

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

Stephanie Viegas Gkionis

**Efeito antiagregante de extratos brutos etanólicos de *Cynara scolymus L.*, *Citrus sinensis*,
Musa spp., *Platonia insignis*, *Litchi chinensis*, *Mangifera indica*, *Nephelium lappaceum*,
Libidibia ferrea e *Carica papaya***

Florianópolis

2022

Stephanie Viegas Gkionis

**Efeito antiagregante de extratos brutos etanólicos de *Cynara scolymus L.*, *Citrus sinensis*,
Musa spp., *Platonia insignis*, *Litchi chinensis*, *Mangifera indica*, *Nephelium lappaceum*,
Libidibia ferrea e *Carica papaya***

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 Farmacêutica. Orientadora: Profª. Ana Carolina Rabello de Moraes, Dra.

Florianópolis

2022

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

Gkionis, Stephanie

Efeito antiagregante de extratos brutos etanólicos de *Cynara scolymus* L., *Citrus sinensis*, *Musa* spp., *Platonia insignis*, *Litchi chinensis*, *Mangifera indica*, *Nephelium lappaceum*, *Libidibia ferrea* e *Carica papaya* / Stephanie Gkionis ; orientador, 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. Extratos brutos. 4. Plantas. I. Rabello de Moraes, Ana Carolina .
II. Universidade Federal de Santa Catarina. Graduação em Farmácia. III. Título.

Stephanie Viegas Gkionis

**Efeito antiagregante de extratos brutos etanólicos de *Cynara scolymus L.*, *Citrus sinensis*,
Musa spp., *Platonia insignis*, *Litchi chinensis*, *Mangifera indica*, *Nephelium lappaceum*,
Libidibia ferrea e *Carica papaya***

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

Florianópolis, 6 de Dezembro de 2022

Profª. Liliete Canes de Souza, Dra.
Coordenadora do Curso

Banca Examinadora:

Profª. Ana Carolina Rabello de Moraes, Dra.
Orientadora
Universidade Federal de Santa Catarina

Profª. Maria Cláudia Santos da Silva, Dra.
Avaliadora
Universidade Federal de Santa Catarina

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

RESUMO

A hemostasia é um mecanismo fisiológico que envolve o equilíbrio dinâmico entre os fatores pró-coagulantes e anticoagulantes. Um desequilíbrio da hemostasia a favor dos mecanismos pró-coagulantes pode resultar em eventos trombóticos. A geração de um trombo espontâneo na circulação arterial ou venosa está associada ao desenvolvimento de doenças cardiovasculares, que representam a principal causa de óbito em todo o mundo. A morbimortalidade dessas doenças e de suas complicações constitui hoje um importante problema de saúde pública. Atualmente, existem diversas estratégias terapêuticas para evitar e prevenir os eventos tromboembólicos, como o uso de fármacos anticoagulantes e antiplaquetários, entretanto, esses medicamentos estão associados a muitos efeitos adversos e dificuldade de adesão. Nesse contexto, produtos de origem natural ainda hoje têm sido amplamente utilizados com o intuito de descobrir e desenvolver novas entidades farmacêuticas. Diante disso, este trabalho teve como objetivo avaliar o efeito de extratos brutos provenientes de plantas sobre a agregação plaquetária. Foram testados os seguintes extratos etanólicos: extrato de alcachofra (EEAlc), extratos de laranja (EELi1, EELi2 e EELa3), extrato de banana (EEBn), extratos de bacuri (EEBc1 e EEBc2), extratos de lichia (EELi1 e EELi2), extrato de manga (EEMg), extratos de rambutan (EERb1 e EERb2), extrato de jucá (EEJc) e extrato de papaya (EPPp). Previamente à realização dos ensaios, as amostras de plasma rico em plaquetas foram incubadas por 5 minutos a 37 °C com os extratos brutos (800 µg/mL) ou dimetilsulfóxido 0,5% (controle). A ação sobre a agregação plaquetária foi avaliada por meio do método de turbidimetria, utilizando-se os agonistas difosfato de adenosina (ADP - 10 µM) ou epinefrina (5 µg/mL). Todos os extratos brutos inibiram de maneira significativa a agregação quando estimulados por ADP ou epinefrina, e os extratos EEAlc, EELi1, EELi2, EEBc2 e EERb1 foram considerados os mais promissores por inibirem de forma mais expressiva a agregação induzida por ambos os agonistas testados. Não foi possível determinar a CI_{50} do extrato de EELi1, no entanto, acredita-se que sua atividade esteja relacionada com a inibição da transdução de sinais pró-agregantes. A partir dos resultados obtidos, foi possível evidenciar o potencial que a flora brasileira representa para a produção de novos fármacos antiagregantes.

Palavras-chave: Agregação plaquetária, Plantas, Extratos brutos.

Anti-aggregation effect of crude ethanolic extracts of *Cynara scolymus L.*, *Citrus sinensis*, *Musa spp.*, *Platonia insignis*, *Litchi chinensis*, *Mangifera indica*, *Nephelium lappaceum*, *Libidibia ferrea* and *Carica papaya*

Hemostasis is a physiological mechanism that involves the dynamic balance between procoagulant and anticoagulant factors. An imbalance of hemostasis in favor of procoagulant mechanisms can result in thrombotic events. The generation of a spontaneous thrombus in the arterial or venous circulation is associated with the development of cardiovascular diseases, which represent the main cause of death worldwide. The morbidity and mortality of these diseases and their complications is today an important public health problem. Currently, there are several therapeutic strategies to avoid and prevent thromboembolic events, such as the use of anticoagulant and antiplatelet drugs, however, these drugs are associated with many adverse effects and difficulty in adherence. In this context, products of natural origin have still been widely used today with the aim of discovering and developing new pharmaceutical entities. Therefore, this study aimed to evaluate the effect of crude extracts from plants on platelet aggregation. The following ethanolic extracts were tested: artichoke extract (EEAlc), orange extracts (EELi1, EELi2 and EELa3), banana extract (EEBn), bacuri extracts (EEBc1 and EEBc2), lychee extracts (EELi1 and EELi2), mango extract (EEMg), rambutan extracts (EERb1 and EERb2), jucá extract (EEJc) and papaya extract (EPPp). Prior to performing the assays, the platelet-rich plasma samples were incubated for 5 minutes at 37 °C with the crude extracts (800 µg/mL) or 0.5% dimethylsulfoxide (control). The action on platelet aggregation was evaluated using the turbidimetry method, using the agonists adenosine diphosphate (ADP - 10 µM) or epinephrine (5 µg/mL). All crude extracts significantly inhibited aggregation when stimulated by ADP or epinephrine, and the extracts EEAlc, EELi1, EELi2, EEBc2 and EERb1 were considered the most promising, as they inhibited more expressively the aggregation induced by both agonists tested. It was not possible to determine the IC₅₀ of the EELi1 extract, however, it is believed that its activity is related to the inhibition of the transduction of pro-aggregating signals. From the results obtained, it was possible to highlight the potential that the Brazilian flora represents for the production of new antiplatelet drugs.

Keywords: Platelet aggregation, Plants, Crude extracts.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Interações receptor-ligante na fase de adesão plaquetária.....	15
Figura 2 - Mecanismos de ativação plaquetária estimulados via Gq e tirosina quinase.....	16
Figura 3 - Mecanismos de ativação plaquetária estimulados via Gi.....	17
Figura 4 - Interações entre plaquetas adjacentes na etapa de agregação.....	19
Figura 5 - Representação esquemática da teoria clássica da cascata de coagulação.....	20
Figura 6 - Representação esquemática do sistema fibrinolítico.....	21
Figura 7 - Fórmula estrutural da heparina (1) em comparação com os flavonoides sulfatados 3-acetil-7,3',4'-trissulfato de quercetina (2) e 3,7,3',4'-tetrassulfato de quercetina (3).....	23
Figura 8 - Fórmula estrutural da varfarina (1) em comparação com os derivados cumarínicos acenocumarol (2), femprocumona (3) e dicumarol (4).....	23
Figura 9 - Representação esquemática da curva de agregação plaquetária.....	28
Figura 10 - Efeito dos extratos das plantas sobre a agregação plaquetária induzidas por ADP e epinefrina.....	32
Figura 11 - Fórmula estrutural de kaempferol (1), quercetina (2), catequina (3) e epicatequina (4).....	37
Figura 12 - Efeito do extrato de casca de lichia (EELi1) sobre a agregação plaquetária induzida por ADP.....	39
Figura 13 - Efeito do extrato de casca de lichia (EELi1) sobre a agregação plaquetária induzida por epinefrina.....	40

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Extratos testados durante a execução do projeto.....	27
Tabela 2 - Efeito dos extratos das plantas sobre a agregação plaquetária induzida por difosfato de adenosina (ADP - 10 μ M) e epinefrina (5 μ g/mL).....	31
Tabela 3 - Efeito dos extratos de casca de Lichia (EELi1) sobre a agregação plaquetária induzida por difosfato de adenosina (ADP - 10 μ M) e epinefrina (5 μ g/mL).....	38

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AAS	Ácido acetilsalicílico
ADP	Difosfato de adenosina
AVC	Acidente vascular cerebral
Ca ⁺²	Cálcio
CAPM	Cininogênio de alto peso molecular
CI ₅₀	Concentração inibitória de 50%
DCV	Doenças cardiovasculares
DMSO	Dimetilsulfóxido
EPI	Epinefrina
FDA	<i>Food and drug administration</i>
FI	Fibrinogênio
F1a	Fibrina
FII	Protrombina
FIIa	Trombina
FT	Fator tecidual
FvW	Fator de von Willebrand
GP	Glicoproteína
IAM	Infarto agudo do miocárdio
PAR	Receptor ativado por protease
PBS	Tampão fosfato-salino
PDF	Produto de degradação de fibrina e fibrinogênio
PPP	Plasma pobre em plaquetas
PRP	Plasma rico em plaquetas
SUS	Sistema único de saúde
TCLE	Termo de consentimento livre e esclarecido
TEV	Tromboembolismo venoso
TxA2	Tromboxano A2
tPA	Ativador do plasminogênio do tipo tecidual
uPA	Ativador do plasminogênio do tipo uroquinase

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	11
2.1 HEMOSTASIA.....	13
2.1.1 Hemostasia Primária.....	14
2.1.1.1 Adesão plaquetária.....	14
2.1.1.2 Ativação plaquetária.....	15
2.1.1.3 Secreção plaquetária.....	17
2.1.1.4 Agregação plaquetária.....	18
2.1.2 Hemostasia Secundária.....	19
2.1.3 Fibrinólise.....	21
2.2 PRODUTOS NATURAIS.....	21
3 OBJETIVOS.....	25
3.1 OBJETIVO GERAL.....	25
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	25
4 METODOLOGIA.....	26
4.1 SELEÇÃO DE PARTICIPANTES E COLETA DA AMOSTRA.....	26
4.2 EXTRATOS NATURAIS.....	26
4.3 ESTUDOS DE AGREGAÇÃO PLAQUETÁRIA.....	27
4.4 DETERMINAÇÃO DA CI_{50} DOS EXTRATOS BRUTOS DE CASCA DE LICHIA...	29
4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	29
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	30
5.1 TRIAGEM DO EFEITO DOS EXTRATOS BRUTOS SOBRE A AGREGAÇÃO PLAQUETÁRIA.....	30
5.2 DETERMINAÇÃO DA CI_{50} DO EXTRATO BRUTO DE CASCA DE LICHIA (EELi1).....	38
6 CONCLUSÃO.....	42
REFERÊNCIAS.....	43
ANEXO A - PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP.....	52

1 INTRODUÇÃO

O sangue tem como função básica o transporte de elementos e substâncias e, por esse motivo, deve permanecer em um estado fluido dentro dos vasos. Para que isso ocorra, mecanismos celulares e moleculares interagem de forma simultânea para manter o equilíbrio hemostático. Quando ocorre uma lesão vascular, o sangue altera sua fluidez a fim de 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).

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 hemostático 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. Pode-se dizer, portanto, que a hemostasia é um processo em que sangramento e trombose são desfechos indesejados e resultantes de anormalidades (AKAY, 2018).

Eventos trombóticos podem ocorrer devido a um desequilíbrio da hemostasia a favor dos mecanismos pró-coagulantes, resultando na formação de um coágulo no lúmen do vaso sanguíneo, o que compromete o seu fluxo e pode levar à isquemia e morte tecidual. Portanto, a geração de trombos está relacionada com a patogenia das doenças cardiovasculares (DCV), sendo que, geralmente, os trombos arteriais, ricos em plaquetas, se depositam nas laterais ou ao redor de placas ateroscleróticas rompidas; e os trombos venosos, por sua vez, ricos em fibrina e eritrócitos, se desenvolvem em uma parede endotelial intacta. Dessa forma, a trombose arterial está relacionada ao infarto agudo do miocárdio (IAM) e ao acidente vascular cerebral (AVC), enquanto a trombose venosa é a causa do tromboembolismo venoso (TEV), embolia pulmonar e síndromes coronarianas agudas (KROUPENOVA *et al.*, 2017).

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), as DCV constituem a principal causa de morte em todo o mundo. Estima-se que 17,9 milhões de pessoas morreram por DCV em 2016, representando 31% de todas as mortes em âmbito global. No Brasil, as DCV seguem a tendência mundial e são a causa número um de morte no país, configurando o mais grave problema de saúde pública no país. Além disso, a prevalência, que atualmente é de

6,1% na população, vem crescendo desde 1990 devido ao envelhecimento populacional. Em relação aos custos, mais de um bilhão de reais foram gastos em procedimentos cirúrgicos para DCVs em 2019, no Brasil. Dessa forma, a elevada incidência, morbidade e mortalidade dos eventos tromboembólicos e de suas complicações, associado ao seu elevado custo para o Sistema Único de Saúde (SUS), faz com que eles sejam considerados um problema de saúde pública de grande importância (OLIVEIRA, 2021; WEITZ; EIKELBOOM, 2016).

