, que é um micronutriente essencial para o ser humano, um poderoso antioxidante natural que contribui com o sistema imunológico do corpo, pois auxilia várias funções celulares do sistema imunológico inato e adaptativo (ETEBU; NWAUZOMA, 2014; CARR; MAGGINI, 2017). Popularmente, sua utilização é feita para tratar doenças como constipação, cólicas, diarreia, bronquite, tuberculose, tosse, resfriado, obesidade, distúrbio menstrual, angina, hipertensão, ansiedade, depressão e estresse, além de conhecidas propriedades cicatrizantes (MILIND; CHATURVEDE, 2014).

### 2.2.2 Lichia

*Litchi chinensis* (lichia) é uma árvore frutífera originária da China, se desenvolve em climas tropicais e subtropicais com invernos frios e secos e verões quentes e úmidos. Possui afinidade com locais de baixa altitude, ricos em irrigação, e com temperatura na faixa de 20 a 35°C (ZHAO et al., 2020; SILVA et al., 2018). Atualmente, é amplamente cultivada em mais de 20 países em todo o mundo. Seus frutos são esféricos ou ovalados, possuem entre 2,5 a 4,0 cm de comprimento, pesam de 12 a 25 g e são produzidos em pencas (ZHAO et al., 2020; SILVA et al., 2018).

As frutas da lichia (Figura 5) são utilizadas principalmente como fonte nutricional, mas também possuem grande escala na medicina tradicional chinesa, onde é usada há muito

tempo para tratar úlceras, feridas abertas, diabetes, tosse, diarreia e vermes intestinais (ZHAO et al., 2020).

Figura 5 – Frutas da lichia (*Litchi chinensis*).



Fonte: MALCOLM MANNERS, 2018.

### 2.2.3 Bacuri

*Platonia insignis*, popularmente conhecido como bacuzeiro (Figura 6), é uma grande planta arbórea de clima tropical, tipicamente encontrada nos estados do Pará, Maranhão, Piauí, Goiás e Mato Grosso, e em vários países da América do Sul (CARVALHO; VASCONCELOS, 2021). A árvore possui grande importância econômica, possui alta comercialização da sua madeira maciça, seus frutos comestíveis (utilizados na fabricação de sucos, sorvetes, cremes, doces e geleias) e alguns produtos derivados utilizados pela indústria farmacêutica e de cosméticos. Ao analisar o peso do fruto, é possível verificar que casca representa cerca de 65% do seu peso, as sementes representam cerca de 20% e a polpa representa cerca de 15% do peso do fruto. A medicina popular faz uso da manteiga de semente de bacuri para o tratamento de feridas, diarreias, problemas de pele, dores de ouvido, picadas de aranha e cobra, reumatismo e artrite (SOEIRO; VERGOTEN; BAILLY, 2022; LINDOSO et al., 2022).

Figura 6 – *Platonia insignis*.



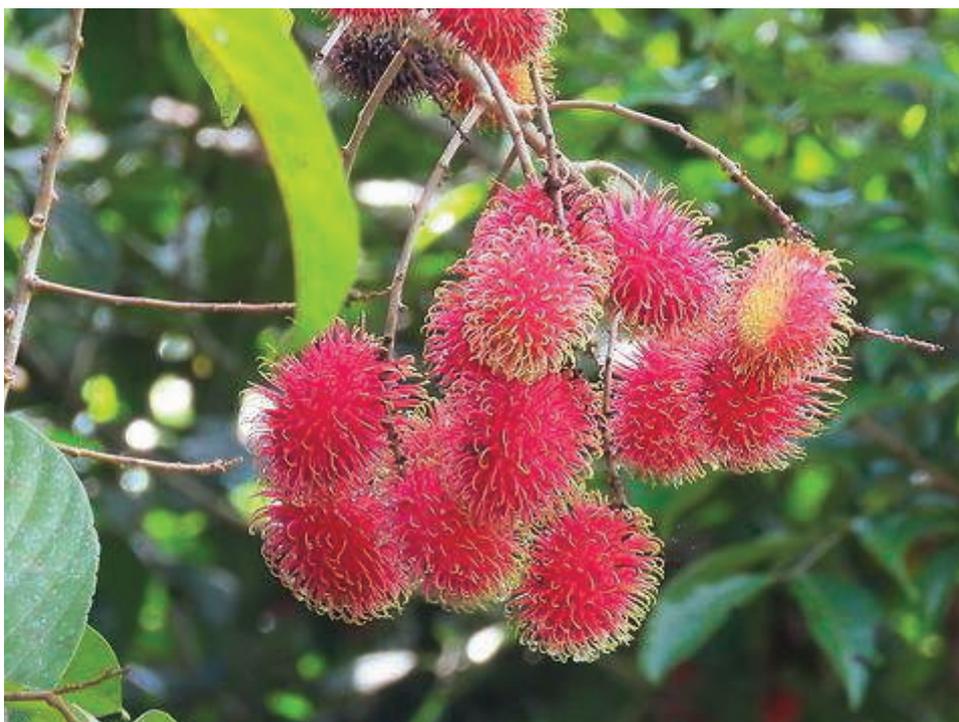
Fonte: ACERVO ISPN, 2021.

#### 2.2.4 Rambutan

*Nephelium lappaceum*, conhecido popularmente como rambutan, é uma fruta exótica com origem asiática e incidência em áreas tropicais, com destaque no México, o principal produtor e exportador de rambutan do mundo (HERNÁNDEZ-HERNÁNDEZ et al., 2019). O rambutan tem se destacado por suas propriedades nutricionais e funcionais, além de ter grande importância comercial, devido ao seu fruto possuir compostos bioativos (a casca do fruto possui compostos fitoquímicos que demonstram efeitos antioxidantes, antimicrobianos, antidiabéticos, antivirais, anti-inflamatórios, anti-hipoglicêmicos e antiproliferativos em testes *in vitro* e *in vivo*) que são de grande interesse das indústrias alimentícia, cosmética e farmacêutica (HERNÁNDEZ-HERNÁNDEZ et al., 2019; JAHURUL et al., 2020).

Popularmente o chá de rambutan (Figura 7) é utilizado como cicatrizante, além de tratar febre, dor de cabeça, diarreia, disenteria, aftas, sarna, coceira e até mesmo no tratamento de parasitos (TSONG; GOH; GANSAU; HOW, 2021). No entanto, atualmente, ainda existem poucas informações sobre características anatômicas e morfológicas da planta (REYES-MORENO; GARCÍA-VILLANUEVA; REYES-MORENO; AGUILAR-LUNA, 2021).

Figura 7 – *Nephelium lappaceum*.



Fonte: ALBERT KANG, 2022.

### 3 OBJETIVO

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito de extratos brutos etanólicos de *Citrus sinensis*, *Litchi chinensis*, *Nephelium lappaceum* e *Platonia insignis* sobre agregação plaquetária.

#### 3.2 OBJETIVO ESPECÍFICO

- Triar o efeito do extrato bruto da semente de bacuri (*Platonia insignis*) sobre a agregação plaquetária induzida por ADP e epinefrina;
- Determinar a concentração inibitória 50% (CI<sub>50</sub>) para agregação plaquetária de cinco extratos brutos - laranja (*Citrus sinensis*); semente de lichia (*Litchi chinensis*); bacuri (fruta) (*Platonia insignis*) e caule de rambutan (*Nephelium lappaceum*) - previamente triados pelo grupo de pesquisa.

## 4 METODOLOGIA

### 4.1 SELEÇÃO DE PARTICIPANTES E COLETA DA AMOSTRA

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa em Seres Humanos da Universidade Federal de Santa Catarina (CAAE N° 12353019.0.0000.0121 – Anexo A). Foram incluídas no estudo amostras de indivíduos clinicamente saudáveis com idade superior a 18 anos, que procuraram a Unidade de Laboratório de Análises Clínicas do Hospital Universitário Professor Polydoro Ernani de São Thiago – HU/UFSC/EBSERH para realizar exames laboratoriais, que não tinham utilizado antiagregantes, anticoagulantes ou anti-inflamatórios não esteroides nos 10 dias anteriores e que não tinham histórico de doença hepática. Aos participantes foram explicados os princípios, critérios de inclusão, riscos e benefícios de participar da pesquisa; após o voluntário concordar com o desenvolvimento do estudo, foi solicitada a assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE). Após a assinatura do TCLE, as amostras utilizadas para a realização dos ensaios foram coletadas em tubos de coleta a vácuo que continham citrato de sódio 3,2% (v/v) em uma proporção de um volume de anticoagulante para nove volumes de sangue total. Para cada experimento, amostras de no mínimo três voluntários foram utilizadas.

