

UFRRJ
INSTITUTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

DISSERTAÇÃO

CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Schinus molle* L. E SUA PROPRIEDADE ANTIHEMOSTÁTICA

Rosiane Conceição dos Santos Siqueira da Silveira

2019



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

**CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DO ÓLEO ESSENCIAL DE
Schinus molle L. E SUA PROPRIEDADE ANTIHEMOSTÁTICA**

**ROSIANE CONCEIÇÃO DOS SANTOS SIQUEIRA DA
SILVEIRA**

Sob a Orientação do Professor
Douglas Siqueira de Almeida Chaves

e Co-orientação do Professor
Flávia Serra Frattani Ferreira

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestra em Química**, no Programa de Pós-Graduação em Química, Área de Concentração em Química.

Seropédica-RJ
Fevereiro de 2019

Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
Biblioteca Central / Seção de Processamento Técnico

Ficha catalográfica elaborada
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Silveira, Rosiane Conceição dos Santos Siqueira da,
S587c 1993-

Caracterização química do óleo essencial de *Schinus molle* L. e sua propriedade antihemostática / Rosiane Conceição dos Santos Siqueira da Silveira. - 2019.
63 f.

Orientador: Douglas Siqueira de Almeida Chaves.
Coorientadora: Flávia Serra Frattani Ferreira.
Dissertação (Mestrado). -- Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Programa de Pós-graduação em Química, 2019.

1. Aroeira. 2. Trombose. 3. Antiplaquetário.
4. Anticoagulante. I. Siqueira de Almeida Chaves, Douglas, 1982-, orient. II. Serra Frattani, Flávia, 1978-, coorient. III Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Programa de Pós-graduação em Química.
IV. Título.

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

ROSIANE CONCEIÇÃO DOS SANTOS SIQUEIRA DA SILVEIRA

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de Mestra em Química,
no Programa de Pós-Graduação em Química, Área de Concentração em Química.

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 06/02/2019

Douglas Siqueira de Almeida Chaves. Dr. UFRRJ
(Orientador)

Marco André Alves de Souza. Dr. UFRRJ

Cristiano Jorge Riger. Dr. UFRRJ

Luciana Wermelinger Serrão. Dr. UFRJ

Bianca Fernandes Glauser. Pós-Dra. UFRJ

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a Deus, o que seria de mim sem a fé que eu tenho nele. Dedico ainda aos meus pais e ao meu esposo.

AGRADECIMENTOS

Ao Senhor meu Deus, que me permitiu chegar até aqui, me dando forças e saúde para superar as dificuldades, me protegeu e me mostrou o seu amor incondicional a cada dia. Eu não seria nada sem o seu amor e misericórdia.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Douglas Siqueira Chaves, o qual eu tenho orgulho de dizer que trabalhamos juntos desde 2013, e que toda minha experiência profissional em pesquisa eu devo a ele. Obrigada professor, pelos incentivos, apoio e dedicação na elaboração deste e de outros trabalhos. Obrigada pela oportunidade de trabalhar com você, por todo conhecimento que me passou, pelas correções e pelas preocupações com meu desenvolvimento profissional e meu futuro, além da confiança depositada em mim. Sou eternamente grata!

Aos professores Dr. Marco André e Dra. Flávia Frattani, pela disponibilidade de tempo e atenção dados a mim, por disponibilizarem seus respectivos laboratórios, equipamentos e materiais para elaboração dos procedimentos, por todas as correções e aprendizado, e por tudo que fizeram que contribuisse para o desenvolvimento deste trabalho, deixo aqui o minha gratidão.

À mestrandia Alessandra Lyra, por ter se mostrado uma grande amiga em todo momento que precisei na UFRJ, se disponibilizou a me ajudar com muita boa vontade, disponibilizou do seu tempo, da sua atenção e paciência, lutou junto comigo, eu não tenho palavras para lhe agradecer. Meus sinceros agradecimentos.

Aos voluntários da UFRJ, que se disponibilizaram com muita boa vontade a doar sangue para esta pesquisa, à equipe do Laboratório de Análises Clínicas da Faculdade de Farmácia (LacFar) que me ajudou com a coleta de sangue, muito obrigada e que Deus os abençoe!

À professora Pós-Dra. Bianca Glauser, pela disponibilidade do indutor colágeno. Muito obrigada pela sua contribuição.

À CAPES, pela bolsa e apoio financeiro.

A todos os professores que passaram pela minha vida, que me ajudaram a subir cada degrau para alcançar esta conquista, desde a educação básica até a pós-graduação.

A esta universidade, e ao PPGQ pela oportunidade de fazer este curso.

Aos meus pais, Aparecida Cristiane e Gislenio Teixeira, os quais foram cruciais para esta conquista, pois me educaram, incentivaram e me formaram essa mulher que sou hoje. Obrigada pai, obrigada mãe, por serem tão presentes em cada momento de minha vida, por

nunca permitirem me faltar nada, mesmo diante de toda dificuldade que passamos juntos, pelos pais que foram e que são até hoje, pela nossa união. Deus sabe o quanto sou grata aos senhores.

Ao meu esposo, Wilson Junior, meu grande amor, que me incentivou a todo o momento, secou minhas lágrimas nos momentos difíceis, celebrou comigo nos momentos felizes, me orientou quando eu me sentia perdida, me trouxe esperanças quando pensei em desistir. Obrigada meu amor, por ter se preocupado com minha segurança, obrigada por me ouvir e por me fazer ouvir quando era necessário. Obrigada por tudo que você significa na minha vida, sem você eu não conseguiria.

Ao meu Irmão, Igor Leonardo, a minha avó Rosemi Bernardo, e a todos os meus familiares, pela contribuição valiosa.

Aos meus amigos, pelas alegrias, tristezas e dores compartilhadas. Pelos momentos de diversão e distração, pois foram fundamentais para os meus bons resultados.

A todos que direta ou indiretamente fizeram parte da dessa trajetória, deixo aqui o meu muito obrigado.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

RESUMO

SILVEIRA, Rosiane Conceição dos Santos Siqueira da. **Caracterização química do óleo essencial de *Schinus molle* L. e sua propriedade antihemostática.** Seropédica, 2019. Dissertação (Mestrado em Química) - Instituto de Química, Departamento Química, UFRRJ.

Segundo dados da OMS, 17,7 milhões de pessoas morrem a cada ano de distúrbios cardiovasculares, essas doenças trazem grandes preocupações para a humanidade, em especial a trombose, pois é uma das principais patologias associada à doença cardíaca isquêmica, acidente vascular cerebral isquêmico e tromboembolismo venoso. Os óleos essenciais possuem grande importância em desenvolvimento de pesquisas, e já foram notificados efeitos sinérgicos com anticoagulantes orais, que indica uma possível propriedade antitrombótica. O objetivo desse trabalho foi avaliar a composição química do óleo essencial de *Schinus molle* L. e analisar sua atividade sobre a hemostase. Para a extração do óleo essencial das folhas de *Schinus molle* L. foi utilizada a técnica de hidrodestilação através do aparelho tipo Clevenger, e o material obtido foi caracterizado por CG-DIC e CG-EM. Ação anticoagulante foi realizada por testes de TTPa e TP, e os ensaios de agregação plaquetária foram realizados em um agregômetro seguindo o método turbidimétrico, utilizando ADP e colágeno como indutores da agregação. Após a análise química do óleo essencial foram identificadas 41 substâncias, principalmente sesquiterpenos (88,1%), dos quais epi- α -cadinol (22,8%) e γ -cadineno (9,7%) apresentaram maior concentração. O óleo essencial de *Schinus molle* não apresentou atividade anticoagulante nas concentrações utilizadas (40, 200 e 400 mg.ml⁻¹). A menor concentração do óleo essencial testada na agregação plaquetária (5 mg.ml⁻¹), utilizando ADP como indutor, apresentou maior poder inibitório (80%) e a maior concentração (40 mg.ml⁻¹) inibiu 48% da ativação plaquetária. Ao utilizar o colágeno como indutor, o óleo essencial não apresentou atividade significativa, assim como não mostrou atividade nos ensaios de coagulação, sugerindo que a ação antihemostática do óleo essencial se destina especialmente via agregação plaquetária, possivelmente pela inibição de receptores da família P2, os quais são ativados pelo ADP. Esse estudo é capaz de sugerir que o óleo essencial de *Schinus molle* pode ser uma fonte promissora de substâncias ativas para terapias curativas e/ou preventivas inovadoras, em particular contra a trombose. Este é o primeiro relato da ação antiplaquetária do óleo essencial de *Schinus molle*.

Palavras chaves: *Aroeira; anticoagulante; Antiplaquetária; Trombose.*

ABSTRACT

SILVEIRA, Rosiane Conceição dos Santos Siqueira da. **Chemical characterization of essential oil of *Schinus molle* L. and its antihemostatic property.** Seropédica, 2019. Dissertation (Master's Degree in Chemistry) - Chemistry Institute, Department of Chemistry, UFRRJ.

According to WHO data, 17.7 million people die each year from cardiovascular disorders, these diseases bring great concern to mankind, especially Thrombosis, as it is one of the major pathologies associated with ischemic heart disease, ischemic stroke and venous thromboembolism. Essential oils have great importance in the development of research, and synergistic effects with oral anticoagulants have already been reported, indicating a possible antithrombotic property. The objective was to evaluate the chemical composition of the essential oil of *Schinus molle* L. and to analyze its activity in hemostasis. The essential oil was extracted from the leaves of *Schinus molle* by the hydrodistillation technique using the Clevenger apparatus, and was characterized by CG-DIC and GC-MS. The anticoagulant assay was performed by aPTT and PT assays. The platelet aggregation assays were performed in aggregate following the turbidimetric method, using ADP and collagen as an aggregation inducer. After the chemical analysis of the essential oil, 41 substances were identified, mainly sesquiterpenes (88,1%), of which epi- α -cadinol (22,8%) and γ -cadinene (9,7%) presented higher concentrations. Essential oil of *Schinus molle* did not present anticoagulant activity at the concentration used (40, 200 and 400 mg.ml⁻¹). The lowest concentration of essential oil was evaluated for platelet aggregation (5 mg.ml⁻¹), using the ADP inducer, presented higher inhibitory power (80%) and the highest concentration (40 mg.ml⁻¹) inhibited 48% of the aggregation platelet. When using collagen as an inducer, essential oil did not present significant activity, suggesting that the anti hemostatic action of essential oil may be related to the ADP inducer, possibly by the inhibition of P2 family receptors, which are activated by ADP. This study is capable of suggesting that the essential oil of *Schinus molle* may be a promising source of active substances for innovative curative and/or preventive therapies, in particular against thrombosis. This is the first report of antiplatelet action of *Schinus molle* L essential oil.

Keywords: *Aroeira; anticoagulant; Antiplatelet; Thrombosis.*

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	1
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
2.1	Família Anacardiaceae	3
2.2	<i>Schinus molle</i> L.	4
2.3	Óleos Essenciais	7
2.4	Hemostasia	12
2.4.1	Hemostasia primária	14
2.4.2	Hemostasia secundária	20
2.5	Controle da Hemostasia	23
2.6	Trombose	24
2.7	Fármacos para Tratamento de Trombose	26
2.8	Produtos Naturais e Trombose	32
3	MATERIAIS E MÉTODOS	37
3.1	Obtenção do Material	37
3.2	Extração e caracterização química do Óleo Essencial	37
3.3	Ensaio Biológicos	38
3.3.1	Atividade anticoagulante	38
3.3.2	Atividade antiplaquetária	39
3.3.3	Análises estatísticas	40
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	41
4.1	Caracterização Química	41
4.2	Atividade Anticoagulante	49
4.3	Atividade Antiplaquetária	50
5	CONCLUSÃO	55
6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	56

1 INTRODUÇÃO

A utilização de plantas para o tratamento de doenças é uma prática histórica, mas com o surgimento de medicamentos industrializados no século XX esta prática foi considerada como atraso tecnológico (TOMAZZONI et al., 2006). Contudo, desde a década de 90 a medicina tradicional tem ressurgido em muitos países, segundo dados da OMS, 80% da população de países em desenvolvimento necessitam da medicina tradicional para seus cuidados básicos de saúde (BRASIL, 2006).

O ressurgimento da fitoterapia como terapia alternativa pode estar associado ao alto custo de medicamentos alopáticos e vinculado à medicina moderna, além de ser considerada pela população como uma forma de tratamento mais saudável e menos danosa, culturalmente aceita e de fácil acesso para a população se comparado aos medicamentos convencionais. Atualmente muitos artigos científicos são encontrados na literatura comprovando seus efeitos benéficos ou tóxicos, além disso, os medicamentos fitoterápicos oferecem qualidade, segurança e eficácia comprovadas (OMS, 2013; UPTON et al., 2011).

Óleos essenciais ou voláteis são definidos pela International Standard Organization (ISO) como produtos obtidos de partes de plantas, extraídos através de destilação por arraste a vapor d'água, bem como produtos obtidos por expressão dos pericarpos de frutos cítricos. Geralmente são misturas complexas de substâncias voláteis, odoríferas e líquidas (SIMÕES; SPITZER, 2007). Atualmente possuem grandes aplicações nas indústrias, na aromaterapia, além de serem comercializados na sua forma bruta ou purificados, para fornecer substâncias como limoneno, citronelal, eugenol e mentol (BIASI e DESCHAMPS, 2009; BIZZO et al., 2009).

As aplicações biológicas de óleos essenciais também têm sido estudadas, e já foram notificados, por exemplo, efeitos sinérgicos com anticoagulantes orais, que indica uma possível propriedade antitrombótica (CAVALEIRO et al., 2007). Óleos essenciais de eucalipto e tomilho foram capazes de inibir a atividade do herpes vírus, além disso, o óleo essencial de *Ocimum sanctum* é conhecido por possuir atividade contra reações inflamatórias desde muito tempo (RAUT; KARUPPAYIL, 2014; THOMAR, 2011).

Schinus molle L., conhecida como pimenta da Califórnia ou aroeira, pertence à família Anacardiaceae, é uma espécie nativa da América do Sul, e no Brasil ocorre desde o Rio Grande do Sul até Minas Gerais (BACKES; NARDINO, 2002). Diversas propriedades biológicas são relatadas para seus constituintes fixos, como: analgésico, anti-inflamatório

(TAYLOR et al., 2016), antiparasitário (GARZA et al., 2014), e para os óleos essenciais são conhecidas ações anticancerígena, antioxidante (BENDAOU et al, 2010) e antimicrobiana (MARTINS et al, 2014). No entanto, suas propriedades antitrombóticas ainda não foram investigadas.

Os distúrbios cardiovasculares (DCV) são exemplos de doenças que trazem grandes preocupações, em especial a Trombose, pois é uma das principais patologias associada à doença cardíaca isquêmica, acidente vascular cerebral isquêmico e tromboembolismo venoso (VIANNA et al, 2012). Segundo dados da OMS, 17,7 milhões de pessoas morrem a cada ano de DCV (WHO, 2017).

Vários fatores de risco estão relacionados com DCV, como fatores genéticos, obesidade, distúrbios do sistema de coagulação, estilo de vida (por exemplo, consumo excessivo de álcool, má alimentação, tabagismo), entre outros (CLEMETSON, 2012; PIETERS; MAAT, 2015). Mudanças de hábitos e melhoria na qualidade de vida pode iniciar o processo de prevenção dessas enfermidades, no entanto, a terapia antitrombótica é considerada a "pedra angular" na prevenção e tratamento de DCV (XIANG et al., 2008).

Já existem medicamentos para prevenir e tratar estes tipos de patologia, com mecanismos de ação bem elucidados, e são rotineiramente utilizados devido suas atividades comprovadas. No entanto, estes medicamentos não estão isentos de efeitos indesejáveis, a aspirina, por exemplo, pode provocar erosões gástricas, hemorragias e em altas doses provocam danos renais (BALLABENI et al, 2004).

Um agente antiplaquetário é considerado ideal quando ele possibilita o bloqueio de mecanismos trombogênicos dependentes de plaquetas em DCV especificamente, de forma que não interfira nas funções normais das plaquetas necessárias na hemostasia. Outro fator importante é a ausência de efeitos adversos. Nenhum dos fármacos disponíveis no mercado conseguem atender todos esses critérios, mas várias estratégias antiplaquetárias são estudadas para atingir o mais próximo possível do agente antiplaquetário ideal (XIANG et al., 2008).

Diante disso, pesquisadores tem se interessado em investigar e desenvolver novas formas de tratamento antiplaquetário/antitrombótico, principalmente quando se trata de produtos de origem natural, visto que são de baixos custos, fácil acesso e podem apresentar segurança adequada para utilização. A indústria farmacêutica também tem se interessado cada vez mais em fitoterápicos como terapia alternativa (BALLABENI et al, 2004).

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Família Anacardiaceae

Espécies vegetais pertencentes à família Anacardiaceae podem ser encontradas em regiões tropicais, se estendendo até algumas regiões temperadas, e estão principalmente em habitats de baixa altitude. A família possui aproximadamente 81 gêneros e 800 espécies, e estão presentes em ambientes secos a úmidos (PELL, 2011).

Diversas espécies desta família possuem valor econômico, pois fornecem frutos comestíveis, madeiras úteis e espécies ornamentais. Os principais produtos alimentares de Anacardiaceae são caju (Anacardium), mangas (Mangifera), pimenta rosa (Schinus) e pistache (Pistacia), no entanto, alguns táxons como Antrocaryon, Buchanania, Choerospondias, Cyrtocarpa, Harpephyllum possuem outras partes comestíveis de alto valor regional (PELL, 2011).

O amplo interesse nos estudos desta família se dá pela grande diversidade metabólica e atividades biológicas observadas em suas espécies, o que as tornam promissoras na busca de princípios bioativos. Do ponto de vista químico, os gêneros mais estudados nesta família são Mangifera, Rhus (Toxicodendron), Anacardium, Spondias, Lannea, Semecarpus, Schinus, Pistacia, Lithraea, Tapirira e Melanorrhoea (CORREIA et al., 2006; PEEL, 2011).

Quanto às características, geralmente são arbóreas, apresentando arbustos e lianas em seu tronco. As flores geralmente são pequenas, pentacórmicas actinomórficas e unissexuais (MARTÍNEZ-MILLÁN et al., 2005). A família Anacardiaceae também é conhecida como dermo-agressiva, pois causam dermatite de contato devido à presença de compostos fenólicos e catecólicos encontrados nas resinas da sua casca, raiz, caule e folha (LUNA, 2012). No entanto, estas substâncias possuem inúmeras aplicações e usos populares, sendo empregadas tradicionalmente como cicatrizantes, estomáquicos e antidiarreicos, pela presença de taninos e óleos-resinas. (LORENZI, 2002.)

A família Anacardiaceae é popularmente utilizada por suas propriedades medicinais, podendo citar o uso de seus gêneros em diversos tratamentos como: doenças gastrointestinais (Anacardium, Antrocaryon, Heeria, Lannea, Ozoroa, Pseudospondias, Schinus, Sorindeia), doenças respiratórias (Astronium), hepatite (Haematostaphis), doenças de pele e/ou feridas (Buchanania, Lannea, Metopium, Ozoroa, Schinus, Sclerocarya, Searsia, Sorindeia,

Trichoscypha), febre (Buchanania, Comocladia), assim como várias condições relacionadas à gravidez (Metopium, Ozoroa, Trichoscypha), entre outros (PELL, 2011).

2.2 *Schinus molle* L.

Existem mais de 30 espécies do gênero *Schinus* na América do Sul, entre elas se destacam as espécies *Schinus molle* e *Schinus aroeira*. Essas espécies em questão são geralmente confundidas devido a alguns fatores, como o nome comum “aroeira” e algumas características taxonômicas que configuram uma discussão entre taxonomistas. Linneus e Juan de Dios Muñoz as consideraram como duas espécies diferentes, no entanto, De Candolle considerou *S. aroeira* como uma variedade de *Schinus molle* L., nomeando-a *Schinus molle* L. var. *areia*. (GUALA et al., 2016)

Schinus molle L. (também conhecida como, pimenta rosa, aroeira-salsa, anacauita ou piriquiteira) é uma espécie nativa da América do Sul, e no Brasil, ocorre desde o Rio Grande do Sul até Minas Gerais (**Figura 1**). É uma espécie comum tanto em áreas campestres da Região Sul do RS como em bordas de matas, especialmente em áreas mais altas, e muito utilizadas em paisagismo (BACKES; NARDINO, 2002). Ela pertence à família Anacardiaceae (**Figura 2**), do gênero *Schinus*, ordem Sapindales, classe Magnoliopsida, sub-classe Rosidae, divisão Spermatophyta, sub-divisão Magnoliophytina (Angiospermae) (disponível em: <https://jb.utad.pt/especie/Schinus_molle> acesso em 27/05/18).



Figura 1: Distribuição geográfica da ocorrência confirmada da espécie *Schinus molle* L. (Disponível em <<http://reflora.jbrj.gov.br/reflora/listaBrasil/FichaPublicaTaxonUC/FichaPublicaTaxonUC.do?id=FB4398>> acesso em 20/12/18).



Figura 2: Folhas e frutos de *Schinus molle* L. Fotografia de UTAD Jardim Botânico - Isabel Garcia-Cabral. (Disponível em: <https://jb.utad.pt/especie/Schinus_molle> acesso em 11/05/2018).

Quanto as suas características físicas, é uma árvore de pequeno porte, com tronco grosso, curto e ramificado a pouca altura, com casca descamante em pequenas placas de cor cinza. Ramificação flexível e pendente, forma copa arredondada, os ramos ao serem quebrados exalam forte cheiro de terebintina. Folhas compostas, paripinadas ou imparipinadas, alternas, folíolos sésseis, opostos de margem denteada, verde-claro-acinzentados, com até 8 cm de comprimento, que também desprendem odor. Inflorescências do tipo panícula, terminais ou axilares com flores unissexuais com pétalas brancas e pequenas. Os frutos são pequenas drupas marrom-avermelhadas de até 6 mm de diâmetro com cheiro de pimenta (GOMES, G. et al., 2013).

Esta espécie produz diversos metabólitos secundários como ácidos fenólicos, flavonoides, terpenos (**Figura 3**) (ONO et al., 2008) e óleos essenciais ricos em espatulenol, β -cariofileno e biciclogermacreno (**Figura 4**) (ATTI DOS SANTOS et al., 2007; BATISTA et al., 2016; MUNHD et al., 2015; BELHAMEL; LUDWIG, 2008). No entanto, observa-se que o óleo essencial de diferentes regiões apresentam variedades na composição química (GOMES, V. et al, 2013).