Estima-se que 1 a 4 pessoas morrem no mundo devido às consequências causadas por eventos trombóticos e, ainda, que 1-2 a cada 100 mil habitantes necessitem de alguma terapia medicamentosa para tratar ou prevenir tais eventos (WTD, 2021). Os principais fármacos utilizados na prevenção ou tratamento da trombose venosa são os anticoagulantes orais e injetáveis, representados pelos varfarínicos (antagonistas da vitamina K) e os inibidores diretos e indiretos dos fatores IIa e Xa (FLATO *et al.*, 2011). Já os principais fármacos utilizados na trombose arterial consistem nos antiplaquetários como o ácido acetilsalicílico (AAS) e o clopidogrel (RANG *et al.*, 2004). Esses agentes 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 dose-resposta, interações medicamentosas e alimentares, necessidade de monitorização laboratorial frequente, plaquetopenia, resistência ao tratamento, inexistência de antídoto e, paradoxalmente, indução de estados de hipercoagulabilidade. Sendo assim, ainda se faz necessário o desenvolvimento de novos fármacos antiagregantes e anticoagulantes que sejam efetivos, permitam administração oral, tenham posologia simplificada, farmacocinética e farmacodinâmica previsíveis e que não necessitem de monitorização laboratorial (AMIROU *et al.*, 2018; STRUIJK *et al.*, 2012).

Nesse contexto, os produtos naturais e/ou suas novas estruturas ainda hoje têm sido 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), 45% eram de origem natural, derivados de produtos naturais, ou sintéticos que mimetizavam um produto natural 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

A hemostasia é um mecanismo fisiológico essencial que envolve o equilíbrio dinâmico entre os fatores pró-coagulantes e anticoagulantes. Esse processo tem como função 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).

Mecanismos celulares e moleculares interagem de forma simultânea para manter o equilíbrio hemostático. Os componentes do sistema hemostático incluem as plaquetas, os vasos sanguíneos, as proteínas pró-coagulantes, os anticoagulantes naturais e o sistema fibrinolítico (O'DONNELL; O'SULLIVAN; PRESTON, 2019).

Em condições fisiológicas, o sangue circula em estado fluido através dos vasos. O endotélio vascular atua como uma barreira física separando os componentes sanguíneos das estruturas subendoteliais reativas, além de produzir inibidores da coagulação e da agregação plaquetária. Porém, quando ocorre um dano vascular, a superfície subendotelial com propriedades altamente trombogênicas passa a ser exposta, e essa alteração para um estado pró-trombótico induz à vasoconstrição, adesão e ativação de plaquetas, ativação da coagulação e deposição de fibrina na parede do vaso. Após a regeneração do tecido, o coágulo de fibrina se dissolve e o fluxo sanguíneo é restaurado (AUSTIN, 2017; SIRA; EYRE, 2016).

Estudos indicam que esses processos ocorrem de forma simultânea e interligada, entretanto, o mecanismo hemostático pode ser didaticamente dividido em hemostasia primária, hemostasia secundária e fibrinólise. A hemostasia primária compreende a interação complexa das plaquetas com o endotélio vascular, o que culmina na formação de um plugue de plaquetas inicial que visa cessar a perda sanguínea. Posteriormente, na hemostasia secundária, ocorre a ativação da cascata de coagulação, que produz uma malha de fibrina responsável por estabilizar o tampão plaquetário, tornando-o mais resistente. A última fase, conhecida como fibrinólise, tem como função degradar a fibrina e dissolver o coágulo formado, controlando sua extensão e prevenindo complicações tromboembólicas. Qualquer desequilíbrio nesses processos altamente regulados pode resultar em eventos trombóticos ou complicações hemorrágicas (AUSTIN, 2017; SIRA; EYRE, 2016; VERSTEEG *et al.*, 2013).

2.1.1 Hemostasia Primária

Os principais componentes da hemostasia primária são: células endoteliais, vasos sanguíneos, plaquetas, fator de von Willebrand (FvW) e fibrinogênio (FI) (FONTES, 2012; RODRIGUES; CASTILHO-FERNANDES).

Em situações normais, o endotélio é responsável por promover uma superfície não trombogênica pela produção de inibidores da ativação plaquetária como prostaciclina e óxido nítrico; inibidores da coagulação como o heparan sulfato e o inibidor da via do fator tecidual (TFPI); e ativadores da fibrinólise como o ativador do plasminogênio do tipo tecidual (tPA). Em contrapartida, a camada subendotelial é altamente trombogênica e contém colágeno, FvW, fibronectina e fator tecidual (FT). Da mesma maneira, em condições fisiológicas, as plaquetas não interagem com a parede intacta do vaso, no entanto, quando ocorre uma lesão no endotélio vascular, ocorre a liberação de FvW, colágeno e FT, que passam a ser expressos na superfície das células endoteliais, o que resulta na alteração para um estado pró-trombótico, na aderência das plaquetas à matriz extracelular e em uma sequência de processos hemostáticos que irão culminar na formação do trombo plaquetário. Classicamente, esses processos são divididos em quatro etapas: adesão, ativação, secreção e agregação plaquetária (BROOS *et al.*, 2011; CIMMINO; GOLINO, 2013; JOBLING; EYRE, 2013; KAZMI; BOYCE; LWALEED, 2015; PALTA; SAROA; PALTA, 2014).

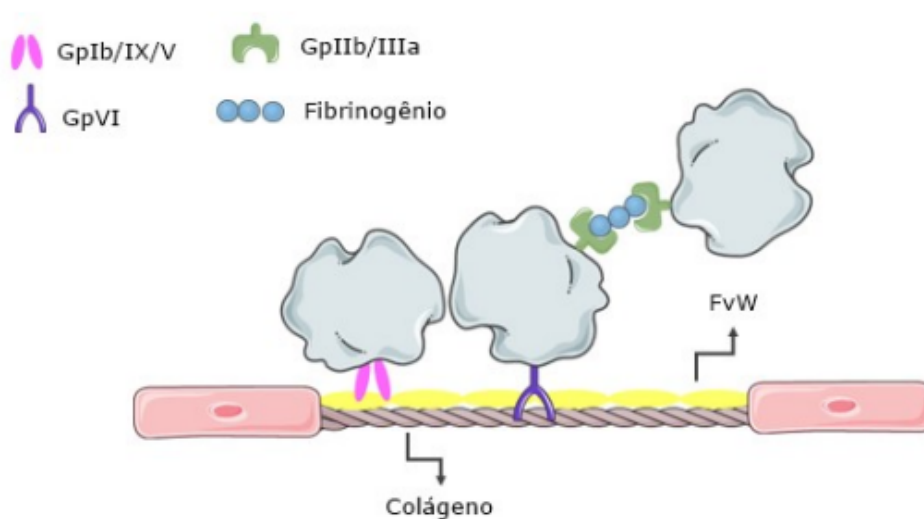
2.1.1.1 Adesão plaquetária

As plaquetas expressam diversos receptores de membrana que são importantes para sua função hemostática como o complexo GpIb/V/IX, a GpVI, a GpIIb/IIIa, a GpIa/IIa, receptores de trombina (receptores ativados por proteases - PARs), receptores de ADP (P2Y1, P2Y12 e P2X1) e receptores de tromboxano A2 (TxA2) (receptores TP) (WANG; GALLANT; NI, 2016). A adesão inicial das plaquetas ao local da lesão vascular é mediada pela interação da GpIb, pertencente ao complexo GpIb/V/IX, com o FvW, uma proteína adesiva multimérica que é liberada a partir da superfície subendotelial na presença de uma lesão (ANGIOLILLO; UENO; GOTO, 2010; CIMMINO; GOLINO, 2013).

Além do FvW, o colágeno também passa a ser expresso pelas células endoteliais e é capaz de interagir com diversas glicoproteínas (Gp) de membrana, de forma direta ou indireta. A interação inicial é indireta e mediada pela interposição do FvW, que é capaz de se ligar ao colágeno e alterar a sua conformação da forma inativa para a forma ativa. Conseqüentemente,

o complexo GpIb/V/IX interage com o FvW ativado e ligado ao colágeno, e essa interação, apesar de não estimular uma firme adesão plaquetária, reduz a velocidade das plaquetas e permite que elas se liguem diretamente ao colágeno por meio das GpVI e GpIIa/IIa. Essas interações ativam outros receptores, como a GpIIb/IIIa, capaz de se ligar de forma irreversível com o fibrinogênio (Figura 1) (GAWAZ; VOGEL, 2013; LISMAN *et al.*, 2006).

Figura 1 - Interações receptor-ligante na fase de adesão plaquetária.



Gp - glicoproteína; FvW - Fator de von Willebrand. Fonte: adaptado de GITZ *et al.*, 2013.

A adesão das plaquetas aos componentes da matriz subendotelial desencadeia uma cascata de sinalização mediada por tirosina-quinases e receptores acoplados à proteína G, o que leva à ativação e liberação de grânulos plaquetários e, como consequência, recrutamento de mais plaquetas adicionais para o local da lesão. Nesse sentido, a adesão representa uma etapa essencial para a formação do trombo plaquetário, visto que a ausência ou deficiência de glicoproteínas ou FvW causam defeitos expressivos na hemostasia (BROOS *et al.*, 2011; CIMMINO; GOLINO, 2013).

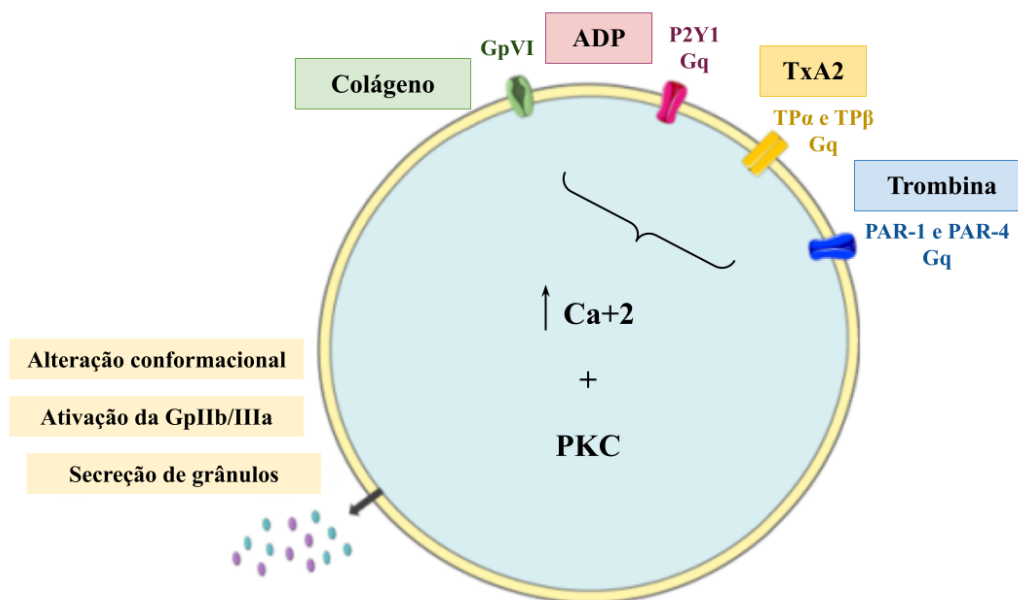
2.1.1.2 Ativação plaquetária

A ativação plaquetária pode ser iniciada por meio de uma série de vias metabólicas, ocorrendo após adesão das plaquetas ao colágeno exposto e pela interação de agonistas com seus respectivos receptores na membrana externa da plaqueta. Essas ligações resultam na ativação de vias comuns de sinalização intracelular, mediadas por tirosina-quinases e

receptores acoplados à proteína G, estimulando a liberação de agonistas a partir das plaquetas e gerando um *loop* de ativação. Os principais agonistas plaquetários são: colágeno, ADP, TxA2, epinefrina e trombina (ANGIOLILLO; UENO; GOTO, 2010).

A ativação das vias comuns resulta na liberação de cálcio (Ca^{+2}) a partir do retículo endoplasmático e na ativação da proteína quinase C (PKC). A liberação de Ca^{+2} resulta no aumento da sua concentração intracelular e na ativação do sistema contrátil actina-miosina, o que gera modificações do citoesqueleto, alteração das plaquetas do formato discoide para o esférico e extensão de pseudópodes. Ainda, a ativação do sistema contrátil actina-miosina promove a contração dos conteúdos granulares do citosol, que se fundem com a membrana externa, resultando na secreção e disseminação destes sobre a área do vaso danificado. A ativação da PKC resulta na secreção de grânulos, exposição da GpIIb/IIIa e, posteriormente, a agregação plaquetária (Figura 2) (BROOS *et al.*, 2011; BYE; UNSWORTH; GIBBINS, 2016; CIMMINO; GOLINO, 2013; JENNINGS, 2009; STALKER *et al.*, 2012).

Figura 2 - Mecanismos de ativação plaquetária estimulados via proteína Gq e tirosina quinase.

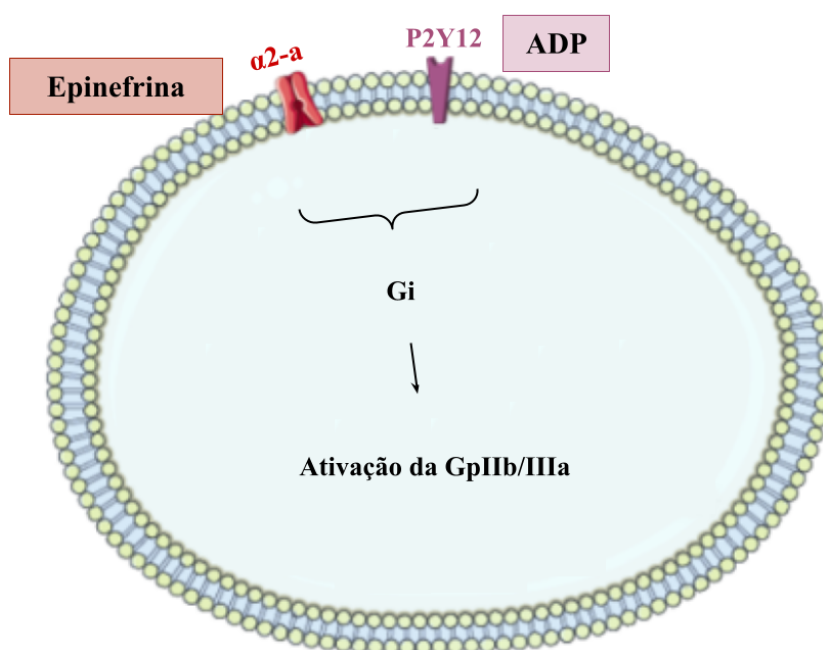


Gp - glicoproteína; TxA2 - tromboxano A2; ADP - difosfato de adenosina; Ca^{+2} - cálcio; PKC - proteína quinase C. Fonte: adaptado de BROOS *et al.*, 2011.