### 4.2 COMPOSTOS NATURAIS

Os extratos brutos etanólicos provenientes de diferentes plantas ou partes de plantas (laranja (*Citrus sinensis*); semente de lichia (*Litchi chinensis*); bacuri (fruta) (*Platonia insignis*); caule de rambutan (*Nephelium lappaceum*) e semente de bacuri (*Platonia insignis*)) foram gentilmente cedidos pelo Prof. Dr. Louis P. Sandjo do Laboratório de Química de Produtos Naturais da Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC. Na Tabela 1, estão apresentados os extratos avaliados no presente estudo com as suas codificações e origens.

Tabela 1 – Codificação de extratos testados avaliados no estudo.

Codificação	Origem
EELa1	Extrato etanólico de laranja ( <i>Citrus sinensis</i> ). Coleta: 22/11/2017
EELa2	Extrato etanólico de laranja ( <i>Citrus sinensis</i> ). Coleta: 16/12/2017
EELi	Extrato etanólico da semente de lichia ( <i>Litchi chinensis</i> )
EER	Extrato etanólico de rambutan (caule) ( <i>Nephelium lappaceum</i> )
EEBF	Extrato etanólico de bacuri (fruta) ( <i>Platonia insignis</i> )
EEBS	Extrato etanólico de bacuri (semente) ( <i>Platonia insignis</i> )

Fonte: O autor.

Todos os extratos brutos foram dissolvidos em dimetilsulfóxido (DMSO) na concentração estoque de 160.000 µg/mL e armazenados em geladeira a 2-8 °C. Para a realização dos experimentos, as soluções estoque foram diluídas em água destilada no mesmo dia de cada experimento. Independentemente do ensaio, foi realizado um experimento controle negativo em paralelo pela adição de DMSO 0,5% (v/v; concentração final) ao invés dos extratos.

#### 4.3 AVALIAÇÃO DO EFEITO DOS EXTRATOS SOBRE A AGREGAÇÃO PLAQUETÁRIA

Os ensaios de agregação plaquetária foram executados de acordo com o descrito por Born e Cross (1963), e utilizou-se um agregômetro semi-automatizado (AgreGO, Qualitem).

Para a obtenção do *pool* de plasma rico em plaquetas (PRP), as amostras de sangue total foram centrifugadas a 123 g por 10 minutos em temperatura ambiente. O sobrenadante obtido foi transferido para um tubo tipo Falcon de 15 mL.

Para a realização dos ensaios de agregação, foi necessário que o *pool* de PRP estivesse em uma concentração aproximada de 250.000 plaquetas/mm<sup>3</sup>. Dessa forma, antes de realizar os experimentos, as plaquetas do *pool* PRP foram enumeradas e sua concentração foi ajustada. Para tanto, após a obtenção do *pool* de PRP, 50 µL do *pool* foram diluídos em 950 µL de oxalato de amônia 1% e a mistura foi incubada por 5 minutos. Após o tempo de incubação, foi realizada a contagem de plaquetas em câmara de Neubauer e a concentração de plaquetas foi ajustada com tampão fosfato-salino (PBS).

Para avaliar o efeito dos extratos brutos sobre a agregação plaquetária, 400  $\mu\text{L}$  do *pool* de PRP foram incubados a  $37^\circ\text{C}$  por 5 minutos com os extratos brutos individualmente na concentração de 800  $\mu\text{g/mL}$ . Posteriormente, as amostras foram estimuladas individualmente com ADP (10  $\mu\text{M}$  concentração final; Sigma-Aldrich<sup>®</sup>, St. Louis, EUA) ou epinefrina (5  $\mu\text{g/mL}$  concentração final; Hipolabor, Minas Gerais, BR), e a agregação foi acompanhada continuamente por 5 minutos através do software AgreGo. Para acertar a linha de base de turbidez da amostra, foi utilizado o *pool* plasma pobre em plaquetas (PPP) obtido por meio da centrifugação das amostras de sangue citratado a 1.107 g por 15 minutos à temperatura de  $8^\circ\text{C}$ . Todos os experimentos foram realizados em triplicata e dentro de um período de três horas após a coleta da amostra.

#### 4.4 DETERMINAÇÃO DE $\text{CI}_{50}$ DOS EXTRATOS BRUTOS

Para a determinação da  $\text{CI}_{50}$ , foram realizadas diluições seriadas dos extratos brutos na razão de dois com o uso de água destilada como diluente. Após realizar as diluições, 400  $\mu\text{L}$  do *pool* de PRP foram incubados a  $37^\circ\text{C}$  por 5 minutos com os extratos nas diferentes concentrações (400, 200, 100 e 50  $\mu\text{g/mL}$ ). Posteriormente, as plaquetas foram estimuladas e a agregação foi acompanhada conforme descrito no item 4.3. As  $\text{CI}_{50}$  de todos os extratos foram calculadas a partir das curvas concentração-resposta obtidas para cada agonista e foi utilizado o software GraphPad Prism<sup>®</sup>. Todos os ensaios foram realizados em triplicata e dentro de um período de três horas após a coleta da amostra.

#### 4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

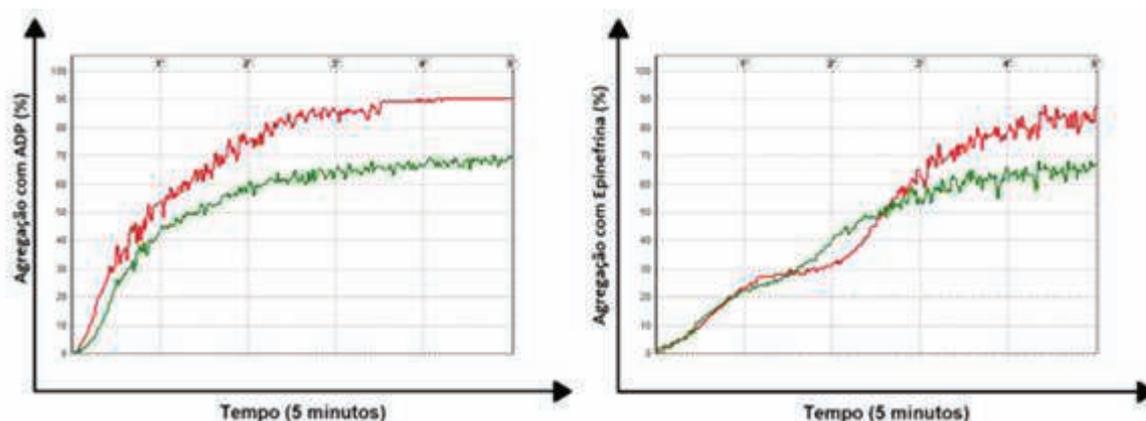
O banco de dados e a análise estatística foram realizados com o auxílio do software MedCalc<sup>®</sup>. Para a construção das figuras e cálculo das  $\text{CI}_{50}$ , foi utilizado o software GraphPad Prism<sup>®</sup>. Os dados foram expressos como média e desvio-padrão (DP). As médias das variáveis numéricas foram comparadas entre os grupos de interesse por meio do teste análise de variância de uma via (ANOVA) seguido pelo pós-teste de Bonferroni. Foi considerado significativo um valor de P menor ou igual a 0,05.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 TRIAGEM DO EFEITO DO EXTRATO BRUTO DA SEMENTE DE BACURI (*Platonia insignis*) SOBRE A AGREGAÇÃO PLAQUETÁRIA

Estudos anteriores realizados pelo nosso grupo de pesquisa demonstraram que o extrato bruto do fruto de bacuri (*Platonia insignis* – EEBF) possuía promissor efeito antiagregante (GKIONIS, 2020). Por isso, levantou-se a hipótese de que o extrato bruto de sementes de bacuri (EEBS) também poderia apresentar atividade semelhante. Para verificar essa hipótese, realizou-se uma triagem para determinar se o extrato EEBS era capaz de inibir a agregação plaquetária induzida por ADP e epinefrina quando ele era utilizado em elevada concentração. Na Figura 8, é possível observar que EEBS inibiu significativamente a agregação plaquetária induzida pelos dois agonistas, com agregação média de  $71,0 \pm 3,5\%$  (controle =  $85,0 \pm 8,7\%$ ) para o ADP e agregação média de  $69,0 \pm 1,5\%$  (controle =  $80,0 \pm 4,5\%$ ) para a epinefrina ( $P \leq 0,05$ ).

Figura 8 – Efeito do extrato da semente de bacuri (EEBS) sobre a agregação plaquetária induzida por ADP e epinefrina.



Curva vermelha – controle DMSO 0,5%.; Curva verde - efeito do extrato da semente de bacuri (EEBS); ADP - difosfato de adenosina (10  $\mu$ M); Epinefrina (5  $\mu$ g/mL). As amostras foram incubadas durante 5 minutos com os extratos (800  $\mu$ g/mL). Imagens ilustrativas de um experimento de três. Fonte: O autor.