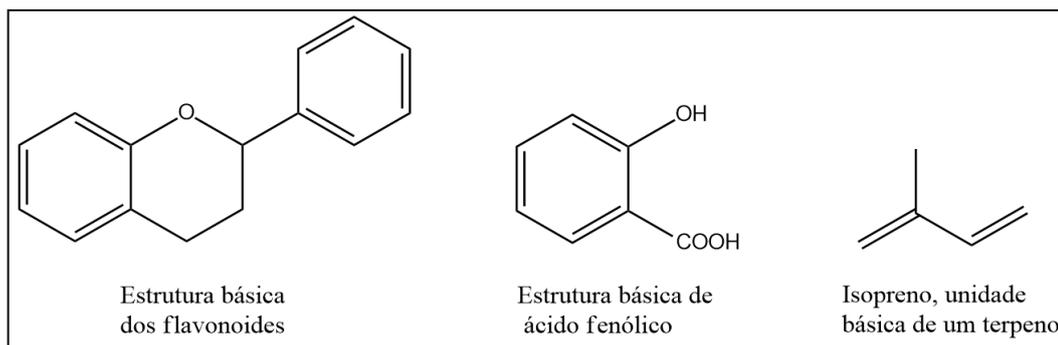


Figura 3: Estruturas químicas das substâncias majoritárias encontradas nos extratos de *Schinus molle* L. (ADAMS, 2011).

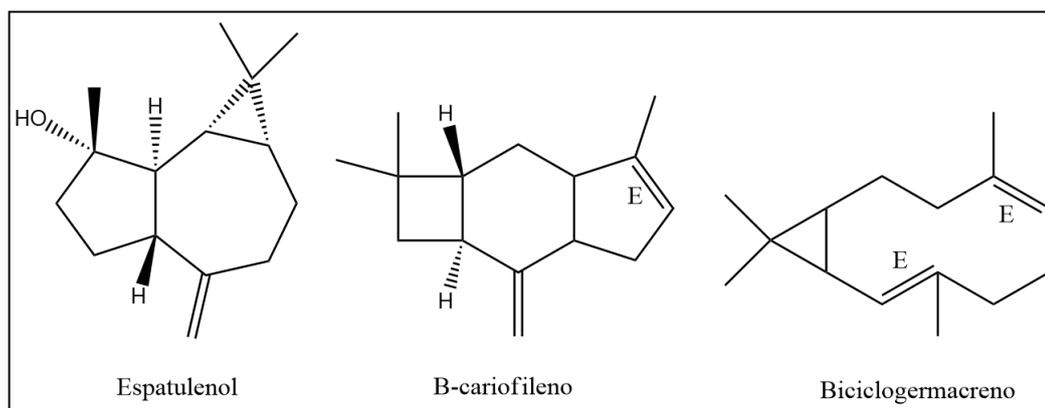


Figura 4: Estrutura química das substâncias comuns em óleo essencial de *Schinus molle* L. (ADAMS, 2011).

Estudos recentes revelaram que os extratos de *Schinus molle* L. possuem efeitos anti-tumorais e a atividade citotóxica contra uma linha celular de carcinoma hepatocelular humano, além disso, o seu óleo essencial apresentou citotoxicidade em várias linhagens celulares, sendo mais efetivo em carcinomas de mama e linhas celulares leucêmicas (GARCIA et al., 2017).

Diversas propriedades biológicas são relatadas para seus constituintes fixos como: analgésico, anti-inflamatório (TAYLOR et al., 2016), antiparasitário (MOLINA-GARZA et al., 2014), e para os óleos essenciais são conhecidas ações anticancerígenas, antioxidantes (BENDAOU et al., 2010), antimicrobianas (MARTINS et al., 2014), citotóxico (DÍAZ et al., 2008) e inseticida contra *Haematobia irritans* L. (LÓPEZ et al., 2014). Além disso, o óleo essencial é utilizado como adjuvante em produtos alimentícios, devido às suas propriedades antimicrobianas e antioxidantes, ou como antiparasitário no gado e na apicultura (GUALA et al., 2016).

2.3 Óleos Essenciais

Os óleos essenciais, conhecidos também por essências, óleos voláteis ou óleos etéreos, são definidos pela “*International Standart Organization*” (ISO) como produtos obtidos da destilação por arraste a vapor d’água de partes de plantas, bem como produtos obtidos por expressão dos pericarpos de frutos cítricos (SIMÕES; SPITZER, 2007). São descritos como misturas complexas de substâncias voláteis, lipofílicas, geralmente odoríficas e líquidas, instáveis na presença de luz, calor, umidade e metais. Suas principais características são o cheiro e o sabor (FERNANDES; FAVERO, 2014).

Os óleos essenciais são solúveis em solventes orgânicos, e as substâncias que o compõem podem ser obtidas por todos os órgãos da planta, ou seja, órgãos reprodutivos, flores, folhas, caules, galhos, sementes, frutos, raízes, madeira ou casca, além de serem produzidas e secretadas por células secretoras, cavidades, canais, células epidérmicas ou tricomas glandulares (BAKKALI, 2008).

O óleo essencial é composto principalmente de derivados terpenoides (formado por isoprenos), ou fenilpropanoides (compostos com estrutura aromática), muito embora, seja comum encontrar outras classes de substâncias e funções orgânicas como, alcanos, alcenos, ésteres, éteres, aldeídos, alcoóis, ácidos, cetonas, óxidos, peróxidos, entre outras (BAKKALI, 2008; ATTI DOS SANTOS et al., 2007).

Os derivados fenilpropanoides são obtidos pela rota biossintética conhecida como via do ácido chiquímico, são unidades básicas compostas por um anel benzênico com uma cadeia lateral de três carbonos, as quais formam os ácidos cinâmico e p-cumárico (**Figura 5**).

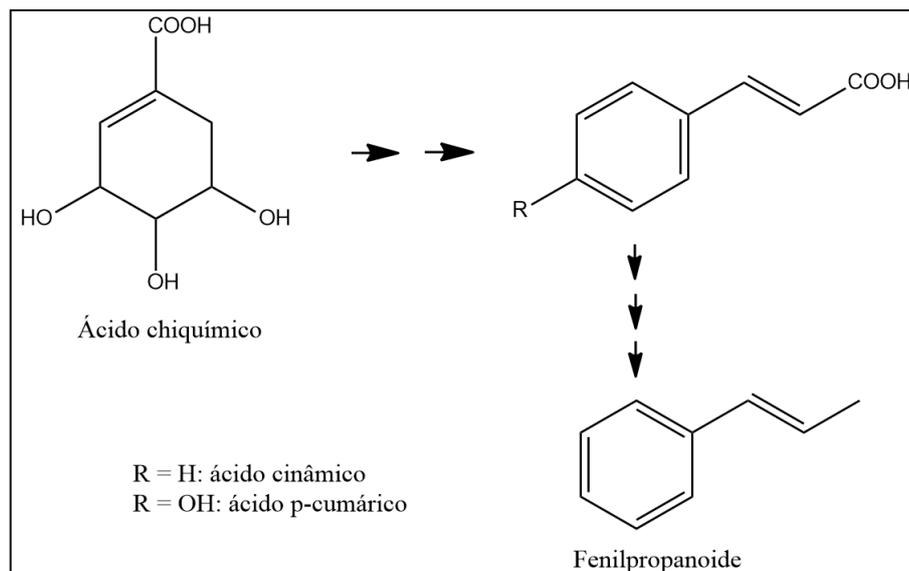


Figura 5: Biossíntese dos fenilpropanoídeos (SIMÕES, 2007).

Já os terpenoides ou terpenos geralmente são as substâncias dominantes no óleo essencial e são obtidos pela via do ácido mevalônico ou pela rota do fosfato de metileritritol (MEP), os esqueletos carbonados dos terpenoides são formados pela condensação de unidades de isoprenos (C5) (**Figura 6**).

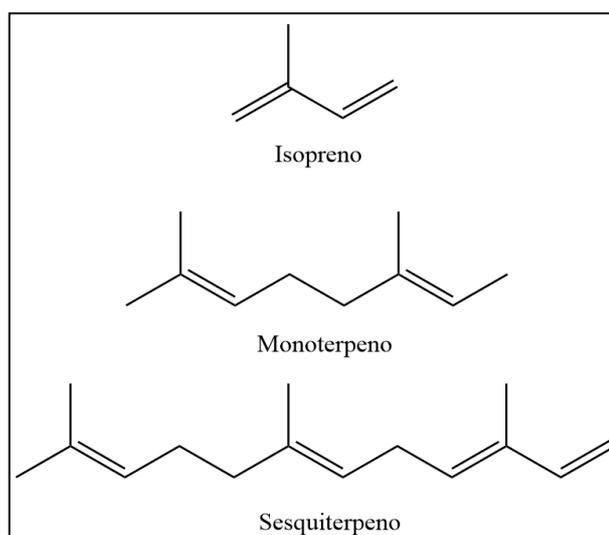


Figura 6: Estrutura química de uma unidade isoprênica, de um monoterpreno e sesquiterpreno (SIMÕES, 2007).

As unidades de isoprenos são ativadas como ésteres dimetilalil difosfato (DMAPP) e isopentenil difosfato (IPP), que são unidas geralmente na forma cabeça-cauda e são representadas por (C5)_n. Os terpenoides são classificados como hemiterpenos (C5), monoterprenos (C10), sesquiterpenos (C15), diterpenos (C20), sesterterpenos (C25), triterpenos (C30) e tetraterpenos (C40) (**Figura 7**). Os monoterprenos e sesquiterpenos são as

substâncias mais frequentemente encontradas em óleos essenciais (**Figura 6**) (DEWICK, 2009).

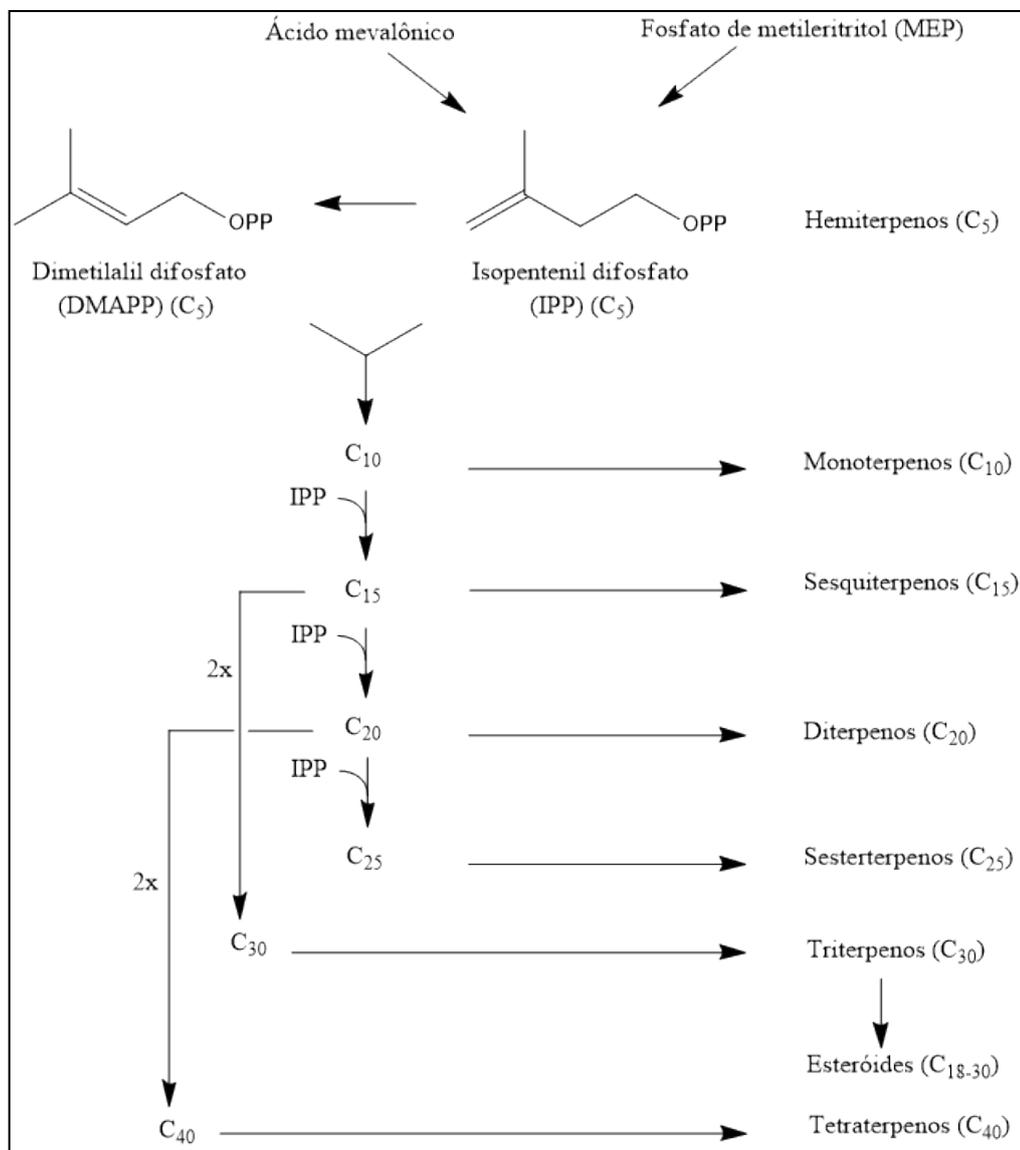


Figura 7: Classificação dos terpenos de acordo com o número de unidades Isoprênicas (Adaptado de DEWICK, 2009).

A biossíntese de isoprenos pela via do ácido mevalônico ocorre no citoplasma, ela acontece por uma série de etapas que unem três moléculas de acetil-CoA formando o ácido mevalônico, que sofre pirofosforilação, descarboxilação e desidratação para síntese da unidade básica de formação dos terpenos, o isopentenil difosfato (IPP), uma molécula de cinco carbonos que fica em equilíbrio químico com seu isômero dimetilalil difosfato (DMAPP). Esses produtos são as unidades com cinco carbonos que se unem para formar moléculas terpênicas maiores (DEWICK, 2009).

Quando a biossíntese de isoprenos tem origem em cloroplastos e outros plastídeos, ela ocorre a partir de um conjunto de reações denominadas rota do metileritritol fosfato (MEP), e seus precursores podem ser intermediários comuns à via das pentoses fosfato plastidial. Nesta via, o gliceraldeído-3-fosfato (GA-3P) se combina com um piruvato formando um intermediário que é convertido em IPP e DMAPP (TAIZ; ZEIGER, 2004).

As próximas etapas da biossíntese de terpenos se dá pela reação entre uma molécula de IPP e uma de DMAPP, que dá origem a uma molécula de geranyl difosfato (GPP), este intermediário possui 10 carbonos e a partir dele são formados os monoterpenos. O GPP também pode se ligar a outra molécula de IPP, dando origem a uma substância com 15 carbonos que é precursora da maioria dos sesquiterpenos, chamado de farnesil difosfato (FPP). Adicionando mais uma molécula de IPP ao FPP gera-se a substância geranylgeranyl difosfato (GGPP), precursor dos diterpenos (C₂₀). Uma vez que uma molécula de FPP e GGPP se dimerizam, formam-se triterpenos (C₃₀) e tetraterpenos (C₄₀) (**Fig. 8**) (DEWICK, 2009).

substâncias do óleo essencial, fornece ainda o tempo de retenção das diferentes substâncias da amostra, e que acoplada com a espectrometria de massas torna-se possível obter informações estruturais, massa molar e aumento adicional da seletividade através dos espectros de massa, proporcionando uma caracterização química com maior confiabilidade (DUDAREVA; PICHERSKY; GERSHENZON, 2004).

Os óleos essenciais apresentam uma grande variedade de funções, por exemplo, podem atuar na proteção da planta contra predadores naturais, como os herbívoros, reduzindo seu apetite por tais plantas, além de atuarem na atração de polinizadores, função muito importante porque dentre todas as espécies de plantas que florescem 66% dependem da polinização por insetos para sua reprodução e manutenção (LUCAS-BARBOSA et al., 2011). Sua atuação na proteção contra perda de água e aumento da temperatura também é relevante, pois contribui para a termotolerância da planta ao estresse abiótico e, também, na remoção de espécies reativas de oxigênio (GLINWOOD et al., 2011).

Algumas substâncias presentes nos óleos essenciais possuem atividade alelopática sobre a germinação de sementes e no crescimento de plântulas. Zahed et al. (2010) relataram que o óleo essencial de *Schinus molle* L. inibiram fortemente a germinação e alongação da radícula de *Triticum aestivum* L.

Além da grande importância para a planta, os óleos essenciais possuem grande utilidade em diferentes setores industriais. Óleos essenciais ou alguns de seus componentes são utilizados para a fabricação de cosméticos, perfumes, alimentos, medicamentos e produtos para a higiene doméstica e pessoal. São usados também em massagens como misturas com óleos vegetais, mais frequentemente em aromaterapia (BIASI; DESCHAMPS, 2009).

2.4 Hemostasia

A hemostasia pode ser definida como o processo dinâmico finamente regulado de manutenção do equilíbrio entre a hemorragia e a trombose, para garantir que o sangue circule pelo sistema de maneira fluida. Diante de uma situação que interfira neste equilíbrio, uma série de reações fisiológicas ocorre para inibir o extravasamento sanguíneo ou a formação de um trombo, o que mantém as condições fisiológicas que preservam a vida. A compreensão do sistema hemostático inclui o reconhecimento do complexo mecanismo controlado pelo endotélio vascular, plaquetas, via de coagulação e fibrinólise (IRULEGUI et al., 2016).

Este processo acontece em três etapas: primária, secundária e fibrinólise. A hemostasia primária ocorre através da adesão, ativação e agregação plaquetária, a qual é responsável pela produção de um tampão, conhecido como "coágulo branco", e nesta etapa ocorre o estancamento do sangramento, este é um processo complexo, pois envolvem receptores e vias de sinalizações múltiplas e complementares. Em seguida, dá-se início a hemostasia secundária, a qual é responsável por evitar que o sangramento volte a ocorrer. Neste caso, os fatores da cascata de coagulação sanguínea culminam na formação da rede de fibrina, o conhecido "coágulo vermelho" (**Figura 9**).

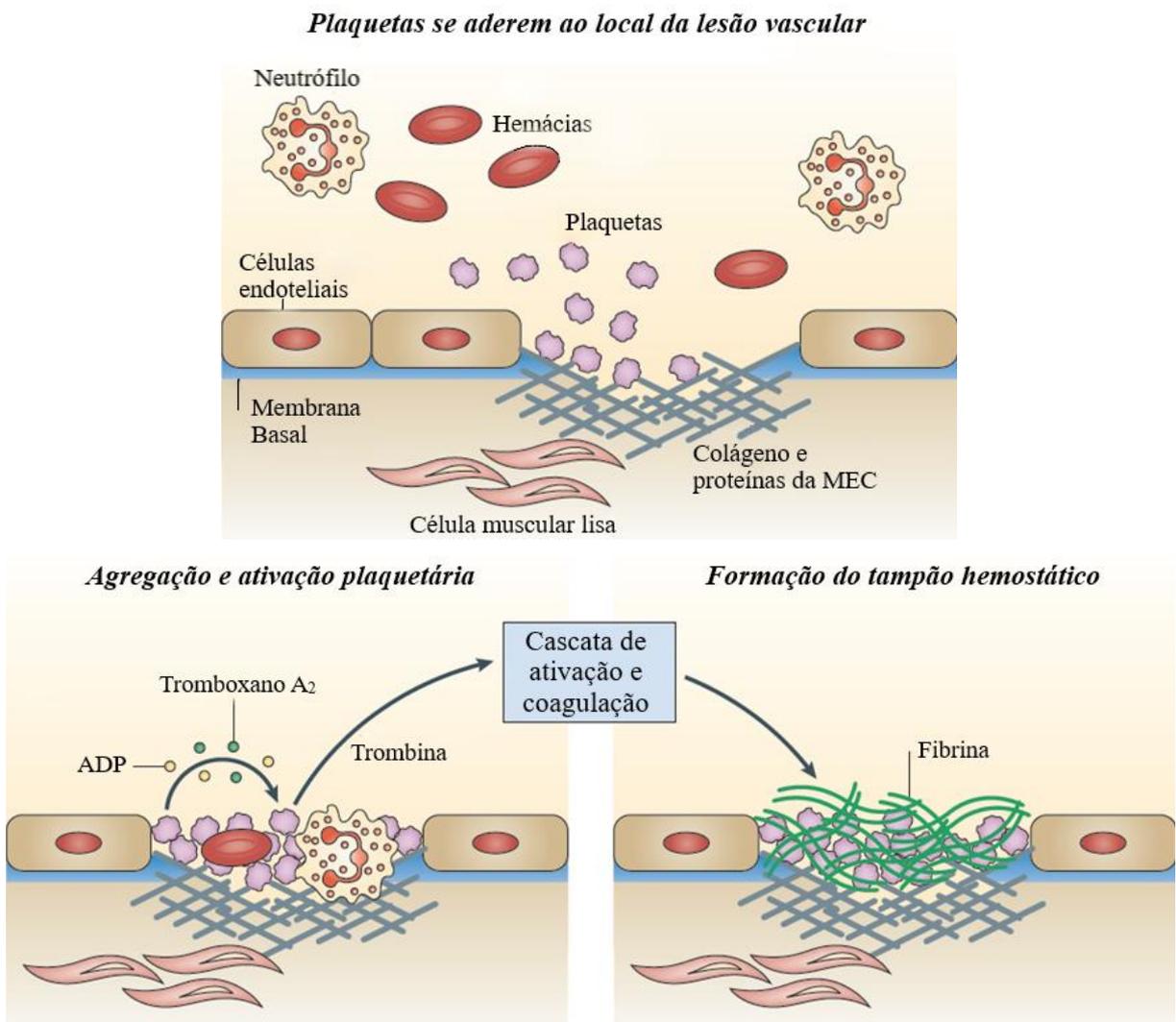


Figura 9: Funções plaquetárias na hemostasia. O processo se inicia com uma lesão vascular que expõe colágeno e proteínas da membrana basal, permitindo a adesão das plaquetas ao substrato. As plaquetas aderentes então agregam e liberam mediadores de ativação plaquetária, como o ADP e o tromboxano A₂. Após a ativação, as plaquetas produzem trombina, que catalisa o início da cascata de coagulação que, eventualmente, gera uma deposição de fibrina em forma de malha. Esta estrutura contrai-se para formar um tampão hemostático que impede o vazamento de sangue. MEC, matriz extracelular (Adaptado de SEMPLE et al., 2011).

As plaquetas são produzidas na medula óssea por fragmentação do citoplasma dos megacariócitos estimulada pela trombopoietina, que embora anucleadas, apresentam elevadas atividades bioquímicas a partir dos seus componentes estruturais metabólicos e sinalizadores. Quando não ativas, elas apresentam formato de discos achatados e circulam no sangue por, em média, 10 dias nas proximidades das paredes vasculares, porém, o endotélio saudável é tromborresistente devido uma barreira natural à trombose. Suas funções compreendem adesão, agregação, secreção e atividade pró-coagulantes (RAUCH; PARIS, 2018; HOFFBRAND; MOSS, 2018).

O endotélio produz e secreta mediadores inibitórios da ativação plaquetária, coagulação e fibrinólise, como a prostaglandina I₂ (prostaciclina), óxido nítrico (ambos antiagregantes plaquetários e vasodilatadores), ectonucleotidases (inibidores do ADP), trombomodulina (receptor de trombina, reduz a capacidade de clivar fibrinogênio), t-PA (ativador de plasminogênio tecidual, ativa o sistema fibrinolítico) e inibidor da via extrínseca da coagulação (retroalimentação negativa da coagulação) (LORENZI, 2006).