O ADP é armazenado em elevadas concentrações nos grânulos densos e é liberado pelas plaquetas aderentes durante a ativação plaquetária. A ligação do ADP ao receptor P2Y1,

acoplado à proteína Gq, é capaz de ativar segundos mensageiros responsáveis pelo aumento de Ca^{+2} intracelular e alterações conformacionais nas plaquetas, levando a uma fraca e transitória agregação (Figura 2) (ANGIOLILLO; FERREIRO, 2010; BRASS *et al.*, 2011; CIMMINO; GOLINO, 2013). O ADP também se liga ao receptor P2Y12, que é acoplado à proteína Gi, assim como os receptores $\alpha 2$ -adrenérgicos da epinefrina (Figura 3). Estas ligações levam à estabilização da agregação plaquetária e mudança da conformação da GpIIb/IIIa, tornando-a receptor para o fibrinogênio. A coativação dos receptores P2Y1 e P2Y12 é essencial para a agregação induzida por ADP, uma vez que a inibição de qualquer um destes receptores resulta em uma diminuição acentuada na agregação (ANGIOLILLO; FERREIRO, 2010; BYE; UNSWORTH; GIBBINS, 2016; JIN; KUNAPULI, 1998).

Figura 3 - Mecanismos de ativação plaquetária estimulados via proteína Gi.



Gp - glicoproteína; ADP - difosfato de adenosina; $\alpha 2$ -a - $\alpha 2$ -adrenérgicos. Fonte: adaptado de BROOS *et al.*, 2011.

2.1.1.3 Secreção plaquetária

As plaquetas contêm três tipos de grânulos: grânulos- α , grânulos densos e lisossomos, que armazenam mediadores fundamentais para a agregação plaquetária e cascata de coagulação (YUN *et al.*, 2016).

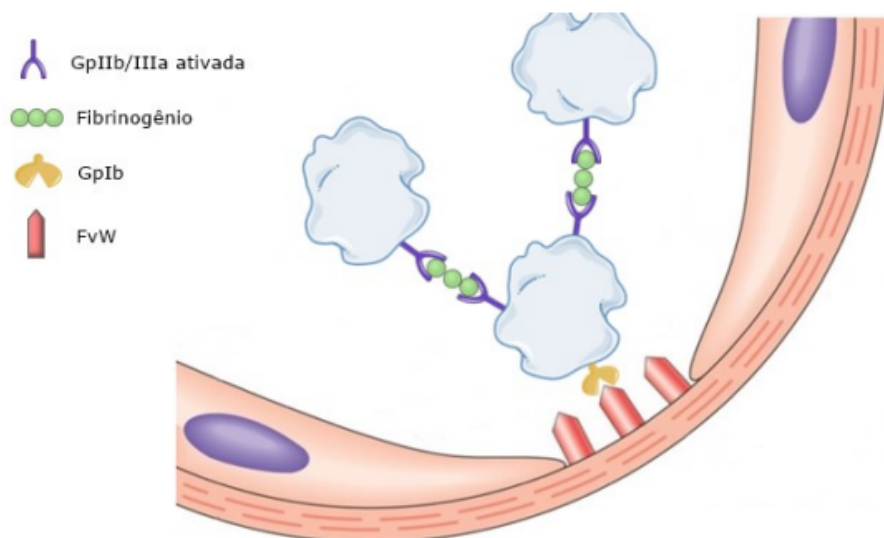
Os grânulos- α são os mais abundantes e os seus conteúdos granulares incluem glicoproteínas adesivas (P-selectina, fibrinogênio e FvW), fatores de coagulação (V, XI e XIII), quimiocinas e um estoque de GpIIb/IIIa. A liberação dessas proteínas potencializa a ligação de plaquetas via GpIIb/IIIa com o fibrinogênio e GpIb/IX/V com o FvW, reforçando as interações plaquetárias e recrutando mais plaquetas para o local da lesão (JENNE; URRUTIA; KUBES, 2013; THOMAS; STOREY, 2015; YUN *et al.*, 2016).

Os grânulos densos armazenam uma variedade de moléculas não proteicas que são secretadas durante a ativação plaquetária, como serotonina, histamina, ADP, trifosfato de adenosina (ATP), magnésio, Ca^{+2} e TxA2. A liberação de mediadores secundários, como os agonistas ADP e TxA2, é fundamental para o *feedback* positivo que leva à rápida ativação de um grande número de plaquetas e suporta a consolidação do trombo plaquetário. Por fim, os lisossomos contêm glicosidases, proteases ácidas e hidrolases, cuja função é eliminar os agregados plaquetários circulantes (BYE; UNSWORTH; GIBBINS, 2016; THOMAS; STOREY, 2015).

2.1.1.4 Agregação plaquetária

Os eventos de adesão e ativação plaquetária culminam na agregação plaquetária, um processo dinâmico que envolve a ligação de proteínas adesivas ao receptor GpIIb/IIIa em sua forma ativa. Após as mudanças conformacionais decorrentes da ativação plaquetária, esse receptor tem sua afinidade pelo fibrinogênio aumentada. O fibrinogênio se liga à GpIIb/IIIa ativada e essa ligação induz outras Gps adesivas, incluindo fibronectina, FvW e vitronectina, a se ligarem nesses receptores, mediando a interação de plaquetas adjacentes, o que contribui para a estabilização do plugue plaquetário e formação de um trombo rico em fibrinogênio no local da lesão (Figura 4) (CIMMINO; GOLINO, 2013; JENNINGS, 2009; MADAN; BERKOWITZ; TCHENG, 1998).

Figura 4 - Interações entre plaquetas adjacentes na etapa de agregação.



Gp – glicoproteína; FvW – Fator de von Willebrand. Fonte: adaptado de ROBBINS; COTRAN, 2010.

2.1.2 Hemostasia Secundária

Para estabilizar o tampão plaquetário inicialmente formado, proteínas plasmáticas sintetizadas pelo fígado e circulantes no sangue, em sua forma inativa, são ativadas para formar uma “rede” de fibrina. Nessa etapa, tem-se a cascata de coagulação, que compreende os fatores de coagulação (RODRIGUES; CASTILHO-FERNANDES; FONTES, 2012; TEN CATE *et al.*, 2017).

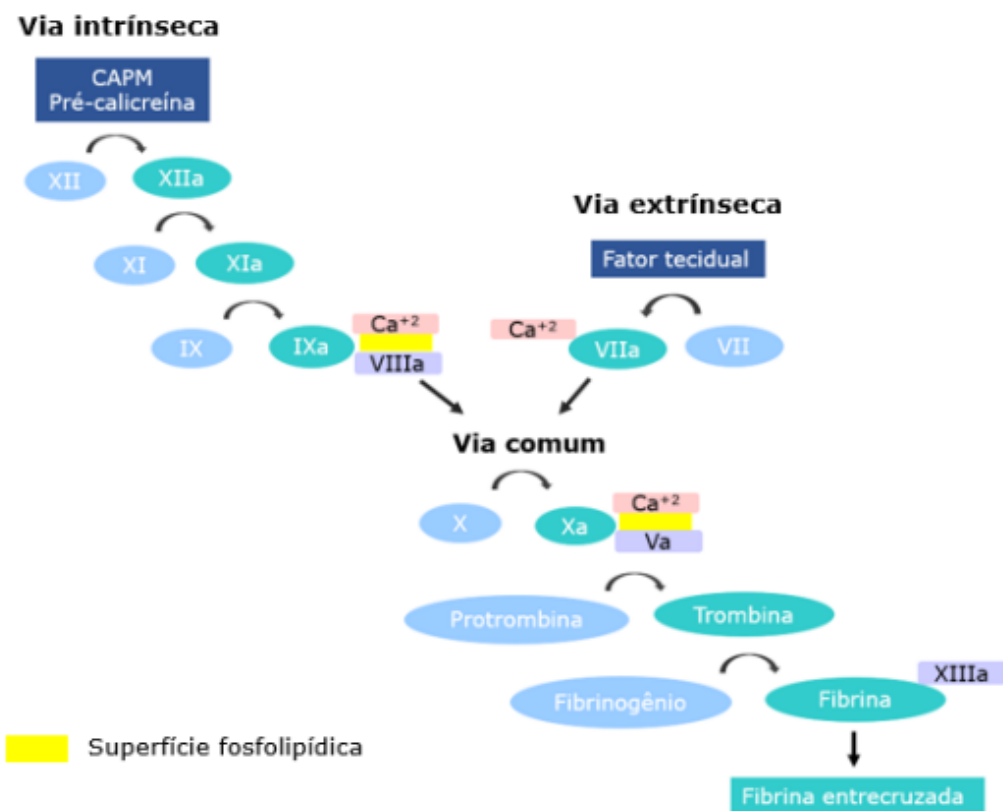
A cascata de coagulação é tradicionalmente dividida em via intrínseca e extrínseca, que convergem em uma via comum. O processo de coagulação inicia-se principalmente pela ativação da via extrínseca ao ocorrer a exposição do FT na corrente sanguínea. Em indivíduos saudáveis, são encontradas baixas concentrações de fator VII (FVII) em sua forma ativa (FVIIa) na circulação sanguínea. Dessa forma, o FVII e o FVIIa se ligam ao FT liberado pelas membranas celulares, formando o complexo FVIIa/FT, que possui atividade enzimática. Esse complexo, também conhecido como complexo tenase extrínseco, é capaz de clivar o fator X (FX) da via comum e o fator IX (FIX) da via intrínseca, tornando-os ativos e dando origem ao FXa e FIXa, respectivamente (FRANCO, 2001; PALTA; SAROA; PALTA, 2014)

Já a via intrínseca é ativada pelo sistema de contato com superfícies de carga elétrica negativa como colágeno e endotoxinas. O processo requer a presença de pré-caliceína (uma serinoprotease) e um cofator não enzimático denominado cininogênio de alto peso molecular (CAPM), que auxiliam na ativação do fator XII (FXII), formando o FXIIa. Em seguida, o

FXIIa converte o fator XI (FXI) em fator XI ativado (FXIa), e o FXIa transforma o FIX em FIXa. O FIXa se liga então ao seu cofator VIII ativado (FVIIIa) formando o complexo tenase intrínseco (FIXa/FVIIIa) que, na presença de fosfolípidios plaquetários e Ca^{+2} , é capaz de ativar o FX, dando origem ao FXa (FRANCO, 2001; SMITH; TRAVERS; MORRISSEY, 2015).

A ativação do FX, tanto pela via extrínseca quanto intrínseca, inicia a via comum da coagulação. Nessa fase, o FXa associa-se ao seu cofator V ativado (FVa), formando o complexo protrombinase (FXa/FVa) na presença de fosfolídeos de membrana e Ca^{+2} . Esse complexo converte a protrombina (FII) em trombina (FIIa), e a trombina cliva o fibrinogênio (FI) solúvel em polímeros de fibrina (FIa) solúveis e ativa o fator XIII (FXIIIa). Por fim, os polímeros de fibrina sofrem ação do complexo trombina/FXIIIa/ Ca^{+2} , gerando a fibrina entrecruzada e formando uma rede estável e insolúvel de fibrina sobre o trombo plaquetário (Figura 5) (FRANCO, 2001; PALTA; SAROA; PALTA, 2014).

Figura 5 - Representação esquemática da teoria clássica da cascata de coagulação.



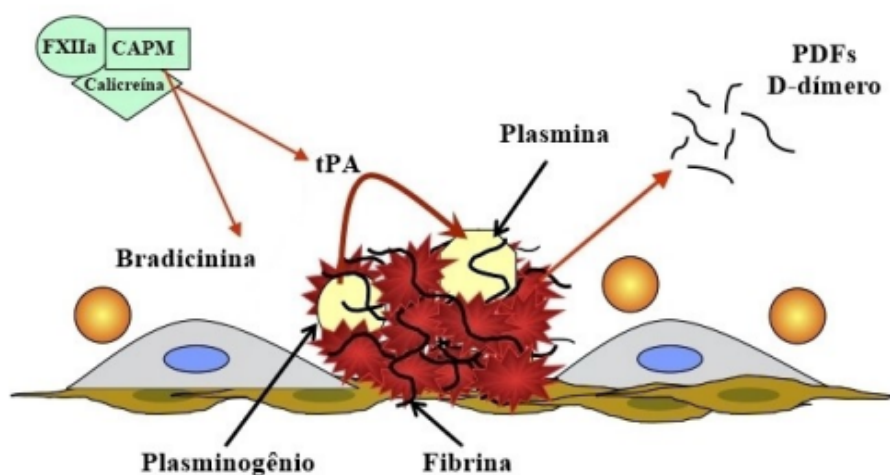
CAPM – cininogênio de alto peso molecular; FT – fator tecidual. Fonte: adaptado de PALTA; SAROA; PALTA, 2014.

2.1.3 Fibrinólise

O sistema fibrinolítico é ativado juntamente com a cascata de coagulação e é responsável por dissolver o coágulo formado, limitando sua extensão. Esse processo se inicia quando o FXII, ao entrar em contato com partículas de carga elétrica negativa, forma um complexo com o CAPM e a pré-caliceína, e esse complexo produz caliceína a partir de pré-caliceína e bradicinina. A bradicinina então estimula a liberação do tPA, óxido nítrico e prostaciclina a partir das células endoteliais (CHAPIN; HAJJAR, 2015; EZIHE-EJIOFOR; HUTCHINSON, 2013; FRANCO, 2001).

Posteriormente, o plasminogênio se liga aos resíduos de lisina da fibrina presente no coágulo e os ativadores do plasminogênio (tPA, uPA e caliceína) clivam o plasminogênio em plasmina. A plasmina, por sua vez, é uma enzima lítica potente que tem a capacidade de degradar fibrinogênio e fibrina, liberando diferentes produtos de degradação (PDFs), além de degradar a fibrina entrecruzada, liberando fragmentos como o dímero-D (Figura 6) (CHAPIN; HAJJAR, 2015; EZIHE-EJIOFOR; HUTCHINSON, 2013; FRANCO, 2001).