Estudos apontam que os metabólitos secundários, compostos bioativos produzidos por plantas (por exemplo, flavonoides e alcaloides), exercem diversas atividades medicinais, dentre elas, ação cardioprotetora, principalmente devido a suas atividades antioxidante, antihipercolesterolêmica, antiangiogênica, anti-isquêmica, anti-inflamatória e/ou

antitrombótica (FAGGIO, 2017; VALLANCE et al., 2019; ULLAH et al., 2020). Dessa forma, credita-se à presença desses constituintes fitoquímicos bioativos nas diferentes partes das plantas o valor medicinal e as atividades biológicas que elas apresentam, por isso, o interesse nestes compostos tem sido crescente nos últimos anos. Dentre os principais metabólitos secundários bioativos, estão os flavonoides, que são amplamente aceitos como agentes terapêuticos e alguns já são empregados comercialmente como a arnica, para o tratamento de inflamações, e a hesperidina, para o tratamento de varizes (CERQUEIRA, 2015; BERNARDINI et al., 2018). Os flavonoides consistem, principalmente, de um anel de benzopirona que contém grupos fenólicos ou polifenólicos em diferentes posições. Até o ano de 2020, mais de 10.000 compostos flavonoides foram isolados e identificados (ULLAH et al., 2020).

Os efeitos dos metabólitos secundários dependem do tipo de composto e da biodisponibilidade do mesmo e, apesar de serem comumente encontrados em frutas, caules, folhas, flores e sementes, as suas concentrações em cada parte da planta podem variar amplamente, o que faz com que nem todas as partes de uma mesma planta tenham o mesmo potencial medicinal (DAVISON; BRIMBLE, 2019). Nesse contexto, é possível sugerir que a significativa atividade antiagregante apresentada pelo extrato de sementes de bacuri (EEBS) esteja relacionada à presença de metabólitos secundários bioativos. Estudos reportaram que o bacuri pode conter em sua composição fitoquímica kaempferol, quercetina e catequina (ROCHA, 2017; PINHEIRO, 2020), metabólitos reconhecidos por sua atividade antiagregante (DIANITA; JANTAN, 2019). Interessantemente, os resultados obtidos no presente estudo para o extrato de sementes de bacuri (EEBS) foram inferiores dos encontrados por Gkionis (2020) para o extrato de fruto, em que a agregação média para ADP e epinefrina foram de  $4,3 \pm 3,3\%$  e  $8,0 \pm 4,1\%$ , respectivamente (GKIONIS, 2020). Diante desses dados, pode-se sugerir que os metabólitos responsáveis pela atividade antiagregante do bacuri estão presentes em maiores concentrações no fruto do que na semente. Em consonância com esses resultados, um estudo aponta que os frutos são a parte da planta onde se concentram a maior quantidade compostos bioativos capazes de trazerem benefícios à saúde humana (COSTA et al., 2016).

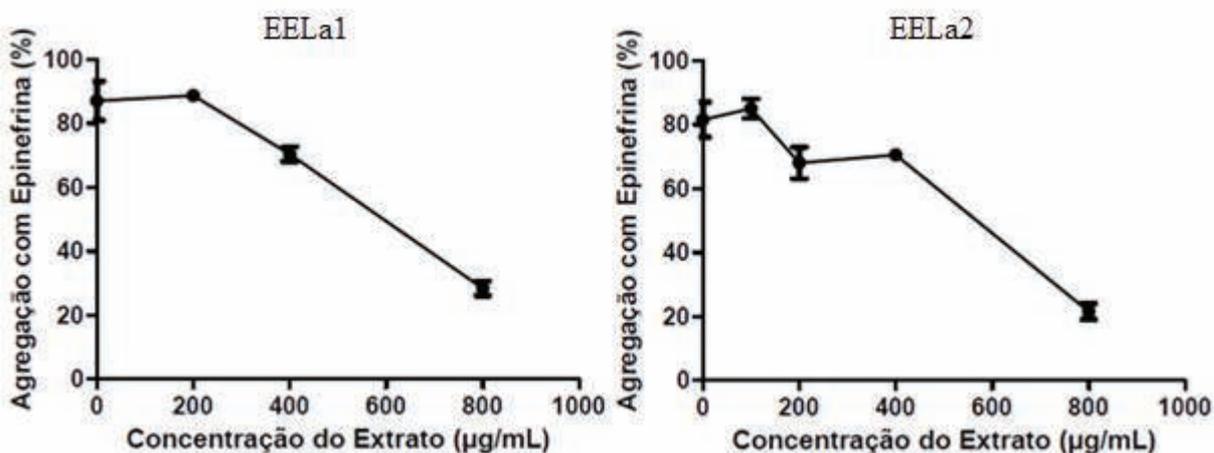
Apesar do EEBS ter inibido significativamente a agregação plaquetária, as porcentagens de agregação médias do EEBS foram superiores a 50% e foram, portanto, consideradas atividades antiagregantes não promissoras. Essa definição é baseada no fato de que extratos que não são capazes de inibir a agregação em 50% já em alta dose teriam uma

CI<sub>50</sub> muito elevada, o que dificultaria a realização de mais estudos, tanto *in vitro* quanto *in vivo*. Devido a isso, não foram realizadas mais investigações com esse extrato.

## 5.2 DETERMINAÇÃO DA CI<sub>50</sub> DOS EXTRATOS BRUTOS

Como mencionado, estudos anteriores realizados pelo nosso grupo de pesquisa demonstraram que extratos brutos de laranja (*Citrus sinensis*; EELa1 e EELa2), de semente de lichia (*Litchi chinensis*; EELi), de fruto de bacuri (*Platonia insignis*; EEBF) e de caule de rambutan (*Nephelium lappaceum*; EER) apresentavam promissora atividade antiagregante (GKIONIS, 2020) e, por isso, deu-se continuidade aos estudos com esses extratos para determinação de suas CI<sub>50</sub>. Como os extratos de laranja inibiram de forma promissora apenas a agregação estimulada por epinefrina (GKIONIS, 2020), a CI<sub>50</sub> foi estipulada apenas para esse agonista. Na Figura 9, estão apresentadas as curvas concentração-resposta dos extratos de laranja (EELa1 e EELa2).

Figura 9 – Curvas concentração-resposta dos extratos de laranja (EELa1 e EELa2).



EELa1 - Curva de agregação concentração-dependente induzida por epinefrina em função do extrato bruto de laranja - coleta: 22/11/2017. EELa2 - Curva de agregação concentração-dependente induzida por epinefrina em função do extrato bruto de laranja - coleta: 16/12/2017. Epinefrina (5 µg/mL); (N=3). Fonte: O autor.

A partir das curvas concentração-resposta, foi possível calcular as CI<sub>50</sub> dos extratos de laranja (EELa1 e EELa2), conforme apresentado na Tabela 2.

Tabela 2 –  $CI_{50}$  calculada do efeito dos extratos de laranja (EELa1 e EELa2) sobre a agregação plaquetária induzida por epinefrina.

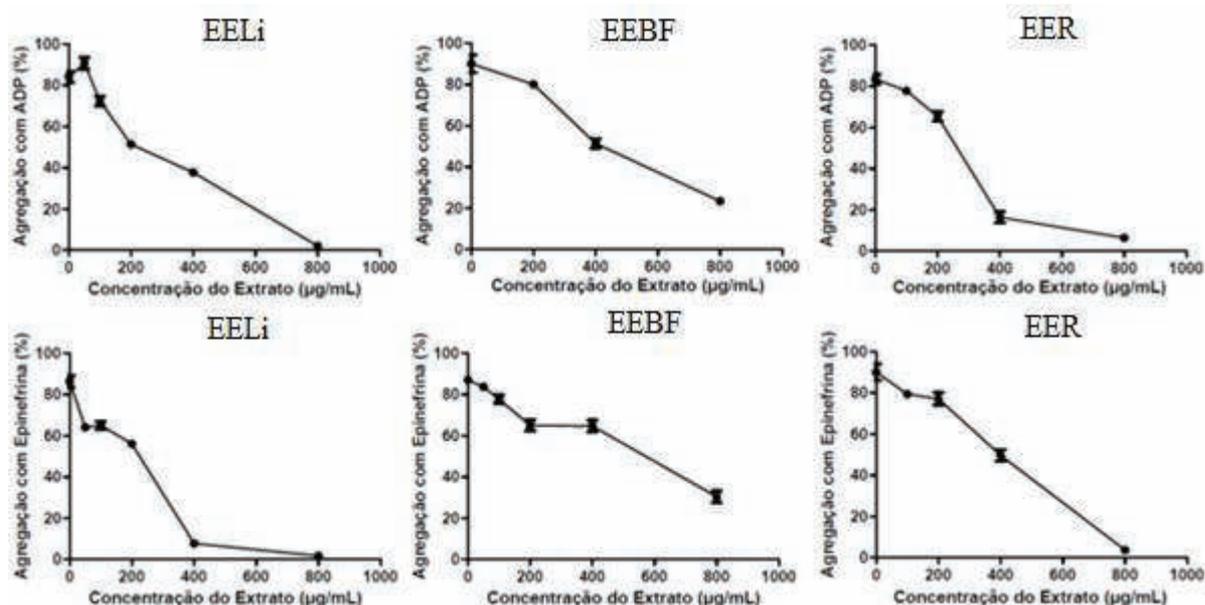
$CI_{50}$	Tratamento	
	EELa1	EELa2
<b>Média ± ERM (<math>\mu\text{g/mL}</math>)</b>	654,0 ± 21,0	482,2 ± 24,6

EELa1 - Extrato etanólico de laranja, coleta: 22/11/2017. EELa2 - Extrato etanólico de laranja, coleta: 16/12/2017.  $CI_{50}$  – concentração inibitória de 50%. ERM - erro padrão da média. Os dados foram expressos como média ± ERM. Epinefrina (5  $\mu\text{g/mL}$ ); (N=3). Fonte: O autor.