Em contrapartida, o subendotélio é rico em moléculas adesivas, como o colágeno, fator Von Willebrand, fator ativador de plaquetas (PAF, agregação plaquetária), fator tecidual (desencadeia mecanismo de coagulação), PAI-1 (inibição do sistema fibrinolítico), receptores de trombina (secreção do fator de Von Willebrand) e endotelina (ET-1, potente vasoconstritor) que são espontaneamente trombogênicos (LORENZI, 2006).

2.4.1 Hemostasia primária

A hemostasia primária começa por uma lesão no endotélio vascular, que permite a exposição da matriz subendotelial, principalmente do colágeno, e neste momento, glicoproteínas (GP) da membrana plaquetária (Ia/IIa e VI) fazem a adesão inicial das plaquetas na lesão, ligando-se ao colágeno, no intuito de conter a hemorragia. Porém, esta ligação das plaquetas ao colágeno inicial não é muito forte, e por isso é necessária ação do fator de Von Willebrand (RAUCH; PARIS, 2018).

O fator de Von Willebrand (VWF) é produzido pelas células endoteliais, pelas plaquetas (armazenados na forma de grânulos alfa), e também é encontrado na sua forma livre pelo plasma, a forma livre pode atuar como carreador do fator VIII da coagulação sanguínea, aumentando seu tempo de meia vida. Para contribuir com a hemostasia primária, na presença de altas forças de cisalhamento o VWF adota uma conformação que permite a

formação de uma ponte que liga o colágeno ao receptor do fator de Von Willebrand que existe na membrana plaquetária, a chamada GP Ib (**Figura 10**). Dessa forma, ocorre a adesão definitiva das plaquetas ao local da lesão (CLEMETSON, 2012).

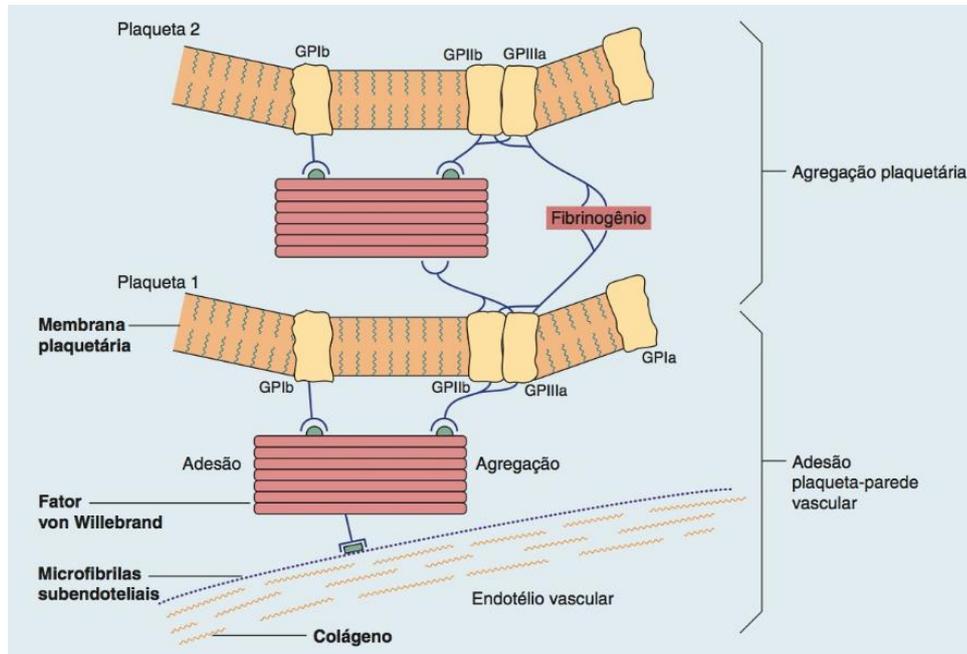


Figura 10: Adesão de plaquetas à parede vascular e às demais plaquetas (agregação). A ligação de glicoproteína (GP) Ib ao fator von Willebrand (VWF) causa adesão plaquetária ao subendotélio. Expõe, também, os sítios de ligação GPIIb/IIIa. Isso leva à ligação de plaquetas ao VWF e, conseqüentemente, à adesão ao subendotélio. As plaquetas também se aderem umas às outras – agregação plaquetária. GPIb e IIB/IIIa estão envolvidas via VWF; já o fibrinogênio está diretamente envolvido via receptores próprios em GPIIb/IIIa (HOFFBRAND; MOSS, 2018).

Contudo, as plaquetas rolam sobre o tecido exposto tornando-se ativadas, onde as proteínas do citoesqueleto organizam-se em microfilamentos fornecendo a força contrátil que promove a formação dos pseudópodes (que indica a ativação e facilita a agregação a outras plaquetas), ocasionando o início das reações de mudança de forma, secreção de grânulos e ativação da GP IIB/IIIa (**Figura 11**). Com a ativação da GP IIB/IIIa, esta glicoproteína passa a expressar regiões com capacidade de se ligar a moléculas de adesão como o fibrinogênio e o fator von Willebrand (LORENZI, 2006).

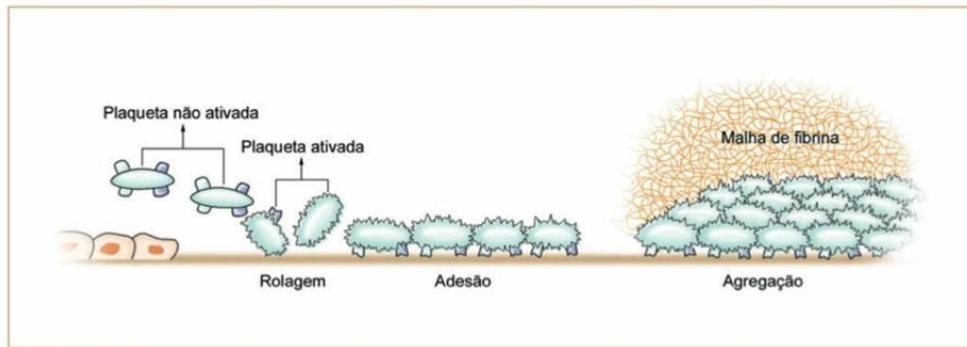


Figura 11: Formação de tampão hemostático: rolagem e ativação das plaquetas, adesão plaquetária, agregação plaquetária e formação da malha de fibrina (LORENZI, 2006).

Após esse processo de adesão, agonistas plaquetários (trombina, ADP, colágeno, fator de ativação plaquetária e adrenalina) promovem a ativação e agregação de mais plaquetas no local (**Figura 12**). Uma vez ativadas, ocorre a degranulação das plaquetas, com liberação dos grânulos densos, ricos em cálcio, adenosina trifosfato (ATP), difosfato de adenosina (ADP), serotonina e histamina, e os grânulos alfas, ricos em fatores de coagulação, VWF, fatores de crescimento derivados das plaquetas (PDGF), β -tromboglobulina, fibrinogênio e outras proteínas, além de fosfolípido plaquetário, que tem grande importância para a hemostasia secundária (RAUCH; PARIS, 2018; HOFFBRAND; MOSS, 2018).

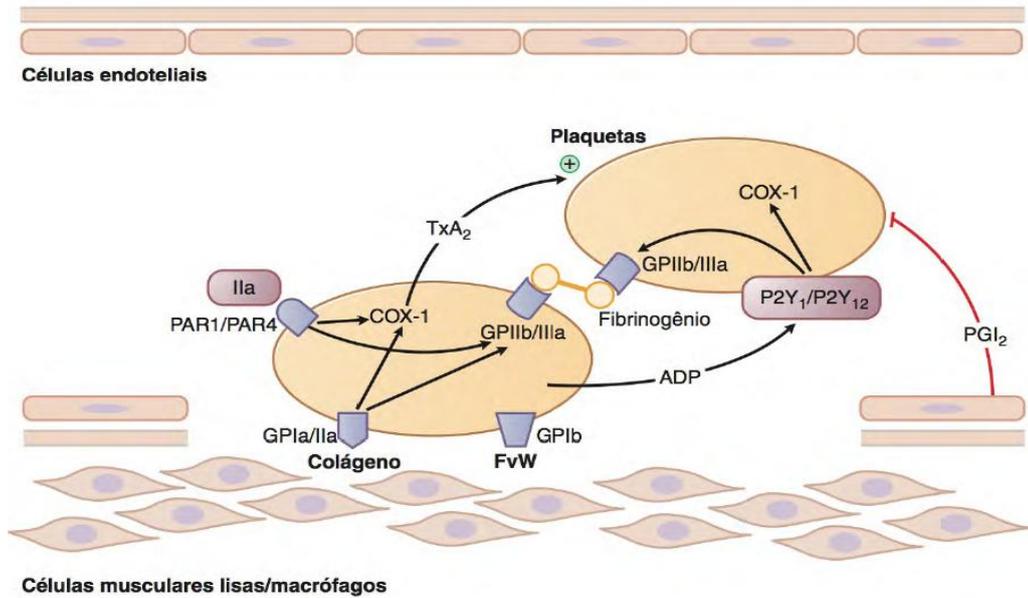


Figura 12: Adesão e agregação plaquetária. A GPIa/IIa e a GPIb são receptores da plaqueta, que se ligam ao colágeno e ao fator de von Willebrand (WvF), causando a adesão plaquetária ao subendotélio de um vaso sanguíneo lesado. Os PAR1 e PAR4 são receptores ativados por protease, que responde a trombina (IIa); P2Y₁ e P2Y₁₂ são receptores para ADP, quando estimulados por agonistas, esses receptores ativam a proteína de ligação do fibrinogênio GPIIb/IIIa e a cicloxigenase-1 (COX-1), promovendo a agregação e secreção plaquetárias. O tromboxano A₂ (TxA₂) é o principal produto da COX-1 envolvido na ativação plaquetária. A prostaglandina I₂ (PGI₂) sintetizada pelas células endoteliais, inibe a ativação das plaquetas (BRUNTON et al., 2012).

Essas substâncias que foram liberadas atuam em receptores plaquetários e promovem a ativação de novas plaquetas, promovendo aumento da concentração de cálcio intracelular. O cálcio elevado gera a ativação da síntese de tromboxano A₂ e liberação de novos grânulos ricos em Trombina, ADP, e outros mediadores químicos. Além disso, o tromboxano A₂, trombina e ADP ativam o receptor GPIIb/IIIa. O PDGF encontrado nos grânulos α das plaquetas estimula a multiplicação das células musculares lisas dos vasos, o que acelera a cicatrização da lesão vascular. (HOFFBRAND; MOSS, 2018)

O mecanismo de ativação plaquetária promovida pelo tromboxano A₂ e trombina podem ser explicados pelas suas atuações em receptores específicos de membrana plaquetária acoplados a proteína Gq, que promovem a ativação da fosfolipase C, e esta converte o fosfolípido de membrana fosfatidil inositol bifosfato nos produtos diacilglicerol e inositol trifosfato (**Figura 13**). O diacilglicerol promove a ativação de uma proteína quinase C (PKC), e o inositol trifosfato (IP₃) promove a liberação de cálcio do retículo endoplasmático para o citoplasma. A PKC ativada e o aumento de cálcio citoplasmático são responsáveis pela ativação da fosfolipase A₂ (PLA₂), que por sua vez, ativa o receptor GPIIb/IIIa, e este receptor

ativado liga-se ao fibrinogênio, possibilitando que as plaquetas se liguem umas às outras, formando o tampão plaquetário (KICKLER, 2006).

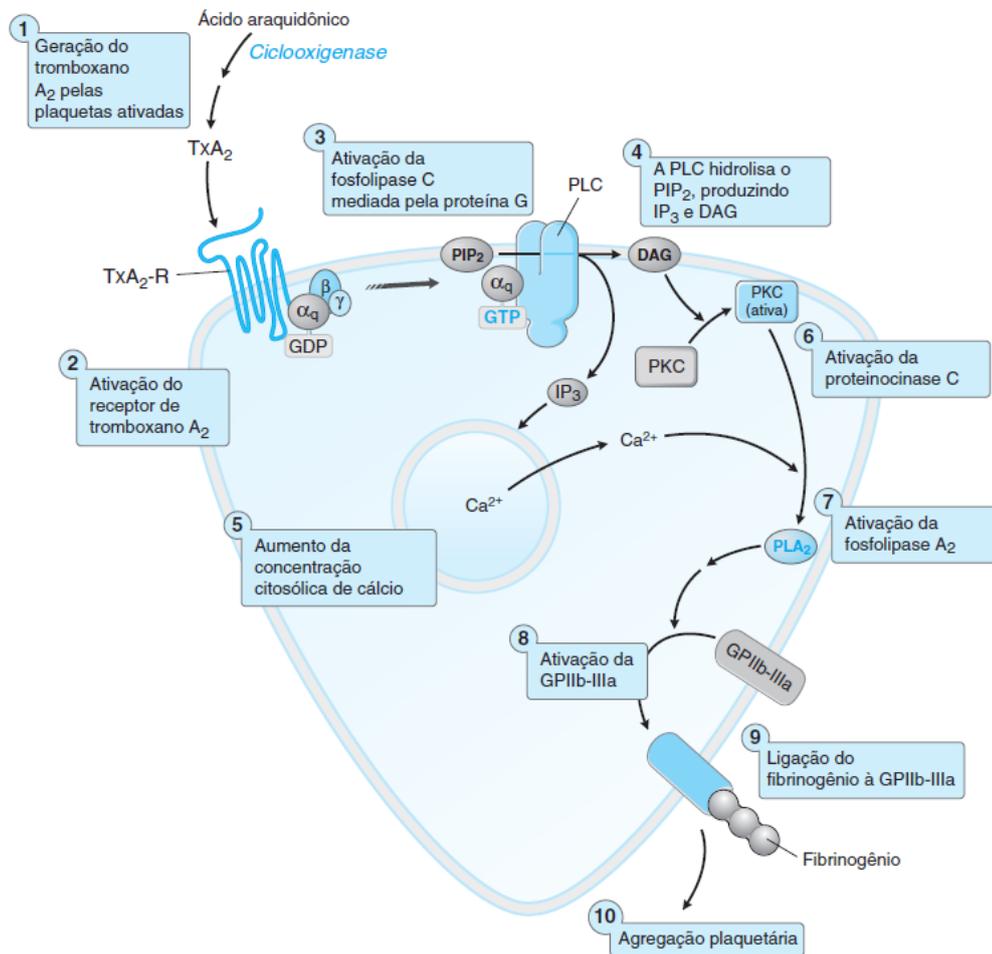


Figura 13: Ativação da agregação plaquetária mediada pelo indutor tromboxano A_2 , que atua em um receptor de membrana acoplado à proteína G_q , que induz uma cascata de sinalização intracelular promovendo a ativação da $GP IIb/IIIa$, que forma uma ligação com o fibrinogênio, o qual intermedia a ligação entre plaquetas (GOLAN et al., 2009).

A PLA_2 também promove a hidrólise de fosfolídeos de membrana, como fosfatidilcolina e fosfatidiletanolamina, realizando a liberação de ácido araquidônico, o qual é substrato para as enzimas cicloxigenases (COX_1 , COX_2 e peroxidase), que desencadeiam a síntese de prostaglandina G_2 (PGG_2) e prostaglandina H_2 (PGH_2). Esses produtos sofrem ação da enzima tromboxano sintetase, promovendo síntese de mais TXA_2 (KICKLER, 2006). Os produtos $COX-1$ (PGG_2 , PGH_2 e TXA_2) são potentes vasoconstritores e ativadores plaquetários. Três dos receptores encontrados nas membranas das plaquetas são a glicoproteína ($GPIb$), o receptor ativado por protease 1 ($PAR1$) e o receptor ativado por protease 4 ($PAR4$), os quais foram descritos como receptores de trombina (CHAVES; MELO; CORRÊA, 2018).

Além de fazer parte dos grânulos plaquetários, o ADP também é secretado pelos eritrócitos e células endoteliais, e constitui um importante mediador da ativação e amplificação da agregação plaquetária. Ele é capaz de interagir com receptores da família P2, encontrados nas membranas plaquetárias, essa família possui dois subtipos: P2X (ligados a canais iônicos e ativados pelo ATP) e P2Y (acoplados a proteína G e ativados pelo ADP) (FALCÃO et al., 2013).

Os receptores conhecidos como P2Y₁, que são receptores acoplados a proteína G_q, e atuam semelhantemente ao mecanismo de ação desencadeado pela trombina e tromboxano A₂, promovendo um rápido influxo de cálcio intracelular e conseqüentemente, ativação de receptores GPIIb/IIIa e síntese de TXA₂ (Figura 14). Este receptor tem um importante papel no início da ativação plaquetária induzida pelo ADP, porém, faz-se necessário a ativação de outros receptores para uma estabilização efetiva do trombo plaquetário (FALCÃO et al., 2013).

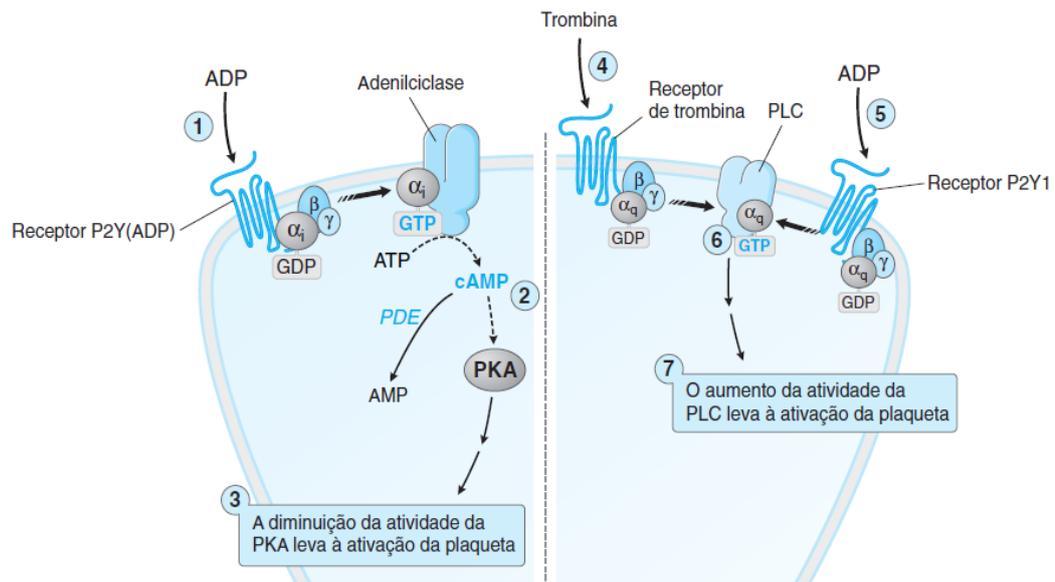


Figura 14: Ativação da agregação plaquetária via ADP e trombina. O ADP atua em receptores P2Y₁ o qual é acoplado à proteína G_q, promovendo a ativação de uma fosfolipase C de membrana, a qual ativa uma cascata de sinalização que promove o aumento de cálcio intracelular e ativação de receptores GPIIb/IIIa e síntese de TXA₂. A trombina possui mecanismo semelhante, pois atua em receptores de trombina acoplados a proteína G_q que desencadeiam a ativação da fosfolipase C. O ADP também atua em receptores P2Y acoplados a proteína G_i, que uma vez ativados, atuam inibindo a enzima adenilciclase, reduzindo a síntese de cAMP e com isso, a sua atividade inibitória sobre as plaquetas (GOLAN et al., 2009).

O receptor de ADP P2Y₁₂ é acoplado a proteína G_i, e uma vez ativado, a proteína G_i inibe a enzima adenilato ciclase, sem a ação dessa enzima não ocorre a conversão de ATP em AMPc, e conseqüentemente, ocorre a redução da ativação da proteína quinase A, com isso

ocorre a redução da inibição plaquetária desencadeada por essa proteína. Além disso, o P2Y₁₂ estimula a atividade da fosfatidil inositol-3 quinase (PI-3K), que é importante para sustentar a agregação, também ativa a enzima GTPase Rap1b através de um mecanismo dependente de PI-3K, além de ocasionar a desfosforilação da fosfoproteína vasodilatadora (VASP). Essas múltiplas vias desencadeadas pelo P2Y₁₂ explicam porque esse receptor desempenha um papel tão central na hemostase e na trombose (GACHET, 2005).

A ativação dos dois receptores P2 é importante para a agregação induzida pelo ADP, pois a inibição seletiva de um dos receptores resulta em uma acentuada redução da agregação plaquetária (FALCÃO et al., 2013).

2.4.2 Hemostasia secundária

A hemostasia secundária é o próximo passo para o restabelecimento do equilíbrio (**Figura 15**). Essa etapa, também conhecida como cascata de coagulação sanguínea, se baseia na ativação de fatores de coagulação (glicoproteínas produzidas, em sua maioria, no fígado) com o objetivo de formar uma rede de fibrina. Esse processo pode ser iniciado pelas vias intrínseca e extrínseca, ambas as vias permitem que a cascata de coagulação se inicie, mas as duas formam uma via comum após certo momento (IRULEGUI et al., 2016).