Figura 6 - Representação esquemática do sistema fibrinolítico.



FXIIa – fator XII ativado; CAPM - cininogênio de alto peso molecular; tPA – ativador do plasminogênio tecidual; PDFs – produtos de degradação de fibrina e fibrinogênio. Fonte: adaptado de ECLINPATH, 2013.

2.2 PRODUTOS NATURAIS

O Brasil é o país com a maior biodiversidade do mundo. São mais de 46.000 espécies vegetais conhecidas no país, espalhadas pelos seis biomas terrestres e três grandes ecossistemas marinhos. As diferentes zonas climáticas do Brasil favorecem a formação de

biomas, a exemplo da Floresta Amazônica, maior floresta tropical úmida do mundo; o Pantanal, maior planície inundável; o Cerrado, com suas savanas e bosques; a Caatinga, composta por florestas semiáridas; os campos dos Pampas; e a floresta tropical pluvial da Mata Atlântica (BIODIVERSIDADE, GOVERNO FEDERAL).

Nesse contexto, os produtos de origem natural têm sido utilizados há muito tempo como uma tradicional fonte medicinal e, ainda hoje, continuam a desempenhar um papel crucial em pesquisas na área da química, biologia e medicina (WANG; DONG; SHENG, 2019), sendo, portanto, considerados a mais promissora fonte de moléculas e/ou protótipos de fármacos (DIAS; URBAN; ROESSNER, 2012).

Estudos relatam que os metabólitos secundários, compostos bioativos produzidos por plantas, como flavonoides e alcaloides, possuem atividade cardioprotetora. Os efeitos cardioprotetores desses fitoquímicos podem ser devido a suas atividades antioxidantes, anti-hipercolesterolêmicas, antiangiogênicas, anti-isquêmicas, anti-inflamatórias e de inibição da agregação plaquetária, que reduzem o risco de distúrbios cardiovasculares (BOTSARIS; ALVES, 2007; FAGGIO, 2017; VALLANCE *et al.*, 2019; VASANTHI; SHRISHRIMAL; DAS, 2012).

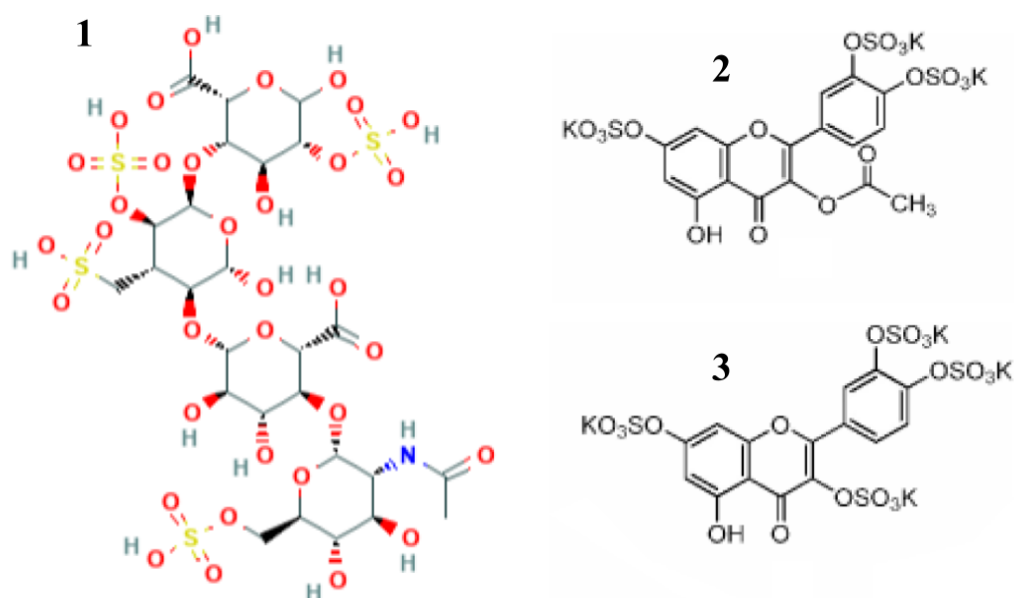
Os compostos do metabolismo secundário, ao contrário dos compostos do metabolismo primário, não são essenciais ao crescimento e desenvolvimento da planta, mas podem ser imprescindíveis à sobrevivência e continuidade da espécie dentro do ecossistema, uma vez que possuem características químicas variadas e apresentam atividades biológicas bastante relevantes (TAIZ; ZEIGER, 2004). Esses compostos são divididos em três grupos principais: terpenos, compostos fenólicos e compostos nitrogenados. Os grandes grupos são divididos em subgrupos com biossíntese, função e importância específica (BORGES; AMORIM, 2020).

O interesse no metabolismo secundário vegetal tem sido crescente nos últimos anos, considerando que o consumo destes metabólitos apresenta resultados promissores na prevenção de doenças como o câncer, disfunções cardiovasculares e outras doenças crônicas (AHARONI; GALILI, 2010).

Um estudo realizado por Chaves e colaboradores (2010) focalizou 43 substâncias de origem vegetal - flavonoides, feniletanoides, fenilpropanoides, alcaloides, cumarinas, ácidos fenólicos, fenantrenos e uma saponina - com atividade antiplaquetária e/ou anticoagulante. No trabalho, foi observado que os flavonoides sulfatados e os derivados cumarínicos são classes químicas promissoras, considerando que ambas apresentam similaridades estruturais com os fármacos clinicamente utilizados, tais como a heparina e a varfarina, respectivamente (Figuras

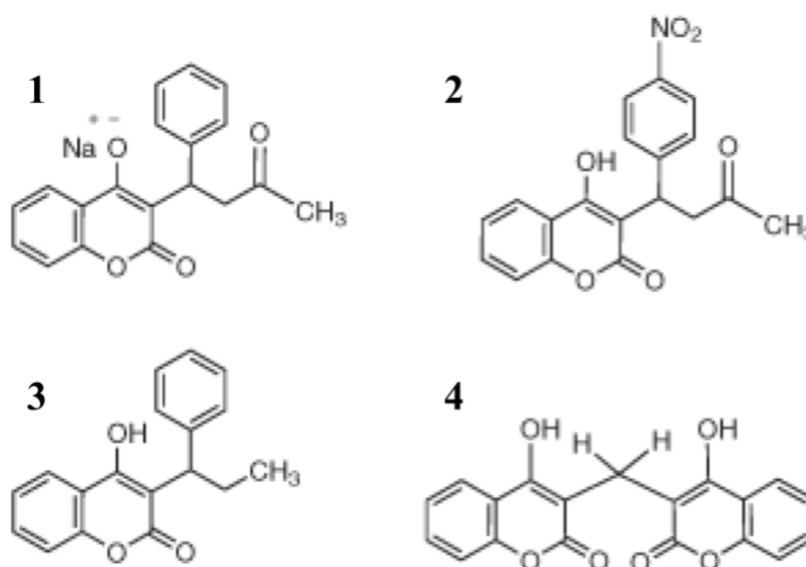
7 e 8). Dessa forma, essas classes químicas poderiam vir a fornecer novos compostos líderes e, eventualmente, se tornarem candidatos a novos fármacos.

Figura 7 - Fórmula estrutural da heparina (1) em comparação com os flavonoides sulfatados 3-acetil-7,3',4'-trissulfato de quercetina (2) e 3,7,3',4'-tetrassulfato de quercetina (3).



1 - fórmula estrutural da heparina; 2 - 3-acetil-7,3',4'-trissulfato de quercetina; 3 - 3,7,3',4'-tetrassulfato de quercetina. Fonte: PubChem e CHAVES *et al*, 2010.

Figura 8 - Fórmula estrutural da varfarina (1) em comparação com os derivados cumarínicos acenocumarol (2), femprocumona (3) e dicumarol (4).



1 - fórmula estrutural da varfarina; 2 - acenocumarol; 3 - femprocumona; 4 - dicumarol. Fonte: CHAVES *et al*, 2010.

O desenvolvimento de compostos biologicamente ativos (protótipos) envolve etapas de descoberta, otimização e desenvolvimento. A descoberta é a etapa destinada à eleição do alvo terapêutico, útil para o tratamento de uma determinada doença e à aplicação de estratégias de planejamento molecular para desenho de ligantes do alvo, utilizando as estratégias de modificação molecular clássicas da química medicinal ou pelo emprego de técnicas computacionais como a modelagem molecular. A etapa de otimização compreende o melhoramento da estrutura do protótipo, realizado por meio de modificações planejadas com auxílio de técnicas definidas, visando o aumento da potência, seletividade, diminuição da toxicidade e adequação do perfil farmacocinético: absorção, distribuição, metabolismo, excreção e toxicidade (ADMET). A etapa de desenvolvimento do protótipo objetiva a otimização de suas propriedades ADMET e farmacêuticas (solubilidade, odor, sabor), de modo a viabilizar seu uso clínico (LIMA, 2007).

Nesse cenário, plantas e sua variedade de ingredientes fitoquímicos continuam sendo uma fonte potencial para a descoberta de novos medicamentos. Como já mencionado anteriormente, entre 1981 e 2019, 45% dos novos fármacos aprovados pelo FDA eram de origem natural ou inspirados em moléculas de origem natural, incluindo: 17 dos 23 anticoagulantes, 15 dos 30 antitrombóticos e todos os quatro fármacos antiagregantes aprovados (NEWMAN; CRAGG, 2020).

Nesse contexto, o objetivo do presente estudo foi avaliar a atividade antiagregante de extratos brutos provenientes de plantas.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito de extratos naturais provenientes de *Cynara scolymus L.*, *Citrus sinensis*, *Musa spp.*, *Platonia insignis*, *Litchi chinensis*, *Mangifera indica*, *Nephelium lappaceum*, *Libidibia ferrea* e *Carica papaya*, na forma de extratos brutos, sobre a agregação plaquetária.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Triar o efeito dos extratos brutos etanólicos de *Cynara scolymus L.*, *Citrus sinensis*, *Musa spp.*, *Platonia insignis*, *Litchi chinensis*, *Mangifera indica*, *Nephelium lappaceum*, *Libidibia ferrea* e *Carica papaya* sobre a agregação plaquetária induzida por difosfato de adenosina (ADP) e epinefrina;
- Determinar a concentração inibitória de 50% (CI₅₀) dos extratos brutos de casca de lichia (*Litchi chinensis*).

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 tenham utilizado antiagregantes, anticoagulantes ou anti-inflamatórios não esteroides nos últimos 10 dias e que não tenham histórico de doença hepática. Aos participantes foram explicados os princípios, critérios de inclusão, riscos e benefícios de participar da pesquisa; estando o selecionado em concordância 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 contendo citrato de sódio 3,2% (v/v). Para cada experimento, amostras de no mínimo três voluntários foram utilizadas.

4.2 EXTRATOS NATURAIS

Os extratos brutos das plantas foram gentilmente cedidos pelo Prof. Dr. Louis Pergaud Sandjo do Laboratório de Química de Produtos Naturais da Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC. Estes extratos são provenientes de diferentes plantas ou partes de plantas, e foram obtidos sob as mesmas condições de extração.

A Tabela 1 apresenta os extratos testados durante a execução do trabalho com suas respectivas codificações.

Tabela 1 - Extratos testados durante a execução do projeto.

Codificação	Origem
EEAlc	Extrato etanólico de Alcachofra (<i>Cynara scolymus L.</i>)
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
EELa3	Extrato etanólico de Laranja (<i>Citrus sinensis</i>). Coleta: 16/01/2019
EEBn	Extrato etanólico da flora de Banana (<i>Musa spp.</i>)
EEBc1	Extrato etanólico de Bacuri (fruto) (<i>Platonia insignis</i>)
EELi1	Extrato etanólico da casca de Lichia (<i>Litchi chinensis</i>)
EELi2	Extrato etanólico da semente de Lichia (<i>Litchi chinensis</i>)
EEBc2	Extrato etanólico de Bacuri (fruta) (<i>Platonia insignis</i>)
EEMg	Extrato etanólico de semente de Manga (<i>Mangifera indica</i>)
EERb1	Extrato etanólico do caule de Rambutan (<i>Nephelium lappaceum</i>)
EEJc	Extrato etanólico de Jucá (<i>Libidibia ferrea</i>)
EEpp	Extrato etanólico de semente de Papaya (<i>Carica papaya</i>)
EERb2	Extrato etanólico da casca de Rambutan (<i>Nephelium lappaceum</i>)

Fonte: A autora.

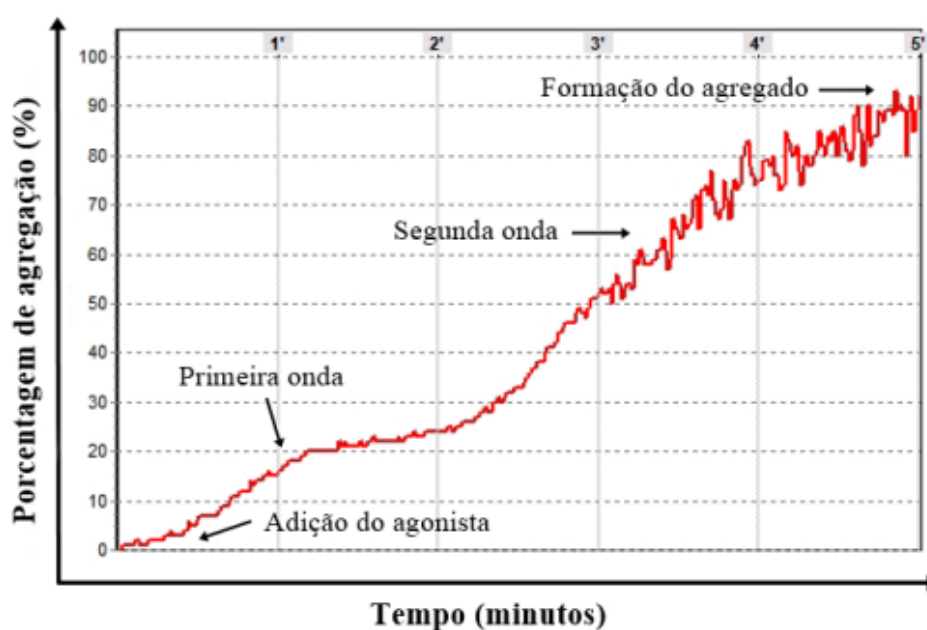
Todos os extratos brutos foram dissolvidos em DMSO na concentração estoque de 160.000 µg/mL e armazenados em geladeira a 2-8 °C. Para a realização dos experimentos, as soluções estoque foram diluídas em água destilada no mesmo dia de cada experimento de forma que a concentração final variasse de 400 µg/mL a 800 µg/mL. Independentemente do ensaio, foi realizado um experimento controle em paralelo pela adição de DMSO (0,5% v/v concentração final) ao invés dos extratos.