Como pode ser visto, os dois extratos apresentaram atividade dependente da concentração, mas com  $CI_{50}$  diferentes entre si, o EELa2 apresentou resultados mais promissores do que o EELa1. Pelo fato de que ambos os extratos são advindos de laranjas da mesma laranjeira, sugere-se que as condições de colheita ou extração exerceram influência sobre a preservação do teor dos constituintes vegetais bioativos presentes nos extratos. Outro fator de possível influência seria a época de colheita, em vista que a idade da planta, a época do ano e as condições climáticas podem influenciar na concentração de alguns metabólitos secundários (GOBBO-NETO et al., 2017).

Diferentemente dos extratos de laranja, os extratos de semente de lichia, de fruto de bacuri e de caule de rambutan inibiram de forma promissora a agregação estimulada por ADP e epinefrina em estudo anterior (GKIONIS, 2020), portanto, a  $CI_{50}$  foi estipulada para ambos agonistas. Na Figura 10, estão apresentadas as curvas concentração-resposta dos extratos de semente de lichia (EELi), de fruto de bacuri (EEBF) e de caule de rambutan (EER).

Figura 10 – Curvas concentração-resposta dos extratos de semente de lichia (EELi), de fruto de bacuri (EEBF) e de caule de rambutan (EER) sobre a agregação plaquetária induzida por ADP e epinefrina.



EELi - Curva de agregação concentração-dependente induzida por epinefrina ou ADP em função do extrato de lichia. EEBF - Curva de agregação concentração-dependente induzida por epinefrina ou ADP em função do extrato de bacuri. EER - Curva de agregação concentração-dependente induzida por epinefrina ou ADP em função do extrato de rambutan. ADP - difosfato de adenosina (10 µM); Epinefrina (5 µg/mL); (N=3). Fonte: O autor.

A partir das curvas concentração-resposta, foi possível calcular as  $CI_{50}$  de EELi, EEBF e EER para ADP e epinefrina, conforme apresentado na Tabela 3

Tabela 3 -  $CI_{50}$  calculada do efeito dos extratos EELi, EEBF e EER sobre a agregação plaquetária induzida por ADP e epinefrina.

Tratamento	ADP	Epinefrina
	Média ± ERM (µg/mL)	Média ± ERM (µg/mL)
<b>EELi</b>	211,8 ± 5,1	128,8 ± 8,6
<b>EEBF</b>	529,4 ± 172,2	438,6 ± 7,1
<b>EER</b>	202,9 ± 7,9	326,3 ± 11,9

$CI_{50}$  – concentração inibitória de 50%. ERM - erro padrão da média. Os dados foram expressos como média ± ERM. ADP - difosfato de adenosina (10 µM); Epinefrina (5 µg/mL); (N=3). Fonte: O autor.

Todos os extratos apresentaram atividade dependente da concentração e  $CI_{50}$  diferentes. O EELi apresentou os resultados mais promissores com o menor conjunto de  $CI_{50}$ . O extrato EER apresentou uma  $CI_{50}$  para ADP próxima ao do EELi, no entanto, a  $CI_{50}$  para

epinefrina foi maior que o dobro. Quando as  $CI_{50}$  para epinefrina e ADP de um mesmo extrato são comparadas entre si, percebe-se que as concentrações foram relativamente próximas entre si, sugere-se que os extratos atuem em mecanismos e vias de ativação plaquetária que são igualmente ativadas por ADP e epinefrina.

Apesar do ADP e da epinefrina serem capazes de ativar as plaquetas, as vias metabólicas que são desencadeadas por eles para que isso ocorra não são exatamente as mesmas, uma vez que eles se ligam a diferentes receptores de membrana. A membrana da plaqueta possui diversas glicoproteínas essenciais que servem como receptores capazes de desencadear a ativação plaquetária, processo fundamental para que ocorra a agregação plaquetária (AMELIRAD et al, 2019). Atualmente, entende-se que, para uma completa ativação plaquetária e formação de um agregado estável, é necessário que sejam ativados receptores acoplados tanto à proteína Gq quanto à Gi. No caso do ADP, uma coativação dos receptores P2Y12 e P2Y1 é necessária para que isso aconteça e a plaqueta seja completamente ativada. O receptor P2Y1, acoplado à proteína Gq, promove uma agregação inicial que é reforçada pela ativação do receptor P2Y12 acoplado à proteína Gi (AMELIRAD et al., 2019; ESTEVEZ; DU, 2017). A epinefrina, por sua vez, consegue ativar o mediador Gi por meio de sua ligação com o receptor  $\alpha_2$ -adrenérgico, porém, seus receptores não são acoplados à proteína Gq. Portanto, para que a epinefrina gere uma agregação normal, ela depende dos processos de amplificação de sinal pró-agregantes, que consistem na secreção plaquetária de ADP e de tromboxano A2 (TxA2), agonistas capazes de ativar Gq. Por isso, a epinefrina é considerada um agonista fraco (CATTANEO, 2015; CIMMINO; GOLINO, 2014; DAWOOD et al., 2015), o que explicaria porque as  $CI_{50}$  para esse agonista foram, em geral, menores do que para o ADP.

De forma complementar, diante do exposto, é possível sugerir que os metabólitos presentes nos extratos inibiam preferencialmente as vias ativadas por Gi. Contudo, precisa-se considerar que os extratos são uma mistura heterogênea de metabólitos de suas plantas de origem e, portanto, é possível que esses extratos atuem de forma sinérgica sobre múltiplas vias de sinalização plaquetária. Por isso, é possível que as vias relacionadas com a proteína Gq também foram inibidas por alguns compostos, o que explicaria porque o EER apresentou uma  $CI_{50}$  para ADP melhor do que para epinefrina. Estudos com os compostos isolados a partir dos extratos são necessários para melhor determinar as vias de atuação dos mesmos.

Como já citado, um estudo recente mostrou o impacto positivo de alguns alimentos na saúde humana através da sua capacidade de reduzir o risco de doenças (COSTA et al.,

2016). Como exemplo desses efeitos benéficos, pode-se citar os frutos da laranja doce que possuem elevadas concentrações de flavonoides capazes de gerar uma proteção cardiovascular quando ingeridos (RAO et al., 2021). Nas frutas cítricas, os flavonoides são representados por duas classes de compostos: flavonas polimetoxiladas e flavanonas glicosiladas (ESCOBEDO-AVELLANEDA et al., 2014). Um estudo realizado em 2014 identificou dezenove compostos pertencentes a diferentes subclasses como flavonoides glicosilados, flavonas, flavanonas, flavonóis e polimetoxiflavonas, que são característicos da laranja doce e detectados em outras espécies de *Citrus spp.* Outro estudo envolveu frações de laranja doce e revelou que quatro flavonoides glicosilados, dentre eles eriocitrina, narirutina, hesperidina e didimina, foram detectados em todas as cascas e polpas de frutas avaliadas, além disso, espécies de flavonas também foram identificadas (LIU, 2018).

Atividades medicinais, como a capacidade de inibir a agregação plaquetária, foram relacionadas a flavonoides contidos na laranja doce e outras espécies do gênero *Citrus spp.* desde 1997. Acredita-se que esta atividade esteja relacionada a presença majoritária de hesperidina e naringina (ASSEFA et al., 2016; DOSOKY; BENAVENTE-GARCIA et al., 1997; SETZER, 2018). Possivelmente, a atividade antiagregante dos extratos de laranja (EELa1 e EELa2) avaliados no presente estudo é decorrente da presença desses flavonoides.

