

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

Bianca Regina Alberton

**Efeito de extratos de plantas sobre a agregação plaquetária e coagulação sanguínea**

FLORIANÓPOLIS

2019

Bianca Regina Alberton

**Efeito de extratos de plantas sobre a agregação plaquetária e coagulação sanguínea**

Trabalho 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 Bacharel em Farmácia.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Ana Carolina Rabello de Moraes, Dr<sup>a</sup>.

Coorientadora: Prof<sup>a</sup>. Beatriz Garcia Mendes Borba, Dr<sup>a</sup>

Florianópolis

2019



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

Alberton, Bianca Regina  
Efeito de extratos de plantas sobre a agregação  
plaquetária e coagulação sanguínea / Bianca Regina  
Alberton ; orientador, Ana Carolina Rabello de  
Moraes, coorientador, Beatriz Garcia Mendes Borba,  
2019.  
56 p.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) -  
Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de  
Ciências da Saúde, Graduação em Farmácia,  
Florianópolis, 2019.

Inclui referências.

1. Farmácia. I. Rabello de Moraes, Ana Carolina  
. II. Garcia Mendes Borba, Beatriz . III.  
Universidade Federal de Santa Catarina. Graduação em  
Farmácia. IV. Título.

Bianca Regina Alberton

**Efeito de extratos de plantas sobre a agregação plaquetária e coagulação sanguínea**

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

Local, 22 de novembro de 2019.

---

Prof.a Mareni Rocha Farias, Dra.  
Coordenadora do Curso

**Banca Examinadora:**

---

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

---

Prof.<sup>a</sup> Beatriz Garcia Mendes Borba, Dra.  
Coorientadora  
Universidade Federal de Santa Catarina

---

Prof.a. Maria Cláudia Santos da Silva, Dra.  
Universidade Federal de Santa Catarina

---

Prof.a. Miriam de Barcellos Falkenberg, Dra.  
Universidade Federal de Santa Catarina

“Ser feliz não é ter uma vida perfeita. Mas usar as lágrimas para irrigar a tolerância. Usar as perdas para refinar a paciência. Usar as falhas para esculpir a serenidade. Usar a dor para lapidar o prazer. Usar os obstáculos para abrir as janelas da inteligência.”

Augusto Cury

## AGRADECIMENTOS

Aos meus amados pais, Airton e Suzana, palavras não são e nunca serão suficientes para expressar meu amor e agradecimentos por todas as coisas que vocês dois já fizeram e fazem por mim, ter o amor e apoio de vocês sempre me deu forças para não desistir e continuar no meu caminho, de sempre saber que não importasse o que acontecesse eu sempre teria meu lar pra voltar, eu amo vocês.

A minha Irmã, Riciane, minha cúmplice, muito obrigada pelo seu apoio, pelo seu amor, e por sempre estar ao meu lado nos momentos que precisei, que sempre me segura, eu amo você, sei que terei pela vida toda um porto seguro.

As minhas amigas, que durante esses seis anos foram minha força, que nunca me deixaram desamimar, que me seguraram a mão e caminharam junto comigo, meu eterno muito obrigada por todos os momentos compartilhados com cada uma de vocês, essa jornada foi, com toda a certeza, mais tranquila com cada uma de vocês ao meu lado, com todo o meu coração, eu amo vocês.

A minha orientadora, Prof<sup>a</sup>. Ana Carolina Rabello de Moraes, que durante os últimos três anos me acolheu, me ajudou, me aconselhou em todos os momentos que precisei, que me estendeu a mão e cuidou de mim como uma filha, não tenho palavras para agradecer e expressar toda a minha gratidão por tudo que fizeste por mim.

A minha coorientadora Prof<sup>a</sup> Beatriz Garcia Mendes Borba por toda a ajuda e carinho durante não só esse último ano, mas toda a minha graduação, muito obrigada por tudo.

Agradecer ao CNPq pelo apoio que permitiu a realização dessa pesquisa.

À banca avaliadora, Prof<sup>a</sup> Maria Claudia e Prof<sup>a</sup> Mirian, que com seus conselhos ajudaram a melhorar os estudos da pesquisa e que me abriram os olhos para várias questões importantes, meu muito obrigada pelo carinho e atenção das duas.

A todos vocês que fizeram parte dessa caminhada, esse trabalho tem um pedacinho de cada um, obrigada por terem feito parte dessa jornada incrível!

## RESUMO

O sistema responsável por manter a regulação da fluidez sanguínea e a integridade vascular é o hemostático. A hemostasia é um processo natural do corpo humano que pode, por meio de fatores naturais ou adquiridos, sofrer alterações, o que leva a quadros de trombose, como infarto agudo do miocárdio, trombose venosa profunda e embolia pulmonar. Os distúrbios tromboembólicos são um problema de saúde pública no Brasil e no mundo. Para o tratamento dessas doenças, há uma ampla variedade de medicamentos antiplaquetários e anticoagulantes que apresentam comprovada efetividade clínica. No entanto, muitos desses fármacos também apresentam efeitos adversos significativos e limitações de uso, o que impede a sua utilização universal. Sendo assim, a procura por novos fármacos ou tratamentos complementares se mostra interessante e, nesse contexto, a avaliação de produtos naturais já utilizados na medicina popular apresentam grande potencial. Deste modo, este estudo teve como objetivo avaliar o efeito de extratos brutos e chás de *Vitex montevidensis* (VMB), de *Plantago major* (PMB) e de *Maytenus ilicifolia* (MIB) frente à agregação plaquetária e à coagulação sanguínea humana. Para tanto, a partir das plantas secas foram preparados extratos etanólicos ou chás. A ação antiagregante foi avaliada por turbidimetria utilizando-se o ADP ou a epinefrina como agonistas. A atividade sobre a coagulação foi avaliada pelos testes de tempo de protrombina (TP) e tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPa). Para a triagem, previamente a realização dos ensaios, as amostras de plasma rico ou pobre em plaquetas foram incubadas a 37 °C por 5 minutos com os extratos brutos etanólicos das plantas (800 µg/mL). Os extratos de PMB e MIB apresentaram discreta atividade anticoagulante ao prolongarem significativamente o TTPa ( $31,0 \pm 1,1\%$  e  $40,6 \pm 1,9\%$ , respectivamente) em relação ao controle ( $28,1 \pm 1,9\%$ ). Todos os extratos brutos apresentaram atividade antiagregante ao inibirem significativamente a agregação induzida por ambos agonistas. A  $CI_{50}$  de MIB para o ADP foi de  $289,8 \pm 7,3$  µg/mL e de  $274,8 \pm 7,5$  µg/mL para a epinefrina. A  $CI_{50}$  dos outros extratos foi maior que 800 µg/mL e não pode ser calculada. Pelo extrato de MIB apresentar o melhor efeito sobre a hemostasia, avaliou-se a ação do seu chá sobre a agregação plaquetária e o TTPa. Ao comparar com o controle ( $87,5 \pm 2,1\%$ ), o chá de MIB foi capaz de inibir significativamente apenas a agregação induzida por epinefrina ( $68,7 \pm 5,1\%$ ). A compilação dos resultados demonstrou que todas as plantas testadas apresentam efeito inibitório sobre a hemostasia humana.

**Palavras-chave:** agregação plaquetária, coagulação sanguínea, plantas medicinais, metabólitos secundários, antiagregante, anticoagulante, *Vitex montevidensis*, *Plantago major*, *Maytenus ilicifolia*

## EFFECT OF PLANTS EXTRACTS ON PLATELET AGGREGATION AND BLOOD COAGULATION

The hemostatic system is responsible for maintaining blood flow and vascular integrity. Hemostasis is a natural process that may change due to natural or acquired factors, may leads to thrombosis, such as acute myocardial infarction, deep vein thrombosis and pulmonary embolism. Thromboembolic disorders are a public health problem in Brazil and worldwide. For the treatment of these diseases, there is a wide variety of antiplatelet and anticoagulant drugs that have proven clinical effectiveness. However, many of these drugs also have significant adverse effects and limitations of use, which prevent their universal use. Thus, the search for new drugs or complementary treatments is interesting and, in this context, the evaluation of natural products already used in folk medicine has great potential. Therefore, this study aimed to evaluate the effect of crude extracts and infusions of *Vitex montevidensis* (VMB), *Plantago major* (PMB) and *Maytenus ilicifolia* (MIB) on platelet aggregation and human blood coagulation. For this, ethanolic extracts or infusions were prepared from the dried plants. The antiplatelet activity was evaluated by turbidimetry using ADP and epinephrine as agonists. Clotting activity was assessed by prothrombin time (PT) and activated partial thromboplastin time (aPTT). For screening, prior to the assays, samples of poor or platelet-rich plasma were incubated at 37 °C for 5 minutes with ethanolic extracts (800 µg/mL). The PMB and MIB extracts showed slight anticoagulant activity as they significantly prolonged the aPTT ( $31.0 \pm 1.1\%$  and  $40.6 \pm 1.9\%$ , respectively) compared to the control ( $28.1 \pm 1.9\%$ ). All ethanolic extracts showed antiplatelet activity as they significantly inhibited platelet aggregation induced by both agonists. The MIB's  $IC_{50}$  for ADP was  $289.8 \pm 7.3$  µg/mL and for epinephrine was  $274.8 \pm 7.5$  µg/mL. The  $IC_{50}$  of the other ethanolic extracts was above than 800 µg/mL and cannot be calculated. Because MIB ethanolic extract had the best effect on hemostasis, the activity of its infusion on platelet aggregation and aPTT was evaluated. Compared to the control ( $87.5 \pm 2.1\%$ ), MIB's infusion was able to significantly inhibit only epinephrine-induced aggregation ( $68.7 \pm 5.1\%$ ). The compilation of these results showed that all plants tested had an inhibitory effect on human hemostasis.

**Keywords:** platelet aggregation, blood coagulation, medicinal plants, secondary metabolites, antiplatelet, anticoagulant, *Vitex montevidensis*, *Plantago major*, *Maytenus ilicifolia*.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Hemostasia primária .....	21
Figura 2 - Hemostasia secundária .....	23
Figura 3 - Fibrinólise .....	24
Figura 4 - Árvore e folhas de tarumã ( <i>Vitex montevidensis</i> ) .....	26
Figura 5 - Tanchagem ( <i>Plantago major</i> ) .....	27
Figura 6 - Folhas de espinheira-santa ( <i>Maytenus ilicifolia</i> ) .....	28
Figura 7 - Perfil da curva de agregação plaquetária .....	32
Figura 8 - Efeito do extrato bruto PMB, MIB e VMB (800 µg/mL) sobre o perfil da curva de agregação plaquetária induzida por adenosina difosfato (ADP) em comparação com o controle.....	37
Figura 9 - Efeito do extrato bruto PMB, MIB e VMB (800 µg/mL) sobre o perfil da curva de agregação plaquetária induzida por epinefrina em comparação com o controle.....	38
Figura 10 - Curva de concentração resposta induzida por ADP e epinefrina em função de MIB.....	40
Figura 11 - Efeito do chá MIB sobre o perfil da curva de agregação plaquetária induzida por ADP e epinefrina .....	43



## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Quantidades de plantas utilizada para o preparo do extrato bruto .....	33
Tabela 2 - Efeito dos extratos brutos (800 µg/mL) sobre o tempo de protrombina (TP) e o tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPa) .....	34
Tabela 3 - Efeito dos extratos brutos de PMB, MIB e VMB (800 µg/mL) sobre a agregação plaquetária induzida por adenosina difosfato (ADP) e epinefrina .....	35
Tabela 4 - Efeito de MIB sobre a agregação plaquetária induzida por ADP e epinefrina .....	41
Tabela 5 - Efeito do chá de MIB sobre a agregação plaquetária sanguínea induzida por adenosina difosfato (ADP) e epinefrina .....	42
Tabela 6 - Efeito do chá de MIB sobre o tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPa) ...	44

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AAS - Ácido acetilsalicílico  
ADP - Adenosina difosfato  
ATP - Adenosina trifosfato  
CI<sub>50</sub> – Concentração inibitória de 50%  
DCV - Doenças cardiovasculares  
DMSO - Dimetilssulfóxido  
EPI - Epinefrina  
FI - Fibrinogênio  
FII - Protrombina  
FIIa - Trombina  
FT - Fator tecidual  
FvW - Fator de von Willebrand  
FXa - Fator X ativado  
GP - Glicoproteína  
MIB - *Maytenus ilicifolia*  
PBS - Tampão fosfato-salino  
PMB - *Plantago major*  
PPP - Plasma pobre em plaquetas  
PRP - Plasma rico em plaquetas  
TP - Tempo de protrombina  
TTPa - Tempo de tromboplastina parcial ativada  
TXA2 - Tromboxano  
VMB - *Vitex montevicensis*