4.3 ESTUDOS DE AGREGAÇÃO PLAQUETÁRIA

Os ensaios de agregação plaquetária foram executados de acordo com Born e Cross (1963), utilizando-se um agregômetro semi-automatizado (AgreGO, Qualitem). A agregação por turbidimetria baseia-se em um sistema fotométrico capaz de captar a alteração da transmitância de um plasma rico em plaquetas (PRP) sob agitação constante, adicionando-se

um agente agregante como ADP ou epinefrina. Quando as plaquetas estão em suspensão, o plasma encontra-se turvo, o que dificulta a passagem de luz através do PRP. Entretanto, quando é adicionado um agonista, ocorre a formação de grumos plaquetários e o meio torna-se mais límpido, facilitando a passagem de luz e aumentando a transmitância, dessa forma, a porcentagem de agregação é diretamente proporcional à transmitância. 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, seguida pela amplificação de sinal, liberação do conteúdo granular e agregação irreversível, o que resulta na segunda onda observada na curva de agregação plaquetária (Figura 9) (KOLTAI *et al.*, 2017).

Figura 9 - Representação esquemática da curva de agregação plaquetária.



Fonte: ARENHART, 2020.

Para a realização dos experimentos, as amostras de sangue coletadas foram centrifugadas a 123 g por 10 minutos em temperatura ambiente. O sobrenadante obtido foi transferido para um tubo tipo Falcon de 15 mL, obtendo-se um *pool* de PRP. Para a realização dos ensaios de agregação, é necessário que o *pool* de PRP tenha uma concentração aproximada de 250.000 plaquetas/mm³. Dessa forma, antes da realização dos experimentos, as plaquetas do PRP foram numeradas e sua concentração ajustada. Para tanto, após a obtenção do *pool* de PRP, 50 µL do *pool* de PRP 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 sobre a agregação plaquetária, 400 μL do *pool* de PRP foram incubados a 37 °C por 5 minutos com os extratos brutos. Posteriormente, as amostras foram estimuladas individualmente com ADP (10 μM concentração final; Sigma-Aldrich®, St. Louis, EUA) ou epinefrina (5 $\mu\text{g/mL}$ concentração final; Hipolabor, Minas Gerais, BR), e a agregação foi acompanhada por 5 minutos utilizando-se o software AgreGo. Para acertar a linha de base de turbidez da amostra, foi utilizado o *pool* de PPP obtido por meio da centrifugação das amostras de sangue citratado a 1.107 g por 15 minutos à temperatura de 8 °C. Todos os experimentos foram realizados em triplicata e dentro de um período de três horas após a coleta da amostra.

4.4 DETERMINAÇÃO DA CI_{50} DOS EXTRATOS BRUTOS DE CASCA DE LICHIA

Para a determinação da CI_{50} , foi realizada diluição seriada do extrato bruto na razão de dois com o uso de água destilada como diluente. O extrato bruto nas suas variadas concentrações foi utilizado nos ensaios de agregação plaquetária como anteriormente descrito no item 4.3. A CI_{50} é obtida a partir da curva concentração-resposta, utilizando-se o *software* GraphPad Prism 5. 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® v.20.115. Para a construção das figuras, foi utilizado o software GraphPad Prism®. Os dados foram expressos como média e desvio-padrão. 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 DOS EXTRATOS BRUTOS SOBRE A AGREGAÇÃO PLAQUETÁRIA

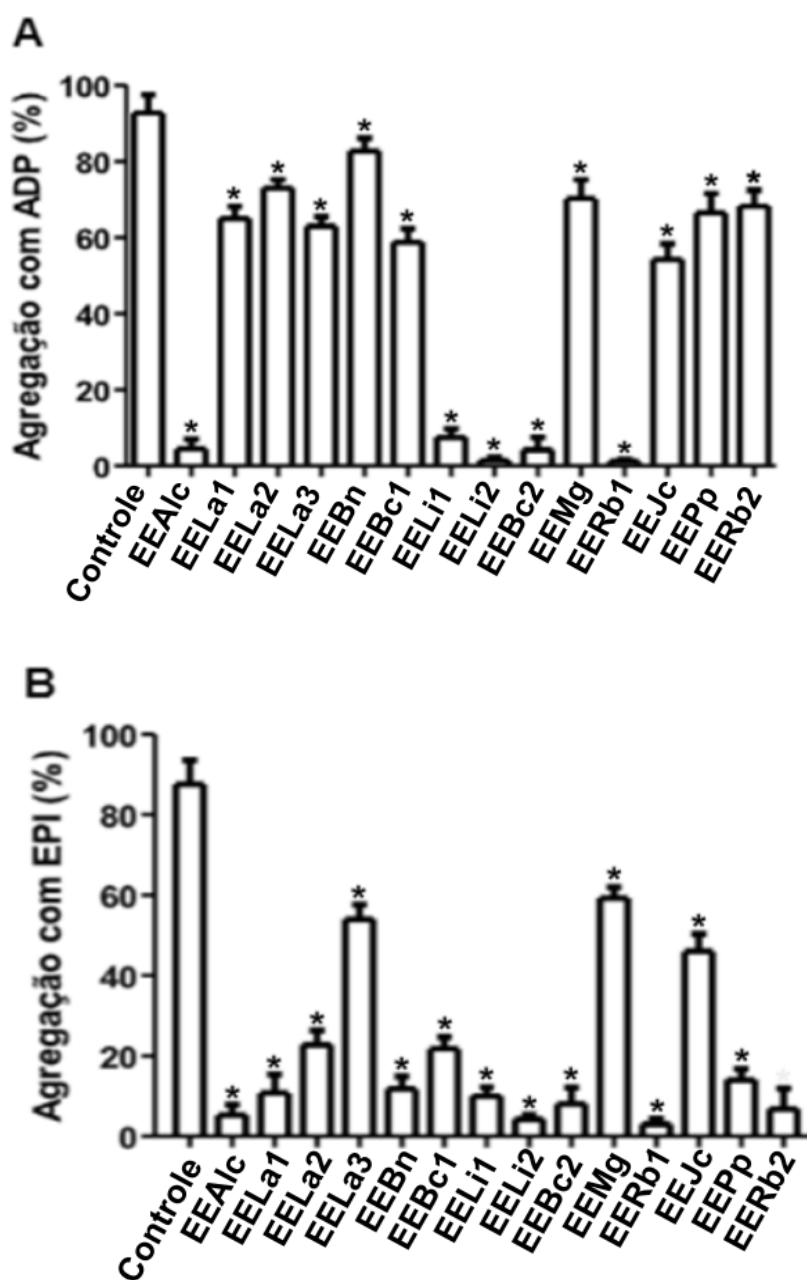
A Tabela 2 e a Figura 10 apresentam os efeitos dos extratos das plantas sobre a agregação plaquetária. Como se pode observar, ao comparar com o controle, todos os extratos inibiram significativamente a agregação quando estimulados por ambos os agonistas.

Tabela 2 - Efeito dos extratos das plantas sobre a agregação plaquetária induzida por difosfato de adenosina (ADP - 10 μ M) e epinefrina (5 μ g/mL).

Tratamento	ADP (%) Média \pm DP	Epinefrina (%) Média \pm DP
Controle (DMSO 0,5%)	92,8 \pm 4,7	87,6 \pm 6,0
EEAlc (800 μg/mL)	4,5 \pm 2,5*	5,3 \pm 2,6*
EELa1 (800 μg/mL)	65,0 \pm 3,2*	10,8 \pm 4,6*
EELa2 (800 μg/mL)	73,0 \pm 2,3*	22,8 \pm 3,6*
EELa3 (800 μg/mL)	63,0 \pm 2,5 *	54,0 \pm 3,7*
EEBn (800 μg/mL)	82,8 \pm 3,3*	11,8 \pm 3,1*
EEBc1 (800 μg/mL)	58,8 \pm 3,6*	21,8 \pm 2,9*
EELi1 (800 μg/mL)	7,5 \pm 2,3*	10,0 \pm 2,2*
EELi2 (800 μg/mL)	1,5 \pm 0,9*	4,3 \pm 1,1*
EEBc2 (800 μg/mL)	4,3 \pm 3,3*	8,0 \pm 4,1*
EEMg (800 μg/mL)	70,3 \pm 4,9*	59,3 \pm 2,7*
EERb1 (800 μg/mL)	1,3 \pm 0,4*	3,0 \pm 1,4*
EEJc (800 μg/mL)	54,3 \pm 4,1*	46,0 \pm 4,3*
EEPP (800 μg/mL)	66,5 \pm 5,0*	14,0 \pm 2,8*
EERb2 (800 μg/mL)	68,3 \pm 4,2*	6,8 \pm 5,1*

DP - desvio padrão; DMSO - dimetilsulfóxido; EEAlc - extrato etanólico de alcachofra; EELa1 - extrato etanólico de laranja, coleta: 22/11/2017; EELa2 - extrato etanólico de laranja, coleta: 16/12/2017; EELa3 - extrato etanólico de laranja, coleta: 16/01/2019; EEBn - extrato etanólico da flora de banana; EEBc1 - extrato etanólico de bacuri (fruto); EELi1 - extrato etanólico da casca de lichia; EELi2 - extrato etanólico da semente de lichia; EEBc2 - extrato etanólico de bacuri (fruta); EEMg - extrato etanólico de semente de manga; EERb1 - extrato etanólico do caule de rambutan; EEJc - extrato etanólico de jucá; EEPP - extrato etanólico de semente de papaya; EERb2 - extrato etanólico da casca de rambutan. Os dados foram expressos como média \pm desvio padrão (N = 3). * Diferença significativa em relação ao controle (P \leq 0,05). Fonte: A autora.

Figura 10 - Efeito dos extratos das plantas sobre a agregação plaquetária induzidas por ADP e epinefrina.



Painel A: Porcentagens da agregação plaquetária utilizando-se o difosfato de adenosina (ADP - 10 μ M) como agonista. Painel B: Porcentagens da agregação plaquetária utilizando-se a epinefrina (EPI - 5 μ g/mL) como agonista. Os dados foram expressos como média \pm desvio padrão (N = 3). Controle - DMSO 0,5%. EEAlc - extrato etanólico de alcachofra; EELa1 - extrato etanólico de laranja, coleta: 22/11/2017; EELa2 - extrato etanólico de laranja, coleta: 16/12/2017; EELa3 - extrato etanólico de laranja, coleta: 16/01/2019; EEBn - extrato etanólico da flora de banana; EEBC1 - extrato etanólico de bacuri (fruto); EELi1 - extrato etanólico da casca de lichia; EELi2 - extrato etanólico da semente de lichia; EEBC2 - extrato etanólico de bacuri (fruta); EEMg - extrato etanólico de semente de manga; EERb1 - extrato etanólico do caule de rambutan; EEJc - extrato etanólico de jucá; EEPP - extrato etanólico de semente de papaya; EERb2 - extrato etanólico da casca de rambutan. Fonte: A autora.

Ainda que todos os extratos tenham inibido a agregação plaquetária de forma significativa, porcentagens de agregação médias superiores a 50% não são consideradas promissoras, uma vez que as concentrações de extrato utilizadas já são altas e, dessa forma, a CI_{50} calculada provavelmente seria muito elevada, o que dificultaria a transposição para ensaios *in vivo*.

Dessa forma, pode-se concluir que os melhores resultados foram obtidos com os extratos EEAlc, EELi1, EELi2, EEBc2 e EERb1 para o ADP, e EEAlc, EELa1, EELa2, EEBn, EEBc1, EELi1, EELi2, EEBc2, EERb1, EEPp, EERb2 para a epinefrina. Ainda, os extratos EEAlc, EELi1, EELi2, EEBc2 e EERb1 podem ser considerados os mais promissores, pois inibiram em mais de 50% a agregação induzida por ambos agonistas.

Para que a agregação plaquetária ocorra adequadamente, é necessário que a ativação da plaqueta ocorra tanto por vias de sinalização que são iniciadas pela proteína Gq, quanto por Gi (AMELIRAD *et al.*, 2019). Como já mencionado anteriormente, o ADP é capaz de ativar os mediadores Gq e Gi por meio de sua ligação com os receptores P2Y1 e P2Y12, respectivamente (ESTEVEZ; DU, 2017; WIJEYERATNE; HEPTINSTALL, 2011). A epinefrina, por sua vez, é considerada um agonista fraco, capaz de ativar o mediador Gi por sua ligação com o receptor α_2 -adrenérgico, mas os seus receptores não são acoplados à proteína Gq. Com isso, a epinefrina é dependente dos processos de amplificação de sinal pró-agregante dependentes de ADP, TxA2 e outros agonistas capazes de ativar Gq para gerar uma agregação normal (CIMMINO; GOLINO, 2013; CATTANEO, 2015; DAWOOD *et al.*, 2012; HARRISON *et al.*, 2011).

Com isso, pode-se sugerir que os extratos que apresentaram melhor atividade sobre a epinefrina do que sobre o ADP (EELa1, EELa2, EEBn, EEBc1, EEPp e EERb2) estão atuando preferencialmente sobre as vias iniciadas pela proteína Gi, uma vez que a epinefrina é totalmente dependente desse mediador para iniciar sua ação, enquanto o ADP é capaz de ativar outros mediadores. Por outro lado, os extratos que inibiram fortemente a ação dos dois agonistas testados (EEAlc, EELi1, EELi2, EEBc2 e EERb1) podem estar agindo principalmente sobre as vias mediadas pela proteína Gq ou, outra hipótese, é que esteja atuando sobre etapas comuns às duas vias. Contudo, precisa-se considerar que os extratos são uma mistura heterogênea de metabólitos de suas plantas de origem. Portanto, é possível que esses extratos estejam atuando de forma sinérgica sobre múltiplas vias de sinalização plaquetária, o que também explicaria a atividade simultânea para os dois agonistas. Estudos com os compostos isolados a partir dos extratos são necessários para melhor determinar as vias de atuação dos mesmos.