A espécie *L. chinensis*, pertencente à família Sapindaceae, é uma árvore frutífera de clima quente originária do sul da China e cultivada em áreas semitropicais do mundo (SILVA et al., 2018). As sementes de lichia são utilizadas na fitoterapia tradicional chinesa como analgésico capaz de aliviar a tosse, gastralgia, neuralgia, orquite, cólica e varíola (ZHAO et al., 2020). Na Índia, a utilização medicinal é feita através da pulverização das sementes em pessoas com problemas intestinais (HUANG et al., 2014). Alguns estudos identificaram que componentes da semente de lichia têm potencial cardioprotetor devido a efeitos antioxidantes, modulação da glicemia e diminuição da lipemia (ZHANG et al., 2015; XIAO et al., 2015). O rambutan, que é um fruto pertencente à mesma família da lichia, possui estudos que mostram a presença de flavonoides e outras substâncias fenólicas com atividade antioxidante no extrato metanólico da casca (ROHMAN et al., 2017). A família Sapindaceae é conhecida por sua abundante fonte de compostos fitoquímicos como diglicosídeo de malvidina, leucocianidina, glicosídeo de cianidina, saponinas, hidroxitolueno, butilado, isolariciresinol, kaempferol, rutina e estigmasterol em todas as partes das plantas (AKBAR, 2020). Alguns desses compostos, como o kaempferol, tem conhecida atividade antiagregante (DIANITA;

JANTAN, 2019) e, portanto, sua presença nos extratos de lichia (EELi) e rambutan (EER) pode estar relacionada com a atividade antiagregante encontrada no presente trabalho.

*P. insignis* é uma espécie frutífera da família Clusiaceae conhecida popularmente como bacurizeiro. Apresenta um fruto rico em constituintes químicos como a vitamina C (ácido ascórbico) e E (tocoferóis), ácidos graxos insaturados (oléico e linoléico), diterpenos, e benzofenonas preniladas (como a garcinialiptona - GFC), kaempferol, quercetina e catequina. Todos esses constituintes conferem ao fruto algumas propriedades medicinais já estudadas, como atividade antioxidante (*in vitro* e *in vivo*), leishmanicida, vasorrelaxante, antiepiléptica, potencial cicatrizante e antiagregante (ARCANJO et al., 2014; SILVA et al., 2016; CHOI et al., 2015; MOSAWY, 2015; MOSCHONA et al., 2017; ROLNIK et al., 2020; STRACK; VALLANCE et al., 2019; WANG et al., 2015). Da mesma forma, é provável que a capacidade de inibir a agregação do extrato de bacuri (EEBF) avaliado no presente trabalho esteja relacionada com a presença de algum ou alguns desses constituintes.

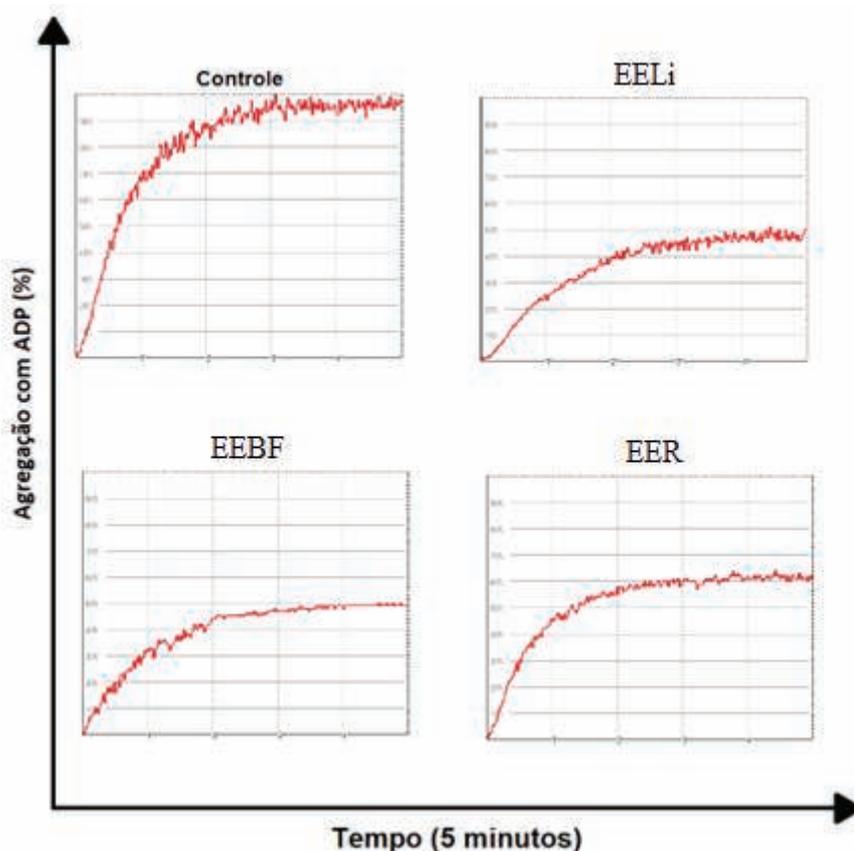
Como pode ser notado, vários tipos de metabólitos secundários podem ser responsáveis pelos efeitos observados no presente estudo. Dessa forma, ressalta-se que são necessários estudos de caracterização dos constituintes dos extratos brutos testados para confirmar se o efeito antiagregante observado é relacionado especificamente a algum desses metabólitos presentes nas plantas. Uma possibilidade é que a ação observada seja resultante de um efeito conjunto dos vários tipos de metabólitos presentes nos extratos.

### 5.3 EFEITO DOS EXTRATOS SOBRE O PERFIL DA CURVA DE AGREGAÇÃO PLAQUETÁRIA

A agregação plaquetária pode ser dividida em uma resposta bifásica, primeiramente, tem-se a agregação reversível que também pode ser chamada de primeira onda de agregação ou agregação primária. Esta fase de ativação plaquetária ocorre, exclusivamente, devido ao estímulo pró-agregante gerado pelo agonista adicionado ao PRP. Em seguida, ocorre uma agregação irreversível, que também pode ser chamada de segunda onda de agregação ou agregação secundária, esta é a fase de amplificação de sinal pró-agregante, que só ocorre caso as plaquetas, inicialmente ativadas pelo agonista, liberem o seu conteúdo granular rico em ADP e produzam TxA<sub>2</sub> (KOLTAI et al., 2017). Dessa maneira, um parâmetro que pode ser analisado para tentar entender a forma como o extrato atua sobre a agregação plaquetária é a análise do perfil da curva de agregação

Na Figura 11, estão apresentadas imagens ilustrativas das curvas de agregação geradas pelo tratamento do PRP com os extratos de lichia (EELi), de bacuri (EEBF) e de rambutan (EER) em concentrações próximas às suas  $CI_{50}$  quando o ADP foi utilizado como agonista. Ao avaliar as curvas de agregação da Figura 11, percebe-se que todos os extratos inibiram parcialmente a segunda onda de agregação quando o ADP foi empregado como agonista.

Figura 11 – Efeito dos extratos das plantas sobre a agregação plaquetária induzida por ADP em concentrações próximas às suas  $CI_{50}$ .