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>15</b>
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>19</b>
2.1	OBJETIVO GERAL.....	19
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	19
<b>3</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA .....</b>	<b>20</b>
3.1	HEMOSTASIA .....	20
<b>3.1.1</b>	<b>Hemostasia primária.....</b>	<b>20</b>
<b>3.1.2</b>	<b>Hemostasia secundária.....</b>	<b>21</b>
<b>3.1.3</b>	<b>Fibrinólise.....</b>	<b>24</b>
3.2	PLANTAS MEDICINAIS .....	25
<b>3.2.1</b>	<b><i>Vitex montevidensis</i> .....</b>	<b>25</b>
<b>3.2.2</b>	<b><i>Plantago major</i> .....</b>	<b>26</b>
<b>3.2.3</b>	<b><i>Maytenus ilicifolia</i> .....</b>	<b>27</b>
<b>4</b>	<b>METODOLOGIA .....</b>	<b>29</b>
4.1	OBTENÇÃO DAS PLANTAS MEDICINAIS.....	29
4.2	PREPARO DOS EXTRATOS BRUTOS ETANÓLICOS E CHÁS .....	29
<b>4.2.1</b>	<b>Extratos brutos etanólicos .....</b>	<b>29</b>
<b>4.2.2</b>	<b>Chás .....</b>	<b>29</b>
4.3	SELEÇÃO DE PARTICIPANTES E COLETA DAS AMOSTRAS.....	30
4.4	ESTUDOS DE COAGULAÇÃO SANGUÍNEA .....	30
4.5	ESTUDOS DE AGRAGAÇÃO PLAQUETÁRIA .....	31
4.6	ANÁLISE DAS CURVAS DE AGREGAÇÃO PLAQUETÁRIA .....	31
4.7	DETERMINAÇÃO DE CI <sub>50</sub> DOS EXTRATOS BRUTOS E DO CHÁ .....	32
4.8	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	32
<b>5</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>33</b>

5.1	PREPARAÇÃO DOS EXTRATOS BRUTOS ETANÓLICOS.....	33
5.2	ATIVIDADE DOS EXTRATOS BRUTOS SOBRE A COAGULAÇÃO SANGUÍNEA.....	33
5.3	ATIVIDADE DOS EXTRATOS BRUTOS SOBRE A AGREGAÇÃO PLAQUETÁRIA .....	35
5.4	DETERMINAÇÃO DE $CI_{50}$ DOS EXTRATOS BRUTOS .....	40
5.5	EFEITO DOS CHÁS DAS PLANTAS COM RESULTADOS ANTIAGREGANTES PROMISSORES.....	41
<b>6</b>	<b>CONCLUSÃO .....</b>	<b>45</b>
<b>7</b>	<b>PERSPECTIVAS.....</b>	<b>46</b>
	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>47</b>
	<b>ANEXO A – Parecer do Comitê de Ética de Pesquisa em Seres Humanos .....</b>	<b>53</b>

## 1 INTRODUÇÃO

O equilíbrio hemostático do fluxo sanguíneo pode ser afetado por distúrbios que podem ser tanto hereditários quanto adquiridos. Estes distúrbios geram descontrole nos mecanismos que regulam a hemostasia primária, secundária e/ou a fibrinólise, o que pode resultar em quadros de trombose e/ou embolia (HOFFBRAND, 2013). Os eventos trombóticos se desenvolvem quando o coágulo é formado no interior do vaso sanguíneo e não apenas na parede endotelial, resultando em uma obstrução do vaso ou da artéria, podendo ser a causa subjacente de ataques cardíacos e derrames cerebrais (HEMOCENTRO UNICAMP, 2019; WEITZ; EIKELBOOM 2016).

Em casos de trombose arterial, a formação do coágulo ocorre nas artérias onde a circulação é rica em oxigênio, que é transportado dos pulmões aos tecidos, e isso decorre principalmente pela formação das chamadas placas de aterosclerose, as quais podem causar tanto infartos agudos do miocárdio, como acidente vascular cerebral. Já na trombose venosa, tem-se a formação do coágulo nas veias, e essa pode ser classificada em trombose venosa profunda, que atinge principalmente membros inferiores, e a tromboembolia pulmonar, que ocorre pelo desprendimento de um trombo, geralmente formado nos membros inferiores, que migra até os pulmões, causando assim obstrução da circulação (WEITZ; EIKELBOOM 2016).

A incidência de doenças cardiovasculares (DCVs) é praticamente igual entre homens e mulheres, e estima-se que a cada ano mais de 900 mil pessoas nos Estados Unidos da América (EUA) e mais de 500 mil na Europa sofram de eventos como trombose venosa profunda e/ou tromboembolismo pulmonar. Já no Brasil, 1-2 indivíduos entre 100 mil habitantes são acometidos por essas doenças (WTD 2019; WHO, 2017). Assim, a trombose pode ser considerada como uma das principais causas de DCVs e, segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), mais de 17 milhões das mortes mundiais nas últimas décadas foram decorrentes de DCVs. No Brasil, cerca de 30% dos óbitos registrados são decorrentes de DCVs. Diante disso, os eventos tromboembólicos são considerados um problema de saúde pública no Brasil e no mundo (ROCHA; MARTINS, 2017; WTD 2019; WHO, 2017).

Atualmente, existem diversas estratégias terapêuticas para evitar e prevenir os eventos tromboembólicos. A terapia medicamentosa se dá principalmente pelo uso de

antiagregantes e anticoagulantes. Dentre os antiagregantes, o mais amplamente utilizado é o ácido acetilsalicílico (AAS), que atua como inibidor irreversível da ciclooxigenase 1 (COX-1), enzima responsável pela produção de tromboxano A2 (TXA2), um importante agregante plaquetário (ANTUNES et al., 2017; DE ANDRADE; BORGES, 2017). Outros antiagregantes também utilizados na clínica incluem o clopidogrel, o prasugrel e a ticlopidina. Esses fármacos inibem a agregação plaquetária por meio da inibição do receptor P2Y12 (DA SILVA SOARES et al., 2010). Apesar de esses medicamentos mostrarem-se efetivos na prevenção secundária de DCV aterotrombóticas, eles podem apresentar efeitos adversos importantes, como hemorragias gastrointestinal e intracraniana, úlcera gástrica, diarreia, neutropenia e trombocitopenia, o que pode limitar o seu uso (LI et al., 2018; YUSUF, ZHAO; MEHTA, 2001).

Dentre os anticoagulantes, um dos mais utilizados é a heparina ou heparina não fracionada, cujo mecanismo de ação envolve a potencialização da antitrombina, um anticoagulante natural responsável por inibir os fatores II e X ativados. Outro medicamento amplamente utilizado é a varfarina, um antagonista de vitamina K que promove a redução da concentração sérica dos fatores dependentes de vitamina K (FII, FVII, FIX e FX). Apesar de apresentarem efetividade clínica, alguns desses medicamentos aumentam significativamente o risco de sangramentos, além de apresentarem importantes interações com outros medicamentos e alimentos, o que limita o seu uso universal (DI MINNO et, al., 2017; RABELO et, al., 2015).

Nos últimos anos, novos anticoagulantes foram aprovados para uso. Dentre eles, pode-se citar os inibidores diretos do fator X ativado (FXa), como rivaroxabana e apixabana, e os inibidores diretos da trombina (FIIa), como dabigatrana, que atua ligando-se ao sítio de ação ativo do FIIa livre, inibindo assim a sua ação pró-coagulante. Todos esses medicamentos fazem parte da nova classe de anticoagulantes orais que estão sendo utilizados como alternativas a terapêutica antiga, porém, mesmo tendo uma eficácia e segurança potencialmente maior que os antigos medicamentos, ainda são relatados alguns efeitos adversos como o risco de infarto do miocárdio, interações medicamentosas com outros medicamentos, como anti-inflamatórios, que podem aumentar o risco de hemorragias nos pacientes em tratamento (FAWOLE, 2013; GÓMEZ-OUTES, 2012).

Por isso, a procura por novas formas de tratamento se mostram promissoras levando em conta os riscos das terapêuticas disponibilizadas (DI MINNO et, al., 2017), isso promove

a investigação de produtos naturais como potenciais anticoagulantes e antiplaquetários (MIRA, 2017).

Plantas com potenciais farmacológicos e terapêuticos vêm sendo usadas há centenas de anos. A etnofarmacologia a ciência que estuda o conhecimento popular sobre plantas medicinais e fármacos, levando em consideração a cultura e local de vivência da população, e um dos seus principais objetivos é a descoberta de novos compostos, derivados de plantas utilizadas pelas populações que podem ser utilizadas para o desenvolvimento de novos medicamentos e produtos farmacêuticos (CUNNINGHAM, MENEZES, 2011).

No Brasil, os estudos com as plantas começaram com os missionários na época do Brasil colonial, que tinham interesse no uso de plantas farmacologicamente ativas que eram utilizadas pela população indígena. Essas descobertas começaram primeiro com observações do uso dessas plantas e depois com estudos das propriedades farmacológicas das mesmas. (CUNNINGHAM, MENEZES, 2011; RANGEL, BRAGANÇA, 2009).

Atualmente, é observado um aumento no uso de produtos naturais e plantas medicinais incorporadas nos tratamentos como forma complementar e também no desenvolvimento de novos medicamentos, mostrando que esses produtos constituem uma fonte essencial e digna de fármacos bem-sucedidos (HEINRICH, 2014; DAVID, WOLFENDER, DIAS, 2015). Dentro dessas linhas de pesquisas com plantas medicinais, os estudos voltados a hemostasia já demonstram que plantas medicinais usadas na medicina popular apresentam atividades na hemostasia humana e que esse efeito é atribuído à presença de compostos bioativos como polifenóis, flavonoides, cumarinas, terpenóides e outras substâncias que podem interferir inibindo vias de sinalização que levam à ativação plaquetária, formação de tromboxano A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>) ou a redução de cálcio citosólico (EL HAUARI; ROSADO, 2016; MIRA et al., 2017).

Sendo assim, estudos com extratos de plantas medicinais que possuem esses compostos bioativos são importantes para o desenvolvimento de terapêuticas alternativas, sendo na forma de medicamentos alopáticos ou na forma de chás, como já usados na medicina popular. Entre as inúmeras plantas medicinais utilizadas entre a população, no presente estudo foram selecionadas três espécies usadas popularmente para diversas funções, que são plantas ricas em flavonoides, fenóis e taninos, metabólitos secundários já conhecidos por atuarem sobre a hemostasia humana, tendo efeitos sobre a agregação plaquetária e coagulação sanguínea (ALMEIDA et al., 2015; HOLNIK et al., 2015; MORES et al., 2018; ROCHA et al., 2014;

SANTOS, 2017), essas plantas são: *Vitex montevidensis*, popularmente conhecida como tarumã, *Plantago major* conhecida como tanchagem, e *Maytenus ilicifolia*, popularmente chamada de espinheira-santa.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito de extratos brutos e de chás de *Vitex montevidensis*, de *Plantago major* e de *Maytenus ilicifolia* sobre a agregação plaquetária e a coagulação sanguínea humana.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Preparo dos extratos brutos etanólicos de *V. montevidensis*, de *P. major* e de *M. ilicifolia*;
- Avaliação da ação dos extratos sobre o tempo de tromboplastina parcialmente ativada (TTPa) e tempo de protrombina (TP);
- Estudar o efeito dos extratos sobre a agregação plaquetária induzida por adenosina difosfato (ADP) e epinefrina;
- Selecionar as plantas cujos extratos brutos mostraram-se mais promissores e verificar o efeito de seus chás sobre a hemostasia;
- Determinar a concentração inibitória de 50% (CI<sub>50</sub>) dos chás e extratos que apresentaram melhor atividade antiagregante e/ou anticoagulante.

### 3 REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1 HEMOSTASIA

O sangue tem como principal função o transporte de células, nutrientes, entre outras substâncias, e para que isso ocorra adequadamente, o sangue deve estar sempre em seu estado fluido (BITTENCOURT, 2016). Porém, frente a uma lesão vascular, o sangue deve coagular no local da lesão para evitar uma perda sanguínea excessiva que venha a comprometer as suas funções básicas. O sistema hemostático é responsável por manter a regulação da fluidez sanguínea e a integridade vascular. Os principais componentes envolvidos nos processos de hemostasia são as plaquetas, os vasos sanguíneos, as proteínas da coagulação e as da fibrinólise (HOFFBRAND, 2013; KOUPENOVA et al., 2016).