Como mencionado anteriormente, dados na literatura relacionam a presença de certos compostos do metabolismo secundário de plantas com atividade antiplaquetária e/ou anticoagulante, como flavonoides, feniletanoides, fenilpropanoides, alcaloides, cumarinas, ácidos fenólicos, fenantrenos e saponinas (BOJIĆ *et al.*, 2019; CHAVES *et al.*, 2010; CHUA; KOH, 2006; KUBATKA *et al.*, 2022).

Flavonoides sulfatados estão presentes em espécies da família Asteraceae e a incubação de plaquetas com esse tipo de flavonoides resultou em uma inibição da agregação plaquetária tempo-dependente quando diferentes agonistas, incluindo ADP, trombina e colágeno, foram utilizados (CHAVES *et al.*, 2010). Ainda, Botsaris e Alves (2007) relacionaram a presença de flavonoides em extratos de alcachofra, que pertence à família Asteraceae, com o aumento da produção de óxido nítrico que, além do seu efeito vasodilatador, protegeu os vasos sanguíneos da trombose ao inibir a agregação e a adesão plaquetária. Pode-se sugerir que o extrato de alcachofra (EEAlc) testado nesse trabalho contenha flavonoides semelhantes aos testados por Chaves e colaboradores (2010) e Botsaris e Alves (2007), o que explica o efeito antiagregante significativo (Tabela 2) obtido nesse estudo.

A presença de flavonoides também pode ser observada em frutos de laranja. Um estudo com frações de laranja doce revelou a presença de quatro flavonoides glicosilados, dentre eles: eriocitrina, narirutina, hesperidina e didimina, detectados em todas as cascas e polpas de frutas avaliadas (LIU, 2018). Trabalhos demonstraram que espécies do gênero *Citrus* spp. ricas em flavonoides apresentam atividade antiagregante, e que a presença majoritária de hesperidina e naringina tem relação com esse efeito (ASSEFA *et al.*, 2016; DOSOKY; SETZER, 2018; YU *et al.*, 2011). Da mesma forma, no presente estudo, os extratos EELa1, EELa2 e EELa3, advindos de laranjas da mesma laranjeira, mas colhidas em datas distintas, inibiram a agregação plaquetária (Tabela 2). No entanto, eles apresentaram resultados diferentes entre si. Os três extratos inibiram de maneira significativa a agregação induzida por ADP e epinefrina, porém, apenas as inibições geradas por EELa1 e EELa2 para a epinefrina foram promissoras. Interessantemente, esses dois extratos foram obtidos aproximadamente dois anos antes do que EELa3, o que sugere que as condições ambientais e época de colheita podem ter influenciado no teor dos constituintes vegetais bioativos presentes nos extratos.

A atividade antiagregante do extrato de banana (EEBn) pode estar relacionada com a presença de seus constituintes já relatados na literatura. Em um estudo realizado por Pereira (2014), no qual envolvia diferentes extratos provenientes de casca de banana, foi realizada a

análise fitoquímica, identificação e quantificação dos compostos bioativos presentes na fruta. Alguns dos compostos encontrados pelo autor já demonstraram atividade antiagregante em outros estudos, dentre eles, galocatequina, epigalocatequina, ácido gálico, kaempferol e quercetina (CHANG *et al.*, 2012; CHAVES *et al.*, 2010; CHOI *et al.*, 2015; JOO *et al.*, 2018; MOSAWY, 2015; MOSCHONA *et al.*, 2017; NEIVA *et al.*, 2008; OH *et al.*, 2012; ROLNIK *et al.*, 2020; STRACK; SOUZA, 2012; VALLANCE *et al.*, 2019; WANG *et al.*, 2015). Nesse sentido, o resultado favorável observado para o extrato de banana (EEBn) (Tabela 2) frente à epinefrina pode estar relacionado com a presença de tais constituintes.

Os extratos provenientes de bacuri (EEBc1 e EEBc2) apresentaram inibição significativa da agregação plaquetária para os dois agonistas testados (Tabela 2). O bacuri, fruto muito utilizado pela população amazônica, tem sido amplamente estudado por apresentar vários efeitos biológicos como atividade antioxidante, leishmanicida, antimicrobiana, citotóxica, anticonvulsivante, cicatrizante e anti-inflamatória (COSTA JÚNIOR *et al.*, 2010; COSTA JÚNIOR *et al.*, 2011; COSTA JÚNIOR *et al.*, 2013; SANTOS JÚNIOR *et al.*, 2010). Atualmente, diversas atividades vêm sendo relatadas para todas as partes deste fruto (semente, casca e polpa). Além de apresentar metabólitos com atividade antiagregante aqui já citadas, como kaempferol, quercetina e catequina, sua composição química apresenta também classes de diterpenos, xantonas, compostos fenólicos, vitaminas C e E e antocianinas (CUNHA JUNIOR *et al.*, 2020; YAMAGUCHI *et al.*, 2014). Estudos já demonstraram a atividade antiagregante das vitaminas C e E (FAHIM *et al.*, 2011; LIU *et al.*, 2020; MOUSA, 2010). Além disso, alguns diterpenos também já apresentaram atividade antiplaquetária (MOURA *et al.*, 2011; MOURA *et al.*, 2014; TIRAPELLI *et al.*, 2010; YANG *et al.*, 2010). Os resultados obtidos nesse estudo para os extratos de bacuri (EEBc1 e EEBc2) podem estar relacionados com a presença dos constituintes citados.

Correia e colaboradores (2006) avaliaram os metabólitos presentes na família Anacardiaceae e determinaram que os terpenoides são as substâncias mais representativas no gênero *Mangifera*, ao qual pertence a manga. Além da mangiferina, foram isolados da fruta de manga compostos fenólicos simples com comprovada atividade antioxidante, tais como ácido hidroxibenzoico, galatos de alquila, ésteres do ácido benzóico, além dos flavonóides catequina e epicatequina, e, de seu látex, foram identificados compostos conhecidos como lipídios fenólicos. Trabalhos já demonstraram que galatos, catequina e epicatequina possuem ação antiagregante (JOO *et al.*, 2018; NEIVA *et al.*, 2008; VALLANCE *et al.*, 2019). Adicionalmente, Alañón e colaboradores (2019) constataram que a semente de manga era capaz de inibir significativamente a agregação plaquetária, enquanto a polpa e casca da fruta e

a casca da semente não eram. Em seu estudo, Alañón e colaboradores (2019) verificaram que parte desse efeito estava relacionado à presença de mangiferina no extrato, uma vez que essa foi capaz de inibir em 31% a agregação plaquetária. Semelhantemente, no presente trabalho, o extrato de semente de manga (EEMg) também apresentou atividade antiagregante (Tabela 2) e isso pode estar relacionado a presença de mangiferina, catequina, epicatequina, entre outros.

Os extratos EERb1 e EERb2, provenientes do caule e da casca do rambutan, respectivamente, apresentaram atividade antiagregante promissora (exceto EERb1 para o ADP) no presente trabalho (Tabela 2). Estudos identificaram que 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* (HERNÁNDEZ-HERNÁNDEZ *et al.*, 2019; JAHURUL *et al.*, 2020). O rambutan pertence à família Sapindaceae, conhecida por ser uma 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, pode estar relacionado com o efeito observado.

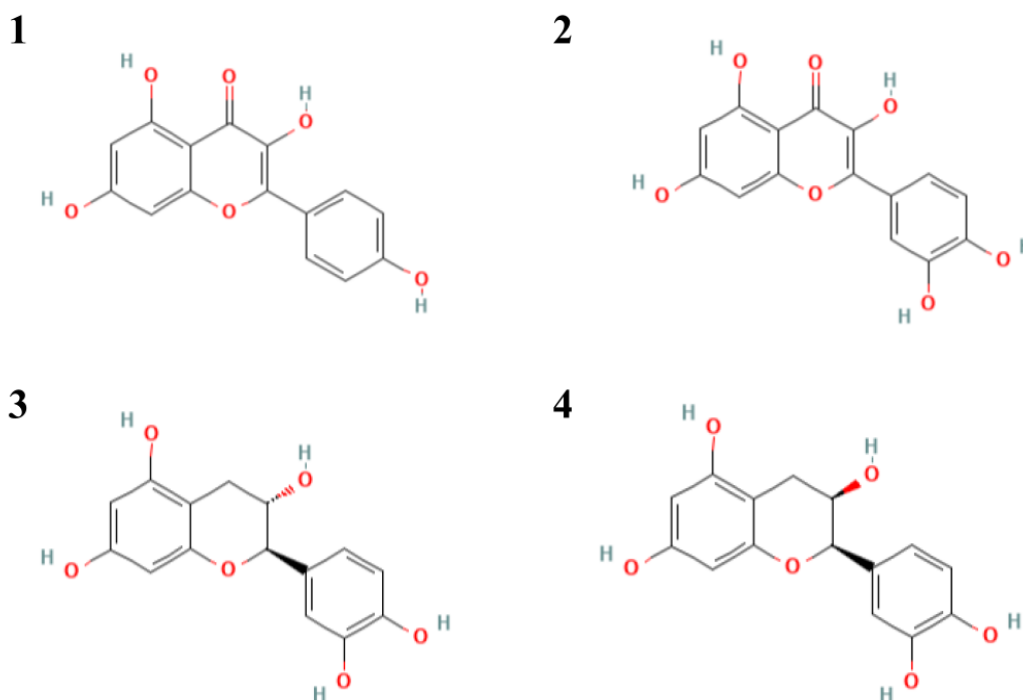
O jucá ou pau-ferro é uma espécie arbórea bastante conhecida na medicina popular, sendo suas diferentes partes utilizadas no tratamento de várias doenças e sintomas. Diante de sua importância etnofarmacológica, o Ministério da Saúde brasileiro incluiu esta espécie na Lista Nacional de Plantas Medicinais importantes para o Sistema de Saúde (SANTOS, 2018). Estudos fitoquímicos apontam a presença de flavonoides, saponinas, taninos, cumarinas, esteroides e compostos fenólicos como possíveis classes de metabólitos responsáveis por suas atividades biológicas (GONZALEZ, 2005). Além disso, outro estudo com extrato seco de jucá mostrou seu potencial antioxidante, fato esse relacionado com a riqueza em componentes polifenólicos como o ácido gálico, e os flavonoides quercetina glicosilada e kaempferol glicosilado (NETO, 2018). A quercetina, o ácido gálico e as cumarinas também já foram reconhecidos como inibidores da agregação plaquetária (CHANG *et al.*, 2012; HSIA *et al.*, 2019; STRACK; SOUZA, 2012; VALLANCE *et al.*, 2019; WRIGHT *et al.*, 2010) e, provavelmente, a atividade antiagregante apresentada pelo extrato EEJc (Tabela 2), proveniente de jucá, deve-se à presença desses metabólitos.

O extrato EEPp, derivado de mamão papaya, apresentou atividade antiagregante promissora para a epinefrina (Tabela 2). Um estudo realizado por Nugroho e colaboradores (2017), utilizando extrato metanólico de folhas de mamão papaya, revelou a presença de

flavonoides antioxidantes nas folhas como quercetina, kaempferol e seus glicosídeos. Em outro trabalho, foi relatada a presença de vitamina C e carotenoides como licopeno, β -criptoxantina e β -caroteno em frutos maduros de mamão papaya (SANCHO *et al.*, 2011). Kaempferol, quercetina e vitamina C já foram citados no presente estudo como compostos com atividade antiagregante (CHOI *et al.*, 2015; FAHIM *et al.*, 2011; LIU *et al.*, 2020; MOSAWY, 2015; MOSCHONA *et al.*, 2017; OH *et al.*, 2012; ROLNIK *et al.*, 2020; STRACK; SOUZA, 2012; WANG *et al.*, 2015). Sawardekar e colaboradores (2016) realizaram um estudo para comparar o efeito antiplaquetário do licopeno com o ácido acetilsalicílico (AAS) e concluíram que todas as concentrações de licopeno utilizadas reduziram a agregação plaquetária induzida por ADP e colágeno, obtendo resultados favoráveis em relação ao AAS.

Diante do exposto, pode-se observar que os achados na literatura e nesse estudo ressaltam o potencial farmacológico dos compostos encontrados nas plantas, envolvendo a presença dos grandes grupos principais de metabólitos secundários (terpenos, compostos fenólicos e compostos nitrogenados) e vitaminas. Ainda, nesse trabalho, destacam-se os compostos fenólicos como potenciais agentes antiplaquetários, dentre eles os flavonoides kaempferol, quercetina, catequina e epicatequina (Figura 11).

Figura 11 - Fórmula estrutural de kaempferol (1), quercetina (2), catequina (3) e epicatequina (4).



1 - kaempferol, 2 - quercetina, 3 - catequina, 4 - epicatequina. Fonte: PubChem.

5.2 DETERMINAÇÃO DA CI_{50} DO EXTRATO BRUTO DE CASCA DE LICHIA (EELi1)

Dentre os extratos mais promissores, os extratos de laranja (EELa1 e EELa2), semente de lichia (EELi2), caule de rambutan (EERb1) e bacuri (fruta) (EEBc2) já tiveram a CI_{50} determinada por outro membro do grupo de pesquisa. Sendo assim, optou-se por continuar os experimentos com o extrato de casca de lichia (EELi1).

Na Tabela 3 estão apresentados os resultados obtidos pela diluição seriada do extrato de casca de lichia (EELi1) utilizando-se o ADP e a epinefrina como agonistas.

Tabela 3 - Efeito dos extratos de casca de Lichia (EELi1) sobre a agregação plaquetária induzida por difosfato de adenosina (ADP - 10 μ M) e epinefrina (5 μ g/mL).

Tratamento	ADP (%) Média \pm DP	Epinefrina (%) Média \pm DP
Controle (DMSO 0,5%)	96,0 \pm 4,8	90,0 \pm 3,8
EELi1 (800 μg/mL)	7,5 \pm 2,3*	10,0 \pm 2,2*
EELi1 (400 μg/mL)	81,8 \pm 9,0	78,5 \pm 9,2

DP - desvio padrão; DMSO - dimetilsulfóxido; EELi1 - extrato etanólico da casca de lichia. Os dados foram expressos como média \pm desvio padrão (N = 3). * Diferença significativa em relação ao controle ($P \leq 0,05$).