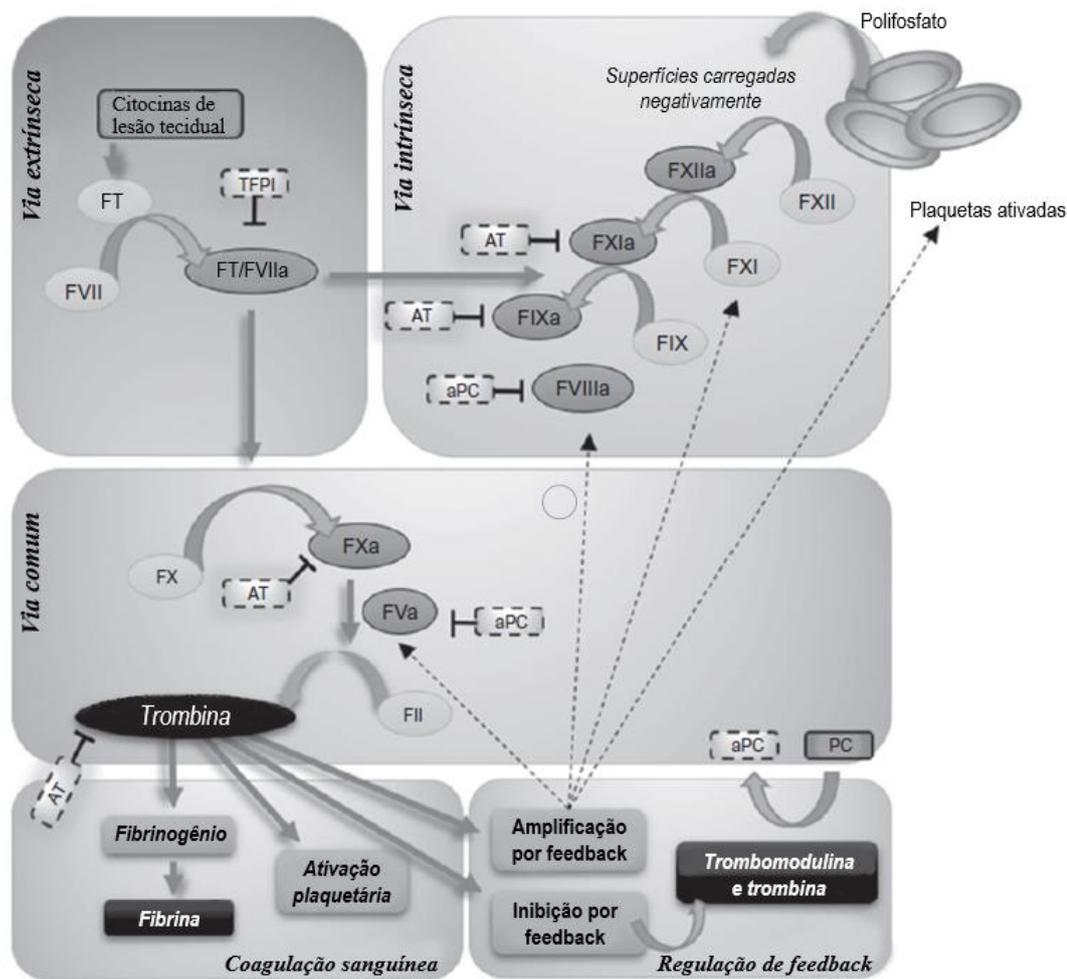


Figura 15: A exposição do fator tecidual (FT) por lesão tecidual ou por citocinas inflamatórias induz a expressão de FT na superfície celular. O complexo FT/FVIIa ativa o FX, que converte os FII em trombina. Na via de ativação intrínseca, superfícies negativamente carregadas (como fosfolípidos e polifosfatos de plaquetas ativadas) ativam FXII, iniciando uma cascata que leva à ativação de FX e geração de trombina. A trombina desencadeia a formação de coágulos sanguíneos, fornece amplificação por feedback ou inibição do processo de ativação da coagulação e envolve a sinalização dependente do receptor. A localização da cascata de coagulação nas superfícies celulares garante uma restrição espacial na geração de trombina. A amplificação por retroalimentação é fornecida por uma ativação dos cofatores não-catalíticos FV e FVIII, ativação plaquetária e ativação de FXI mediada por trombina. O excesso de ativação da coagulação é evitado através de vários mecanismos anticoagulantes, incluindo inibição do complexo TF/ FVIIa /FXa pelo inibidor da via do fator tecidual (TFPI), inibição de vários fatores de coagulação pela antitrombina (AT) e inativação proteolítica de FVa e FVIIIa pela proteína C ativada (aPC). Como o aPC é gerado pelo complexo FIIa / trombomodulina em células endoteliais não perturbadas, a geração local de FIIa após lesão endotelial ou vascular desencadeia a formação de aPC de maneira espacial e temporalmente limitada. A trombina, a aPC e outras proteases da coagulação interagem com os receptores ativados pela protease, iniciando sinalização celular que regula a inflamação e remodelação tecidual. a, ativado; F, fator; PC, proteína C (Adaptado de: CHAVES; MELO; CORRÊA, 2018).

A coagulação é iniciada *in vivo* pela via extrínseca, ela acontece a partir do contato do sangue com o fator tecidual, que é uma proteína de membrana das células subendoteliais o qual fica exposto após a lesão. O fator tecidual converte o fator VII em VIIa, e o fator VIIa

transforma o fator X em Xa, mediante a presença de cálcio e do fosfolípido plaquetário. O fator Xa, na ausência de seu cofator, transforma pequenas quantidades de protrombina em trombina, mas isso é insuficiente para iniciar uma significativa polimerização de fibrina, há necessidade de amplificação. A partir da formação do fator Xa, ocorre o encontro entre a via extrínseca e a via intrínseca (MERCER; CHAMBERS, 2013; HOFFBRAND; MOSS, 2018).

A via intrínseca se desenvolve pelo contato do sangue com superfícies de carga negativa, como o colágeno. A partir disso o cininogênio de Alto Peso Molecular (CAPM) é liberado. Ele é responsável pela conversão da pré-caliceína em caliceína, e ambos pela ativação do fator XII, formando o XIIa, em seguida, o XIIa permite a conversão do fator XI em XIa. O XIa, por sua vez, transforma o IX em IXa, que ativa o fator X, dando origem ao Xa. Essa última reação ocorre mediante a presença de cálcio, do fosfolípido plaquetário (liberado pelas plaquetas na hemostasia primária) e o fator VIIIa. Nesse ponto (formação do fator Xa) se inicia a via comum (AFONSO et al., 2016).

Na via comum, o fator Xa, juntamente com cálcio, o fosfolípido plaquetário e o fator Va, promovem a conversão da protrombina (fator II) em trombina (fator IIa). A trombina é uma enzima chave para este processo, entre suas funções, destacam-se a ativação plaquetária, mecanismos de retroalimentação de amplificação da coagulação, e transformação do fibrinogênio (proteína solúvel) em monômeros de fibrina (proteína insolúvel) (LORENZI, 2006).

A fibrina forma um polímero ligando-se entre si de modo não covalente, e se deposita sobre as plaquetas, formando uma malha fechada, fazendo com que o tampão plaquetário seja mais eficiente. Além disso, a trombina promove a ativação dos fatores V e VIII em Va e VIIIa. A rede de fibrina, é ainda estabilizada pelo fator XIIIa. Dessa forma, um coágulo bem formado resulta na restauração da integridade do vaso e evita o ressangramento da lesão (BRUNTON et. al, 2012).

O tamanho do trombo deve ser regulado para interromper a hemorragia de forma que não ocorra uma obstrução do fluxo sanguíneo através do vaso, para isso existe uma regulação natural do crescimento do trombo. Ao passo que o trombo aumenta de tamanho, o cisalhamento sobre a sua superfície cresce, portanto, a força a ser superada pela adesão plaquetária aumenta, além disso, as plaquetas no exterior são progressivamente menos ativadas além de reduzir a força que se aderem ao trombo, até que se forma um equilíbrio (CLEMETSON, 2012).

2.5 Controle da Hemostasia

O sistema hemostático deve ser sempre balanceado, e para manter a hemostasia existem os agentes anticoagulantes, antiplaquetários e os fibrinolíticos. Os agentes antiplaquetários são classificados como inibidores da hemostase primária e os anticoagulantes como inibidores da hemostase secundária. O próprio endotélio vascular possui a capacidade de síntese e liberação dessas substâncias, assim como as plaquetas.

Os agentes antiplaquetários da hemostase primária são aqueles que atingem as plaquetas, como o óxido nítrico, Ecto-ADPase endotelial e a prostaciclina. O mecanismo de ação da prostaciclina para inibir as plaquetas acontece através de mecanismos dependentes de adenosina monofosfato cíclico (AMPc), pois ele reduz diretamente a mobilização de Ca^{2+} além de reduzir a liberação dos grânulos pelas plaquetas. A ecto-ADPase endotelial atua através da inativação do ADP liberado na degranulação plaquetária, para isso, ele converte o ADP em adenosina monofosfato (AMP), o que limita a ativação e agregação plaquetária induzida por ADP (JURK; KEHREL, 2005).

O óxido nítrico tem um papel fundamental na hemostasia, e ele pode ser produzido pelo endotélio e pelas próprias plaquetas. O mecanismo de ação mais importante do NO ocorre através da ativação da enzima ciclase de guanil solúvel (CGs) para produção de monofosfato cíclico de guanosina (GMPc). O GMPc é capaz de reduzir concentrações de Ca^{2+} intracelular disponíveis para os mecanismos de ativação e agregação plaquetário. Além disso, o GMPc reduz o número total de receptores GPIIb/IIIa, resultando em condições desfavoráveis para a agregação de plaquetária. Ele também interfere na adesão plaquetária, ao regular a expressão de moléculas de adesão na superfície das plaquetas e células endoteliais, como a P-selectina (JIN; LOSCALZO, 2010).

Já os agentes anticoagulantes da hemostase secundária inibem ou destroem fatores envolvidos na cascata de coagulação. A via extrínseca da coagulação é regulada pelo Inibidor de fator tecidual (TFPI), que inativa o complexo TF-FVIIa-FXa. Já a via intrínseca pode ser regulada através de mecanismos envolvendo a trombina. Ela é controlada por uma variedade de anticoagulantes, incluindo antitrombina, além de outras proteinases de coagulação na presença de heparina, cofator de heparina II e protease nexina-1 (MERCER; CHAMBERS, 2013).

Além disso, a trombina pode se ligar à trombomodulina no endotélio, onde será convertida de um pró-coagulante em anticoagulante, a qual ativa a proteína C (PC) ligada ao

receptor da proteína C da célula endotelial (EPCR). A proteína C ativada (APC), em conjunto com a proteína S, inativa os fatores Va e VIIIa e, portanto, suprime a geração adicional de trombina (HOFFBRAND; MOSS, 2018).

Outros fatores podem modular a cascata de coagulação, por exemplo, a α 2-Macroglobulina e α 1-antitripsina inibem a trombina e os fatores IXa, Xa e XIa. O inibidor da proteinase dependente de proteína Z inibe o FXa na presença de proteína Z, fosfolípidos pró-coagulantes e cálcio (MERCER; CHAMBERS, 2013).

A fibrinólise é caracterizada pela degradação da rede de fibrina de maneira controlada, ela é a fase final da hemostasia. Para isso, o ativador tecidual da pró-enzima plasminogênio, transforma o plasminogênio em plasmina, que é a responsável pela degradação dos coágulos formados, através da degradação de fibrina. É necessário que este processo se inicie no momento certo e com a intensidade acurada, para garantir a integridade de todo o processo de restabelecimento da hemostasia (BRUNTON et. al, 2012; IRULEGUI et al., 2016).

2.6 Trombose

A hemostase funciona em um equilíbrio entre mecanismos de coagulação e fibrinólise, e uma vez que esse equilíbrio é afetado, seja por fatores genéticos ou adquiridos, leva a complicações trombóticas e hemorrágicas. Portanto, a trombose é a versão patológica da hemostase, e é definida pela formação de um trombo (coágulo de sangue) que pode causar o entupimento de vasos e artérias, o que desencadeia a formação da trombose venosa e a trombose arterial, respectivamente (CLEMETSON, 2012).

Um dos fatores que induzem a formação de um trombo está relacionado com a fibrinólise, pois ela é responsável pela dissolução de trombos sanguíneos formados em resposta à lesão tecidual, e uma vez que apresente alguma anormalidade, como fibrinólise disfuncional ou a hipofibrinólise, ocorre a diminuição da depuração dos trombos sanguíneos, o que leva a um estado trombolítico (PRABHUDESAIA et al., 2017).

No entanto, os principais fatores de riscos envolvidos com a trombose foram descritos por Virchow em 1856, a conhecida tríade de Virchow, que incluem estase sanguínea, hipercoagulabilidade e lesão endotelial. A hipercoagulabilidade inclui fatores congênitos (fator V de Leiden, hiper-homocisteinemia, mutação 20210A do gene da protrombina, antitrombina III, e as deficiências das proteínas C e S) e fatores adquiridos (os anticorpos

antifosfolípidios, neoplasias, gestação, puerpério, cirurgias, traumas e o uso dos anticoncepcionais são os mais frequentes) (GODOY, 2009).

A trombose arterial (**Figura 16a**) é, principalmente, associada com um aumento da reatividade plaquetária e dano no endotélio, ela é caracterizada pela formação de trombos dentro de artérias, que podem causar o bloqueio da passagem sanguínea, o quadro clínico isquêmico e malignidade vão depender da artéria que foi obstruída. Para o tratamento dessa patologia estão os agentes antiplaquetários, como a aspirina. Algumas condições clínicas incluem aterosclerose, fumo, hipertensão e diabetes (CALLAI et al., 2017; CASTRO et al., 2006).

Por outro lado, trombose venosa profunda (**Figura 16b**) tem sido associada, comumente, com estase sanguínea e hipercoagulabilidade, ela é caracterizada pela formação de trombos dentro de veias profundas, com obstrução total ou parcial, sendo mais comumente em membros inferiores (CALLAI et al, 2017). A sua complicação mais grave é a embolia pulmonar, muitas vezes se apresenta de forma assintomática e se resolve sem complicações, geralmente quando apresentam sintomas são responsáveis pela morbidade e mortalidade. Dentre os fatores de riscos estão os procedimentos cirúrgicos, imobilização, uso de estrogênios, trauma, gravidez, idade avançada e câncer (LOPES et al., 2014).

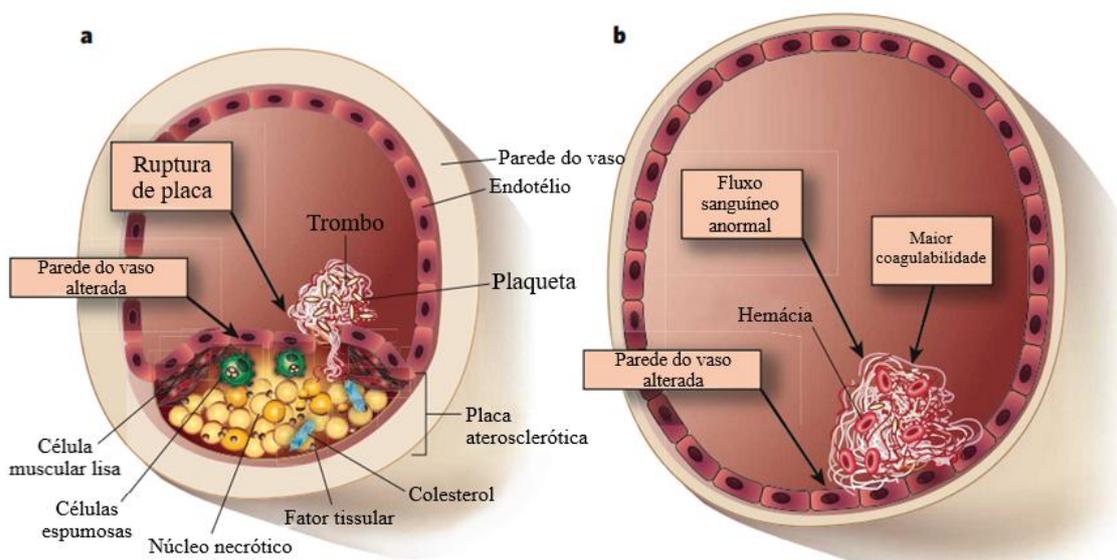


Figura 16: Estímulos da trombose arterial e venosa. **a)** artéria. O estímulo primário da trombose arterial é a ruptura de uma placa aterosclerótica. Isso envolve o rompimento do endotélio e a liberação de substâncias da placa no lúmen do vaso sanguíneo. **b)** veia. Em contraste, na trombose venosa, o endotélio permanece intacto, mas pode ser convertido de uma superfície com propriedades anticoagulantes para um com propriedades pró-coagulantes. A trombose venosa pode ser desencadeada por diversos fatores: fluxo sanguíneo anormal (como ausência de fluxo sanguíneo); propriedades alteradas do próprio sangue (trombofilia); e alterações no endotélio (Adaptado de: MACKMAN, 2008).

2.7 Fármacos para Tratamento de Trombose

Os agentes farmacológicos utilizados no tratamento de doenças trombóticas são classificados como antiplaquetários (inibem a ativação e/ou agregação plaquetária), anticoagulantes (que atenuam a formação de fibrina), e agentes fibrinolíticos (que degradam fibrinas).

Atualmente, as principais classes de agentes antiplaquetários incluem os inibidores de tromboxano (aspirina, ridogrel, ramatroban), inibidores da agregação plaquetária induzida por ADP (clopidogrel, ticlopidine, prasugrel), inibidores da GpIIIb/IIa (abciximab, eptifibatide), antagonistas do receptor da trombina (vorapaxar), supressor da degradação de AMPc intraplaquetário (cilostazol) (**Figura 17**) (AFONSO et al., 2016; ATTA-UR-RAHMAN, 2018). Para tratamento de doenças trombóticas, a aspirina e clopidogrel são os mais utilizados isoladamente ou associados (SARDENBERG et al., 2017).

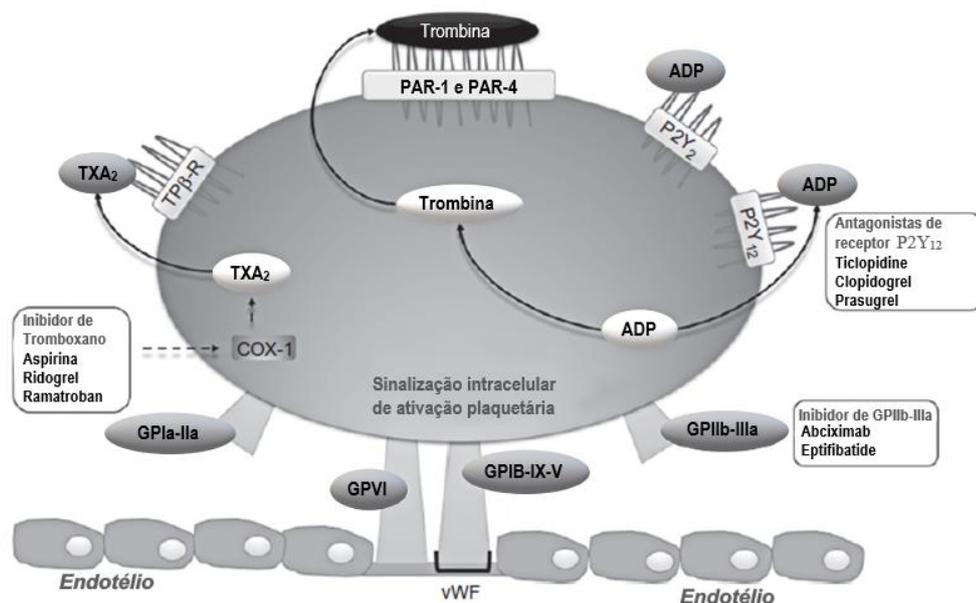


Figura 17: Principais alvos dos agentes antiplaquetários. A adesão plaquetária ao endotélio ocorre em sítios de lesão vascular através da ligação dos receptores GP às proteínas da matriz extracelular expostas (colágeno e fator von Willebrand (vWF)). A ativação plaquetária ocorre via processos de sinalização intracelular e causa a produção e liberação de múltiplos agonistas, incluindo TXA₂ e ADP, e a produção local de trombina. Esses fatores se ligam a seus respectivos receptores acoplados à proteína G, mediando mecanismos parácrinos e autócrinos. Além disso, eles potencializam as ações uns dos outros (por exemplo, a sinalização P2Y₁₂ modula a geração de trombina). A principal integrina plaquetária GP IIb/IIIa medeia a etapa comum final da ativação plaquetária, submetendo-se a uma mudança conformacional e à ligação do fibrinogênio e do fator von Willebrand, levando à agregação plaquetária. O resultado líquido dessas interações é a formação de trombos, resultando em interações plaquetas/plaquetas com fibrina. Terapias atuais e emergentes que inibem os receptores plaquetários, integrinas e proteínas envolvidas nesse processo, incluem inibidores de tromboxano, antagonistas do receptor de ADP P2Y₁₂, e inibidores de GP IIb/IIIa (Adaptado de: CHAVES; MELO; CORRÊA, 2018).

O ácido acetilsalicílico (AAS), comumente conhecido como aspirina (**Figura 18**), é muito utilizado na clínica como fármaco inibidor plaquetário, além disso, possui outras aplicações, como analgésico, redutor de febre, redutor da inflamação, para tratamento do cancro, doenças cardiovasculares, Alzheimer, ataque cardíaco, acidente vascular cerebral etc. Mas seu uso deve ser cuidadosamente monitorado devido seus efeitos colaterais nocivos, como vômitos, dor de estômago, náuseas, perda de audição etc. Além disso, doses acima de 500 mg por dia podem promover hemorragia digestiva alta. Apesar disto, o AAS se mantém como fármaco de primeira linha em baixas doses (55-325 mg/dia) (SIVAKUMAR et al., 2017).

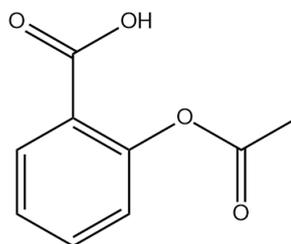


Figura 18: Estrutura química do ácido acetilsalicílico (SIVAKUMAR et al., 2017).

O mecanismo de ação da aspirina baseia-se no bloqueio irreversível da enzima cicloxigenase 1 (COX-1) após a acetilação do seu sítio ativo, com isso, a enzima fica impedida de catalisar a oxidação do ácido araquidônico para síntese de TxA₂. O TxA₂ é capaz de se ligar ao receptor de prostaglandina acoplado a proteína Gq, que gera uma mudança conformacional nas plaquetas, permitindo um aumento no recrutamento e agregação plaquetária (RYTEL; CALKA, 2016).

O clopidogrel é um pró-fármaco da classe dos compostos tienopiridínicos. Este fármaco associado com a aspirina é mais eficaz que a aspirina isolada, na redução da incidência de eventos cardiovasculares precoces e de longo prazo, em pacientes com síndrome coronariana aguda submetidos à intervenção coronariana percutânea. Porém, em alguns estudos foi relatado que esse tratamento só atinge 4 a 44% dos pacientes tratados. Portanto, uma grande parcela dos pacientes tratados permanece na zona de risco, isso mostra a necessidade de se desenvolver novas drogas mais potentes, além de novas combinações de terapias antiplaquetárias (VLACHOJANNIS et al., 2011).

Acredita-se que a resistência aos efeitos antiplaquetários do clopidogrel esteja relacionado a metabolização hepática da droga, ao seu metabólito ativo e as variações

genéticas no receptor de ADP, P2Y₁₂. Louca et al. (2014) relataram em seu estudo que a duplicação da dose de clopidogrel parece ser uma opção razoável para pacientes com resistência, no entanto, segundo as orientações da *European Society of Cardiology* (ESC) entre outras associações, a prática não é recomendada devido aumento do risco de hemorragia (TENDERA et al., 2011).

O mecanismo de ação do clopidogrel (**Figura 19**) se baseia na inibição irreversível e seletiva de receptores P2Y₁₂. Esses receptores são ativados naturalmente por ADP, e são capazes de desencadear a ativação plaquetária, uma vez inibidos pelo clopidogrel, o ADP não consegue se ligar ao receptor, impossibilitando a transdução do sinal (LOUCA et al., 2014).

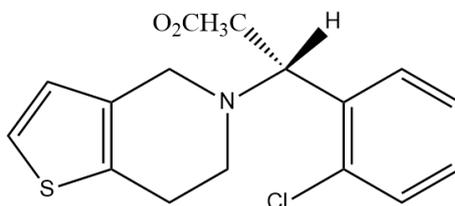


Figura 19: Estrutura química do Clopidogrel (SHARIS; LOSCALZO, 2003).