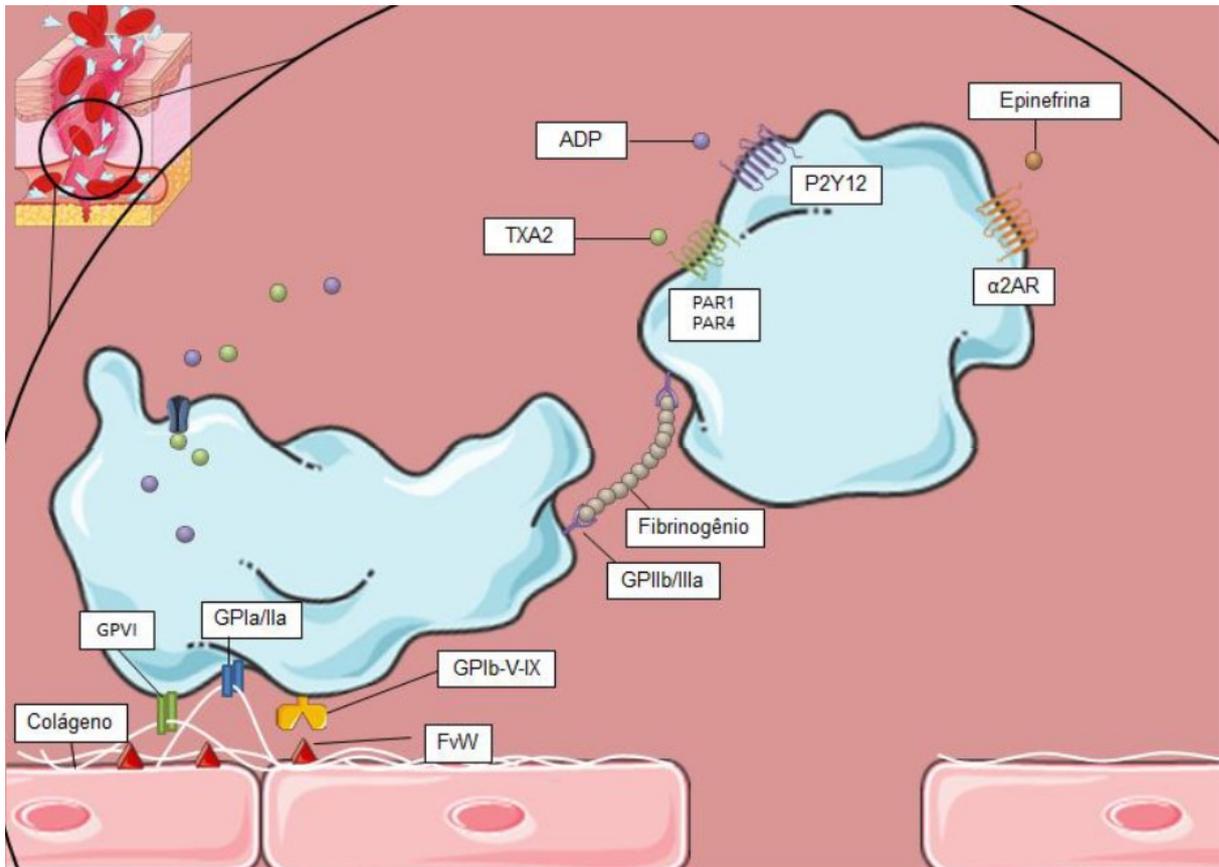
Por estratégia didática e para facilitar os estudos, os processos que envolvem a hemostasia são divididos em hemostasia primária, secundária e fibrinólise (GRIMALDO-GÓMEZ, 2017).

##### 3.1.1 Hemostasia primária

Na hemostasia primária, a função das plaquetas é crucial para a formação de um trombo diante a uma lesão vascular ou disfunção endotelial. A lesão vascular desencadeará a adesão e ativação das plaquetas, o que induz a rearranjos na estrutura plaquetária, secreção dos grânulos plaquetários e agregação plaquetária, o que, conseqüentemente, leva à formação do tampão hemostático que terá a função de obstruir o local lesionado, impedindo a perda sanguínea e auxiliando no processo de regeneração tecidual (MATUS et al., 2018).

A adesão das plaquetas ao endotélio dá-se por meio de glicoproteínas (GP) de membrana, como a GPIb/IX/V, que interagem com o colágeno subendotelial e o fator de von Willebrand (FvW). Após a adesão, ocorre a ativação plaquetária que leva à mudança conformacional e aumento da afinidade da GPIIb/IIIa pelo fibrinogênio (FI), que possui dois sítios de ligação a esse receptor e, com isso, pode mediar as interações entre as plaquetas, ligando-se a receptores em duas plaquetas adjacentes e formando o agregado plaquetário (Figura 1) (KOUPENOVA-ZAMOR et al., 2017; TOMAIUOLO et al., 2017).

**Figura 1 - Hemostasia primária**



Fatore de von Willebrand (FvW); Tromboxano A2 (TXA2); Adenosina difosfato (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.

As plaquetas ativadas também são capazes de recrutar outras plaquetas circulantes pela secreção de mediadores da ativação plaquetária, como TXA2, adenosina difosfato (ADP), adenosina trifosfato (ATP), cálcio, entre outros, levando ao aumento do tamanho do tampão plaquetário (KROUPENOVA-ZAMOR et al., 2017).

### 3.1.2 Hemostasia secundária

As ligações entre as plaquetas mediadas pelo fibrinogênio via GPIIb/IIIa são fracas e, para que o tampão hemostático seja eficiente, é necessário que o agregado plaquetário seja firme. Para estabilizar o tampão, o fibrinogênio presente no local da lesão sofre ação da trombina, convertendo-se em fibrina, uma proteína que faz ligações covalentes com outros monômeros de fibrina, formando uma “rede” firme que irá estabilizar o agregado

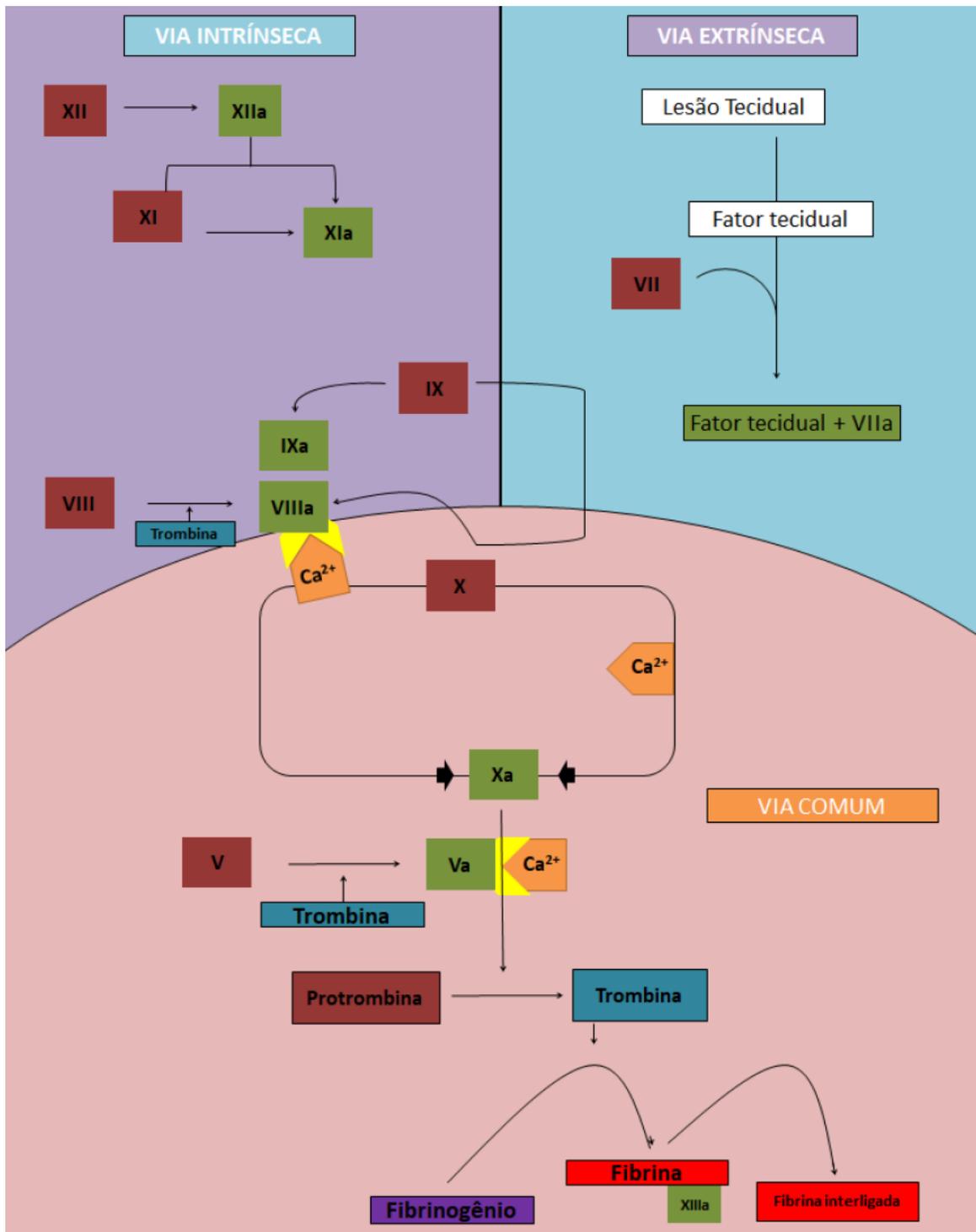
plaquetário. Os processos que envolvem essa conversão de fibrinogênio em fibrina fazem parte da hemostasia secundária (TOMAIUOLO, 2017).

A hemostasia secundária compreende a cascata de coagulação, que é um sistema finamente sintonizado que junto com a agregação plaquetária auxilia a restaurar da lesão. Os fatores de coagulação que participam dessa cascata são proteínas sintetizadas pelo fígado, que frente ao trauma são ativadas em cascata, o que origina o termo “cascata da coagulação” (TEN CATE et al., 2017).

O modelo clássico da cascata divide a coagulação sanguínea em duas vias, intrínseca e extrínseca, que culminam em uma via comum (Figura 2). A via extrínseca inicia-se com a ligação do fator VII ativado (FVIIa) presente no plasma ao fator tecidual (FT) liberado pelo endotélio lesionado. Na presença de cálcio, o complexo FVIIa/FT ativa o fator X (FXa) dando início a via comum da coagulação. O FXa forma um complexo com o fator V ativado (FVa), cálcio e fosfolípidios (FXa/FVa/Ca<sup>2+</sup>/fosfolípidios) que irá converter a protrombina (FII) em trombina (FIIa), que tem, por sua vez, a função de catalisar a conversão de fibrinogênio em monômeros de fibrina. Esses monômeros de fibrina se polimerizam e sofrem ação do complexo trombina/FXIIIa/Ca<sup>2+</sup>, o que no final gera um coágulo de fibrina covalentemente ligado e insolúvel (RODRIGUES et al., 2012).

O início da via intrínseca ocorre por meio da ativação de seus fatores pela trombina ou por superfícies carregadas negativamente. Nessa via, o fator XII ativado (FXIIa) irá converter o fator XI inativo (FXI) a sua forma ativa (FXIa) e, assim, o FXIa na presença de cálcio ativará o fator IX inativo (FIX) em sua forma ativa (FIXa). O FIXa liga-se então ao seu cofator VIII ativado (FVIIIa) formando o complexo FIXa/FVIIIa que, na presença de fosfolípidios plaquetários e cálcio, é capaz de ativar o FX, dando origem ao FXa (HOFFBRAND, 2013; RODRIGUES et al., 2012).