Fonte: A autora.

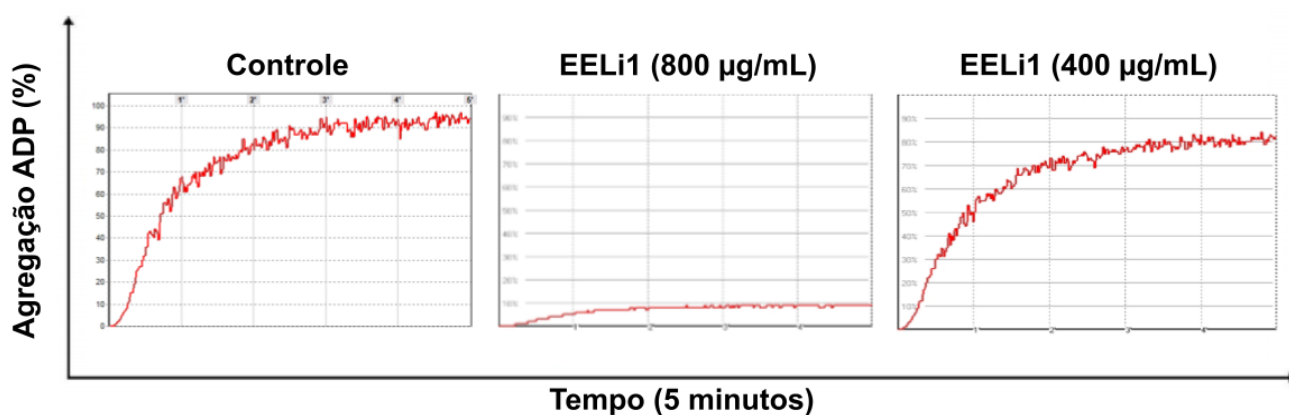
Ao observar a Tabela 3, pode-se concluir que o extrato apresenta atividade dependente da concentração, uma vez que, ao reduzir a concentração pela metade, o efeito antiagregante também diminui e chega próximo da porcentagem de agregação obtida no controle. Infelizmente, devido ao pequeno volume de extrato cedido para a realização desse trabalho, não foi possível realizar diluições intermediárias para estabelecer uma curva concentração-resposta e, conseqüentemente, determinar a CI_{50} do extrato. No entanto, ao avaliar melhor o efeito de EELi1 sobre a agregação plaquetária e tentar entender a forma como o extrato atua sobre a agregação plaquetária, foi possível avaliar o perfil da curva de agregação.

Em relação ao perfil das curvas de agregação, sabe-se que a agregação plaquetária ocorre após a ligação de agonistas a seus receptores acoplados a proteínas Gq e Gi, sendo que essas ligações transduzem sinais de ativação plaquetária, gerando a primeira onda de agregação ou agregação reversível. Posteriormente, as vias de sinalização ativadas por diferentes agonistas convergem para vias de sinalização comuns, amplificando os sinais

desencadeados pela ligação ao receptor e liberando o conteúdo granular, gerando assim a segunda onda ou agregação irreversível (BERNARDI; MOREIRA, 2004).

Na Figura 12, estão apresentadas as curvas de agregação obtidas pela diluição seriada do extrato de casca de lichia (EELi1) quando o ADP foi empregado como agonista. Como pode ser observado, o extrato EELi1 na concentração de 800 $\mu\text{g/mL}$ inibiu parcialmente a primeira onda de agregação. Por outro lado, na concentração de 400 $\mu\text{g/mL}$, o extrato inibiu parcialmente apenas a segunda onda e não afetou a primeira.

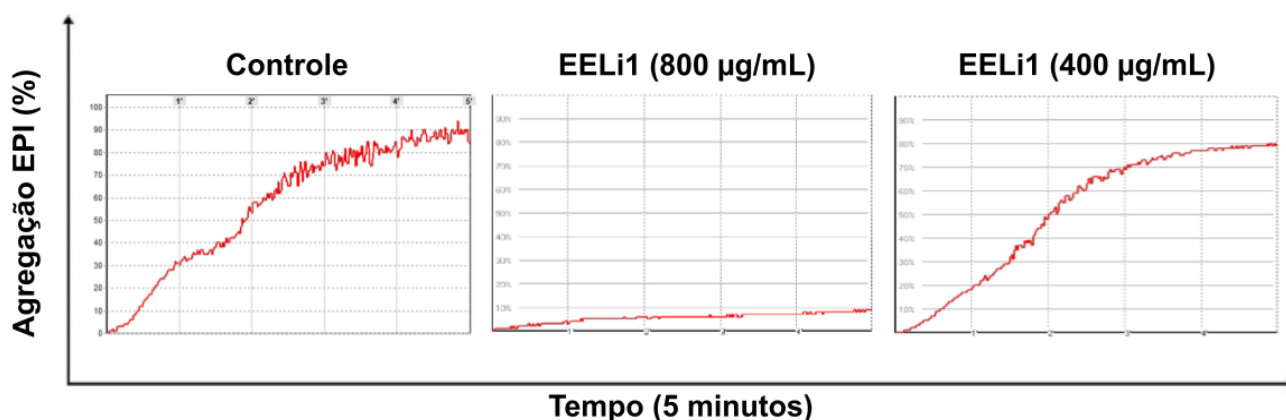
Figura 12 - Efeito do extrato de casca de lichia (EELi1) sobre a agregação plaquetária induzida por ADP.



ADP - difosfato de adenosina (10 μM); Controle - DMSO 0,5%; EELi1 - extrato etanólico da casca de lichia. As amostras foram incubadas durante 5 minutos. Imagens ilustrativas de um experimento de três. Fonte: A autora.

Na Figura 13, estão apresentadas as curvas de agregação obtidas pela diluição seriada de EELi1 quando a epinefrina foi utilizada para iniciar a agregação. De forma semelhante ao ADP, observa-se que o extrato na concentração de 800 $\mu\text{g/mL}$ inibiu totalmente a segunda onda de agregação e parcialmente a primeira, enquanto, na concentração de 400 $\mu\text{g/mL}$, o extrato inibiu parcialmente a segunda onda e não afetou a primeira.

Figura 13 - Efeito do extrato de casca de lichia (EELi1) sobre a agregação plaquetária induzida por epinefrina.



EPI - epinefrina (5 µg/mL); Controle - DMSO 0,5%; EELi1 - extrato etanólico da casca de lichia. As amostras foram incubadas durante 5 minutos. Imagens ilustrativas de um experimento de três. Fonte: A autora.

Por inibir de alguma forma a primeira onda, sugere-se que o extrato possui ação sobre a transdução de sinal pró-agregante ocasionada pela ligação do agonista ao seu receptor. Contudo, precisa-se considerar que os extratos são uma mistura heterogênea de metabólitos de suas plantas de origem, portanto, pode haver compostos presentes nos extratos que atuam sobre a segunda onda de agregação e que não são percebidos por essa análise devido à presença dos que atuam na primeira onda.

A lichia (Figura 14), pertencente à família Sapindaceae, é uma planta importante na medicina tradicional chinesa e no sudeste asiático, e suas bioatividades promissoras atraíram muita atenção de pesquisadores de todo o mundo. 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).

Estudos já demonstraram o potencial antioxidante, antimicrobiano, hepato-protetor, anticâncer, citotóxico, anti-inflamatório, analgésico e imunomodulador em diferentes partes da lichia (GANJEWALA, 2017). Prasad e colaboradores (2009) investigaram a presença de compostos fenólicos em extratos de sementes de lichia e relataram a presença de ácido gálico, procianidina B2, galocatequina, epicatequina e epicatequina-3-galato. Além disso, como já mencionado anteriormente, a família Sapindaceae é conhecida pela abundância de compostos fitoquímicos em todas as partes da planta. Dentre esses compostos, o kaempferol já é conhecido por desempenhar atividade antiagregante (AKBAR, 2020; DIANITA; JANTAN, 2019). Ainda, Sung e colaboradores (2012) relataram que o extrato de lichia inibiu a

agregação plaquetária induzida por colágeno e ADP em PRP de ratos na concentração de 4 mg/mL. Nesse sentido, o efeito antiagregante promissor dos extratos de Lichia (EELi1 e EELi2) para o ADP e a epinefrina possivelmente está relacionado com a presença de tais constituintes.

Como pode ser observado, 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.

Ainda, a partir dos resultados obtidos, foi possível evidenciar o potencial que a flora brasileira representa para a produção de novos fármacos antiagregantes.

6 CONCLUSÃO

A partir dos resultados encontrados concluiu-se que:

- Todos os extratos de plantas causaram inibição significativa da agregação plaquetária induzida por ADP e epinefrina;
- Os extratos que inibiram de forma mais promissora a agregação plaquetária foram: EEAlc, EELi1, EELi2, EEBc2 e EERb1;
- Não foi possível determinar a CI_{50} do extrato de EELi1, no entanto, acredita-se que sua atividade esteja relacionada com a inibição da transdução de sinais pró-agregantes.

REFERÊNCIAS

- ABBAS, A.K.; FAUSTO, N.; KUMAR, V. **Robbins & Cotran - Patologia - Bases Patológicas das Doenças**. 8a ed. Rio de Janeiro: Elsevier/Medicina Nacionais, 2010, 732 p.
- AHARONI A., GALILI G. Metabolic engineering of the plant primary-secondary metabolism interface. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 22, p. 1-6, 2010.
- 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.
- ALANÓN M. E. *et al.* Antiplatelet Activity of Natural Bioactive Extracts from Mango (*Mangifera Indica* L.) and its By-Products. **Antioxidants**. 2019, 8, 517.
- AMELIRAD A. *et al.* Signaling Pathways of Receptors Involved in Platelet Activation and Shedding of These Receptors in Stored Platelets. **Adv Pharm Bull**. 2019; 9(1): 38-47.
- 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.
- ANGIOLILLO, D. J.; UENO, M.; GOTO, S. Basic principles of platelet biology and clinical implications. **Circ J**, v. 74, n. 4, p. 597-607, 2010.
- ARENHART, T. Avaliação do efeito in vitro de compostos isolados de algas marinhas pardas sobre a hemostasia humana. UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA. Florianópolis, 2020.
- ASSEFA A. D., KO E. Y., MOON S. H. *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.
- 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.
- BIODIVERSIDADE. Governo Federal. Disponível em: <https://www.gov.br/mma/pt-br/assuntos/biodiversidade#:~:text=O%20Brasil%20ocupa%20quase%20metade,e%20tr%C3%AAs%20grandes%20ecossistemas%20marinhos> Acesso em 10/10/2022.

BORGES L. P.; AMORIM V. A. METABÓLITOS SECUNDÁRIOS DE PLANTAS. **Revista Agrotecnologia**, Ipameri, v.11, n.1, p.54-67, 2020.

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

BOTSARIS A. S., ALVES L. F. *Cynara scolymus L.* (Artichoke). **Revista Fitos**, p. 51-63, Rio de Janeiro, 2007.

BRASS, L. F. *et al.* Regulating thrombus growth and stability to achieve an optimal response to injury. **J Thromb Haemost.**, v. 9, n. 1, p. 66-75, 2011.

BROOS, K. *et al.* Platelets at work in primary hemostasis. **Blood Rev**, v. 25, n. 4, p. 155-167, 2011.

BYE, A. P.; UNSWORTH, A. J.; GIBBINS, J. M. Platelet signaling: a complex interplay between inhibitory and activatory networks. **J Thromb Haemost**, v. 14, n. 5, p. 918-930, 2016.

CATTANEO, M. P2Y12 receptors: structure and function. **Journal Of Thrombosis And Haemostasis**, [s.l.], v. 13, p. S10-S16. 2015.

CHANG S. S., LEE V. S., TSENG Y. L., *et al.* Gallic Acid Attenuates Platelet Activation and Platelet-Leukocyte Aggregation: Involving Pathways of Akt and GSK3 β . **Evid Based Complement Alternat Med.** 2012; 2012:683872.

CHAPIN, J. C.; HAJJAR, K. A. Fibrinolysis and the control of blood coagulation. **Blood Rev.**, v. 29, n. 1, p. 17-24, 2015.

CHAVES D. S. A. *et al.* Metabólitos secundários de origem vegetal: uma fonte potencial de fármacos antitrombóticos. **Quím. Nova**, vol. 33, n. 1, São Paulo, 2010.

CHOI J. H. *et al.* Kaempferol inhibits thrombosis and platelet activation. **Biochimie**. Volume 115, 2015, Pages 177-186.

CHUA T. K, KOH H. L. Medicinal plants as potential sources of lead compounds with anti-platelet and anti-coagulant activities. **Mini Reviews in Medicinal Chemistry**. 2006 Jun;6(6):611-624.

CIMMINO, G.; GOLINO, P. Platelet biology and receptor pathways. **J Cardiovasc Transl Res**, v. 6, n. 3, p. 299-309, 2013.

CORREIA S. J., DAVID J. P., DAVID J. M. Secondary metabolites from species of *Anacardiaceae*. **Quím. Nova**, vol. 29, n. 6, São Paulo, 2006.

COSTA JÚNIOR J. S. *et al.* Cytotoxic and leishmanicidal properties of garcinielliptone FC, a prenylated benzophenone from *Platonia insignis*. **Natural Product Research** Vol.27, No.4-5, Pp. 470-474, 2013.

COSTA JÚNIOR J. S. *et al.* Evaluation of antioxidant effects in vitro of garcinielliptone FC (GFC) isolated from *Platonia insignis Mart.* **Journal of Medicinal Plants Research**, Vol. 5, No.2, pp.293-299, 2011.

COSTA JÚNIOR J. S. *et al.* Evaluation of effects of dichloromethane fraction from *Platonia insignis Mart.* on pilocarpine-induced seizures. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, Vol. 21, pp. 1104-1110, 2011.

COSTA JÚNIOR J. S. *et al.* Evaluation of effects of ethanolic extract (EE) from *Platonia insignis Mart.* on pilocarpine-induced seizures. **Journal of biological Science**, Vol. 10, pp.747-753, 2010.