Entre os agentes anticoagulantes, a varfarina é o mais utilizado na clínica, e por muito tempo permaneceu como única opção terapêutica anticoagulante oral para tratamentos de doenças tromboembólicas (SARDENBERG et al., 2017). No entanto, o tratamento com varfarina é limitado devido a vários fatores, como a imprevisibilidade do seu metabolismo, além da necessidade de monitoramento laboratorial da sua atividade antitrombótica. Diante dessas limitações, gerou-se a necessidade de se desenvolver outros fármacos (AFONSO et al., 2016). Outros antagonistas da vitamina K utilizados na clínica são acenocumarol e femprocumona (ATTA-UR-RAHMAN, 2018).

A varfarina (**Figura 20**) é um antagonista da vitamina K, que fisiologicamente atua como co-fator na carboxilação de resíduos específicos de ácido glutâmico para formar o ácido gama carboxiglutâmico (Gla), aminoácido presente nos fatores de coagulação (fatores II, VII, IX e X). Para que ocorra a gamacarboxilação do ácido glutâmico, a vitamina k é reduzida à hidroquinona pela ação da enzima quinona redutase, e é oxidada pela ação da enzima carboxilase, dando origem à forma 2,3-epoxi. Esse metabólito é convertido novamente em sua forma ativa pela ação da vitamina k epóxido redutase, completando o ciclo da vitamina k. A varfarina atua sobre a enzima epóxido redutase e sobre a quinona redutase,

inibindo a conversão da vitamina k 2,3-epoxi em sua forma ativa (hidroquinona), o que faz o paciente expressar baixos níveis dos fatores II, VII, IX e X (TELES et al., 2012).

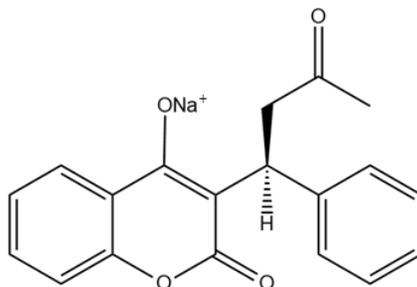


Figura 20: Fórmula estrutural da Varfarina (BOTTON, 2010).

A heparina (**Figura 21**) e seus derivados também são anticoagulantes potentes e muito utilizados na clínica. Trata-se de um glicosaminoglicano encontrado nos grânulos secretores dos mastócitos, comumente extraída na mucosa intestinal de suínos. Os derivados da heparina em uso no momento incluem heparinas de baixo peso molecular (HBPMs, p. ex. enoxaparina, daltaparina, tinzaparina), que são fragmentos da heparina com peso molecular entre 1-10 kDa (cerca de 17 unidades de sacarídeos), e o fondaparinux, um análogo sintético de cinco sacarídeos de uma sequência natural encontrada na heparina (BRUNTON et al., 2012).

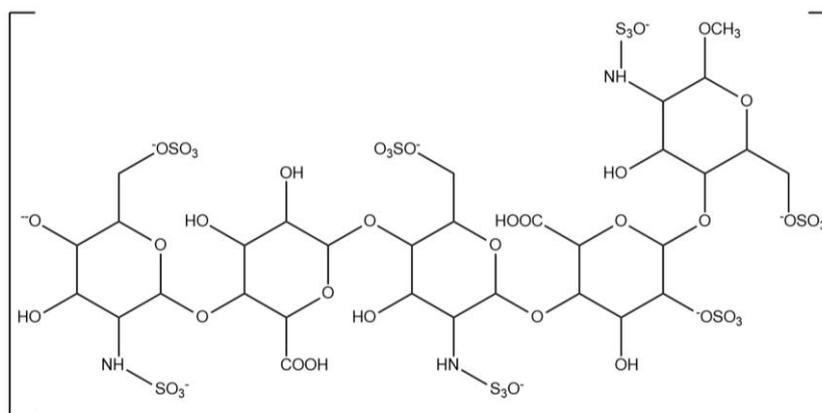


Figura 21: Sequência demonstrativa de sacarídeos encontrada nas cadeias heterogêneas de heparina (CHAVES; MELO; CORRÊA, 2018).

O mecanismo de ação da heparina, HBPMs e fondaparinux não está relacionado à atividade anticoagulante intrínseca, pois esses fármacos atuam como catalisadores da atividade da antitrombina (**Figura 22**). A antitrombina inibe os fatores de coagulação ativados envolvidos na via intrínseca e comum, e quando a heparina e seus derivados se ligam a

antitrombina, eles induzem uma mudança conformacional na antitrombina que torna seu sítio ativo mais acessível para a protease-alvo (LEME; SGUIZZATTO, 2012).

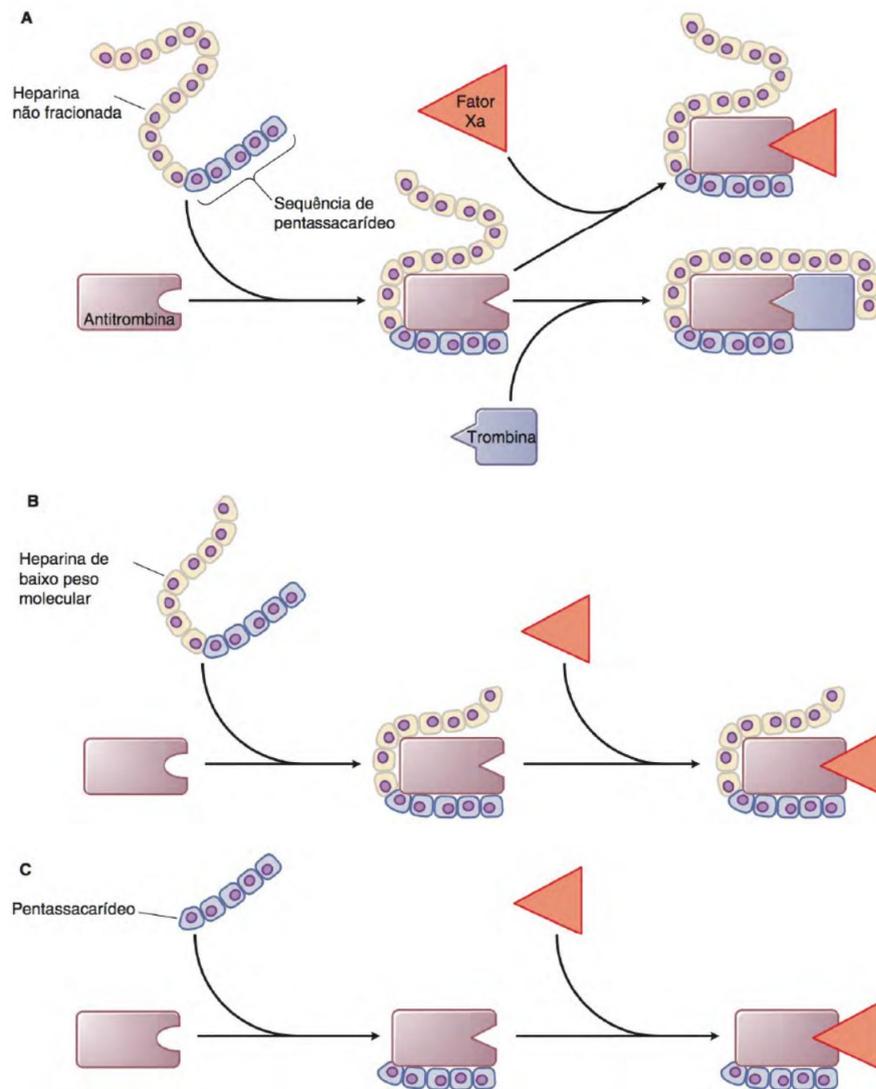


Figura 22: Mecanismo de ação da heparina, heparina de baixo peso molecular (HBPM) e do pentassacarídeo sintético fondaparinux. **A.** A heparina se liga à antitrombina por meio da sua sequência de pentassacarídeos que leva à mudança conformacional na alça do centro reativo da antitrombina e acelera sua interação com o fator Xa. Para potencializar a inibição da trombina, a heparina deve ligar-se simultaneamente à antitrombina e à trombina. Apenas as cadeias de heparinas compostas por, pelo menos, 18 unidades de sacarídeos são longas o suficiente para realizar a função de ponte. **B.** HBPM tem capacidade maior para potencializar a inibição do fator Xa do que a trombina, porque pelo menos metade das cadeias de HBPM é curta demais para unir a antitrombina à trombina. **C.** O pentassacarídeo acelera apenas a inibição do fator Xa pela antitrombina, ele é curto demais para ligar a antitrombina (BRUNTON et. al, 2012).

Essa alteração conformacional gerada na antitrombina acelera a taxa de inibição do fator Xa em pelo menos duas ordens de magnitude, mas não tem efeito sobre a taxa de inibição da trombina. Para potencializar a inibição da trombina, apenas a heparina serve como

modelo catalítico, pois possui 18 unidades ou mais de monossacarídeos e com isso possui comprimento suficiente para unir a trombina e a antitrombina (BRUNTON et al., 2012).

As plaquetas sintetizam e liberam em seus grânulos α uma proteína catiônica chamada fator plaquetário 4, capaz de impedir que a heparina se ligue a antitrombina, o que pode limitar a sua atividade próxima dos trombos ricos em plaquetas. No entanto, HBPMs e fondaparinux possuem menor afinidade por esse fator plaquetário, sendo mais eficientes em trombos em um grau maior que a heparina. A heparina, HBPMs e fondaparinux podem ser utilizados no tratamento inicial da trombose venosa e da embolia pulmonar graças ao seu efeito rápido, geralmente são utilizados em tratamento concomitante a um antagonista de vitamina K (por ex.: varfarina) que possuem efeito tardio. HBPMs e fondaparinux não necessitam de monitoramento laboratorial (BRUNTON et al., 2012).

A heparina não fracionada pode gerar trombocitopenia induzida pela heparina (TIH), caracterizada pela formação de anticorpos anti-heparina/fator plaquetário, plaquetopenia, com efeito pró-trombótico, podendo evoluir para sangramento, trombose, embolias e até ao óbito, portanto, a heparina deverá ser imediatamente suspensa quando há suspeita de HIT (ROBERTS; CHANEY, 2018).

Novos fármacos são produzidos constantemente, e apesar dos desenvolvimentos atuais, a busca pelo fármaco ideal é assídua. Hoje já foram desenvolvidos os novos anticoagulantes orais (NACO), que tem grande vantagem por não exigirem monitoramento da sua atividade, como por exemplo, rivaroxiban (Xarelto®), o dabigatran (Pradaxa®), Apixaban (Inibidores reversíveis do fator Xa), e edoxaban (inibidor reversível do fator IIa) que já foram aprovados para seu uso clínico. Estes medicamentos têm maiores vantagens devido a sua farmacocinética, com tempos de vida plasmáticos mais curtos, que permitem uma suspensão segura, num tempo mais curto previamente à cirurgia, e o seu metabolismo previsível dispensando a monitorização da sua ação. As desvantagens são que ainda não existe um antídoto disponível, além do elevado preço no mercado (**Figura 23**) (AFONSO et al., 2016).

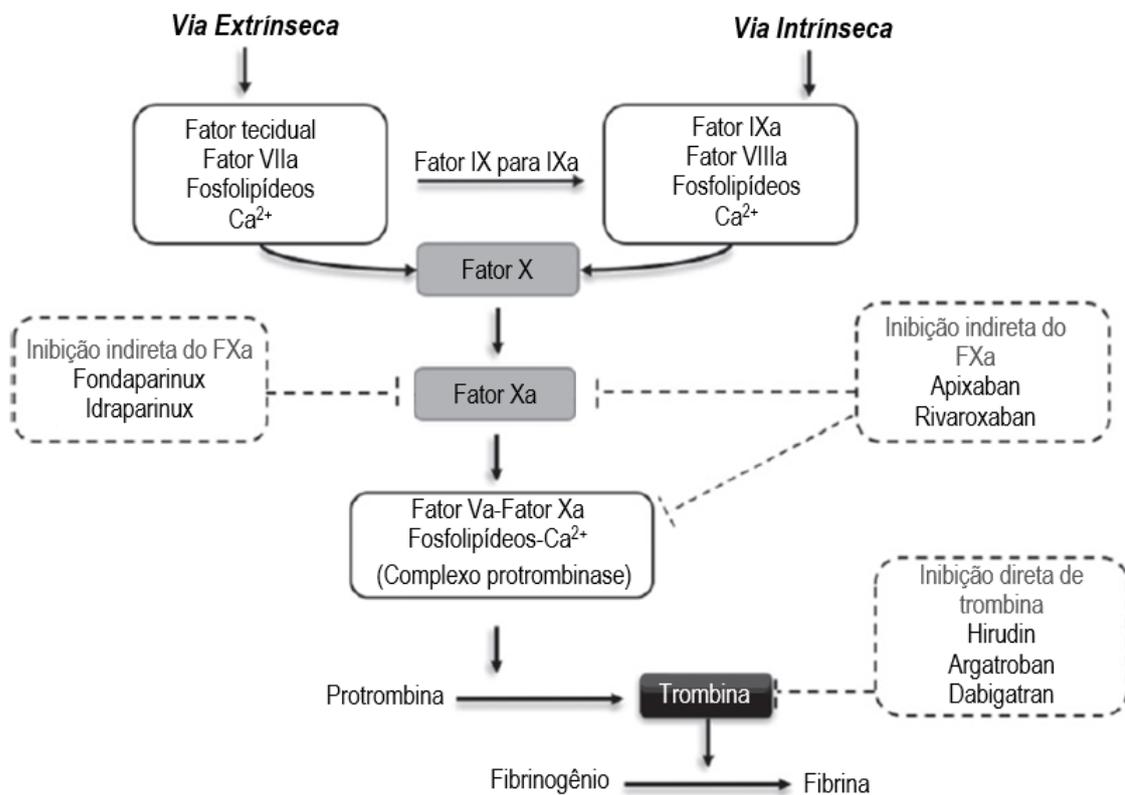


Figura 23: Mecanismo de ação dos principais agentes anticoagulantes. Com a exposição do fator tecidual, os zimogênicos (fatores inativos) são convertidos em fatores ativados, permitindo a formação de monômeros de trombina e fibrina. Todas as cascatas são mostradas em setas pretas. Alguns dos mecanismos inibitórios são apresentados em caixas tracejadas (inibidores diretos e indiretos do fator Xa e inibidores diretos da trombina). F, fator. (Adaptado de: CHAVES; MELO; CORRÊA, 2018).

2.8 Produtos Naturais e Trombose

Muitas substâncias medicamentosas usadas no tratamento de doenças cardiovasculares que são aprovadas e altamente prescritas foram originadas de plantas ou ervas, estima-se que 50% dos medicamentos aprovados nos últimos 35 anos são de origens naturais (CHAVES; MELO; CORRÊA, 2018).

A aspirina, uma droga de origem vegetal sintetizada a partir do precursor salicina, o qual é originalmente derivado da casca e folhas de salgueiro (*Salix* spp.), apresenta uma potente atividade sobre as plaquetas (MONTINARI et al., 2018). No entanto, um intenso efeito antiplaquetário pode gerar riscos graves de hemorragias para o paciente, e diante disso, buscaram-se terapias e substâncias químicas que promovam efeitos antiplaquetários atenuados (XIANG et al., 2008).

Entre as plantas medicinais utilizadas popularmente para tratar doenças cardiovasculares incluem-se: ginseng, açafraão da terra, alho, arroz vermelho fermentado,

Ginkgo biloba, tanshinona e ginsenoside (LI et al., 2015). Tsai et al. (2017) relataram que o uso da fitoterapia chinesa como terapia adjunta pode melhorar a sobrevida global de pacientes com diabetes tipo 2 e que sofreram AVC.

O extrato de *Ginkgo biloba* é um medicamento fitoterápico conhecido popularmente e muito utilizado em vários países, como Alemanha, EUA e países asiáticos. Essa espécie vegetal apresenta diversos efeitos benéficos à saúde já conhecidos, como anti-inflamatório, antiasmático, antitumorais, e tem sido indicado em casos de doenças cerebrais e arteriais periféricas. Seus extratos apresentam atividade antiplaquetária induzida por ADP e colágeno *in vitro* e *in vivo* através do aumento de cAMP e inibição da síntese de tromboxano A₂ (CHO; SHON; NAM, 2007). Uma das suas principais substâncias químicas, os ginkgolídeos, apresenta efeitos inibitórios sobre a agregação plaquetária através de vias dependentes de AMPc e GMPc (CHO et al., 2007). Ginkgolide B também já foi estudado e observou-se antagonismo potente sobre o fator ativador de plaquetas (XIA; FANG, 2007).

A romã (*Punica granatum* L.) também tem sido alvo de estudos devido suas potentes propriedades antioxidantes, antimicrobianas, anticarcinogênicas e principalmente devido sua capacidade de reduzir a agregação plaquetária induzida por ácido colágeno e araquidônico, função esta atribuída à presença de taninos hidrolisáveis elagitaninos e ácido elágico, além de outros compostos, como por exemplo, antocianinas e flavonoides (WANG et al., 2018).

Existem diversas classes de substâncias químicas produzidas pelo metabolismo vegetal que podem ser responsáveis pelos seus efeitos antitrombóticos, dentre elas, destacam-se os polissacarídeos, peptídeos, compostos fenólicos, saponinas, flavonoides, terpenos, cumarinas e taninos (CHAVES; MELO; CORRÊA, 2018).

A curcumina, diferucoilmetano, é um componente polifenólico da *Curcuma longa*, conhecida popularmente como açafrão da terra, e tem sido muito utilizada em produtos complementares e na medicina alternativa, pois além de possuir muitas ações terapêuticas, dentre elas, efeitos protetores antitrombóticos e cardiovasculares, ela é considerada uma substância segura, porque doses orais altas como 8g/dia administrada a humanos não resulta em efeitos colaterais evidentes. Sabe-se que ela inibe a agregação plaquetária induzida pelo ácido araquidônico, adrenalina e colágeno (KEIHANIAN et al., 2017).

Outra substância polifenólica com propriedade antitrombótica comprovada é o resveratrol, um polifenol não flavonoide pertencente ao grupo estilbeno, que pode ser encontrado em muitos alimentos e bebidas à base de plantas, incluindo vinho tinto, uvas, uma variedade de frutas e amendoim. Existem vários mecanismos propostos para explicar o efeito

antiplaquetário do resveratrol, entre eles, a inibição da agregação plaquetária induzida pela epinefrina e pelo colágeno de pacientes resistentes à aspirina é de grande importância, pois sugere que o resveratrol pode ser um antiplaquetário de segunda linha nesses pacientes resistentes à aspirina (ZORDOKY et al., 2015).

Os flavonoides são caracterizados por um grande grupo de polifenóis encontrados amplamente em frutas e vegetais. Já é conhecida sua capacidade de reduzir a atividade plaquetária atenuando a ativação do receptor GPIIb/IIIa induzido por agonistas, a mobilização da exocitose de grânulos livres de Ca^{+2} intracelular, bem como a ativação de diferentes moléculas de sinalização, tais como proteínas quinases ou fosfolipases ativadas por mitógenos (LOPES et al., 2018). No estudo de Zhang et al. (2017), foi observado que amostras de própolis apresentaram ação antiplaquetária de forma eficaz, na qual os flavonoides contribuíram evidentemente para esta atividade farmacológica.

Os óleos essenciais extraídos de algumas espécies vegetais também já foram notificados com efeitos antitrombóticos. Tognolini et al. (2006) analisaram óleos essenciais extraídos de diferentes espécies vegetais, e notaram fortes atividades antitrombóticas dos óleos extraídos de *O. quixos*, *F. vulgaris* e *A. dracunculus* frente ao ADP, ácido araquidônico e agonista do tromboxano A_2 . Esses autores associaram as atividades encontradas com a composição química dos óleos essenciais ricos em substâncias fenilpropanóides.

Curdione, uma das principais substâncias sesquiterpênicas encontradas no óleo essencial de *Rhizoma Curcumae* demonstrou possuir múltiplas propriedades bioativas, dentre elas, apresentou atividade antiplaquetária frente ao PAF, ADP, ácido araquidônico e trombina. Foi observado por Xia et al. (2012) um aumento nos níveis de cAMP plaquetário, atenuação da mobilização de Ca^{2+} intracelular em plaquetas ativadas por PAF e efeitos antitrombóticos induzidos por vasodilatação.

Diante disso, observa-se que os produtos naturais podem fornecer uma abordagem preventiva útil para a saúde, assim como podem ser usados como alternativas ou complementos para tratamentos farmacológicos atuais de doenças trombóticas, desde que tenham sido submetidos a estudos científicos que garantam orientações adequadas quanto ao efeito sobre a hemostasia, e seus efeitos toxicológicos (**tabela 1**).

Tabela 1: Substâncias químicas encontradas em espécies vegetais e seus mecanismos de ação propostos.

Substância química	Origem vegetal	Mecanismo de ação proposto	Bibliografia
Ginkgolídeos	<i>Ginkgo biloba</i> .	Antiplaquetário por vias dependentes de AMPc e GMPc.	CHO, SHON e NAM, 2007.
Elagitaninos, ácido elágico, antocianinas e flavonoides	<i>Punica granatum</i> L.	Redução da agregação plaquetária induzida por colágeno e ácido araquidônico.	WANG et al., 2018.
Curcumina	<i>Curcuma longa</i> .	Inibe a agregação plaquetária induzida pelo ácido araquidônico (AA), adrenalina e colágeno.	KEIHANIAN et al., 2017.
Resveratrol	Vinho tinto, uvas, frutas e amendoim.	Inibição da agregação plaquetária induzida pela epinefrina e pelo colágeno.	ZORDOKY et al., 2015.
Flavonoides	Própolis, frutas e vegetais.	Atenua ativação do receptor GPIIb/IIIa induzido por agonistas, a mobilização da exocitose de grânulos livres de Ca ⁺² intracelular, a ativação de diferentes moléculas de sinalização, tais como proteínas quinases ou fosfolipases ativadas por mitógenos.	LOPES et. al, 2018.
Fenilpropanóides	O. quixos, vulgaris e A. dracunculus	F. Atividade antitrombótica frente ao ADP, ácido araquidônico e agonista do tromboxano A ₂	Tognolini et al., 2006.
Curdione	Rhizoma Curcumae	Aumento nos níveis de cAMP plaquetário, atenuação da mobilização de Ca ²⁺ intracelular em plaquetas ativadas por PAF e efeitos antitrombóticos induzidos por vasodilatação.	Xia et al., 2012.