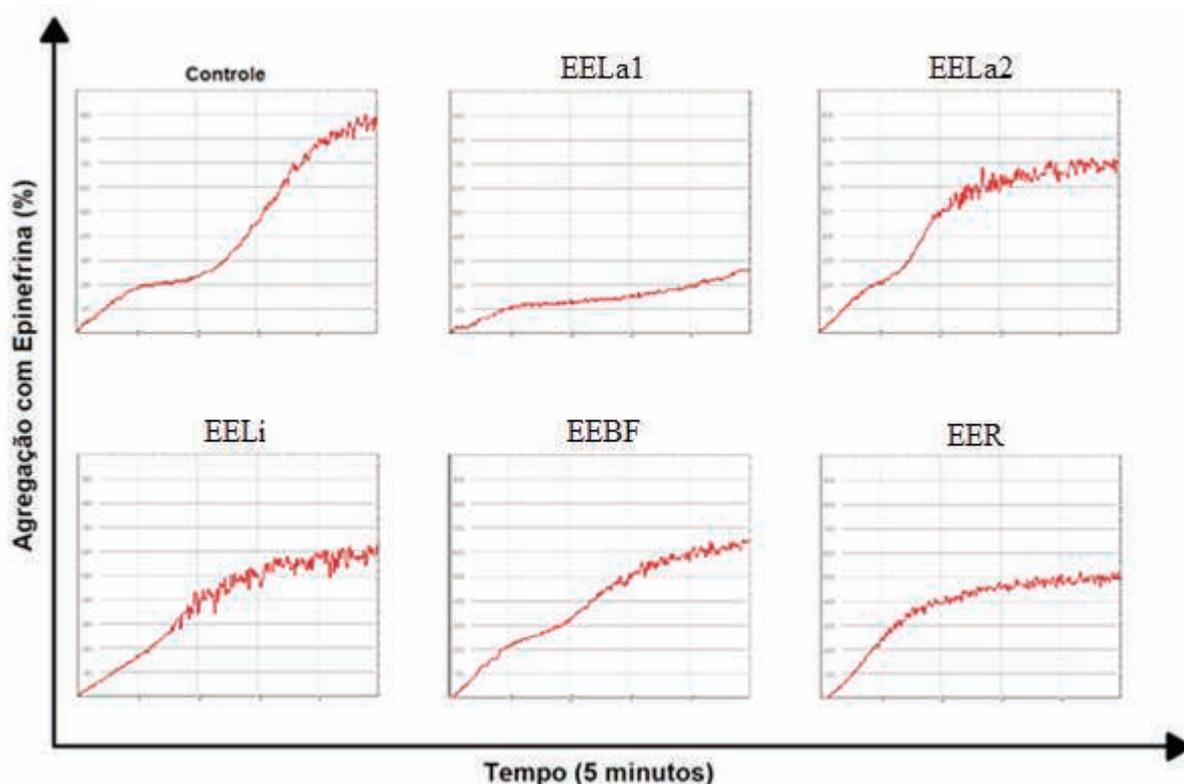


EELi - Efeito do extrato do extrato de lichia (200  $\mu\text{g/mL}$ ) sobre a agregação plaquetária induzida por ADP.  
 EEBF - Efeito do extrato do extrato de bacuri (400  $\mu\text{g/mL}$ ) sobre a agregação plaquetária induzida por ADP.  
 EER - Efeito do extrato do extrato de rambutan (200  $\mu\text{g/mL}$ ) sobre a agregação plaquetária induzida por ADP.  
 ADP - difosfato de adenosina (10  $\mu\text{M}$ ); Controle - DMSO 0,5%. As amostras foram incubadas durante 5 minutos. Imagens ilustrativas de um experimento de três. Fonte: O autor.

Na Figura 12, estão apresentadas imagens ilustrativas das curvas de agregação geradas pelos extratos de laranja (EELa1 e EELa2), de lichia (EELi), de bacuri (EEBF) e de rambutan (EER) quando as plaquetas foram estimuladas por epinefrina. Ao observar a Figura 12, é possível verificar que os extratos EELa2, EELi, EEBF e EER repetem o padrão de

inibição encontrado para o ADP, ou seja, eles inibem a segunda onda de agregação para a epinefrina. O extrato EELa1 apresentou um perfil de curva diferente dos demais, ele inibiu parcialmente a primeira e totalmente a segunda onda de agregação induzidas pela epinefrina.

Figura 12 – Efeito dos extratos das plantas sobre a agregação plaquetária induzida por epinefrina em concentrações próximas às suas  $CI_{50}$ .



EELa1 - Efeito do extrato do extrato de laranja (800  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) sobre a agregação plaquetária induzida por epinefrina. EELa2 - Efeito do extrato do extrato de laranja (400  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) sobre a agregação plaquetária induzida por epinefrina. EELi - Efeito do extrato do extrato de lichia (100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) sobre a agregação plaquetária induzida por epinefrina. EEBF - Efeito do extrato do extrato de bacuri (400  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) sobre a agregação plaquetária induzida por epinefrina. EER - Efeito do extrato do extrato de rambutan (400  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) sobre a agregação plaquetária induzida por epinefrina. Epinefrina (5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ); Controle - DMSO 0,5%. As amostras foram incubadas durante 5 minutos. Imagens ilustrativas de um experimento de três. Fonte: O autor.

Desta forma, a análise dos perfis das curvas sugere que o extrato EELa1 exerce uma atividade antiagregante ao inibir a transdução de sinal pró-agregante ocasionada pela ligação do agonista ao seu receptor. Por outro lado, o EELa2, EELi, EEBF e EER parecem exercer a sua ação pela inibição dos processos de amplificação de sinal, ou seja, pela inibição de secreção de ADP e/ou  $\text{TxA}_2$ . Em consonância com os resultados apresentados no presente trabalho, estudos que avaliaram o efeito antiagregante de flavonoides já demonstraram que esse tipo de metabólito secundário pode atuar tanto sobre mecanismos de transdução, quanto

sobre a amplificação de sinal (AL-SNAFI, 2015; EL HAOURI et al., 2016; ISMAIL IYNEM, 2018).

## 6 CONCLUSÃO

A partir dos resultados encontrados concluiu-se que:

- O extrato EEBS teve ação antiagregante significativa, porém considerada pouco promissora;
- A ação antiagregante dos extratos EELa1, EELa2, EELi, EEBF e EER foi considerada dependente da concentração utilizada;
- A compilação dos resultados de  $CI_{50}$  demonstrou que, com exceção do EER, todos os extratos avaliados inibem mais fortemente a agregação induzida por epinefrina;
- O extrato EELi apresentou o melhor conjunto de  $CI_{50}$  e foi, portanto, considerado o extrato com melhor potencial antiagregante;
- A análise das curvas de agregação sugere que o extrato EELa1 exerça sua atividade antiagregante pela inibição da transdução de sinal pró-agregante ocasionada pela ligação do agonista ao seu receptor. Enquanto os extratos EELa2, EELi, EEBF e EER parecem exercer a sua ação pela inibição dos processos de amplificação de sinal, ou seja, pela inibição de secreção de ADP e/ou TxA2.

## REFERÊNCIAS

- AKAY, O. M. The Double Hazard of Bleeding and Thrombosis in Hemostasis From a Clinical Point of View: A Global Assessment by Rotational Thromboelastometry (ROTEM). **Clinical and Applied Thrombosis/Hemostasis**, v. 24 n. 6, 2018.
- AKBAR, S. *Cardiospermum halicacabum L.* (Sapindaceae). **Handbook of 200 Medicinal Plants**. Springer, Cham. 2020.
- AL-SNAFI, A. E. Therapeutic properties of medicinal plants: a review of plants with hypolipidemic, hemostatic, fibrinolytic and anticoagulant effects (part 1). **Asian Journal of Pharmaceutical Science & Technology**, v. 5, n. 4, p. 271-284, 2015.
- AMELIRAD A. et al. Signaling Pathways of Receptors Involved in Platelet Activation and Shedding of These Receptors in Stored Platelets. **Adv Pharm Bull.** 9(1): 38-47. 2019.
- AMIROU A. et al. Effects of Juglans regia Root Bark Extract on Platelet Aggregation, Bleeding Time, and Plasmatic Coagulation: In Vitro and Ex Vivo Experiments. **Evidence-based Complementary And Alternative Medicine**, v. 2018, p.1-7, 2018.
- ARCANJO, D.D.R. et al. Garcinielliptone FC, a polyisoprenylated benzophenone from *Platonia insignis* Mart., promotes vasorelaxant effect on rat mesenteric artery. **Natural Product Research**, v. 28, n. 12, p. 923–927, 2014.
- ASSEFA A. D. et al. Antioxidant and antiplatelet activities of flavonoid-rich fractions of three citrus fruits from Korea. **3 Biotech** 6, 109 (2016).
- AUSTIN S. K. Haemostasis. **Medicine**, v. 45, n. 4, p. 204-208, 2017.
- BENAVENTE-GARCIA, O. et al. Uses and properties of Citrus flavonoids. **J. Agric. Food Chem.** 1997, 45, 4505-4515.
- BERNARDINI, S. et al. Natural products for human health: an historical overview of the drug discovery approaches. **Natural Product Research**, v. 32, n. 16, p. 1926–1950, 2018.
- CAGNOLATI D. et al. **Hemostasia e distúrbios da coagulação**. Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto -USP- Ribeirão Preto-SP. Faculdade de Medicina da USP. 2017.
- CARR, A. C; MAGGINI, S. Vitamin C and immune function. **Nutrients**, 2017 Nov 3;9 (11): 1211.
- CARVALHO J. E. U.; VASCONCELOS L. F. L. Bancos genéticos de bacuri. **A arca de Noé das frutas nativas brasileiras**, capítulo 7, 2021.
- CERQUEIRA. Flavonóides em medicamentos fitoterápicos comercializados em Santo Antônio de Jesus, Recôncavo da Bahia. **Enciclopédia Biosfera**, Centro Científico Conhecer - Goiânia, vol.7, N.13; 2015.

CHOI J. H. et al. Kaempferol inhibits thrombosis and platelet activation. **Biochimie**. Volume115, 2015, Pages 177-186.

COSTA NMB, ROSA COB. Alimentos funcionais: componentes bioativos e efeitos fisiológicos. **Editora Rubio**. 2016. 504p. ISBN-13: 978-8584110544.

DAVISON, E. K.; BRIMBLE, M. A. Natural product derived privileged scaffolds in drug discovery. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 52, p. 1–8, 2019.

DIANITA, R.; JANTAN, I. Inhibition of human platelet aggregation and low-density lipoprotein oxidation by *Premna foetida* extract and its major compounds. **Molecules**. 2019 Apr 13;24(8):1469.