COSTA JÚNIOR J. S. *et al.* Evaluation of possible anticonvulsant effects of ethyl acetate fraction from *Platonia insignis Mart.* (Bacuri) on epilepsy models. **Epilepsy & Behavior**. Vol. 22, pp. 678-684, 2011.

COSTA JÚNIOR J. S. *et al.* Investigation of Biological Activities of Dichloromethane and Ethyl Acetate Fractions of *Platonia insignis Mart.* Seed. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, Vol.112, pp. 34- 41, 2013.

CUNHA JÚNIOR R. M. *et al.* Brazilian Amazon Plants: An Overview of Chemical Composition and Biological Activity. **Natural Resources Management and Biological Sciences**, 2020.

DAWOOD B. B. *et al.* Evaluation of participants with suspected heritable platelet function disorders including recommendation and validation of a streamlined agonist panel. **Blood**, [s.l.], v. 120, n. 25, p. 5041-5049, 2012.

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

DIAS, D. A.; URBAN, S.; ROESSNER, U. A Historical Overview of Natural Products in Drug Discovery. **Metabolites**, v. 2, n. 2, p. 303-336, 2012.

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

ECLINPATH – Cornell University College of Veterinary Medicine. Disponível em: <http://eclinpath.com/>. Acesso em: 06 jul. 2022.

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

EZIHE-EJIOFOR, J. A; HUTCHINSON, N. Anticlotting mechanisms I: Physiology and pathology. **Contin Educ Anesth Crit Care Pain.**, v. 13, n. 3, p. 87-92, 2013.

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

- FAHIM M. A. *et al.* Antioxidants Alleviate Nicotine-Induced Platelet Aggregation in Cerebral Arterioles of Mice in Vivo. **Physiol. Res.** 60: 695-700, 2011.
- FLATO U. A. P. *et al.* Novos anticoagulantes em cuidados intensivos. **Rev. bras. ter. intensiva**, v.23, n.1, p. 68-77, 2011.
- FRANCO R. F. Fisiologia da coagulação, anticoagulação e fibrinólise. **Medicina**, Ribeirão Preto, v. 34, p. 229-237, 2001.
- GANJEWALA D. Secondary Metabolite Credentials and Biological Properties of *Litchi chinensis*. In: Kumar M., Kumar V., Prasad R., Varma A. (eds) The Lychee Biotechnology. **Springer**, Singapore, 2017.
- GAWAZ, M.; VOGEL, S. Platelets in tissue repair: control of apoptosis and interactions with regenerative cells. **Blood**, v. 122, n. 15, p. 2550-54, 2013.
- GITZ, E. *et al.* Platelet interaction with von Willebrand factor is enhanced by shear-induced clustering of glycoprotein Iba. **Haematologica.**, v. 98, n. 11, p. 1810-8, 2013.
- GONZALEZ F. G. Estudo farmacognóstico e farmacológico de *Caesalpinia ferrea Martius*. Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, 2005.
- HARRISON P. *et al.* Guidelines for the laboratory investigation of heritable disorders of platelet function. **British Journal Of Haematology**, [s.l.], v. 155, n. 1, p.30-44, 2011.
- 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.
- HSIA C. W., LIN K. C., LEE T. Y., *et al.* Esculetin, a Coumarin Derivative, Prevents Thrombosis: Inhibitory Signaling on PLC γ 2-PKC-AKT Activation in Human Platelets. **Int J Mol Sci.** 2019; 20(11):2731.
- 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.
- JENNE, C. N.; URRUTIA, R.; KUBES, P. Platelets: bridging hemostasis, inflammation, and immunity. **Int J Lab Hematol.**, v. 35, n. 3, p. 254-61, 2013.
- JENNINGS, L. K. Role of platelets in atherothrombosis. **Am J Cardiol.**, v. 103, n. 3, p. 4A-10A, 2009.
- JIANG Y. *et al.* Antioxidant properties of anthocyanins extracted from litchi (*Litchi chinensis Sonn.*) fruit pericarp tissues in relation to their role in the pericarp browning. **Food Chemistry**, v. 101, p. 1365-1371, 2007.

- JIN, J.; KUNAPULI, S. P. Coactivation of two different G protein-coupled receptors is essential for ADP-induced platelet aggregation. **Proc Natl Acad Sci**, v. 95, n. 14, p. 8070-4, 1998.
- JOBLING, L.; EYRE, L. Haemostasis, blood platelets and coagulation. **Anaesthesia and intensive care medicine**, v. 14, n. 2, p.51-53, 2013.
- JOO H. J. *et al.* Anti-platelet Effects of epigallocatechin-3-gallate in Addition to the Concomitant Aspirin, Clopidogrel or Ticagrelor Treatment. **Korean J Intern Med.** 2018; 33(3):522-531.
- 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.
- KUBATKA, P., MAZURAKOVA, A., KOKLESOVA, L. *et al.* Efeitos antitrombóticos e antiplaquetários de compostos derivados de plantas: um grande potencial de utilidade para cuidados primários, secundários e terciários no âmbito da medicina 3P. **EPMA Journal**, 407-431 (2022).
- LIMA, L. M. Modern Medicinal Chemistry: challenges and Brazilian contribution. **Quím. Nova** 30 (6), 2007.
- LISMAN, T. *et al.* Elevated levels of von Willebrand Factor in cirrhosis support platelet adhesion despite reduced functional capacity. **Hepatology.**, v. 44, n. 1, p. 53-61, 2006.
- LIU D. *et al.* Effects and Mechanisms of Vitamin C Post-Conditioning on Platelet Activation after Hypoxia/Reoxygenation. **Transfus Med Hemother.** 2020; 47:110-118.
- LIU X. *et al.* Functional Characterization of a Flavonoid Glycosyltransferase in Sweet Orange (*Citrus sinensis*). **Front. Plant Sci.** 2018.
- LORENZI T. F. Atlas de hematologia: clínica hematológica ilustrada. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006. 659p.
- MADAN, M.; BERKOWITZ, S. D.; TCHENG, J. E. Glycoprotein IIb/IIIa integrin blockade. **Circulation.**, v. 98, n. 23, p. 2629-35, 1998.
- 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.
- MOURA L. A. *et al.* Anticoagulation and antiplatelet effects of a dolastane diterpene isolated from the marine brown alga *Canistrocarpus cervicornis*. **Journal of Thrombosis and Thrombolysis**, 31(2), 235–240, 2011.
- MOURA L. A. *et al.* Antiplatelet and Anticoagulant Effects of Diterpenes Isolated from the Marine Alga, *Dictyota menstrualis*. **Mar. Drugs**, 12(5), 2471-2484, 2014.
- MOUSA S. A. Antithrombotic Effects of Naturally Derived Products on Coagulation and Platelet Function. **Methods in Molecular Biology**, 229-240, 2010.
- NEIVA T. J. C. *et al.* Atividade antiplaquetária do *Croton celtidifolius*. **Rev. Bras. Cienc. Farm.** [online]. 2008, vol.44, n.1, pp.127-132.
- NETO F. C. C. Desenvolvimento do extrato seco de *Libidibia ferrea* (jucá) como alimento funcional: caracterização química e avaliação das atividades antioxidante e anti-inflamatória em modelo de neuroinflamação. Universidade Federal do Ceará. Fortaleza, 2018.
- 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.
- NUGROHO A., *et al.* Identification and quantification of flavonoids in *Carica papaya* leaf and peroxynitrite-scavenging activity. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 7, Issue 3, p. 208-213, 2017.
- O'DONNELL J. S., O'SULLIVAN J. M., PRESTON R. J. S. Advances in understanding the molecular mechanisms that maintain normal haemostasis. **British Journal Of Haematology**, 2019.
- OH G. J. *et al.* Dual Roles of Quercetin in Platelets: Phosphoinositide-3-Kinase and MAP Kinases Inhibition, and cAMP-Dependent Vasodilator-Stimulated Phosphoprotein Stimulation. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2012, Article ID 485262, 10 pages, 2012.
- OLIVEIRA, G. M. M. de *et al.* Estatística Cardiovascular – Brasil 2021. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia** [online]. 2022, v. 118, n. 1, pp. 115-373.
- PALTA S., SAROA R., PALTA A. Overview of the coagulation system. **Indian J Anaesth.**, v. 58, n. 5, p. 515-523, 2014.
- PEREIRA A. Determinação do perfil químico e da atividade cicatrizante de extratos de casca de banana cultivar prata anã (*Musa sp.*) e o desenvolvimento de um curativo para pequenas lesões. Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2014.

- PRASAD, K. N. *et al.* Identification of phenolic compounds and appraisal of antioxidant and antityrosinase activities from litchi (*Litchi sinensis* Sonn.) seeds. **Food Chemistry**. Volume 116, Issue 1, 1 September 2009, Pages 1-7.
- RANG H. P. *et al.* Farmacologia, **Elsevier Editora Ltda.**, São Paulo, 2004.
- RODRIGUES E.S, CASTILHO-FERNANDES A., FONTES A. M. Novos conceitos sobre a fisiologia da hemostasia. **Revista da Universidade do Vale do Rio Verde**, v. 10, n. 1, p. 218-233, 2012.
- 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.
- SANCHO L. E., YAHIAE E. M., ADOLFO G. Identification and quantification of phenols, carotenoids, and vitamin C from papaya (*Carica papaya* L., cv. Maradol) fruit determined by HPLC-DAD-MS/MS-ESI. **Food Research International**. v. 44, Issue 5, p. 1284-1291, 2011.
- SANTOS JÚNIOR R. Q. *et al.* Estudo histológico da cicatrização de feridas cutâneas utilizando a banha de bacuri (*Platonia insignis* Mart.). **ConScientiae Saúde**, Vol. 9, pp. 575-581, 2010.
- SANTOS S. F. *et al.* Aspects of the in vitro culture of *Libidibia ferrea* as an alternative source for the production of secondary metabolites. **Espacios**. v. 39, n. 37, p. 17, 2018.
- SARNI-MANCHADO P. *et al.* Phenolic composition of litchi fruit pericarp. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 48, p. 5995-6002, 2000.
- SAWARDEKAR S. B., PATEL T. C., UCHIL D. Comparative evaluation of antiplatelet effect of lycopene with aspirin and the effect of their combination on platelet aggregation: An *in vitro* study. **Indian J Pharmacol**. 48(1): 26–31, 2016.
- SHIKDAR S., BHATTACHARYA P. T. International Normalized Ratio (INR). Treasure Island (FL): **StatPearls Publishing**, 2019.
- SIRA J., EYRE L. Physiology of haemostasis. **Anaesthesia and intensive care medicine**, v. 17, n. 2, p. 79-82, 2016.
- SMITH S. A., TRAVERS R. J., MORRISSEY J. H. How it all starts: initiation of the clotting cascade. **Crit Rev Biochem Mol Biol**., v. 50, n. 4, p. 326-336, 2015.
- STALKER, T. J. *et al.* Platelet Signaling. **Handb Exp Pharmacol**., v. 210, p. 59-85, 2012.
- STRACK M. H., SOUZA C. G. Anthocyanins, catechins and quercetin: evidences in the prevention and treatment of cardiovascular disease. **Rev Bras Nutr Clin**, 2012; 27(1): 43-50.
- 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, 2012.

SUNG, Y. Y.; YANG, W. K.; KIM, H. K. Antiplatelet, anticoagulant and fibrinolytic effects of *Litchi chinensis* Sonn. extract. **Mol. Med. Rep.**, 5 (2012), pp. 721-724.

TAIZ L., ZEIGER E. Fisiologia vegetal. 3. ed. Porto Alegre: **Artmed**, 2004. 719p.

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.

THOMAS, M. R.; STOREY, R. F. The role of platelets in inflammation. **Thromb Haemost.**, v. 114, n. 3, p. 449-458, 2015.

TIRAPELLI C. R. *et al.* Hypotensive action of naturally occurring diterpenes: A therapeutic promise for the treatment of hypertension. **Fitoterapia**, 81(7), 690–702, 2010.

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

VASANTHI H. R., SHRISHRIMAL N., DAS D. K. Phytochemicals from Plants to Combat Cardiovascular Disease. **Current Medicinal Chemistry**, 19(14), 2242–2251, 2012.

VERSTEEG, H. H. *et al.* New fundamentals in hemostasis. **Physiol Rev.**, v. 93, n. 1, p. 327-58, 2013.

WANG, S.; DONG, G.; SHENG, C. Structural Simplification of Natural Products. **Chem. Rev.**, v. 119, n. 6, 2019.

WANG, Y.; GALLANT, R. C.; NI, H. Extracellular matrix proteins in the regulation of thrombus formation. **Curr Opin Hematol.**, v. 23, n. 3, p. 280-7, 2016.

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.

WEITZ J. I., EIKELBOOM J. W. Advances in Thrombosis and Hemostasis. **Circulation Research**, v. 118, n. 9, p.1337-1339, 2016.

WIJEYERATNE Y. D., HEPTINSTALL S. Anti-platelet therapy: ADP receptor antagonists. **Br J Clin Pharmacol.**, v. 72, n. 4, p. 647-657, 2011.

WRIGHT B. *et al.* A structural basis for the inhibition of collagen-stimulated platelet function by quercetin and structurally related flavonoids. **British Journal of Pharmacology**. Vol 159, No 6, 2010, 1312-1325.

WTD 2021. World Thrombosis Day. **International Society on Thrombosis and Haemostasis**. Disponível em: <<http://www.worldthrombosisday.org/issue/thombosis/>>. Acesso em: 01 de Junho de 2022.

YAMAGUCHI K. K. L. Y. *et al.* Química e farmacologia do bacuri (*Platonia insignis*). **Scientia Amazonia**, v. 3, n.2, p. 39-46, 2014.

YANG N. Y. *et al.* Two new isopimarane diterpenes from the feces of *Trogopterus xanthipes*. **Fitoterapia**, 81(5), 381–384, 2010.

YU H. Y. *et al.* Anti-platelet effects of yuzu extract and its components. **Food and Chemical Toxicology**. 2011; 49(12):3018-3024.

YUN, S. H. *et al.* Platelet Activation: The Mechanisms and Potential Biomarkers. **BioMed Research International**, v. 2016, p. 1-5, 2016.

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.

ANEXO A - PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

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 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

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

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
SANTA CATARINA - UFSC



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_PSH_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