**Figura 2 - Hemostasia secundária**



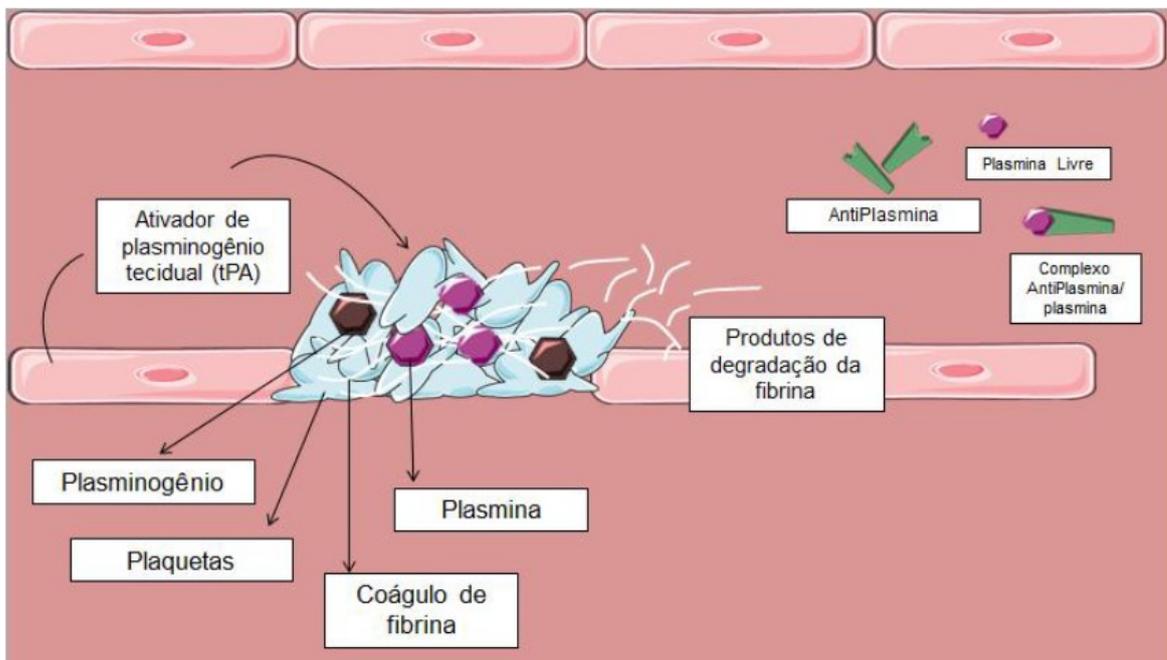
Fonte: adaptado de COTRAN; KUMAR; COLLINS, 2005.

### 3.1.3 Fibrinólise

Como o tecido lesionado é restaurado e o tampão hemostático não é mais necessário, ocorre de forma mais pronunciada a fibrinólise. A eficiência dessa fase é grandemente influenciada pela estrutura do coágulo, por isoformas e polimorfismos de fibrinogênio, pela taxa de geração de trombina, pela reatividade de células associadas a trombos, como plaquetas, e pelo meio bioquímico em geral (REZENDE, 2010).

A fibrinólise pode ser definida como a degradação da fibrina que é mediada pela plasmina. O sistema fibrinolítico é composto por várias proteínas (proteases séricas e inibidores) que regulam a geração de plasmina. A fibrinólise inicia-se com a ativação do plasminogênio (PLG) e sua conversão em plasmina. A plasmina livre no plasma é rapidamente destruída pela antiplasmina, já a plasmina ligada à fibrina é minimamente afetada pela antiplasmina e, assim, é capaz de exercer sua ação fisiológica, ou seja, degradar a fibrina e conseqüentemente o coágulo, gerando produtos de degradação de fibrinogênio/fibrina (PDF), como o dímero D (Figura 3) (GUYTON; HALL, 2006; RODRIGUES, 2012).

**Figura 3 - Fibrinólise**



Fonte: adaptado de COTRAN; KUMAR; COLLINS, 2005.

## 3.2 PLANTAS MEDICINAIS

### 3.2.1 *Vitex montevidensis*

Conhecida popularmente como tarumã e/ou azeitona-do-mato, a espécie *V. montevidensis* pertencente à família Lamiaceae e pode ser encontrada em vários estados brasileiros como Minas Gerais e Mato Grosso do Sul, mas é principalmente encontrada nos estados de Santa Catarina e Rio Grande do Sul, assim como em países fronteiros, como Argentina e Paraguai (LORENZI, 2008; MORES et al., 2018).

A árvore da tarumã tem altura entre cinco e vinte metros (Figura 4, Painel A), e seus períodos de floração são entre outubro e dezembro, seus frutos são comestíveis com sabor adocicado e ficam maduros de janeiro a março (MORES et al., 2018). Popularmente, as folhas de *V. montevidensis* (Figura 4, Painel B) são utilizadas na forma de chá, preparados pelo processo de infusão, como tratamento para quadros de hemorroidas, como depurativa do sangue (ação hipocolesterolêmica), e como anti-inflamatória (LONGHI, 1995; MORES et al., 2018). Além das folhas, a casca da planta também pode ser utilizada para o tratamento em casos de hipertensão arterial e inflamação em órgãos como útero, bexiga e próstata (MORES et al., 2018). Muito das suas multifunções estão associadas aos metabolitos secundários que fazem parte de sua composição da planta, sendo as principais classes os fenóis, os taninos e as saponinas (BRUM et al., 2012).

**Figura 4** - Árvore e folhas de tarumã (*Vitex montevidensis*)



Painel A – Árvore de tarumã; Painel B – Folhas e flores de tarumã. Fonte: LORENZE, 2008.

### 3.2.2 *Plantago major*

Popularmente conhecida como tanchagem ou tansagem esta planta pertencente à família Plantaginaceae que possui cerca de 90 gêneros e mais de 2000 espécies. A tanchagem pode ser encontrada principalmente em regiões de clima temperado, incluindo as regiões sul e sudeste do Brasil (SANTOS, 2017).

É uma planta de aproximadamente 15 cm de altura que possui folhas com formato ovalado e flores de tamanho pequeno (Figura 5). Usualmente é utilizada na forma de chá ou tintura, sendo utilizado de 6-9 g da planta para 150 mL de água para a preparação do chá (BRASIL, 2014). Popularmente usada como: antidiarreica, expectorante, diurética e cicatrizante, e também é extremamente conhecida por combater infecções nas vias respiratórias (SANTOS, 2017). A tanchagem apresenta em sua composição metabólitos

secundários como flavonoides, fenóis e terpenos que parecem ser os responsáveis pelas suas propriedades sobre o organismo humano (BRASIL, 2012; SANTOS, 2017)

**Figura 5 - Tanchagem (*Plantago major*)**



Fonte: JARDIM BOTÂNICO UTAD, 2019.

### 3.2.3 *Maytenus ilicifolia*

Popularmente conhecida como espinheira-santa, *M. ilicifolia* recebeu esse nome por apresentar espinhos nas bordas de suas folhas (Figura 6). A espécie pertence à família Celastraceae é uma árvore de porte pequeno e ramificada em sua base e pode ser encontrada principalmente nos estados do sul do país (MARIOT; BARBIERI, 2007).

Sua utilização se dá pelo uso das folhas, cascas ou raízes em forma de chá, onde é utilizados entre 2 a 5 gramas das folhas da planta para 150 mL de água, e é preparada em infusão (ALMEIDA et al., 2015). Ela é indicada principalmente para problemas digestivos, sendo conhecida por sua ação antiulcerosa, cicatrizante, antiflatulência e antiácida (MARIOT, BARBIERI, 2007; HOLNIK et al., 2015).

Todas as atividades e efeitos que a planta apresenta sobre o organismo humano parecem estar relacionados com metabolitos secundários que são encontrados em sua

composição, entre eles os principais são taninos, triterpenos e flavonoides (MARIOT, BARBIERI, 2007; HOLNIK, 2015).

**Figura 6** – Espinheira-santa (*Maytenus ilicifolia*).



Fonte: APREMAVI, 2019.

## 4 METODOLOGIA

### 4.1 OBTENÇÃO DAS PLANTAS MEDICINAIS

As plantas frescas foram adquiridas sem rótulo em estabelecimento comercial informal no município de Xanxerê, localizado no extremo oeste do estado de Santa Catarina no mês de julho de 2019. As folhas e caules dos exemplares obtidos foram secos à temperatura ambiente e armazenadas em embalagens de papel até o momento do preparo dos extratos brutos e chás.

### 4.2 PREPARO DOS EXTRATOS BRUTOS ETANÓLICOS E CHÁS

#### 4.2.1 Extratos brutos etanólicos

As partes selecionadas das plantas foram primeiramente trituradas em moinho de facas e pesadas. Posteriormente, adicionou-se 10 mL de álcool etílico absoluto (Sigma-Aldrich®, St. Louis, EUA) às partes moídas das plantas e a mistura foi colocada em banho de ultrassom, em temperatura ambiente, por uma hora. Após, os extratos foram filtrados, armazenados em frasco de vidro âmbar previamente pesado e então colocadas na capela de exaustão para a completa evaporação do solvente. Após essa etapa, os extratos brutos foram pesados e dissolvidos em dimetilsulfóxido (DMSO, Sigma-Aldrich®, St. Louis, EUA) na concentração estoque de 0,0025 g/mL e armazenados a 2-8 °C. Para a realização dos experimentos foram utilizadas soluções preparadas a partir da solução estoque e diluídas em tampão fosfato-salino (PBS) no mesmo dia do experimento, de forma que a concentração final dos extratos brutos variasse entre 800 e 100 µg/mL. O DMSO 0,0025% (concentração final) foi utilizado como controle negativo para todos os experimentos com extratos brutos.

#### 4.2.2 Chás

Para o preparo dos chás, utilizaram-se indicações de preparo sugeridas por artigos científicos e *sites* de medicina popular (ALMEIDA et al., 2014; BRUM, 2012; HOLNIK, 2012; MARIOT, 2007; MORES et al., 2018; SANTOS, 2017; ROCHA, 2014). Brevemente,

para o preparo dos chás das plantas, foram selecionadas de três a quatro folhas da planta e, após a seleção, essas foram lavadas e secas. Posteriormente, as folhas foram colocadas em infusão com 200 mL de água fervente por 15 minutos. Após, a infusão foi filtrada e utilizada no mesmo dia para a realização dos ensaios. Como controle negativo para os experimentos com chás utilizou-se água, previamente fervida.

#### 4.3 SELEÇÃO DE PARTICIPANTES E COLETA DAS AMOSTRAS

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética de Pesquisa em Seres Humanos da Universidade Federal de Santa Catarina (Anexo A). Para a realização do trabalho, foram utilizadas amostras de sangue anticoaguladas com citrato de sódio 0,38% de indivíduos clinicamente saudáveis atendidos no Laboratório de Análises Clínicas do Hospital Universitário Polydoro Ernani de São Thiago da Universidade Federal de Santa Catarina (HU/UFSC/EBSERH). Aos participantes foi dada uma explicação sobre a pesquisa, seus riscos e benefícios, e os que concordaram em participar do estudo assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE). Após a assinatura do TCLE, foram coletados até dois tubos de 3 mL de sangue total de cada doador por meio de punção venosa. Todos os ensaios foram realizados com amostras de pelo menos três indivíduos diferentes.

#### 4.4 ESTUDOS DE COAGULAÇÃO SANGUÍNEA

Os estudos de coagulação foram realizados de acordo com Triplett, Harms e Koepke (1978) utilizando-se coagulômetro semi-automatizado (CLOTimer, Quick Timer). Para os ensaios de coagulação, foi utilizado um *pool* de plasma pobre em plaquetas (PPP) obtido pela centrifugação do sangue citratado a 1.107 g por 15 minutos à temperatura de 8 °C. Após a obtenção do *pool* de PPP, 100 µL deste foram incubados a 37 °C por 5 minutos com 10 µL dos extratos brutos, chá ou de DMSO 0,0025%. Em seguida, foram realizados os testes de TP ou TTPa conforme bula do conjunto diagnóstico. Todos os experimentos foram realizados em triplicata e em até três horas após a coleta da amostra.