Portanto, esse trabalho teve como objetivo geral caracterizar quimicamente o óleo essencial de *Schinus molle* L. e avaliar sua atividade sobre o processo de hemostase. Nesse contexto, os objetivos específicos baseiam-se em: Extração do óleo essencial da espécie *Schinus molle* L. a partir das folhas secas, utilizando o processo de hidrodestilação; Determinação da composição química (qualitativa e quantitativa) do óleo essencial e caracterização das substâncias químicas majoritárias por Cromatografia Gasosa acoplada ao Detector de Chamas e Massas; Avaliação da atividade anticoagulante *in vitro* do óleo essencial de *Schinus molle* L., nos ensaios de Tempo de Protrombina (TP) e Tempo de Protrombina Parcialmente ativado (TTPa); Avaliação da atividade antiplaquetária *in vitro* do óleo essencial de *Schinus molle* L., utilizando ADP e colágeno como indutores da agregação plaquetária.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Obtenção do Material

Folhas de *Schinus molle* L. foram coletadas na região de Seropédica - RJ (22°42'56"S 43°43'01"W), classificada e depositada no Herbário da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro - exsicata RBR 35791. Em seguida foram secas em estufas com circulação e renovação de ar, em temperatura controlada de 45°C durante 72 horas, seguidas de pulverização manual e armazenadas ao abrigo de luz e umidade até o momento da extração.

3.2 Extração e caracterização química do Óleo Essencial

A extração do óleo essencial foi realizada no Laboratório de Plantas Aromáticas e Medicinais, no Departamento de Fitotecnia da UFRRJ. Óleo essencial de *Schinus molle* L. foi extraído das folhas secas e trituradas após 3 horas de hidrodestilação utilizando o aparelho de Clevenger. Em seguida, a umidade do óleo essencial foi eliminada com sulfato de sódio anidro (Na₂SO₂), e armazenado no refrigerador em frasco de vidro âmbar, vedado e ao abrigo da luz.

A caracterização química do óleo essencial foi realizada na central analítica do Instituto de Química da UFRRJ. Um Cromatógrafo Gasoso 5890 Séries II (Agilent, USA), equipado com um detector de ionização de chama e injetor no modo “split” (1:20) foi utilizado para separar e detectar os constituintes dos óleos essenciais das plantas aromáticas. As substâncias foram separadas em uma coluna capilar de sílicas fundida (Fact Four VF-5ms, 30 m x 0,25 mm x 0,25 µm, Agilent J&W). O hélio foi utilizado como gás carreador com fluxo de 1 mL min⁻¹. A programação da temperatura do forno foi de 60°C por 2 min. com incremento de 5°C min⁻¹ até 110°C, seguido por incremento de 3°C min⁻¹ até 150°C e, finalmente, seguido por incremento de 15°C min⁻¹ até 290°C, mantidos por 15 min. As temperaturas do injetor e do detector foram de 220 e 290 °C, respectivamente.

Um Cromatógrafo Gasosos acoplado ao espectrômetro de massa QP-2010 Plus (Shimadzu, JPN) foi utilizado para separar e analisar as substâncias presentes nos óleos essenciais das plantas aromáticas. O fluxo de hélio, a coluna capilar e a programação de temperatura para a análise por CG-EM foram as mesmas descritas para a análise por CG-DIC.

As temperaturas do injetor e de interface foram de 220 e 250 °C, respectivamente. O espectro de massa foi obtido em um detector quadrupolo operando a 70 eV, com intervalo de massa entre 40 e 400 m/z e a razão de 0,5 scan s^{-1} .

A identificação dos constituintes do óleo essencial foi realizada com base na comparação dos índices de retenção calculados (Van Den Dool and Kratz, 1963) e dos espectros de massa obtidos com aqueles descritos na literatura (Adams, 2007) e no banco de dados do equipamento (Biblioteca NIST 2008).

3.3 Ensaios Biológicos

Todos os ensaios biológicos foram submetidos ao Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do Hospital Universitário Clementino Fraga Filho/HUCFF/UFRJ, e aprovados pelo número CAAE: 60160716.3.0000.5257. Os ensaios foram realizados em colaboração com o grupo do laboratório de Hemostasia e Trombose, que pertence ao Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas (DACT) da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), sob a orientação e coordenação da professora Flávia Serra Frattani Ferreira. Os ensaios também foram acompanhados pela aluna de mestrado Alessandra Lyra Guedes.

3.3.1 Atividade anticoagulante

Para testar a atividade anticoagulante do óleo essencial foram realizados ensaios de Tempo de Tromboplastina Parcial Ativada (TTPa) e Tempo de Protrombina (TP). O tempo de coagulação do plasma foi medido (em segundos) utilizando o microcoagulômetro AMELUNG, modelo KC4A, Alemanha, o qual é equipado com um sistema de agitação e aquecimento e indica o tempo decorrido desde o início da reação de coagulação até a formação do coágulo. O plasma pobre em plaquetas (PPP) humano utilizado foi adquirido da BioRad e ressuspenso com água destilada. O reagente de TTPa utilizado foi Cefalina Ativada e foi comprada da Diamed (Rio de Janeiro, Brasil), para o TP, o reagente utilizado foi a tromboplastina tecidual cálcica, que foi obtida da Biolab (Rio de Janeiro, Brasil). O controle foi a heparina de alto peso molecular.

Os ensaios iniciaram com a incubação de 50 μ l de PPP a 37°C por 60 segundos no microcoagulômetro, e após esse tempo, a amostra (óleo essencial puro) ou o controle (tampão tris-NaCl: TBS) foi adicionado. Foram testadas as concentrações (da amostra) de 40, 200 e

400 mg.ml⁻¹ no ensaio de TTPa, e 50, 250 e 500mg.ml⁻¹ para o ensaio de TP (cada concentração foi analisada em duplicata). O reagente de TTPa (50µl) ou de TP (100µl) foi adicionado 60 segundos depois da amostra ou controle. Para o TTPa, a reação foi iniciada com 100µl de cloreto de cálcio 25 mM após 180 segundos, para o TP, a reação foi iniciada após a adição do reagente de TP (tromboplastina).

3.3.2 Atividade antiplaquetária

Os ensaios de agregação plaquetária foram realizados em um agregômetro Chronolog (Havertown, PA) seguindo o método turbidimétrico de Born & Cross (1963) (**Figura 24**). As concentrações da amostra (óleo essencial puro) analisadas foram de 5, 10, 20, 30 e 40 mg/ml, cada concentração foi analisada em triplicata, e o controle positivo utilizado foi a aspirina.

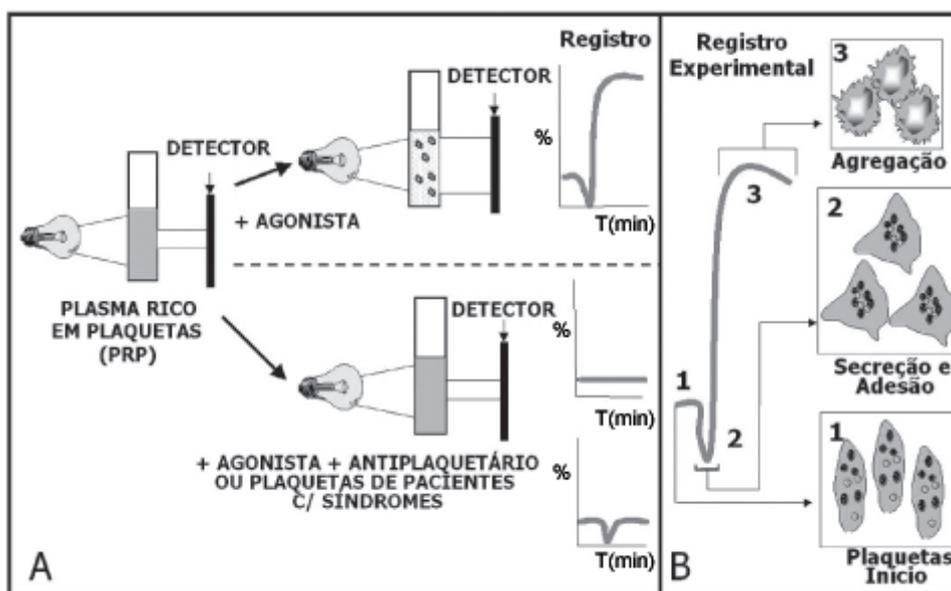


Figura 24: Ensaio de agregação plaquetária no agregômetro (A) e seu registro experimental (B). A: plaquetas normais (acima), deficientes ou tratadas com antagonistas plaquetários (abaixo) são testadas com agonistas, como o ADP e colágeno utilizados neste estudo. B: registro experimental de um ensaio no agregômetro utilizando plaquetas normais, mostrando o início do experimento (1), após a adição do agonista, quando ocorre a mudança de forma da plaqueta (shapechange) com posterior secreção dos grânulos (2) e, finalmente, a agregação plaquetária (3) (CASTRO et al., 2006).

O sangue humano foi obtido de doadores voluntários após consentimento informado, o qual foi coletado em tubos BD[®] Vacutainer com citrato de sódio a 3,2%. O sangue foi centrifugado em 1200 rpm por 12 minutos, o sobrenadante foi armazenado e utilizado como Plasma Rico em Plaquetas (PRP). Parte do PRP foi centrifugado novamente a 2000 rpm por

10 minutos, e o sobrenadante foi armazenado e utilizado como Plasma Pobre em Plaquetas (PPP). Para esta análise, utilizamos como indutores da agregação plaquetária os agonistas: difosfato de adenosina (ADP) e colágeno.

O PRP (350 μ l) foi incubado a 37°C por 1 minuto, e em seguida foi adicionado o indutor ADP (5,02 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$) ou o colágeno ($5,7\times 10^{-3}$ $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$), para induzir a agregação plaquetária máxima e gerar um grupo controle positivo. A amostra a ser analisada foi adicionada 1 minuto após a incubação do PRP, e 1 minuto antes do indutor. A agregação foi registrada como a mudança percentual na transmissão de luz: o valor de referência foi definido usando o PRP, e a transmissão máxima usando o PPP.

3.3.3 Análises estatísticas

Para realizar as análises estatísticas foi utilizado o software Graphpad Prism for Windows version 6.01. Os resultados obtidos foram expressos em média \pm SD e as análises estatísticas foram obtidas através da determinação da variância unidirecional (ANOVA), comparando as concentrações com o controle pelo teste de Dunnet, com mudanças consideradas significativas quando p-valor menor ou igual a 0,05.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Caracterização Química

A extração do óleo essencial apresentou rendimento de 2,44% (m/m). As substâncias encontradas no óleo essencial das folhas de *Schinus molle* L. estão representadas na **tabela 2** dispostas na ordem de eluição na coluna cromatográfica, suas estruturas químicas encontram-se na **figura 25** e o perfil cromatográfico observa-se na **figura 26**. Foram obtidas 45 substâncias, e quatro destas não foram identificadas.

Tabela 2: Caracterização química do óleo essencial das folhas de *Schinus molle* L. após 3h de extração por hidrodestilação.

OEC	Substância	IRL ^a	IRL ^b	Área %
1	α -Pinoeno	934	932	0,78
2	β -Pinoeno	978	974	1,62
3	α -Canfolenal	1128	1122	0,34
4	Nopinona	1139	1135	0,10
5	Trans-pinocarveol	1141	1135	1,74
6	Cis-verbenol	1143	1137	0,09
7	Trans-verbenol	1147	1140	1,16
8	NI	1151	-	0,07
9	Pinocarvone	1165	1160	0,85
10	<i>p</i> -Mentha-1,5-dien-8-ol	1169	1166	0,36
11	Terpinen-4-ol	1179	1174	0,10
12	α -terpineol	1193	1186	0,08
13	Mirtenal	1199	1195	2,80
14	Verbenona	1212	1204	0,53
15	Trans-carveol	1222	1215	0,17
16	α -copaeno	1380	1374	0,26
17	β -Elemeno	1396	1389	0,34
18	α -gurjuneno	1414	1409	0,33
19	β -cariofileno	1425	1417	4,44
20	Aromadendrene	1444	1439	0,13
21	Cis-muurola-3,5-dieno	1451	1448	0,19
22	α -humuleno	1459	1452	0,73
23	9-epi- β -cariofileno	1467	1464	5,50
24	Germacreno D	1481	1484	0,25
25	γ -amorfenol	1487	1495	2,86
26	Biciclogermacreno	1502	1500	5,67
27	α -Muuroleno	1505	1500	1,64
28	γ -cadineno	1520	1513	9,66
29	δ -cadineno	1529	1522	5,23
30	α -cadineno	1543	1537	0,84
31	NI	1575	-	0,67
32	Espatuleno	1581	1577	7,62
33	Óxido de cariofileno	1586	1582	5,45
34	Globulol	1594	1590	2,80
35	Ledol	1611	1602	1,80
36	Epóxido de humuleno II	1616	1608	0,66
37	1,10-di-epi-Cubenol	1622	1618	5,19
38	1-epi-cubenol	1635	1627	0,67
39	Epi- α -cadinol	1650	1638	22,85
40	α -Cadinol	1662	1652	2,20
41	Cadeleno	1682	1675	0,27
42	NI	1695	-	0,10
43	Shyobunol	1700	1688	0,44
44	Acetato de cariofileno	1717	1701	0,08
45	NI	1752	-	0,30
Hidrocarbonetos monoterpênicos				2,40
Monoterpenos oxigenados				8,32
Monoterpenos totais				10,72
Hidrocarbonetos sesquiterpênicos				38,07
Sesquiterpenos oxigenados				50,03
Sesquiterpenos totais				88,10
Total identificado				98,82

^a Índice de retenção linear obtido através da equação de van den Dool e Kratz (1963).

^b Índice de Retenção Linear encontrado na literatura (Adams, 2007).

OEC= Ordem de eluição na coluna cromatográfica

NI = Composto não identificado.

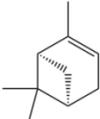
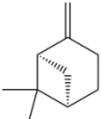
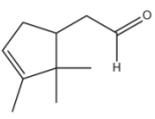
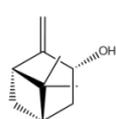
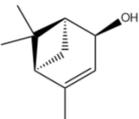
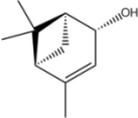
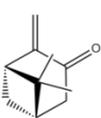
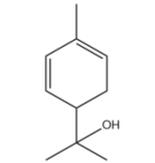
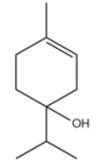
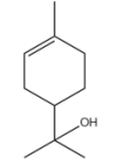
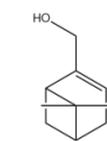
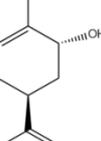
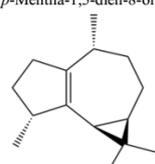
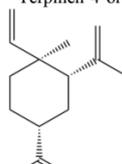
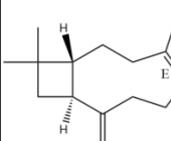
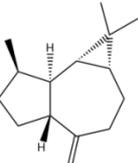
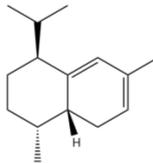
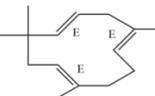
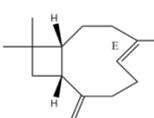
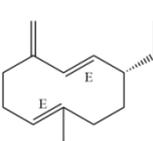
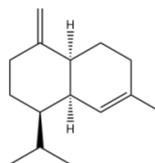
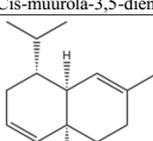
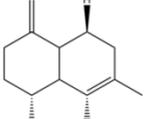
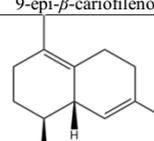
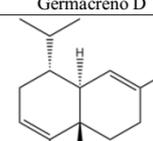
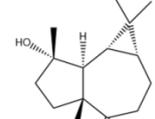
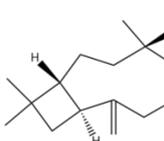
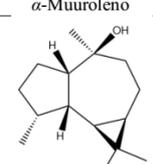
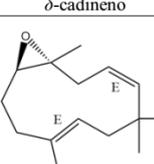
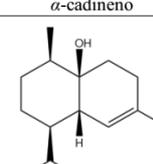
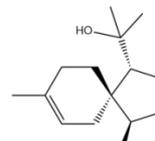
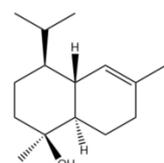
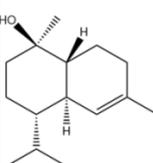
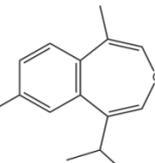
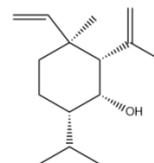
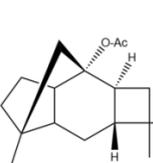
 <i>α</i> -Pineno	 <i>β</i> -Pineno	 <i>α</i> -Canfolenal	 Nopinona	 Trans-pinocarveol	 Cis-verbenol
 Trans-verbenol	 Pinocarvone	 <i>p</i> -Mentha-1,5-dien-8-ol	 Terpinen-4-ol	 <i>α</i> -terpineol	 Mirtenal
 Verbenona	 Trans-carveol	 <i>α</i> -copaeno	 <i>β</i> -Elemeno	 <i>α</i> -gurjuneno	 <i>β</i> -cariofileno
 Aromadendrene	 Cis-muurolo-3,5-dieno	 <i>α</i> -humuleno	 9-epi- <i>β</i> -cariofileno	 Germacreno D	 <i>γ</i> -amorfenol
 Biciclogermacreno	 <i>α</i> -Muurolo	 cadineno	 <i>γ</i> - <i>δ</i> -cadineno	 <i>α</i> -cadineno	 Espatuleno
 Óxido de cariofileno	 Globulol	 Ledol	 Epoxido de humuleno II	 1,10-di-epi-Cubeno	 1-epi-cubeno
 Epi- <i>α</i> -cadinol	 <i>α</i> -Cadinol	 Cadeleno	 Shyobunol	 Acetato de cariofileno	

Figura 25: Estruturas químicas de cada substância encontrada e identificada no óleo essencial extraído das folhas de *S. molle*.

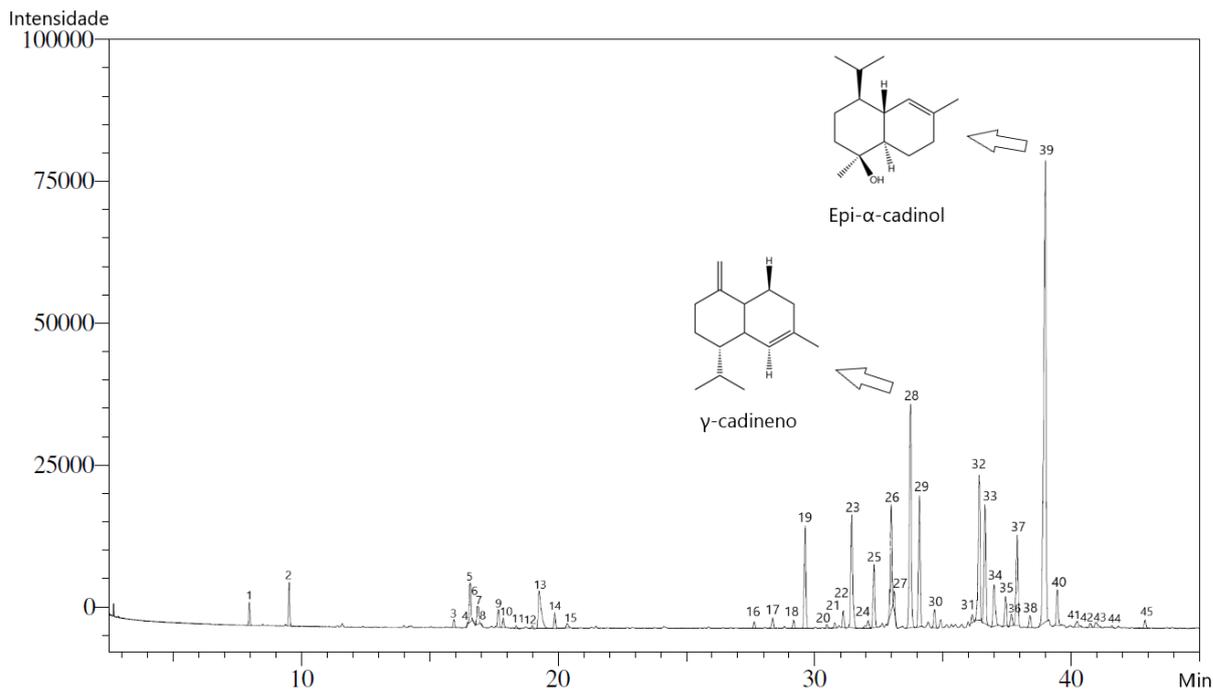


Figura 26: Cromatograma (CG-DIC) do óleo essencial de *S. molle* obtido das folhas secas por hidrodestilação. Os números na ordem de eluição estão listados na tabela 2 com os respectivos nomes de cada substância química.

As substâncias epi- α -cadinol e γ -cadineno são majoritárias no óleo essencial, com 22,85% e 9,66%, respectivamente, e suas estruturas químicas podem ser observadas na **figura 25**. O espectro de massas da substância epi- α -cadinol está representado na **Figura 27**, seu íon molecular apresenta 222 m/z e o pico base 161 m/z , já o espectro de massas da substância γ -cadineno pode ser visto na **Figura 28**, sendo o íon molecular 204 m/z e o pico base 105 m/z . No perfil químico deste óleo destacaram-se também as substâncias espatulenol (7,62%), biciclogermacreno (5,67%), δ -cadineno (5,23%), 9-epi- β -cariofileno (5,50%), óxido de cariofileno (5,45%), 1,10-di-epi-Cubenol (5,19%) e β -cariofileno (4,44%).

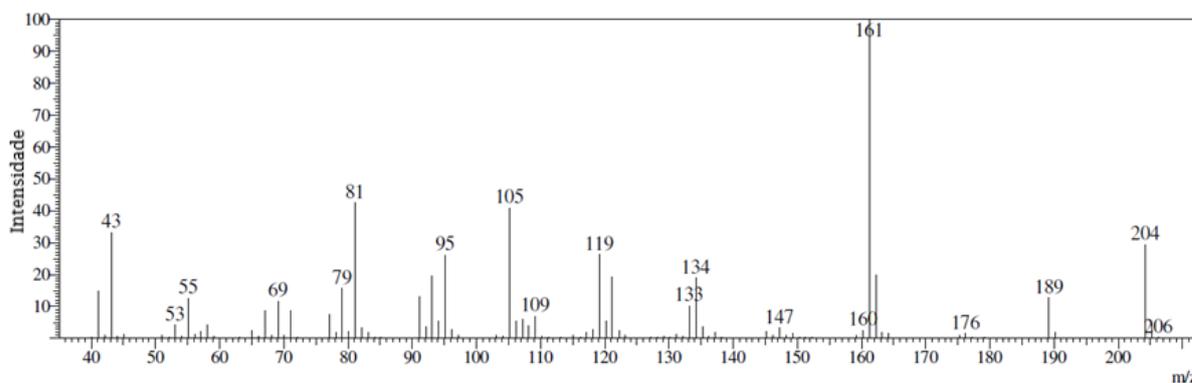


Figura 27: Espectro de massas obtido da substância epi- α -cadinol.