DOSOKY N. S., SETZER W. N. Biological Activities and Safety of Citrus spp. Essential Oils. **Int. J. Mol. Sci.** 19, 1966, 2018.

ETEBU, E.; NWAUZOMA, A.B. A review on sweet orange (*Citrus sinensis* osbeck): **Health, diseases, and management**. Am. J. Res. 2014, 2, 33–70.

ESCOBEDO-AVELLANEDA, Z. et al. Phytochemicals and antioxidant activity of juice, flavedo, albedo and comminuted orange. **Journal of Functional Foods**, 2014, 6, 470-481.

ESTEVEZ B., DU X. New Concepts and Mechanisms of Platelet Activation Signaling. **Physiology (Bethesda)**, v. 32, n. 2, p. 162-177, 2017.

FAGGIO C. Flavonoids and platelet aggregation: A brief review. **European Journal of Pharmacology**, 807, 91–101, 2017.

FAVELA-HERNÁNDEZ J. M. J. et al. Chemistry and pharmacology of *Citrus sinensis*. **Molecules** 2016, 21(2), 247.

FENG G. et al. High-spatiotemporal-resolution transcriptomes provide insights into fruit development and ripening in *Citrus sinensis*. **Plant Biotechnol J**. 2021 Jul; 19(7): 1337–1353.

FERREIRA C.N. et al. O novo modelo da cascata de coagulação baseado nas superfícies celulares e suas implicações. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter**. 32, 5. 2010.

FLORES M.P. et al. Teoria da coagulação baseada em superfícies celulares e terapia guiada por tromboelastometria. **Rev. Saúde HSI**. 2015; 2 DEZ 4: 8-14.

GOBBO-NETO et al. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Quím. Nova** 30 (2), Abr 2017.

GKIONIS, S. V. Efeito de compostos naturais provenientes de plantas e fungos do Pantanal MatoGrossense sobre a hemostasia humana. **Repositório Institucional da UFSC**, 2020.

HERNÁNDEZ-HERNÁNDEZ, C. et al. Rambutan (*Nephelium lappaceum L.*): Nutritional and functional properties. **Trends in Food Science & Technology**. Volume 85, March 2019, Pages 201-210.

JAHURUL, M. H. A. et al. Functional and nutritional properties of rambutan (*Nephelium lappaceum L.*) seed and its industrial application: A review. **Trends in Food Science & Technology**. Volume 99, May 2020, Pages 367-374.

JOBLING L., EYRE L. Haemostasis, blood platelets and coagulation. *Anaesthesia and intensive care medicine*, v. 14, n. 2, p.51-53, 2013.

KAMMOUNA A. K., ALTYARB A. E., GAD H. A. Comparative metabolic study of *Citrus sinensis* leaves cultivars based on GC–MS and their cytotoxic activity. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**. Volume 198, 10 May 2021, 113991.

KAZMI R. S., BOYCE S., LWALEED B. A. Homeostasis of Hemostasis: The Role of Endothelium. **Semin Thromb Hemost.**, v. 41, n. 6, p. 549-55, 2015.

KOLTAI, K. et al. Platelet aggregometry testing: molecular mechanisms, techniques and clinical implications. **Int J Mol Sci.**, v. 18, n. 8, 2017.

KOUPENOVA M. *et al.* Thrombosis and platelets: an update. **European Heart Journal**, v. 38, n. 11, p. 785-791, 2017.

KOUPENOVA-ZAMOR, M. et al. Thrombosis and platelets: an update. 2017.

KOW C. S., HASAN S. S. The use of antiplatelet agents for arterial thromboprophylaxis in COVID-19. **Rev Esp Cardiol.** 2021 Jan; 74(1): 114–115.

LEUNG L. K. Hemostasis and its Regulation. **ACP Medicine**. 2012

LINDOSO, J. V. S. et al. Effects of “bacuri” seed butter (*Platonia insignis Mart.*), a Brazilian Amazon fruit, on oxidative stress and diabetes mellitus-related parameters in STZ-diabetic rats. **Biology** 2022, 11(4), 562.

LIU X. et al. Functional Characterization of a Flavonoid Glycosyltransferase in Sweet Orange (*Citrus sinensis*). **Front. Plant Sci.** 2018.

LORENZI TF. **Atlas de hematologia: clínica hematológica ilustrada**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006. 659p.

MASSA K. et al. Análise da prevalência de doenças cardiovasculares e fatores associados em idosos, 2000-2010. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 24, n. 1, 2019.

MATUS M. F. et al. Nanotechnology and primary hemostasis: Differential effects of nanoparticles on platelet responses. **Vascular pharmacology**, v. 101, p. 1- 8, 2018.

MILIND, P.; CHATURVEDE, D. Orange: Range of benefits. **Int. Res. J. Pharm.** 2014, 3, 59 – 63.

- MOHAMMED B. et al. Mouse models of hemostasis. **Platelets**, v. 31, n. 4, 2020.
- MOSAWY S. Effect of the Flavonol Quercetin on Human Platelet Function: A Review. **Food and Public Health**, 5(1): 1-9, 2015.
- MOSCHONA A. et al. Comparative Study of Natural Phenolic Acids and Flavonols as Antiplatelet and Anti-Inflammatory Agents. **The Grant Medical Journals**. 2017; 02(04): 057-066.
- NEWMAN D., CRAGG G. Natural Products as Sources of New Drugs over the Nearly Four Decades from 01/1981 to 09/2019. **Journal of Natural Products**, v. 83, n. 3, 2020.
- PALTA, S., SAROA, R., PALTA, A. Overview of the coagulation system. **Indian J Anaesth.**, v. 58, n. 5, p. 515-523, 2014
- PATEL P., KARCH J. Regulation of cell death in the cardiovascular system. **Cell Death Regulation In Health And Disease - Part C**, [S.L.], p. 153-209, 2020. Elsevier.
- PINHEIRO. Contribuição ao estudo fitoquímico e potencial biológico das flores de *Platonia insignis* mart. **Dissertação (Mestrado Acadêmico) do Programa de Pós - Graduação em Química**. Centro de Ciências da Natureza da Universidade Federal do Piauí. Teresina, PI, 2020.
- PRESTI C. et al. Trombose venosa profunda diagnóstico e tratamento. **Projeto Diretrizes Sociedade Brasileira de Angiologia e de Cirurgia Vascular**. 2015.
- RAO, M. J. et al. Antioxidant metabolites in primitive, wild, and cultivated citrus and their role in stress tolerance. **Molecules**. 2021 Sep 24;26(19):5801.
- REYES-MORENO J.; GARCÍA-VILLANUEVA E.; REYES-MORENO M.; AGUILAR-LUNA J. M. E. Anatomy and morphology of reproductive organs of *Nephelium lappaceum* L. **Bioagro**, 33(2), 115-126. 2021.
- REZENDE S. M. Distúrbios da hemostasia: doenças hemorrágicas. **Ver Med Minas Gerais**, v. 20, n. 4, p. 534-53, 2013.
- ROCHA. Produção de bioprodutos com atividade antimicrobiana a partir do extrato das folhas de *Platonia insignis* Mart. (bacuri). **Dissertação (Mestrado Acadêmico) do Programa de Pósgraduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Tocantins**. Gurupi, TO, 2017.
- RODRIGUES E.S., CASTILHO-FERNANDES A., FONTES A. M. Novos conceitos sobre a fisiologia da hemostasia. **Revista da Universidade Vale do Rio Verde**, v. 10, n. 1, p. 218-233, 2012.
- ROHMAN A. et al. Antiradical Activities of Rambutan Peel: Study from Two Cultivars. **Research Journal of Phytochemistry**, 11: 42-47, 2017.

ROLNIK A. et al. Quercetin and kaempferol derivatives isolated from aerial parts of *Lens culinaris* Medik as modulators of blood platelet functions. **Industrial Crops and Products**. V. 152, 2020, 112536.

SILVA, A.P.S.C.L. et al. *Platonia insignis* Mart com aplicações farmacológicas para o Sistema Nervoso Central: uma revisão. **Boletim Informativo Geum**, 7(2), p. 24-31, 2016.

SILVA R.D.R, MELO E.M. A atual teoria da coagulação baseada em superfícies celulares. **Saúde & Ciência Em Ação – Revista Acadêmica do Instituto de Ciências da Saúde**, v.2, n.01: Jan-Julho 2016 ISSN: 2447 9330.

SILVA, R. P. et al. Características morfométricas e químicas de frutos de três cultivares de lichia (*Litchi chinensis* Sonn.) cultivados em Maquiné, Rio Grande do Sul. **Pesq. Agrop. Gaúcha**, Porto Alegre, v.24, ns.1/2, p. 12-22, 2018.

SOEIRO M. N. C; VERGOTEN G; BAILLY C. Pharmacological profile of garcinielliptone FC from *Platonia insignis*. **Rev. Bras. Farmacogn.** 2022.