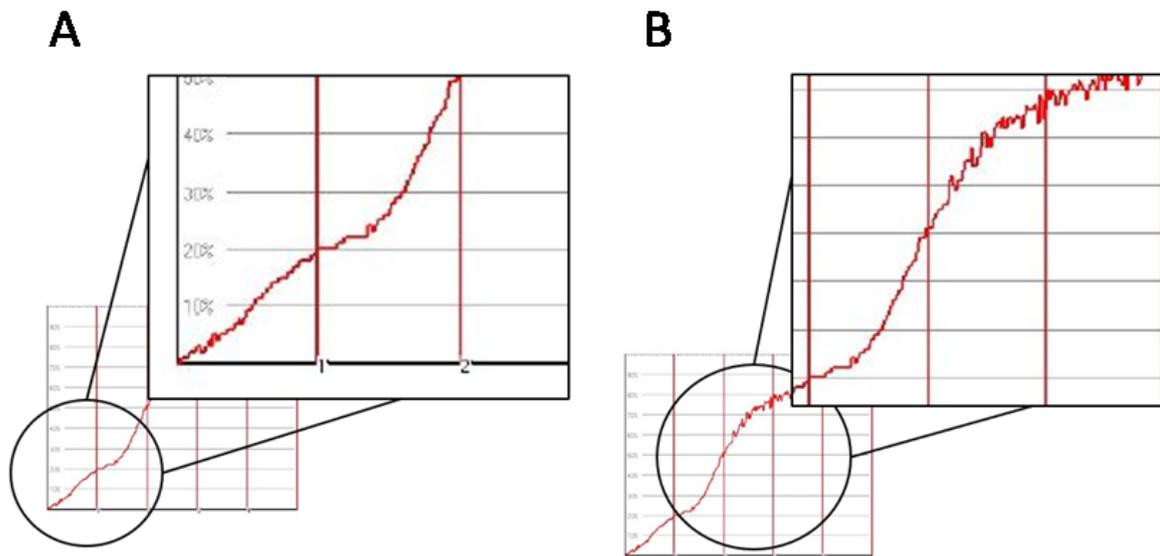
#### 4.5 ESTUDOS DE AGRAGAÇÃO PLAQUETÁRIA

A agregação plaquetária foi avaliada de acordo com Born e Cross (1963), e utilizou-se um agregômetro semi-automatizado (AgreGO, Qualiterm). As plaquetas foram isoladas através de centrifugação do sangue citratado a 123 g por 10 minutos à temperatura ambiente para a obtenção do plasma rico em plaquetas (PRP). As plaquetas foram contadas em câmara de Neubauer e reajustadas com PBS para 250.000 plaquetas/mm<sup>3</sup>. Para avaliar os efeitos dos extratos das plantas sobre a agregação plaquetária, as plaquetas isoladas foram incubadas a 37 °C por 5 minutos com 10 µL dos extratos brutos, do chá ou de DMSO 0,0025%. A seguir, as amostras foram estimuladas individualmente com ADP (10 µM; Sigma-Aldrich®, St. Louis, EUA) ou epinefrina (6 µM; Hipolabor, Minas Gerais, BR), e a agregação foi acompanhada por 5 minutos. Para acertar a linha de base de turbidez da amostra, foi utilizado o PPP da mesma amostra. Todos os experimentos foram efetuados em triplicata e dentro de um período de três horas após a coleta da amostra.

#### 4.6 ANÁLISE DAS CURVAS DE AGREGAÇÃO PLAQUETÁRIA

A agregação por turbidimetria baseia-se em um sistema fotométrico capaz de captar a alteração da transmitância de um PRP sob agitação constante, adicionando-se um agente agregante, como o ADP e a epinefrina. Por meio dessa metodologia, é possível observar que a agregação possui uma resposta bifásica, composta pela fase de ativação plaquetária frente ao estímulo com o agonista, denominada agregação reversível ou primeira onda (Figura 7, Painel A), seguida pela amplificação de sinal, liberação do conteúdo granular e agregação irreversível, o que dá origem a segunda onda observada no gráfico de porcentagem de agregação (Figura 7, Painel B) (RODRIGUES, 2012; TOMAIUOLO, 2017). Ao observar o perfil da curva de agregação gerado após o tratamento do PRP com o extrato ou chá, pode-se avaliar como este interfere nas diferentes fases da cinética de agregação durante a formação do agregado.

**Figura 7** – Perfil da curva de agregação plaquetária.



Painel A – Primeira onda da curva de agregação. Painel B – Segunda onda da curva de agregação. Fonte: A autora

#### 4.7 DETERMINAÇÃO DE $CI_{50}$ DOS EXTRATOS BRUTOS E DO CHÁ

A  $CI_{50}$  foi calculada apenas para os extratos brutos cuja ação fizeram com que agregação plaquetária fosse inferior a 50%, ou que aumentaram o tempo de TP e TTPA em 50% na concentração de 800  $\mu\text{g/mL}$ . Para a determinação da  $CI_{50}$ , foram realizadas diluições seriadas dos extratos brutos na razão de dois. Os extratos nas suas variadas concentrações foram utilizados nos ensaios de agregação plaquetária como anteriormente descrito. Todos os ensaios foram realizados em triplicata. A  $CI_{50}$  foi obtida a partir da curva concentração-resposta, utilizando-se o software GraphPad Prism 5.

#### 4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

O banco de dados e a análise estatística foram realizados com o auxílio do software MedCalc<sup>®</sup> v.18.11.6. As variáveis numéricas foram expressas como média e desvio-padrão. As médias das variáveis foram comparadas utilizando-se o teste t de Student para amostras independentes e foi adotado um nível de significância de 5% ( $P \leq 0,05$ ).

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 PREPARAÇÃO DOS EXTRATOS BRUTOS ETANÓLICOS

Para a preparação dos extratos brutos etanólicos das plantas foram feitas pré-seleções das partes que seriam utilizadas. Para o extrato de *P. major* e de *M. ilicifolia* foram utilizadas apenas as folhas, enquanto para *V. montevidensis* foram usadas as folhas juntamente com o caule. A escolha dessas partes pode ser justificada pela alta concentração de metabólitos secundários que se acumulam nessas regiões. Adicionalmente, já é descrito na literatura popular e científica o uso dessas estruturas para a realização de infusões e preparações de extratos (ALMEIDA, 2014; BRUM, 2012; HOLNIK, 2012; MARIOT, 2007; MORES et al., 2018; SANTOS, 2017; ROCHA, 2014).

Após a seleção das partes, essas foram trituradas em moinho de facas e pesadas. Posteriormente, o extrato bruto etanólico foi obtido e também pesado (Tabela 1).

**Tabela 1** – Massa das partes das plantas e dos extratos brutos.

<b>Planta</b>	<b>Massa das partes trituradas</b>	<b>Massa dos extratos</b>
<b>PMB (<i>Plantago major</i>)</b>	2,7846 g	0,0300 g
<b>MIB (<i>Maytenus ilicifolia</i>)</b>	2,7566 g	0,0408 g
<b>VMB (<i>Vitex montevidensis</i>)</b>	6,9551 g	0,0132 g

Fonte: A autora.

### 5.2 ATIVIDADE DOS EXTRATOS BRUTOS SOBRE A COAGULAÇÃO SANGUÍNEA

O presente estudo avaliou o efeito dos extratos brutos de três plantas encontradas no Brasil na coagulação sanguínea sobre a via extrínseca (TP) e a via intrínseca (TTPa) da coagulação. Na Tabela 2 podem ser vistos os resultados dos experimentos.

**Tabela 2** - Efeito dos extratos brutos (800 µg/mL) sobre o tempo de protrombina (TP) e o tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPa).

Tratamento	TP	TTPa
	Média ± DP (s)	Média ± DP (s)
<b>Controle DMSO (0,0025%)</b>	14,8 ± 0,8	28,1 ± 1,9
<b>PMB (<i>Plantago major</i>)</b>	13,4 ± 1,0	31,0 ± 1,1*
<b>MIB (<i>Maytenus ilicifolia</i>)</b>	13,4 ± 0,6	40,6 ± 1,9*
<b>VMB (<i>Vitex montevidensis</i>)</b>	12,3 ± 1,8	25,7 ± 0,1

DP – desvio padrão. \* Prolongamento significativo em relação ao controle ( $P \leq 0,05$ ). Fonte: A autora.

Como pode ser observado, os extratos PMB e MIB prolongaram significativamente apenas o TTPa, sugerindo que os dois extratos atuam especificamente sobre os fatores e processos envolvidos com a via intrínseca da coagulação sanguínea. O extrato VMB não prolongou de forma não significativa os dois parâmetros, mostrando que esse não apresenta efeito anticoagulante.

Os extratos brutos são misturas de compostos presentes nas partes das plantas. Como já mencionado, *M. ilicifolia* e *P. major* são ricas em flavonoides, taninos e triterpenos, que são metabólitos secundários conhecidos por exercerem atividade inibitória sobre a coagulação sanguínea (AL-SNAFI, 2017; COSTA, 2015; DURAIRAJ, 2010). Al-Snafi (2017) descreveu o efeito anticoagulante de *Allium sativum*, popularmente conhecido com alho, que também possui flavonoides, dentre eles quercetina (flanonol), apigenina (flavona) e miricetina (flavonol), como seus metabolitos. Além dos flavonoides, o alho tem presente na sua composição metabolitos como os organosulfurados e terpenóides (MISTERIO DA SAUDE E ANVISA, 2013). Um estudo realizado com extratos isolados de *Allium sativum* demonstrou que os apigeninas e os organosulfurados presentes na planta, em conjunto, atuam reduzindo a concentração de cálcio intracelular e inibindo o metabolismo do AA e a secreção de mediadores da amplificação de sinal (EL HAOUARI; ROSADO, 2016). Dessa forma, no presente trabalho, o efeito dos extratos etanólicos pode estar relacionado com a presença de um único metabólito ou com o efeito sinérgico de vários.

Na prática clínica, um dos anticoagulantes mais utilizados é a heparina não fracionada. Como mencionado anteriormente, ela atua inibindo fatores ativos da coagulação e age, principalmente, sobre fatores da via intrínseca. Na rotina clínica, pacientes que fazem uso

de heparina não fracionada devem manter os valores de relação TTPa do paciente/TTpa do controle entre 1,5 e 2,0 (BRASIL, 2010). No caso dos extratos PMB e MIB, as relações obtidas foram aproximadamente de 1,1 e 1,4, respectivamente, ou seja, inferiores ao alvo terapêutico. Dessa forma, apesar dos prolongamentos significativos de TTPa após o tratamento com PMB e MIB, esses resultados não foram considerados promissores e, portanto, não foi dada continuidade às investigações sobre os efeitos anticoagulantes desses dois extratos. No entanto, seria interessante realizar o isolamento dos constituintes desses extratos brutos e testar os seus efeitos sobre a coagulação, de forma a identificar quais têm ação sobre a hemostasia secundária e seus mecanismos de ação, pois, ao trabalhar com compostos isolados, seria possível utilizá-los em concentrações maiores, de forma a obter-se novas moléculas com atividade clinicamente significativa.

### 5.3 ATIVIDADE DOS EXTRATOS BRUTOS SOBRE A AGREGAÇÃO PLAQUETÁRIA

O presente estudo também avaliou o efeito dos extratos brutos sobre a agregação plaquetária induzida por dois agonistas diferentes, o ADP e a epinefrina. Na Tabela 3 pode-se ver a média de agregação do PRP após o tratamento com os extratos.

**Tabela 3** - Efeito dos extratos brutos de PMB, MIB e VMB (800 µg/mL) sobre a agregação plaquetária induzida por adenosina difosfato (ADP) e epinefrina.

Tratamento	ADP	Epinefrina
	Média ± DP (%)	Média ± DP (%)
<b>Controle DMSO (0,0025%)</b>	89,1 ± 3,6	87,1 ± 3,6
<b>PMB (<i>Plantago major</i>)</b>	40,2 ± 2,9*	48,2 ± 2,9*
<b>MIB (<i>Maytenus ilicifolia</i>)</b>	16,9 ± 3,9*	14,8 ± 3,9*
<b>VMB (<i>Vitex montevidensis</i>)</b>	57,5 ± 6,1*	63,0 ± 6,1*

DP – desvio padrão. \* Diferença significativa em relação ao controle ( $P \leq 0,05$ ). Fonte: A autora.