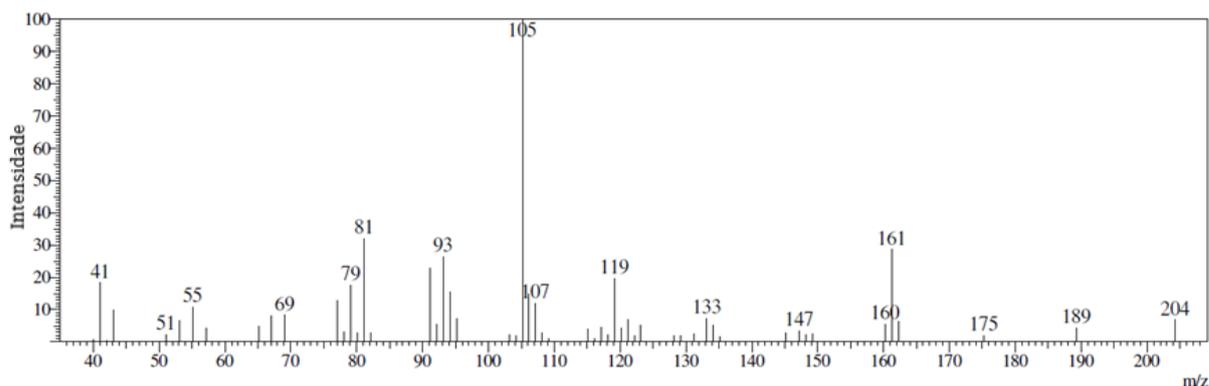


Figura 28: Espectro de massas obtido da substância γ -cadineno.

Em geral, óleos essenciais apresentam maior predominância de substâncias monoterpênicas, seguidas de sesquiterpênicas (THORMAR, 2011), no entanto, observa-se em alguns estudos que o óleo essencial de *Schinus molle* L. pode apresentar variações na sua composição química. Neste estudo, foram observados 88,1% de substâncias sesquiterpênicas, sendo 50,03% oxigenadas (**Figura 29**). Munhd et al. (2015) também alcançaram estes resultados nos estudos com *Schinus molle* L. de diferentes regiões do Rio Grande do Sul, por outro lado, Martins et al. (2014) analisaram o óleo essencial de *Schinus molle* L. nativas do sudeste de Portugal e observaram predominância de hidrocarbonetos monoterpênicos, assim como os resultados obtidos por Díaz et al. (2008).

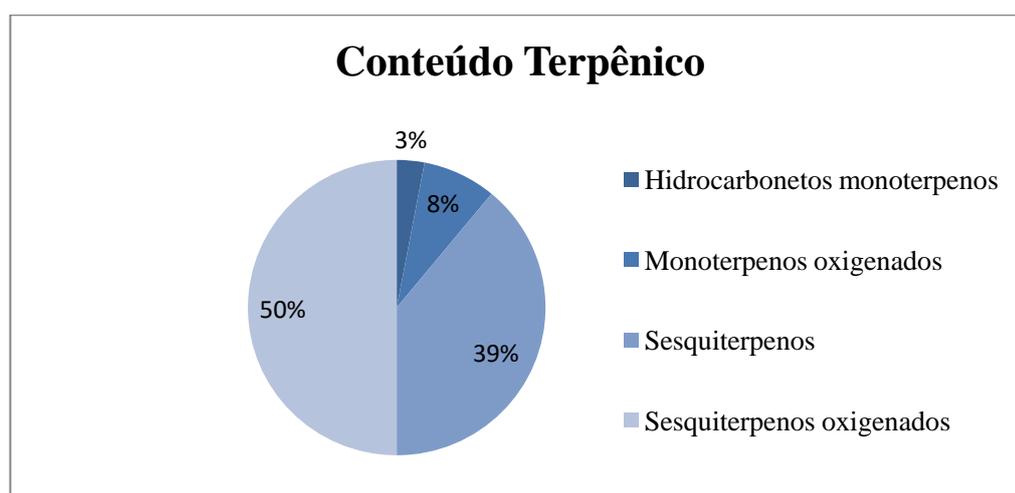


Fig. 29: Conteúdo terpênico encontrado no perfil químico do óleo essencial das folhas de *S. molle*.

Essa diferença pode ser uma característica dessa espécie, devido a diferentes quimiotipos existentes. Além disso, Cavalcante et al. (2015) relataram que a prevalência de monoterpênicos permanecem nas duas primeiras horas de extração do óleo essencial, já

substâncias sesquiterpênicas aparecem a partir da segunda hora, e isso pode ser explicado devido as diferenças do peso molecular e polaridade de cada substância, os quais influenciam no tempo de sua extração, além da volatilidade no decorrer do procedimento. Isso pode explicar o perfil químico encontrado neste estudo, pois o tempo de extração foi em torno de 3h.

Cavalcante et al. (2015) analisaram o óleo essencial das folhas de *Schinus molle* L. da região de Volta Redonda - RJ. Após quatro horas de hidrodestilação as substâncias majoritárias encontradas foram os sesquiterpenos cubenol, óxido de cariofileno e espatulenol. Neste estudo, o óxido de cariofileno e o espatulenol também foram encontrados com maiores concentrações, já o cubenol não foi obtido. Outras substâncias comuns em ambas as análises foram γ -cadineno, globulol, ledol, 1,10-di-epi-cubenol, e alfa-cadinol.

O óleo essencial de *Schinus molle* L. analisado por Batista et al. (2016), também da região de Volta Redonda (RJ), apresentou alguma semelhança com este estudo. Esses autores encontraram 35 substâncias, sendo espatulenol e cubenol majoritárias, e destes, apenas o espatulenol aparece neste estudo. Ambas as análises apresentaram substâncias como biciclogermacreno, β -cariofileno e 1,10-di-epi-Cubenol. Batista et al. (2016) não detectaram as substâncias 9-epi- β -cariofileno e óxido de cariofileno, as quais estão em destaque em nossos resultados.

Atti dos Santos et al. (2007) fizeram a caracterização química do óleo essencial das folhas de *Schinus molle* L. de diferentes locais do Rio Grande do Sul, e encontraram como substâncias majoritárias os monoterpenos α -Pineno, β -Pineno, mirceno e limoneno, e sesquiterpenos biciclogermacreno, α -cadinol, espatulenol, δ -cadineno, β -cariofileno. Com excessão dos monoterpenos mirceno e limoneno, todas essas substâncias foram detectadas neste estudo, e os monoterpenos α -Pineno, β -Pineno se apresentaram em quantidades muito baixas. O tempo de extração utilizado neste estudo foi de 1h, o que explica a alta porcentagem de monoterpenos.

Os resultados publicados por Munhd et al. (2015) indicaram 19 componentes no óleo essencial de *Schinus molle* L. do Rio Grande do Sul, sendo caracterizados principalmente pelo biciclogermacreno, β -cariofileno, espatulenol, globulol, germacreno-D, óxido de cariofileno e terpinen-4-ol. Fazendo uma comparação com este estudo, apenas o globulol, germacreno-D e terpinen-4-ol não aparecem como majoritários, no entanto, todas as substâncias foram encontradas em ambos.

O óleo essencial das folhas de *Schinus molle* L. da região do Cerrado brasileiro foram analisadas por Simionatto et al. (2011), coletadas no Mato Grosso do Sul, a extração do óleo percorreu por quatro horas. Esses autores encontraram 18 substâncias, sendo as substâncias sesquiterpênicas majoritárias, entre elas estão: Epi- α -cadinol, óxido de cariofileno, γ -cadineno, espatulenol e 1,10-di-epi-cubenol. Todas essas substâncias foram encontradas em nossa análise.

Em outro estudo, Martins et al. (2014) relataram vinte e dois componentes no óleo essencial de *Schinus molle* L. nativa do sudeste de Portugal, e os componentes que se destacaram foram α -felandreno, limoneno, β -mirceno, β -felandreno e elemol. Este trabalho apresentou um perfil químico com substâncias diferentes da nossa análise, mesmo em períodos de extração por hidrodestilação iguais em ambos os estudos.

Na província de Taif, KSA, folhas de *Schinus molle* L. foram hidrodestiladas por 1,5h e o óleo essencial obtido foi identificado por Abdel-Hameed e Bazaid (2017), eles encontraram 50 substâncias químicas, destacando-se os sesquiterpenos δ -cadineno, γ -gurjuneno, D-longifoleno, β -cariofileno, guaiol, β -cadinol e α -cadinol. Apenas as substâncias δ -cadineno e β -cariofileno assemelham-se aos majoritários de nossa análise, e α -cadinol aparece em concentração inferior.

Belhamel e Ludwig (2008) encontraram 38 substâncias químicas no óleo essencial de folhas de *Schinus molle* L. nativas da Argélia, país africano, das quais α -felandreno, β -felandreno foram as substâncias majoritárias, e ambas não foram encontradas em nosso estudo. No entanto, também destacaram-se, assim como em nossa análise, as substâncias biciclogermacreno, 1,10-di-epi-cubenol e δ -cadineno.

Díaz et al. (2008) obtiveram 42 substâncias químicas no óleo essencial de folhas de *Schinus molle* L. cultivadas na Costa Rica, a hidrodestilação percorreu por duas horas. As substâncias majoritárias foram os monoterpenos α -pineno e β -pineno, mas, também se destacaram as substâncias γ -cadineno, epi- α -cadinol e β -cariofileno. Observa-se grande semelhança com a nossa análise.

Portanto, em comparação com outros estudos, esta análise apresentou algumas diferenças na composição química do óleo essencial, seja qualitativa ou quantitativamente. A substância sesquiterpênica espatulenol foi observada em todos os estudos brasileiros aqui relatados, e não constou nos estudos estrangeiros. A substância β -cariofileno também foi uma substância em destaque, pois esteve presente em seis das dez análises.

Essa variação química na composição do óleo essencial de *Schinus molle* L. retrata a interferência das condições intrínsecas e extrínsecas sobre a planta, pois sua origem geográfica pode promover diferentes condições ambientais, como disponibilidade de luz, água e nutrientes (LIMA et al., 2003), assim como podem haver diferenças intra-específicas, incluindo fatores genéticos, que também sugerem a presença de diferentes quimiotipos da planta (GOMES, V. et al., 2013).

Apesar das variações na composição química, é notável a presença de determinadas substâncias constantes em alguns estudos, como por exemplo, biciclogermacreno, δ -cadineno, óxido de cariofileno, 1,10-di-epi-cubenol e γ -cadineno. Todas essas substâncias foram encontradas em nossa análise em maiores teores.

O perfil químico do óleo essencial também pode variar de acordo com a parte da planta em que foi extraído, o que pode ser confirmado através da comparação de estudos, por exemplo, de frutos e folhas de *Schinus molle* L. de diferentes autores.

No estudo de Zahed et al. (2011) em quatro regiões diferentes do nordeste da Tunísia, o conteúdo de monoterpenos representou 81 a 96% do óleo essencial de frutos de *Schinus molle* L., sendo majoritários o limoneno, β -fentandreno, α -fandireno, mirceno e α -pineno, e em baixas concentrações, os sesquiterpenos β -cariofileno, germacreno-D, δ -cadineno e γ -muuroleno. Já no estudo de Cavalcante et al. (2015) o óleo essencial dos frutos de *Schinus molle* L. do Rio de Janeiro, sudoeste do Brasil, apresentou 75,9% do conteúdo químico de sesquiterpenos, e as substâncias majoritárias foram: α -pineno, β -pineno, β -cariofileno, germacreno D, δ -cadineno e espatulenol. A hidrodestilação em ambos os estudos percorreu por 2 horas.

Apesar da grande diferença de porcentagens de substâncias sesquiterpênicas entre o estudo na Tunísia e Brasil, as substâncias químicas são quase as mesmas. A diferença encontrada na quantidade das substâncias pode estar relacionada com o ambiente em que a espécie foi cultivada, visto que são estudos de países diferentes.

Comparando esses dois estudos com o perfil químico encontrado no óleo essencial das folhas de *Schinus molle* L. de Seropédica, observa-se a prevalência apenas as substâncias δ -cadineno, β -cariofileno e espatulenol. As substâncias germacreno D e α -pineno apareceram em ambos os estudos como majoritários, mas nesta análise a prevalência destas substâncias foi de menos de 1%. Esses dados mostram que o óleo essencial de frutos e folhas de *Schinus molle* L. de diferentes regiões possuem uma pequena semelhança qualitativa.

4.2 Atividade Anticoagulante

Os resultados dos ensaios laboratoriais para testar o efeito *in vitro* do óleo essencial sobre a coagulação sanguínea comparados ao controle positivo (Heparina) podem ser observados nas figuras 30 e 31.

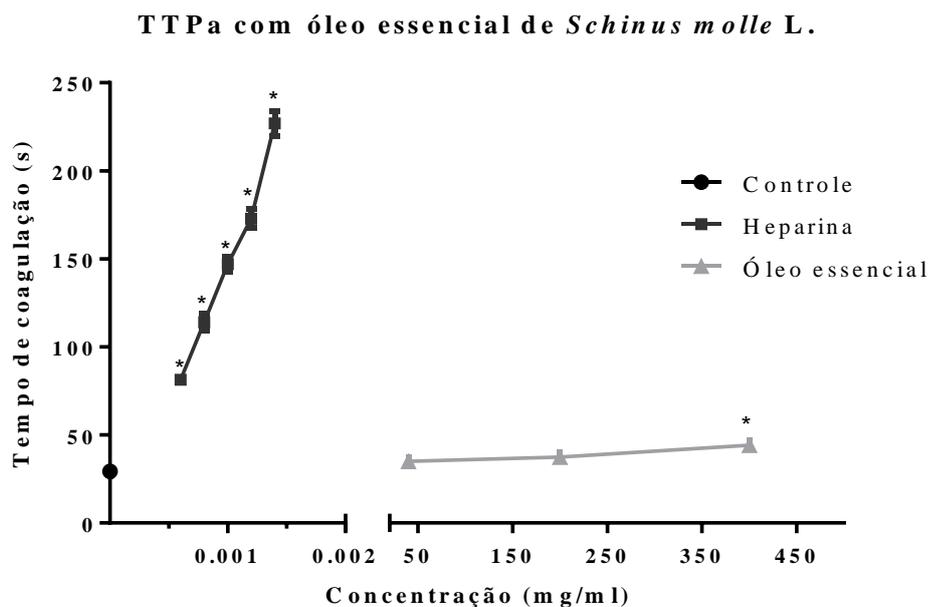


Figura 30: Efeito *in vitro* do óleo essencial de *Schinus molle* L. sobre a coagulação do plasma, após a ativação da via intrínseca induzida pelo reagente TTPa. N=3; * representa valor de $p < 0,05$.

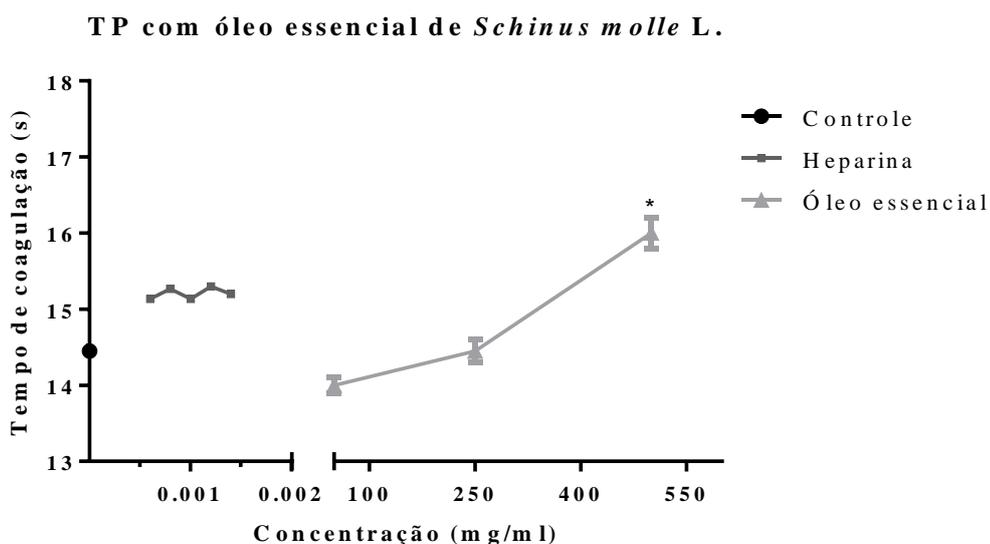


Figura 31: Efeito *in vitro* do óleo essencial de *Schinus molle* L. sobre a coagulação do plasma, após a ativação da via extrínseca induzida pelo reagente TP. N=3; * representa valor de $p < 0,05$.

Tempo de Protrombina Parcialmente ativada (TTPa) é o teste laboratorial clínico mais utilizado para monitorar a via intrínseca da cascata de coagulação (KAMAL et al., 2007), e na **figura 30** pode ser observado o resultado do TTPa para o óleo essencial, o qual não apresentou atividade anticoagulante significativa. Observa-se que em sua maior concentração (400 mg.ml⁻¹) atingiu o tempo de coagulação de 44s, que se comparado ao controle (29s) não é um resultado estatisticamente significativo.

O tempo de protrombina (TP) é usado para avaliar as vias extrínseca (fator VII) e comum (fatores X, V, II e I) e está entre os testes de coagulação mais comumente solicitados (KAMAL et al., 2007). O óleo essencial não apresentou qualquer atividade no ensaio de TP, como pode ser observado na **figura 31**. Vale ressaltar que a heparina foi utilizada como um controle negativo neste ensaio de TP, visto que ela também não prolonga o tempo de coagulação sanguínea na faixa de concentração testada.

Os resultados negativos nos testes da coagulação sanguínea são considerados vantajosos, pois uma vez que o óleo essencial apresente atividade frente às plaquetas, isso pode direcionar sua atividade para este mecanismo de ação, o que é considerado vantajoso, visto que reduz as possibilidades de gerar efeitos colaterais. Os resultados dos testes sobre a atividade antiplaquetária dessa substância estão descritos a seguir.

4.3 Atividade Antiplaquetária

Na **figura 32** observa-se que o óleo essencial de *Schinus molle* L. apresentou atividade antiplaquetária no ensaio de agregação induzida por ADP. Neste estudo foi observado que o óleo essencial apresentou atividade inibitória de forma concentração dependente, no entanto, apresentou um comportamento inibitório diferente do comum, pois a menor concentração testada deste óleo (5 mg.ml⁻¹) demonstrou maior poder inibitório sobre as plaquetas (80%), e a maior concentração testada (40 mg.ml⁻¹) inibiu 48% da ativação plaquetária, ou seja, quanto menor a concentração testada, maior foi seu potencial inibitório sobre as plaquetas.

Agregação plaquetária com ADP

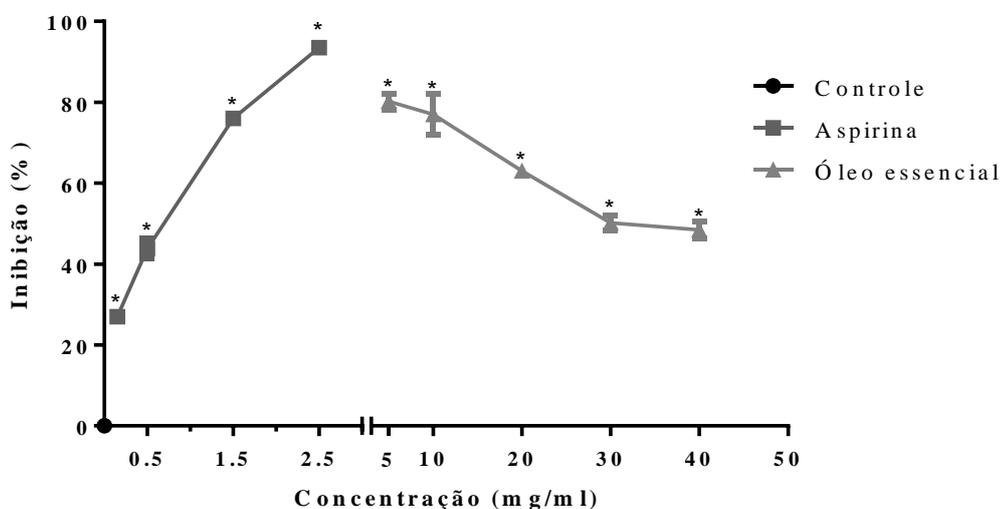


Figura 32: Agregação plaquetária *in vitro* induzida por ADP ($5,02\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$) utilizando plasma rico em plaqueta humana (PRP), frente ao óleo essencial de *Schinus molle* L. N=5; * representa valor de $p<0,05$.

Este resultado pode ser considerado economicamente vantajoso, visto que é necessária uma menor quantidade da substância para se obter uma atividade inibitória mais eficiente, além disso, menores doses necessárias diminuem os riscos de efeitos colaterais. No entanto, é necessária a continuidade do estudo, para elucidarmos melhor o mecanismo de inibição.

Observa-se ainda que a dose máxima testada de aspirina ($2,5\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$), que apresenta a maior atividade inibitória sobre as plaquetas (93,5%), encontra-se muito próxima à dose mínima testada de óleo essencial ($5\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$), e que também apresentou seu maior poder inibitório *in vitro* (80%). Há um alto risco de intoxicação pela administração excessiva de aspirina, visto que uma pequena dose desempenha uma potente ação antiplaquetária, em contrapartida, se administrado doses maiores de óleo essencial, espera-se que o efeito sobre as plaquetas sejam reduzidos, o que pode proporcionar maior segurança em seu uso.

A atividade antiplaquetária do óleo essencial foi diferente quando foi utilizado o colágeno como indutor. Como pode ser observado na **figura 33**, o óleo inibiu apenas 25,17% da agregação plaquetária ($80\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$), e nas menores concentrações testadas ($5\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ e $20\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$), as quais apresentaram a maior atividade antiplaquetária quando testadas com o indutor ADP, nesta análise apresentaram as menores porcentagem de inibição (4,82% e 3,69%, respectivamente). Este resultado também pode ser considerado vantajoso, pois direciona a atividade do óleo essencial para as vias de ativação induzidas por ADP.

Agregação plaquetária com colágeno

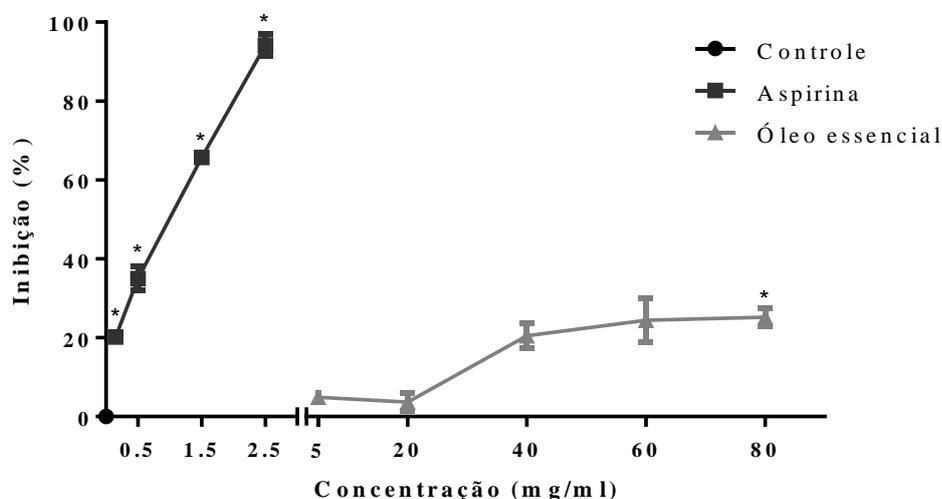


Figura 33: Agregação plaquetária *in vitro* induzida por colágeno ($5,7 \times 10^{-3}$ mg.ml⁻¹) utilizando plasma rico em plaqueta humana (PRP), frente ao óleo essencial de *Schinus molle* L. N=5; * representa valor de p<0,05.