STRUIJK M. et al. Optimal drug therapy after aspirin-induced upper gastrointestinal bleeding. **European Journal Of Internal Medicine**, v. 23, n. 3, p. 227-230, 2014.

TEN CATE H., HACKENG T. M., DE FRUTOS P. G. Coagulation factor and protease pathways in thrombosis and cardiovascular disease. **Thrombosis and haemostasis**, v. 117, n. 07, p. 1265-1271, 2017.

TOMAIUOLO M.; BRASS, L. F.; STALKER, T. J.; Regulation of platelet activation and coagulation and its role in vascular injury and arterial thrombosis. **Interventional cardiology clinics**, v. 6, n. 1, p. 1, 2017.

TSONG L. J.; GOH L. P. W.; GANSAU J. A.; HOW S. E. Review of *Nephelium lappaceum* and *Nephelium ramboutan-ake*: A high potential supplement. **Molecules**. 2021 Nov; 26(22): 7005.

ULLAH, A. et al. Important Flavonoids and Their Role as a Therapeutic Agent. **Molecules**, (2020), 25(22).

VALLANCE T. M. et al. Synthetic Flavonoids as Novel Modulators of Platelet Function and Thrombosis. **Int. J. Mol. Sci.** 2019, 20, 3106.

WANG S. B. et al. Kaempferol suppresses collagen-induced platelet activation by inhibiting NADPH oxidase and protecting SHP-2 from oxidative inactivation. **Free Radical Biology and Medicine**. V. 83, 2015, Pages 41-53.

WTD 2021. World Thrombosis Day. **International Society on Thrombosis and Haemostasis**. Disponível em: <<https://www.worldthrombosisday.org/issue/thrombosis/>>. Acesso em: 05 de Novembro de 2021.

ZAGO M. A., FALCÃO R. P., PASQUINI R. **Tratado de Hematologia**. São Paulo: Editora Atheneu, 2013.

ZHAO, L. et al. Nutrient components, health benefits, and safety of litchi (*Litchi chinensis* Sonn.): A review. **Comprehensive Reviews In Food Science And Food Safety**. Volume 19, Issue 4. July 2020. Pages 2139-2163.

**PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP**

**DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

**Título da Pesquisa:** Avaliação do efeito de compostos naturais sobre a hemostasia humana

**Pesquisador:** Ana Carolina Rabello de Moraes

**Área Temática:**

**Versão:** 2

**CAAE:** 12353019.0.0000.0121

**Instituição Proponente:** UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

**DADOS DO PARECER**

**Número do Parecer:** 3.433.945

**Apresentação do Projeto:**

Projeto de pesquisa de Ana Carolina Rabello de Moraes, docente do Departamento de Análises Clínicas, com a participação de Carine Bollis Frozza, Bianca Regina Alberton, Iara Kretzer, Bruna Jaques, Tanara Arenhart e Stephanie Viegas Gkionis.

Trata-se de um estudo quantitativo e transversal, com previsão de 900 participantes, que utilizará amostras de sangue total de indivíduos referenciados à Unidade de Laboratório de Análises Clínicas do Hospital Universitário Professor Polydoro Ernani de São Thiago – HU/UFSC/EBSERH. ). A amostra para a pesquisa é sangue total anticoagulado com citrato de sódio 3,2% ou EDTA, o qual será coletado no mesmo momento da coleta de amostra para a realização de outros exames laboratoriais, evitando uma segunda punção venosa. As amostras acondicionadas serão transportadas até o Laboratório de Oncologia Experimental e Hemopatias (LOEH) localizado no Hospital Universitário Professor Polydoro Ernani de São Thiago – HU/UFSC/EBSERH, onde serão processadas para a realização dos ensaios biológicos, como estudos de agregação plaquetária, de coagulação sanguínea, de western blot, de citometria de fluxo, de citotoxicidade, entre outros. As metodologias empregadas em cada um destes estudos constam do projeto anexado.

São critérios de inclusão:

- indivíduos com idade superior a 18 anos, que procuraram a Unidade de Laboratório de Análises

**Endereço:** Universidade Federal de Santa Catarina, Prédio Reitoria II, R: Desembargador Vitor Lima, nº 222, sala 401

**Bairro:** Trindade

**CEP:** 88.040-400

**UF:** SC

**Município:** FLORIANOPOLIS

**Telefone:** (48)3721-6094

**E-mail:** cep.propesq@contato.ufsc.br

Continuação do Parecer: 3.433.945

Clínicas do Hospital Universitário Professor Polydoro Ernani de São Thiago – HU/UFSC/EBSERH para realizar exames laboratoriais;

- indivíduos que não tenham utilizado antiagregantes, anticoagulantes ou anti-inflamatórios não esteroidais nos últimos 10 dias;
- indivíduos que não tenham histórico de doença hepática;
- indivíduos que tenham concordado em participar do estudo por meio da assinatura do TCLE. A hipótese é que os compostos naturais testados nas suas diferentes formas apresentam atividade antiagregante e/ou anticoagulante. Como desfecho primário, a pesquisadora cita a identificação de novos compostos de origem natural com atividade sobre a hemostasia humana.

**Objetivo da Pesquisa:**

Realizar estudos sistemáticos para avaliar os efeitos de compostos de origem natural, na forma de extrato

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

São citados os riscos relativos aos procedimentos de coleta de sangue (formação de hematoma e dor), possíveis constrangimentos durante a explicação do projeto e/ou quebra de confidencialidade dos dados coletados. São descritos os procedimentos para reduzir os riscos.

Não haverão benefícios diretos. São citado como benefício indireto a possibilidade de serem identificados novos compostos de origem natural com propriedades terapêuticas e que representem um avanço em direção ao desenvolvimento de novos fármacos antitrombóticos.

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

A pesquisa apresenta pertinência, fundamentação bibliográfica, clareza em seus objetivos e potencial para contribuir com a linha de pesquisa que se encaixa.

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

A folha de rosto vem assinada pela pesquisadora responsável e pela autoridade institucional competente (Chefe do Departamento de Análises Clínicas).

Consta declaração da instituição onde será realizada a pesquisa (HU/UFSC), assinada por responsável institucional, disponibilizando a existência de infraestrutura necessária ao

**Endereço:** Universidade Federal de Santa Catarina, Prédio Reitoria II, R: Desembargador Vitor Lima, nº 222, sala 401  
**Bairro:** Trindade **CEP:** 88.040-400  
**UF:** SC **Município:** FLORIANOPOLIS  
**Telefone:** (48)3721-6094 **E-mail:** cep.propesq@contato.ufsc.br

Continuação do Parecer: 3.433.945

desenvolvimento da pesquisa, autorizando a sua execução e comprometendo-se a cumprir os

O cronograma informa que a coleta de dados acontecerá a partir de 22/07/2019.

O orçamento informa despesas de R\$ 13.500,00 com financiamento próprio.

O TCLE está claro quanto a objetivos, procedimentos e riscos e cumpre essencialmente todas as exigências da res. 466/12.

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

Sem pendências.

**Considerações Finais a critério do CEP:**

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

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1337608.pdf	03/06/2019 13:48:01		Aceito
Outros	hemostasia_carta_de_resposta_ao_CEP_SH_28052019.pdf	03/06/2019 13:46:24	Ana Carolina Rabello de Moraes	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_projeto_hemostasia_produtos_naturais_2v_28052019.pdf	03/06/2019 13:45:17	Ana Carolina Rabello de Moraes	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	projeto_comite_etica_hemostasia_produtos_naturais_2v.pdf	03/06/2019 13:44:50	Ana Carolina Rabello de Moraes	Aceito
Folha de Rosto	folhaDeRosto_assinada.pdf	16/04/2019 17:46:23	Ana Carolina Rabello de Moraes	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	declaracao_concordancia_hu_16042019.pdf	16/04/2019 16:14:23	Ana Carolina Rabello de Moraes	Aceito

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

**Endereço:** Universidade Federal de Santa Catarina, Prédio Reitoria II, R: Desembargador Vitor Lima, nº 222, sala 401

**Bairro:** Trindade

**CEP:** 88.040-400

**UF:** SC

**Município:** FLORIANOPOLIS

**Telefone:** (48)3721-6094

**E-mail:** cep.propesq@contato.ufsc.br

Continuação do Parecer: 3.433.945

FLORIANOPOLIS, 03 de Julho de 2019

---

**Assinado por:**  
**Maria Luiza Bazzo**  
**(Coordenador(a))**

**Endereço:** Universidade Federal de Santa Catarina, Prédio Reitoria II, R: Desembargador Vitor Lima, nº 222, sala 401  
**Bairro:** Trindade **CEP:** 88.040-400  
**UF:** SC **Município:** FLORIANOPOLIS  
**Telefone:** (48)3721-6094 **E-mail:** cep.propesq@contato.ufsc.br