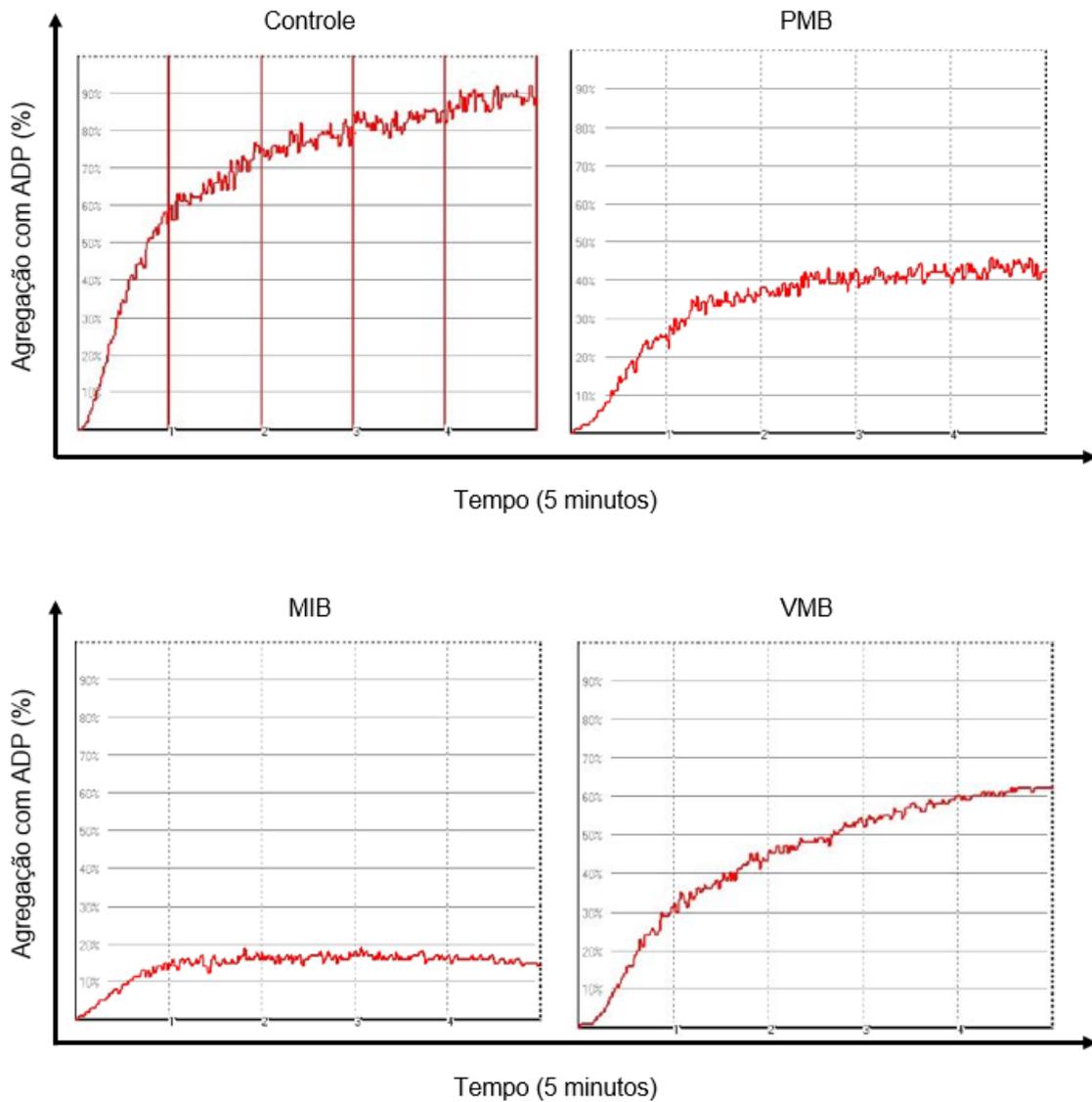
Como se pode observar, todos os extratos apresentaram efeito antiagregante ao inibir significativamente a agregação plaquetária quando comparado ao controle. Dentre os três extratos, o que se mostrou menos promissor foi o VMB, que apresentou porcentagens de agregação do PRP superiores a 50% após o tratamento. Porcentagens de agregação superiores

a 50% não são consideradas promissoras, uma vez que a  $CI_{50}$  calculada provavelmente seria muito alta, o que dificultaria a sua utilização em modelos *in vivo*. Por isso, optou-se por não dar continuidade às investigações do potencial antiagregante desse extrato.

Já os extratos PMB e MIB tiveram efeitos significativos e promissores, uma vez que as porcentagens de agregação foram inferiores a 50% para os dois agonistas utilizados. Da mesma forma que o efeito anticoagulante encontrado para esses extratos, provavelmente os efeitos sobre a agregação plaquetária podem estar relacionados com os metabolitos secundários que são encontrados nessas plantas. As duas plantas (PMB e MIB) são ricas em flavonoides e estudos encontrados na literatura já demonstram seus efeitos sobre a hemostasia humana (FAGGIO, 2017; ROCHA et al., 2014; SANTOS, 2017; HOLNIK, 2015). Estudos envolvendo plantas como *Campomanesia xanthocarpa*, *Arbutus unedo* e *Ginkgo biloba*, ricas em flavonoides, enfatizam o alto poder antiagregante que esse metabolito tem sobre a agregação plaquetária (HAOUARI, 2016; SOGUT, 2015).

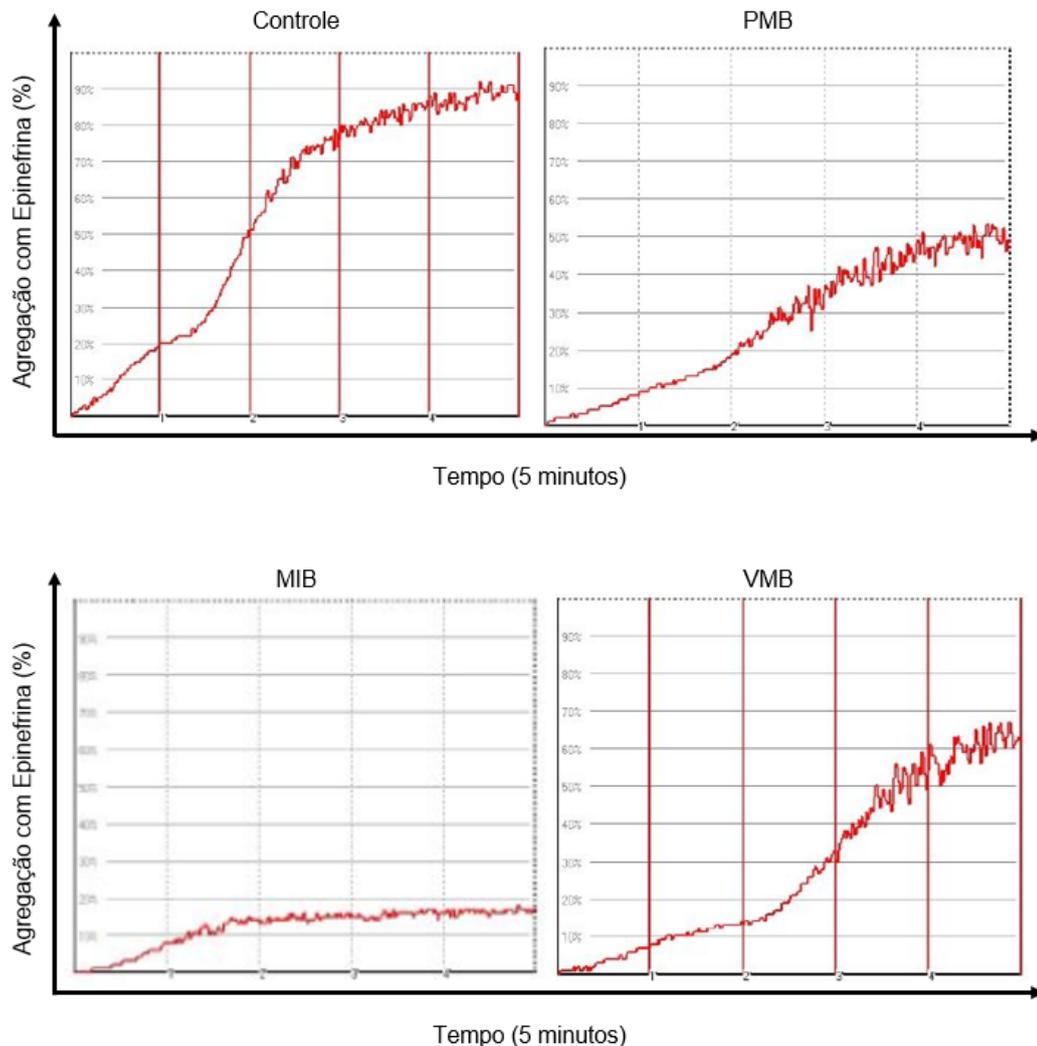
Além do percentual de agregação, também foi avaliado o efeito dos extratos sobre o perfil da curva de agregação do PRP (Figura 8 e 9).

**Figura 8** – Efeito do extrato bruto PMB, MIB e VMB (800 µg/mL) sobre o perfil da curva de agregação plaquetária induzida por adenosina difosfato (ADP), em comparação com o controle



PMB - *Plantago major*; MIB - *Maytenus ilicifolia*; VMB - *Vitex montevidensis*. Fonte: A autora.

**Figura 9** - Efeito do extrato bruto PMB, MIB e VMB (800 µg/mL) sobre o perfil da curva de agregação plaquetária induzida por epinefrina, em comparação com o controle.



PMB - *Plantago major*; MIB - *Maytenus ilicifolia*; VMB - *Vitex montevidensis*. Fonte: A autora

Como anteriormente mencionado, a agregação possui uma resposta bifásica, composta pela fase de ativação plaquetária frente ao estímulo com o agonista, denominada agregação reversível ou primeira onda, seguida pela amplificação de sinal, liberação do conteúdo granular e agregação irreversível, o que dá origem a segunda onda de agregação (BERNARDI; MOREIRA, 2004).

Como se pode verificar nas Figuras 8 e 9, PMB e VMB inibiram parcialmente a segunda onda de agregação induzida pelos dois agonistas. Dessa forma, pode-se sugerir que

os constituintes desses extratos não sejam capazes a inibir os processos de transdução de sinal pró-agregante (primeira onda), mas sejam capazes de inibir os processos de amplificação de sinal que envolve, principalmente, a degranulação plaquetária e a produção de TXA2 por meio da ativação do metabolismo do ácido araquidônico. Estudos que avaliaram o efeito antiagregante de flavonoides já demonstraram que esse tipo de metabólito secundário pode atuar sobre esses mecanismos de amplificação de sinal (AL-SNAFI, 2015; EL HAOURI et al., 2016; ISMAIL IYNEM, 2013).

Em estudo realizado por Bijak et al. (2017) avaliou o efeito de flavonoides sobre a agregação plaquetária induzida por ácido araquidônico. Nesse estudo, após o tratamento das plaquetas com concentrações de 50  $\mu\text{M}$  e 100  $\mu\text{M}$ , obtiveram-se agregações plaquetárias tão baixas quanto 10%, o que demonstra que esses flavonoides são inibidores do metabolismo do ácido araquidônico. Outros estudos que avaliaram flavonoides extraídos de *Ginkgo biloba*, uma planta amplamente conhecida pelo seu efeito antiagregante, também demonstraram que esses metabólitos atuam inibindo a produção de TXA2 (AL-SNAFI, 2015; ISMAIL IYNEM et al., 2013).

Outro trabalho relatou que fenóis também apresentam atividade antiplaquetária. Nesse estudo, os fenóis, principalmente os tocofenóis, presentes nos óleos extraídos de *Argania spinosa* inibiram a síntese de TXA2, afetando, dessa forma, a amplificação de sinal pró-agregante da hemostasia primária (HAIMEUR et al., 2013).

Diferentemente de PMB e VMB, MIB parece inibir totalmente a segunda onda e parcialmente a primeira onde de agregação gerada pelos agonistas testados (Figuras 8 e 9). Com isso, pode-se sugerir que os constituintes desse extrato atuem inibindo os processos de transdução de sinal pró-agregante (primeira onda) que são desencadeados pela ligação do agonista ao seu receptor específico. Da mesma forma, essa atividade pode estar relacionada aos flavonoides presentes na planta. Um estudo demonstrou que flavonoides podem atuar aumentando as concentrações de monofosfato cíclico de adenosina (AMPc) nas plaquetas (EL HAOURI, 2016). O AMPc desempenha um papel importante nos processos de transdução de sinal e ativação plaquetária e, quando uma plaqueta é estimulada a agregar, as concentrações citoplasmáticas de AMPc diminuem. Portanto, ao promover o aumento da concentração de AMPc, o flavonóides estaria exercendo uma ação antiagregante (FAGGIO, 2017).

A atividade antiplaquetária também pode estar relacionada com outros metabólitos que não flavonóides. Um estudo demonstrou que os taninos apresentam atividade sobre a

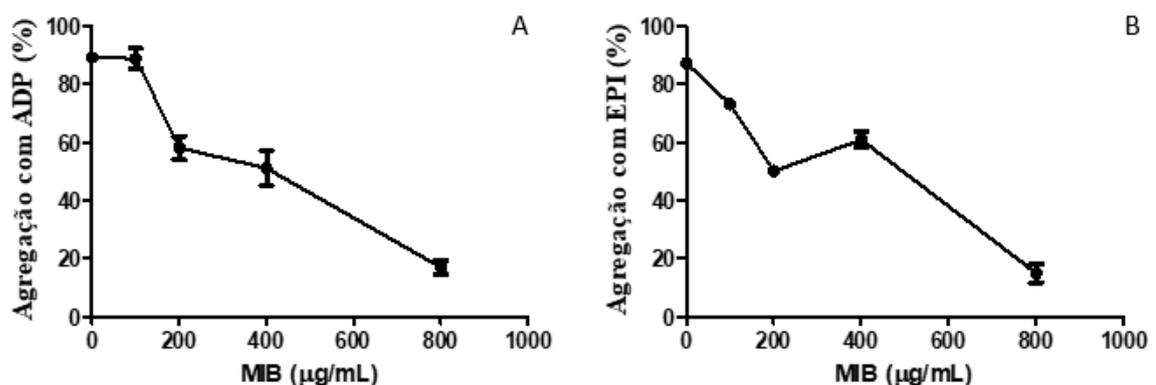
hemostasia humana ao inibir a agregação plaquetária induzida por ADP e AA por meio da diminuição da concentração de cálcio citosólico (MEKHFI et al., 2006).

Visto que vários tipos de metabólitos secundários podem ser responsáveis pelos efeitos observados no perfil da curva de agregação, ressalta-se que são necessários estudos de caracterização dos constituintes dos extratos brutos testados para se ter certeza de sua composição e, dessa forma, confirmar se o efeito antiagregante observado é relacionado aos flavonoides supostamente presentes nas plantas, ou a outro tipo de metabólito. Outra hipótese é que a ação observada seja resultado de um efeito conjunto dos vários tipos de metabólitos presentes nos extratos.

#### 5.4 DETERMINAÇÃO DE $CI_{50}$ DOS EXTRATOS BRUTOS

Como MIB foi capaz de inibir significativamente a agregação plaquetária induzida tanto por ADP quanto por epinefrina, foram realizadas diluições seriadas do extrato para investigar se essa atividade antiagregante de *M. ilicifolia* era concentração dependente (Figura 10).

**Figura 10** – Curvas de concentração resposta induzida por ADP e epinefrina em função de MIB.



Painel A – Curva de agregação concentração-dependente induzida por adenosina difosfato (ADP) em função do extrato bruto de MIB - *Maytenus ilicifolia*. Painel B – Curva de agregação concentração-dependente induzida por Epinefrina (EPI) em função do extrato bruto de MIB - *Maytenus ilicifolia*. (n=3) Fonte: A autora

Como pode ser observado na Figura 10, o extrato apresentou uma ação dependente da sua concentração. A partir das curvas de dose resposta, foram calculadas as  $CI_{50}$  do extrato MIB (Tabela 4). As duas  $CI_{50}$  foram muito semelhantes entre si, sugerindo que o extrato atue em mecanismos comuns às duas vias de ativação plaquetária.

**Tabela 4** – Efeito de MIB sobre a agregação plaquetária induzida por ADP e epinefrina.

Tratamento	$CI_{50}$	
	ADP Média $\pm$ DP ( $\mu\text{g/mL}$ )	Epinefrina Média $\pm$ DP ( $\mu\text{g/mL}$ )
<b>MIB (<i>Maytenus ilicifolia</i>)</b>	289,8 $\pm$ 7,3	274,8 $\pm$ 7,5

ADP – adenosina difosfato;  $CI_{50}$  – concentração inibitória de 50%; DP – desvio padrão. Fonte: A autora.

O extrato de PMB também apresentou significativa inibição da agregação plaquetária com os agonistas, porém por ultrapassar a linearidade da curva e ter valores maiores que 800  $\mu\text{g/mL}$ , não foi possível determinar as  $CI_{50}$  de PMB. Devido a essa elevada  $CI_{50}$ , não foi dada continuidade aos estudos com PMB.

## 5.5 EFEITO DOS CHÁS DAS PLANTAS COM RESULTADOS ANTIAGREGANTES PROMISSORES

Como o extrato bruto etanólico de MIB foi o que se apresentou mais promissor e o que possuía as melhores  $CI_{50}$  calculadas, decidiu-se avaliar se o chá obtido através da infusão das suas folhas, apresentaria algum efeito sobre a hemostasia sanguínea, haja visto que, na medicina popular, essa planta é consumida na forma de chá.

Como pode ser visto na Tabela 5, o chá de MIB foi capaz de inibir significativamente a agregação induzida por epinefrina, mas não por ADP. Esses resultados inferiores aos encontrados para o tratamento com extrato bruto estão provavelmente relacionados com os métodos de extração. Na utilização do chá de *M. ilicifolia*, a extração foi realizada através de infusão com água fervente, diferente do preparo do extrato bruto, com isso os resultados não foram significativos, pois provavelmente o chá concentra quantidades muito inferiores dos metabolitos ativos da planta, sendo necessário quantidades muito maiores para um possível efeito ser observado.

**Tabela 5** - Efeito do chá de MIB sobre a agregação plaquetária sanguínea induzida por adenosina difosfato (ADP) e epinefrina.

Tratamento	ADP	Epinefrina
	Média ± DP (%)	Média ± DP (%)
<b>Controle DMSO (0,0025%)</b>	89,0 ± 5,6	87,5 ± 2,1
<b>MIB (<i>Maytenus ilicifolia</i>)</b>	88,5 ± 6,4	68,7 ± 5,1*

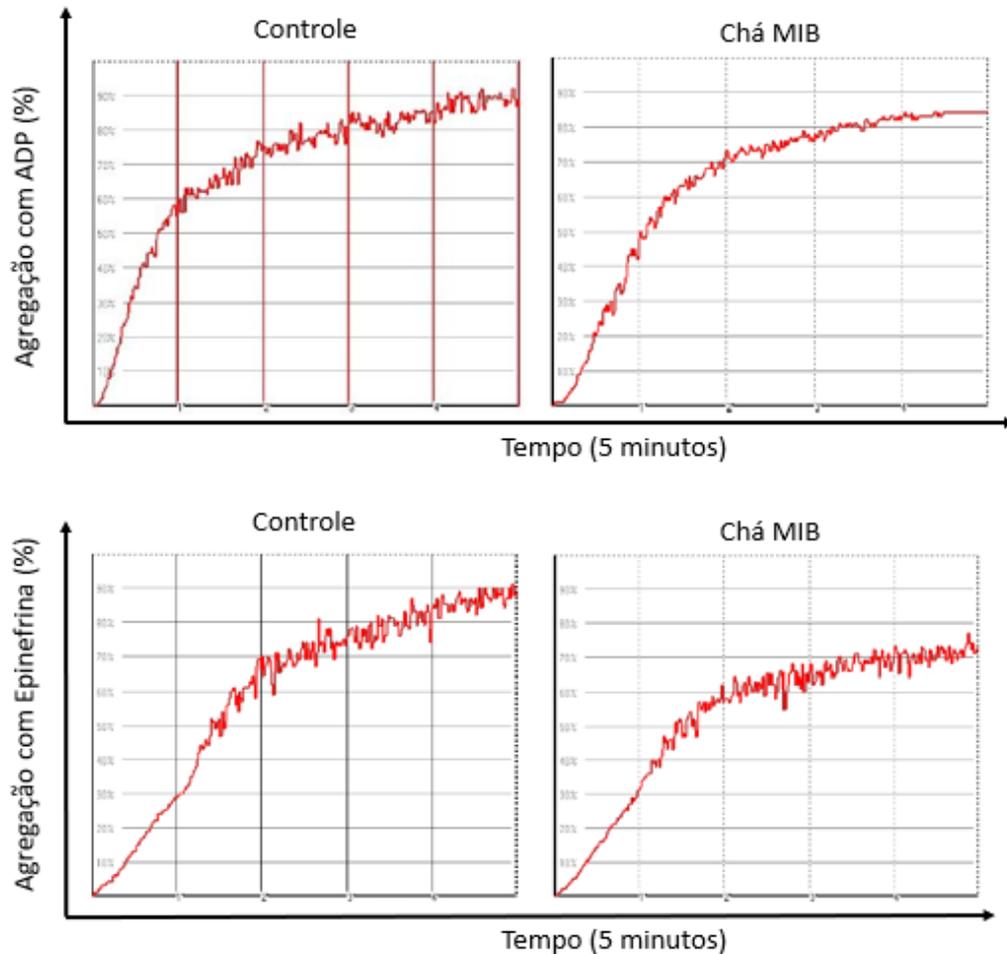
DP – desvio padrão. \* Diferença significativa em relação ao controle ( $P \leq 0,05$ ). Fonte: A autora.

Além do percentual de agregação, também foi avaliado o efeito do chá de MIB sobre o perfil da curva de agregação do PRP (Figura 11). Como se pode verificar, o chá não interferiu no perfil da curva de agregação induzida por ADP, mas inibiu fracamente a segunda onda de agregação induzida pela epinefrina. Esse resultado é diferente do encontrado para o extrato bruto etanólico de MIB, que inibiu totalmente a segunda onda e parcialmente a primeira onde de agregação gerada pelos dois agonistas testados.

A diferença entre a concentração dos metabólitos nas duas soluções pode estar relacionada com o solvente utilizado na extração e no tempo de extração. O extrato bruto foi extraído com álcool etílico absoluto em ultrassom por uma hora, que traz vantagens sobre o método da infusão para a preparação do chá que não utilizou ultrassom e foi preparado em 15 minutos. O ultrassom pode facilitar a extração, pois causa dilatação e hidratação dos materiais das plantas e causa alargamento dos poros da parede celular, com isso ocorre uma quebra da parede aumentando a penetração do solvente e assim aumentando o rendimento da extração (JAQUES, 2005; OLIVEIRA, 2016).

Em relação ao preparo do chá, o método de infusão em água fervente pode apresentar uma série de fatores que podem resultar em maior ou menor rendimento como o tempo de infusão, temperatura e grau de mineralização da água, bem como a granulometria do material vegetal utilizado (ALMEIDA et al, 2019). No experimento realizado e seus resultados não promissores referentes ao chá, esse desfecho pode estar relacionado não necessariamente a planta e suas propriedades, mas ao método utilizado. O método de infusão foi selecionado devido ao fato de ser o procedimento mais utilizado na medicina popular para a preparação de chás. No entanto, alguns fatores referentes a esse método podem ter interferido nos resultados, como o tempo de extração, que pode ter sido insuficiente. Além disso, outro ponto importante a ser considerado é a natureza do solvente, uma vez que a água pode competir pela dissolução do soluto (planta) caso o material esteja com uma taxa de umidade alta (VEGGI et al., 2009).

**Figura 11** - Efeito do chá MIB sobre o perfil da curva de agregação plaquetária induzida por ADP e epinefrina.



MIB - *Maytenus ilicifolia*; ADP - Adenosina difosfato. Fonte: A autora

Apesar de a atividade de MIB sobre o TTPa não ter sido clinicamente significativa, também avaliou-se a ação do seu chá sobre esse ensaio, uma vez que o resultado obtido foi muito próximo do clinicamente desejável. Como pode ser visto na Tabela 6, o chá não prolongou o TTPa, não apresentando, portanto, ação anticoagulante.

Como explicado anteriormente, o não prolongamento do tempo de TTPa pode ser justificado pela baixa concentração dos metabólitos secundários no chá pela forma de extração.

**Tabela 6** – Efeito do chá de MIB sobre o tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPa).

<b>Tratamento</b>	<b>TTPa</b>
	<b>Média ± DP (s)</b>
<b>Controle DMSO (0,0025%)</b>	26,5 ± 0,7
<b>MIB (<i>Maytenus ilicifolia</i>)</b>	24,4 ± 1,2

DP – desvio padrão. Fonte: A autora.

## 6 CONCLUSÃO

A compilação dos resultados permitiu concluir que:

- Os extratos brutos etanólicos de PMB e MIB possuem discreto efeito sobre a coagulação, ao prolongarem significativamente o TTPa;
- Os extratos brutos etanólicos de PMB, MIB e VMB apresentaram atividade antiagregante frente ao ADP e a epinefrina, mas apenas os extratos de PMB e MIB se mostraram promissores por gerarem agregações inferiores a 50% após o tratamento;
- Os extratos de PMB e VMB atuam inibindo a amplificação de sinal pró-agregante, enquanto MIB inibe a transdução de sinal pró-agregante gerado pela ligação do agonista;
- A ação antiagregante de MIB foi concentração dependente e sua  $CI_{50}$  para ADP e epinefrina foram de  $289,8 \pm 7,3 \mu\text{g/mL}$  e de  $274,8 \pm 7,5 \mu\text{g/mL}$ , respectivamente. A  $CI_{50}$  de PMB não pode ser calculada;
- O chá de MIB apresentou efeito inferior ao extrato etanólico ao inibir significativamente apenas a agregação induzida por epinefrina.

## 7 PERSPECTIVAS

- Identificar os metabólitos secundários presentes nos extratos etanólicos e no chá;
- Realizar o isolamento dos principais constituintes dos extratos;
- Avaliar qual(ais) compostos isolados são responsáveis pela atividade antiagregante e anticoagulantes das plantas;
- Investigar o mecanismo de ação desses compostos isolados.

## REFERÊNCIAS

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.

ALMEIDA, C. et al. Espinheira-santa (*Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reiss.): knowledge by herbalists and marketers in Pelotas (RS). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 17, n. 4, p. 722-729, 2015.

ALMEIDA, T. S et al. Influence of preparation procedures on the phenolic content, antioxidant and antidiabetic activities of green and black teas. **Braz. J. Pharm. Sci.** 2019; 55:e17695.

ANTUNES, A. L. et al. Efeito antiplaquetário do ácido acetilsalicílico em prevenção secundária do infarto agudo do miocárdio. *Revista transformar*, v. 8, n. 8, p. 179-192, 2016.

APREMAVI 2019. Espinheira-Santa, Um espinho que cura. <  
<https://apremavi.org.br/espinheira-santa-um-espinho-que-cura/>> Acesso em: 20/08/2019.

BITTENCOURT, N. C.; **Avaliação das provas da hemostasia primária em indivíduos atendidos nas clínicas odontológicas da Universidade Estadual de Feira de Santana.** *Brazilian Journal of Clinical Analysis*, v. 48, n. 2, p. 144-8, 2016.

BRASIL. Ministério da Saúde e Anvisa. **Monografia da Espécie *Plantago major* L.** (TANCHAGEM). Brasília, 2014.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Formulário terapêutico nacional 2010: Rename 2010/Ministério da Saúde, Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos, Departamento de Assistência Farmacêutica e Insumos Estratégicos**, 2. ed, p. 756-759. Brasília: Ministério da Saúde, 2010

BORN, G.V.; CROSS, M.J. Aggregation of blood platelets. **J Physiology**, v.168, p. 178-195, 1963.

BERNARDI, P. S. M.; MOREIRA, H. W. Análise dos traçados de ondas da agregação plaquetária em pacientes com doenças cardiovasculares em uso do ácido acetil salicílico comparados a doadores de sangue. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.**, v. 26, n. 4, p. 239-244, 2004.

BRUM, T. F. de et al. **Metabólitos secundários, composição química e atividade antioxidante do óleo essencial e das folhas de *Vitex megapotamica* (SPRENGEL) MOLDENKE.** 2012.

COSTA, N. C. et al. Atividade antimicrobiana e análise fitoquímica preliminar do extrato vegetal de alho no controle de fungos fitopatogênicos. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, 2017.

COTRAN, R. S.; KUMAR, V.; COLLINS, T. **Robbins pathologic basis of disease.** 7. izd. 2005.

CUNNINGHAM, F.; MENEZES, F. S.; Ethnopharmacology in Dublin: surveys on the medicinal plants use profile. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 21, n. 5, p. 814-817, 2011.

DAVID, B.; WOLFENDER, J.; DIAS, D. A. The pharmaceutical industry and natural products: historical status and new trends. **Phytochemistry Reviews**, v. 14, n. 2, p. 299-315, 2015.

DA SILVA SOARES, J. et al. Aspectos farmacogenéticos associados à resistência terapêutica antiplaquetária em pacientes com síndrome coronariana aguda. **Rev Bras Cardiol**, v. 23, n. 2, p. 131-142, 2010.

DE ANDRADE, P. B.; BORGES, L. S. R. Antiplaquetários nas síndromes coronarianas agudas. **International Journal of Cardiovascular Sciences**, v. 30, n. 5, p. 442-451, 2017.

DI MINNO, A. et al. Old and new oral anticoagulants: food, herbal medicines and drug interactions. **Blood Reviews**, v. 31, n. 4, p. 193-203, 2017.

EL HAOUARI, M.; ROSADO, J. A.; Medicinal plants with antiplatelet activity. **Phytotherapy Research**, v. 30, n. 7, p. 1059-1071, 2016.

DURAIRAJ, B.; DORAI, A. Antiplatelet activity of white and pink *Nelumbo nucifera* Gaertn flowers. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 46, n. 3, p. 579-583, 2010.

FAGGIO, C. et al. Flavonoids and platelet aggregation: a brief review. **European journal of pharmacology**, v. 807, p. 91-101, 2017.

FAWOLE, A.; DAW, H. A.; CROWTHER, M. A.; Practical management of bleeding due to the anticoagulants dabigatran, rivaroxaban, and apixaban. **Cleve Clin J Med**, v. 80, n. 7, p. 443-51, 2013.

GÓMEZ-OUTES, A. et al. Dabigatran, rivaroxaban, or apixaban versus enoxaparin for thromboprophylaxis after total hip or knee replacement: systematic review, meta-analysis, and indirect treatment comparisons. **Bmj**, v. 344, p. e3675, 2012.

GRIMALDO-GÓMEZ, F. A.; Fisiología de la hemostasia. **Revista Mexicana de Anestesiología**, v. 40, n. S2, p. 398-400, 2017.

GUYTON, A.C.; HALL, J.E.; **Tratado de Fisiologia Médica: Hemostasia e Coagulação Sanguínea**, 11 ed., Rio de Janeiro: Elsevier, 2006, pág. 457-68.

HAIMEUR, A; MESSAOURI, H; ULMANN, L; et al. 2013. Argan oil prevents prothrombotic complications by lowering lipid levels and platelet aggregation, enhancing oxidative status in dyslipidemic patients from the area of Rabat (Morocco). *Lipids Health Dis* 12: 107.

HEINRICH, M. Ethnopharmacology: quo vadis? Challenges for the future. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 24, n. 2, p. 99-102, 2014.

HEMOCENTRO UNICAMP, 2019. Doenças de Sangue. <https://www.hemocentro.unicamp.br/doencas-de-sangue/tromboses-venenosas>>. Acesso em: 02/06/2019

HOFFBRAND, A. V.; **Fundamentos em Hematologia**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2013.

HOLNIK, P. R. et al. Comparação do teor de taninos entre duas espécies de espinheira-santa (*Maytenus aquifolium* Mart. e *Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reissek) cultivadas no Horto Medicinal do Refúgio Biológico Bela Vista-RBBV da Itaipu Binacional-Foz do Iguaçu, PR-Brasil. **Rev. bras. plantas med**, v. 17, n. 3, p. 385-391, 2015.

ISMAIL IYNEN, M. D.; LEVENT ALBAYRAK, M. D. Hemostatic Efficacy of a Traditional Medicinal Plant Extract (Ankaferd Blood Stopper) in **Bleeding Control**. 2013.

JACQUES, R. A. Caracterização química da erva-mate (*Ilex paraguariensis*): aplicação de diferentes processos de extração e influência das condições de plantio sobre a composição química. 2005. 139 f. **Tese de Doutorado**, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brasil, 2005.

JARDIM BOTÂNICO UTAD 2019. *Plantago major*.  
<[https://jb.utad.pt/especie/Plantago\\_major\\_subesp\\_major](https://jb.utad.pt/especie/Plantago_major_subesp_major)>. Acesso em 02/11/2019.

KOUPENOVA, M. et al. Thrombosis and platelets: an update. **European heart journal**, v. 38, n. 11, p. 785-791, 2016.

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

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

LORENZI, H. Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas do Brasil. 5.ed. Nova Odessa, SP. **Instituto Plantarum**, v. 1, 2008

LI, Y.H. et al. 2018 Expert Consensus on the Management of Adverse Effects of Antiplatelet Therapy for Acute Coronary Syndrome in Taiwan. **Acta Cardiologica Sinica**, v. 34, n. 3, p. 201, 2018.

MEKHFI, H;EIHAOUAR; M; BNOUHAM, M; AZIZ ,M; ZIYYAT, A, LEGSSYER, A. 2006. Effects of extracts and tannins from *Arbutus unedo* leaves on rat platelet aggregation. *Phytother Res* 20:135–139.

MINISTÉRIO DA SAÚDE E ANVISA (Brasil). Ministério da Saúde e Anvisa. MONOGRAFIA DA ESPÉCIE *Allium sativum* (ALHO)rativa. Brasília: [s. n.], 2013. 66 p.

MARIOT, M.P.; BARBIERI, R.L. Metabólitos secundários e propriedades medicinais da espinheira-santa (*Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reiss. e *Maytenus aquifolium* Mart. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v.9, n.3, 2007.

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

MIRA, A.; ALKHIARY, W.; SHIMIZU, K.; Antiplatelet and anticoagulant activities of *Angelica shikokiana* extract and its isolated compounds. **Clinical and Applied Thrombosis/Hemostasis**, v. 23, n. 1, p. 91-99, 2017.

MORES, S. et al. Avaliação da atividade antioxidante de extratos de alecrim (*Rosmarinus officinalis*) e tarumã (*Vitex megapotamica*). 2018.

OLIVEIRA, R. S.; ROCHA, J. S.; PINHEIRO, K. H.; MENDONÇA, M. P.; BARÃO, C. E. Aplicação de processo ultrassom na extração de catequinas dos resíduos de chá verde. **Brazilian Journal of Food Research**, Campo Mourão, v. 7, n. 3, p. 29-40, set./dez. 2016.

RABELO, R. B. et al. A comissão nacional de incorporação de tecnologias no SUS. **Revista Eletrônica Gestão & Saúde**, p. ág. 3225-3240, 2015.

RANGEL, M.; BRAGANÇA, F. C. R. Representações de gestantes sobre o uso de plantas medicinais. **Rev Bras Med**, Botucatu, v. 11, n. 1, p. 100-109, 2009.

REZENDE, S. M.; Distúrbios da hemostasia: doenças hemorrágicas. Ver **Med Minas Gerais**, v. 20, n. 4, p. 534-53, 2010.

ROCHA, J. N. et al. Desenvolvimento de *Maytenus ilicifolia* e de seus polifenóis totais sob condição de sombreamento e poda. **Rev. Bras. Pl. Med**, v. 16, n. 3 supl I, p. 663-669, 2014

ROCHA, R. M.; MARTINS, W. A. Manual de prevenção cardiovascular. Rocha RM. **Epidemiologia das doenças cardiovasculares e fatores de risco**. São Paulo: Planmark, p. 10-5, 2017.

RODRIGUES, E. S.; CASTILHO-FERNANDES, A.; FONTES, Aparecida Maria. Novos conceitos sobre a fisiologia da hemostasia. **Revista da Universidade Vale do Rio Verde**, v. 10, n. 1, p. 218-233, 2012.

SANTOS, K. B. dos. Teores de compostos bioativos e capacidade antioxidante das folhas da tansagem (*Plantago major*). **Trabalho de Conclusão de Curso**. Universidade Tecnológica Federal do Paraná. 2017.

SOGUT, O. et al. Hemostatic efficacy of a traditional medicinal plant extract (Ankaferd Blood Stopper) in bleeding control. **Clinical and Applied Thrombosis/Hemostasis**, v. 21, n. 4, p. 348-353, 2015.

SOUZA, L. S. S.. Extratos aquosos de alho (*Allium sativum* L.) e sisal (*Agave sisalana* Perrine) no controle de *Aspergillus niger* e da podridão vermelha do sisal, Cruz das Almas, BA, 2010.

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.

TRIPLETT, D.A.; HARMS, C.S.; KOEPKE, J.A. **The effect of heparin on the activated partial thromboplastin time.** Am J Clin Pathol, v. 70, n. 3, suppl. 3, p. 556-559, 1978.

VEGGI, P. C. et al. Obtenção de extratos vegetais por diferentes métodos de extração: estudo experimental e simulação dos processos. 2009.

WEITZ, Jeffrey I.; EIKELBOOM, John W. **Advances in thrombosis and hemostasis: an introduction to the compendium.** 2016.

WHO. 2017. **Cardiovascular diseases (CVDs)** <[https://www.who.int/newsroom/factsheets/detail/cardiovascular-diseases-\(cvds\)](https://www.who.int/newsroom/factsheets/detail/cardiovascular-diseases-(cvds))> Acesso em: 05/05/2019.

WTD 2019. **World Thrombosis Day.**

<<http://www.worldthrombosisday.org/issue/thrombosis/>> Acesso em: 08/05/2019.

YACOUBA, D. Biochemical and Hemostatic properties of herbal plants used for the treatment of bleeding in Mali et al. **Academia Journal of Medicinal Plants**, p. 241-248, August, 2018.

YUSUF, S. ZHAO, F. MEHTA, SR. et al. Effects of clopidogrel in addition to aspirin in patients with acute coronary syndromes without ST-segment elevation. **N Engl J Med**; p. 345:494-502. 2001

## ANEXO A – Parecer do Comitê de Ética de Pesquisa em Seres Humanos

UNIVERSIDADE FEDERAL DE  
SANTA CATARINA - UFSC



### 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 Vítor 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

UNIVERSIDADE FEDERAL DE  
SANTA CATARINA - UFSC



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 haverá 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_BASICAS_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

UNIVERSIDADE FEDERAL DE  
SANTA CATARINA - UFSC



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