A ação antiplaquetária de uma substância por vias de ativação induzidas por ADP é cientificamente importante, pois esse agonista apresenta um importante papel na hemostasia e trombose. O ADP promove a ativação plaquetária através de dois receptores, P2Y₁ e P2Y₁₂. Quando os receptores P2Y₁ são ativados, o ADP promove um rápido influxo de cálcio citoplasmático que desencadeia a ativação dos receptores GPIIb/IIIa e síntese de TXA₂, o que gera agregação plaquetária. Uma vez que sua atuação seja nos receptores P2Y₁₂, múltiplas vias podem ser ativadas, um exemplo é a redução intracelular de AMPc desencadeada por esse receptor, que reduz a inibição da atividade plaquetária desencadeada pela proteína quinase A (GACHET, 2005).

Em um estudo com camundongos nocautes para a proteína Munc13-4 (proteína responsável pela ancoragem e fusão dos grânulos com a membrana plaquetária para exocitose), observou-se a ausência de secreção granular de plaquetas, e não foi possível formar trombos nos modelos de trombose *in vivo* e *in vitro*, mostrando a importância desta etapa. Neste estudo, a co-estimulação com ADP exógeno resgatou parcialmente a função plaquetária, destacando o papel essencial do ADP na condução do feedback positivo para a formação de trombos, e provando que ele tem um papel essencial na hemostase primária das plaquetas (GOLEBIEWSKA; POOLE, 2015).

Para confirmar a presença de atividade antiplaquetária e a hipótese de que o mecanismo de ação do óleo essencial de *Schinus molle* L. se dá por vias induzidas por ADP, faz-se necessário testar a sua atividade com outros indutores, como por exemplo, ácido araquidônico e trombina, além de testes em modelos *in vivo*.

Moharam et al. (2010) fizeram uma análise da atividade antiplaquetária de óleos essenciais extraídos de cinco espécies de *Goniothalus*. Foi observado que o óleo da casca de *G. velutinus* foi o mais potente inibidor de ácido araquidônico e ADP, e outros óleos estudados apresentaram efeitos inibitórios significativos na ligação do receptor de PAF. Esses autores associaram a forte atividade antagonista do PAF aos seus elevados teores de substâncias sesquiterpênicas. Este estudo sugere testar a atividade antiplaquetária do óleo essencial de *Schinus molle* L. sobre a ação agregante de PAF, além de indicar que os resultados obtidos podem estar relacionados ao elevado teor de substâncias sesquiterpênicas.

Tognolini et al. (2006) também analisaram óleos essenciais extraídos de diferentes espécies medicinais, das quais *Ocotea quixos*, *Foeniculum vulgare* e *Artemisia dracunculoides* apresentaram as maiores atividades antiagregantes plaquetárias contra o ADP, o Ácido Araquidônico e o análogo do Tromboxano A₂ (U46619), apresentaram também capacidade de desestabilizar a retração do coágulo. Para estes óleos, os autores correlacionaram a atividade antiplaquetária com o conteúdo de fenilpropanóides que se apresentaram como substâncias majoritárias, e diante disso, eles aprofundaram suas análises em modelos *in vivo* (BALLABENI et al., 2007).

Esses autores encontraram atividade antitrombótica *in vitro* e *in vivo* ao testar o óleo essencial de *Ocotea quixos*. A fim de observar a contribuição para a atividade do óleo integral, esses autores analisaram isoladamente a atividade antitrombótica dos fenilpropanóides trans-cinamaldeído e cinamato de metila, substâncias encontradas como majoritárias no óleo essencial obtido. Eles concluíram que o trans-cinamaldeído pode ser responsável pelas atividades encontradas no óleo bruto, além disso, observaram que o óleo é desprovido de toxicidade sistêmica (BALLABENI et al., 2007)

A atividade antitrombótica do óleo essencial de *Foeniculum vulgare* também foi investigada em modelos *in vivo* por Tognolini et al. (2007), eles observaram resultados satisfatórios semelhantes aos encontrados no estudo de *Ocotea quixos*. Além disso, fizeram a análise da atividade antitrombótica da substância anetol, a qual foi encontrada como majoritária neste óleo essencial, e concluíram que a atividade encontrada no óleo bruto pode estar vinculada a esta substância.

Al-jaber et al. (2014) analisaram o óleo obtido a partir de flores secas da espécie *Achillea biebersteinii* Afan. (Asteraceae), e foi observada forte inibição dose-dependente da agregação plaquetária causada por ADP e colágeno, a eficiência sobre o ADP foi maior, no entanto, ambos atingiram a inibição completa em maiores dosagens. Esses autores também analisaram a ação antiplaquetária de substâncias químicas majoritárias encontradas neste óleo, as principais foram α -terpineno e p-cimeno, e ambas apresentaram ação inibitória sobre a agregação induzida pelo ADP, mas não pelo colágeno, o que indica um efeito sinérgico entre as substâncias existentes no conteúdo do óleo essencial.

Na literatura encontram-se ainda outros estudos sobre a atividade antiplaquetária de compostos existentes em óleos essenciais. Foi investigado, por exemplo, a atividade antitrombótica de curdione, um dos principais compostos sesquiterpênicos do óleo essencial de *Rhizoma curcumae*, com diferentes métodos *in vitro* e *in vivo*, e foi observada uma atividade antiplaquetária significativa de curdione preferencialmente via indução da agregação por fator ativador de plaquetas (PAF) e trombina (XIA et al., 2012).

Em outro estudo, dois compostos sesquiterpênicos foram isolados do óleo essencial de *Dalbergia odorifera*, uma espécie medicinal chinesa, e esses compostos apresentaram atividade antiplaquetária *in vitro* (TAO; WANG, 2010). Esses estudos propõem que pode haver uma ligação da atividade antiplaquetária encontrada ao utilizar óleo essencial de *Schinus molle* L. com a classe dominante de substâncias químicas encontradas na caracterização química dele, visto que 88,1% das substâncias encontradas no óleo essencial de *Schinus molle* L. são sesquiterpênicas.

Em contrapartida, Ballabeni et al. (2004) relataram que os componentes do óleo essencial de *Lavandula hybrida* estudados isoladamente não apresentaram efeito antiplaquetário comparado a atividade do óleo essencial bruto dessa espécie, portanto, esse resultado sugere que em alguns óleos essenciais a atividade antiplaquetária pode ser devido a um efeito sinérgico dos seus componentes. Diante disso, é válido fazer um estudo detalhado da atividade antiplaquetária dos compostos majoritários encontrados no óleo essencial de *Schinus molle* L. para esclarecer se a atividade encontrada deve-se a substâncias químicas específicas ou se ocorre um efeito sinérgico entre os componentes do óleo essencial.

5 CONCLUSÃO

O óleo essencial extraído das folhas da espécie *Schinus molle* L. apresentou majoritariamente substâncias sesquiterpênicas, sendo as substâncias epi- α -cadinol e γ -cadineno majoritárias.

O óleo essencial apresentou uma promissora atividade antihemostática *in vitro*, que pode se dar exclusivamente via inibição da agregação plaquetária, pois o óleo essencial não interferiu nas vias de coagulação sanguínea realizadas, porém apresentou atividade inibitória na presença do ADP.

No entanto, o óleo essencial não apresentou ação representativa sobre a indução das plaquetas pelo colágeno, o que pode direcionar a atividade antiplaquetária para mecanismos que envolvam o ADP. Contudo, são necessários estudos com outros indutores da agregação plaquetária para que a via de atuação seja proposta.

Esse estudo é capaz de sugerir que o óleo essencial de *Schinus molle* L. pode ser uma fonte promissora de substâncias ativas para terapias curativas e/ou preventivas inovadoras, em particular contra a trombose.

Portanto, estes resultados são muito úteis para seguimento dos estudos com outros indutores da agregação plaquetária e futuros estudos *in vivo*, com intuito de promover bases científicas para desenvolvimento de um medicamento fitoterápico que possa ser utilizado na prevenção ou tratamento de doenças cardiovasculares.

Este é o primeiro relato da ação antiplaquetária do óleo essencial da espécie *Schinus molle* L.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, R. P. **Identification of essential oil components by gas chromatography / mass spectrometry**. Carol Stream: Allured Publishing Corporation, ed 4; 2007.

ABDEL-HAMEED, E. S.; BAZAID, S. A. **Chemical Composition of Essential Oil from Leaves of *Schinus molle* L. Growing in Taif, KSA**. Journal of Essential Oil Bearing Plants, Published online: 09 Mar 2017. DOI:10.1080/0972060X.2017.1294999.

AFONSO, A.; MARQUES, G.; ALVES, A.G.; BARROSO, P.; GONZALEZ, A.; RODRIGUES, H.; FERREIRA, M.J. **A terapêutica antitrombótica: atual e em desenvolvimento**. Angiol Cir Vasc.; v. 12, n°3, p.170-179, 2016.

AL-JABER, H, I. et al. **Volatile Oil Composition and Antiplatelet Activity of Jordanian *Achillea biebersteinii* Collected at Different Growth Stages**. TROP, v. 17, n. 4, p. 584 – 598, 2014.

ATTI DOS SANTOS, A. C. et al. **Caracterização química de populações de *Schinus molle* L. do Rio Grande do Sul**. Revista Brasileira de Biociências, v. 5, supl. 2, p. 1014-1016, Porto Alegre, 2007.

BACKES, P.; NARDINO, M. **Árvores, arbustos e algumas lianas nativas no Rio Grande do Sul**. São Leopoldo, Editora Unisinos. 202p, 2002.

BAKKALI, F.; AVERBECK, S.; AVERBECK, D.; IDAOMAR, M. **Biological effects of essential oils– A Review**. Food and Chemical Toxicology, v. 46, p. 446-475, 2008.

BALLABENI, V. et al. **Novel antiplatelet and antithrombotic activities of essential oil from *Lavandula hybrida* Reverchon “grosso”**. Phytomedicine, v.11, ed. 7–8 , 25, p. 596-601, 2004.

BALLABENI, V. et al. **Antiplatelet and antithrombotic activities of essential oil from wild *Ocotea quixos* (Lam.) Kosterm. (Lauraceae) calices from Amazonian Ecuador**. Pharmacological Research, v. 55, p. 23–30, 2007.

BELHAMEL, K.; LUDWIG, A. A. R. **Chemical composition and antibacterial activity of the essential oil of *Schinus molle* L. grown in Algeria**. International Journal of Essential Oil Therapeutics, v. 2, p. 175-177, 2008.

BENDAOUD, H. et al. **Chemical Composition and Anticancer and Antioxidant Activities of *Schinus Molle* L. and *Schinus Terebinthifolius* Raddi Berries Essential Oils**. Journal of Food Science, V. 75, N. 6, 2010.

BIASI, L. A.; DESCHAMPS, C. **Plantas aromáticas: do cultivo à produção de óleo essencial**. 1ªed. Curitiba, Layer Studio Gráfico e Editora Ltda, 160pg, 2009.

BIZZO, H.R.; HOVELL, A.M.; REZENDE, C.M. **Óleos essenciais no Brasil: aspectos gerais, desenvolvimento e perspectivas**. Quim. Nova, vol. 32, n° 3, p. 588-594, 2009.

BORN, G. V. R. & CROSS, M. J.; **The aggregation of blood platelets.** Journal of Physiology, v. 168, p. 178-195, 1963.

BOTTON, R.M. **Farmacogenética da varfarina: proposta de um algoritmo para a predição de dose.** Dissertação de mestrado. Porto alegre, 2010. Disponível em <<https://www.lume.ufrgs.br/bitstream/handle/10183/69701/000866636.pdf?sequence=1>> acessado em 01 de junho de 2018, às 14:47h

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica. **Política nacional de plantas medicinais e fitoterápicos.** Brasília: Ministério da Saúde, 2006.

BRUNTON, L. L.; CHABNER, B. A.; KNOLLMANN, B. C. **As bases farmacológicas da terapêutica de Goodman & Gilman.** 12 ed., Porto Alegre: AMGH, 2012.

CALLAI, T. et al. **Tabagismo e uso de anticoncepcionais orais relacionados a fenômenos tromboembólicos: relato de caso e revisão de literatura.** reprod clim., v. 32, n^o2, p.138–144,2017.

CASTRO, H. C. et al. **Platelets: still a therapeutical target.** J. Bras. Patol. Med. Lab., v.42, n^o5, 2006.

CAVALCANTI, A. S. et al. **Volatiles composition and extraction kinetics from *Schinus terebinthifolius* and *Schinus molle* leaves and fruit.**v. 25, ed. 4, p. 356-362, 2015.

CAVALEIRO, C.; FIGUEIREDO, A.C.; BARROSO, J. G.; PEDRO, L.G. **Potencialidades e aplicações das plantas aromáticas e medicinais.** Curso teórico-prático, edição da Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa, Centro de biotecnologia Vegetal, Lisboa, Portugal. Ed. 3, p.55-62, 2007.

CHAVES, D. S. A.; MELO, G. O.; CORRÊA, M. F. P. A Review of Recent Patents Regarding Antithrombotic Drugs Derived From Natural Products. In: ATTA-UR-RAHMAN, F. R. S. **Studies in Natural Products Chemistry.** v. 61. Bioactive Natural Products, cap 1, 2018.

CHO, H.J.; NAM, K. S. **Inhibitory effect of ginkgolide B on platelet aggregation in a cAMP- and cGMP-dependent manner by activated MMP-9.** J Biochem Mol Biol. V.40:678–83, 2007.

CHO, H. J.; SHON, Y. H.; NAM, K. S. **Ginkgolide C inhibits platelet aggregation in cAMP- and cGMP-dependent manner by activating MMP-9.** Biol Pharm Bull. V.30: 2340–4, 2007.

CLEMETSON, K. J. **Platelets and Primary Haemostasis.** Thrombosis Research. v. 129, ed. 3, p. 220-224, 2012

CORREIA, S.J., DAVID, J.P, DAVID J.M. **Metabólitos secundários de espécies anacardiaceae.** Quim. Nova, v. 29, n^o6, p. 1287 - 1300, 2006.

DEWICK, P. M. **Medicinal natural products: a biosynthetic approach**. John Wiley & Sons Ltd, 3 ed, cap. 5, 2009.

DÍAZ, C.; QUESADA, S.; BRENES, O.; AGUILAR, G.; CICCÍO, J. G. **Composição química do óleo essencial de *Schinus molle* e sua atividade citotóxica em linhagens tumorais**. Nat. Prod. Res. , 22, pp. 1521 – 1534, 2008.

DUDAREVA, N.; PICHERSKY, E.; GERSHENZON, J. **Biochemistry of plant volatiles**. PlantPhysiol., v. 135, p. 1893-1902, 2004.

FALCÃO, F. J. A. et al. **P2Y₁₂ Platelet Receptors: Importance in Percutaneous Coronary Intervention**. Arq. Bras. Cardiol. vol. 101, nº.3, São Paulo, 2013.

FERNANDES, E. T.; FAVERO, S. **Óleo essencial de *Schinus molle* L. para o controle de *Sitophilus zeamais* Most. 1855 (Coleoptera: Curculionidae) em milho**. Rev. Bras. de Agroecologia. v. 9, nº1, p. 225-231, 2014.

GACHET, C. **The platelet P2 receptors as molecular targets for old and new antiplatelet drugs**. Pharmacology & Therapeutics, v. 108, p. 180-192, 2005.

GARCIA, G. R. M. et al. **Constituintes da resina de casca de *Schinus molle***. Rev. Bra. de Farmacognosia, v. 27, ed. 1, p. 67-69, 2017.

GLINWOOD, R.; NINKOVIK, V.; PETTERSSON, J. **Chemical interaction between undamaged plants – Effects on herbivores and natural enemies**. Phytochemistry, v. 72, p. 1683-1689, 2011.

GODOY, J.M.P. **Risk factors and thromboembolic events**. Rev. Bras. Hematol. Hemoter., v.31, nº3, p. 122, 2009.

GOLAN D. E. et al. **Bases Fisiopatológica da farmacoterapia**, 2 ed. Guanabara Koogan, p. 360-361, 2009.

GOLEBIEWSKA, E.M.; POOLE, A.W. **Platelet secretion: From haemostasis to wound healing and beyond**. BloodReviews. v. 29, ed 3, p. 153-162,2015.

GOMES, G. C. et al. **Árvores da Serra dos Tapes: Guia de Identificação com Informações Ecológicas, Econômicas e Culturais**. Brasília, DF: Embrapa, 171 p., 2013.

GOMES, V. et al. **Variation in the essential oils composition in Brazilian populations of *Schinus molle* L. (Anacardiaceae)**. Biochemical Systematics and Ecology, v. 48, p. 222-227, 2013.

GUALA, M. S. et al. **Rose pepper (*Schinus molle* L.) oil**. V. Preedy (Ed.), Essential Oils in Food Preservation, Flavor and Safety, Academic Press, Elsevier Inc., San Diego,pp. 689-695, 2016.

HOFFBRAND, A. V.; MOSS, P. A. H. **Fundamentos em hematologia de Hoffbrand**. 7. ed. Porto Alegre: Artmed, 2018.

IRULEGUI, G.I.; AISA, C.S.; QUINTANA, A.M.; MARTITEGUI, X.M.; GARCÍA-RUIZ, J.C. **Alteraciones del sistema hemostático. Estrategias diagnósticas de lapatología hemorrágica. Coagulopatías congénitas.** Medicine - Programa de Formación Médica Continuada Acreditado. v. 12, ed. 22, p. 1255-1266, 2016

International Standart Organization - ISO/TC 54- **Draft Report of the 25rd plenary meeting of ISO/TC 54 “Essential Oils” 2006.** Document ISO/TC 54 - N 2405.

JIN, R. C.; LOSCALZO, J. **Vascular nitric oxide: formation and function.** Journal of Blood Medicine, v. 1, p. 147-162, 2010.

JURK, K.; KEHREL, B.E. **Platelets: Physiology and Biochemistry.** Seminars in Thrombosis and Hemostasis. v. 31, n^o. 4, 2005.

KAMAL, A.H.; TEFFERI, A.; PRUTHI, R.K. **Como interpretar e buscar um tempo de protrombina anormal, tempo de tromboplastina parcial ativado e tempo de sangramento em adultos.** Mayo Clin. Proc. , v. 82, p. 864 - 873, 2007.

KEIHANIAN, F.; SAEIDINIA, A.; BAGHERI, R.K.; JOHNSTON, T.P.; SAHEBKAR, A. **Curcumin, hemostasis, thrombosis and coagulation.** Journal of Cellular Physiology, 2017.

KICKLER, T. S. **Platelet biology – an overview.** Journal Compilation © 2006 LMS Group - Transfusion Alternatives in Transfusion Medicine, v. 2 , p. 79–85, 2006.

LEME, L. E. G.; SGUIZZATTO, G. T. **Prophylaxis of Venous Thromboembolism in Orthopaedic Surgery.** Rev Bras Ortop. 47(6), p. 685-93, 2012.

LI, L.; ZHOU, X.; LI, N.; SOL, M.; XU, Z. **Herbal drugs against cardiovascular disease: traditional medicine and modern development.** Drug Discovery Today, v. 20, n^o. 9, 2015.

LIMA, H. R. P.; KAPLAN, M. A. C.; CRUZ, A. V. M. **Influência dos fatores abióticos na produção e variabilidade de terpenóides em plantas.** Floresta e Ambiente , V. 10, n.2, p. 71 - 77, 2003.

LOPES, L. C. et al. **Shorter or longer anticoagulation to prevent recurrent venous thromboembolism: systematic review and meta-analysis.** BMJ Open, ed. 4, 2014.

LOPEZ, J. J. et al. **Flavonoids and platelet-derived thrombotic disorders.** Curr Med Chem. 2018. DOI: 10.2174 / 0929867325666180417170218

LÓPEZ, A. et al. **Insecticidal activity of microencapsulated *Schinus molle* essential oil.** Ind. Crops Prod., 53, pp. 209-216, 2014.

LORENZI, H. **Árvores Brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas do Brasil.** Ed. 4, Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum, v. 1, 2002.

LORENZI, T. F. **Atlas de hematologia: clínica hematológica ilustrada.** Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 2006.

LOUCA, J.I.; MINA, G. S., HABIB, B.W.; SADE, S.E. **The effect of doubling the dose of clopidogrel on platelet aggregation in patients with clopidogrel resistance.** The Egyptian Heart Journal v. 66, p. 259–262, 2014.

LUCAS-BARBOSA, D.; VAN LOON, J. J. A.; DICKE, M. **The effects of herbivore-induced plant volatiles on interactions between plants and flower-visiting insects.** *Phytochemistry*, v. 72, p. 1647-1654, 2011.

LUNA, C. V. **Distribución e importanciamaderera de la familia Anacardiáceas en el gran chaco argentino,** Ra Ximhai, v. 8, n.º. 3 Universidad Autónoma Indígena de México Mochicahui, El Fuerte, Sinaloa. p. 83-95. 2012.

MACKMAN, N. **Triggers, targets and treatments for thrombosis.** Nature, Vol 451: 21 February 2008.

MARTÍNEZ-MILLÁN, M.; CEVALLOS-FERRIZ, S.R.S. **Arquitetura foliar de Anacardiaceae,** Rev. Mex. Biodiv., v.76, n.º2, 2005.

MARTINS, M. R. et.al. **Antioxidant, antimicrobial and toxicological properties of *Schinus molle* L. essential oils.** Journal of Ethnopharmacology, v. 151, p. 485–492, 2014.

MERCER, P.F.; CHAMBERS, R.C. **Coagulation and coagulation signalling in fibrosis.** Biochimica et Biophysica Acta, v. 1832, ed. 7, p.1018-1027, 2013.

MOHARAM, B. A. et al. **Antiplatelet Aggregation and Platelet Activating Factor (PAF) Receptor Antagonistic Activities of the Essential Oils of Five *Goniothalamus* Species.** Molecules 2010, 15, 5124-5138.

MOLINA-GARZA, Z. J. et al. **Anti-Trypanosoma cruzi activity of 10 medicinal plants used in northeast Mexico.** Acta Tropica v. 136, p.14–18, 2014.

MONTINARI, M. R.; MINELLI, S.; CATERINA, R. **The first 3500 years of aspirin history from its roots - A concise summary.** Vph (2018), <https://doi.org/10.1016/j.vph.2018.10.008>

MUNHD, P. S. D. et al. **Chemical composition of the *Schinus molle* L. essential oil and their biological activities.** Revista Cubana de Farmacia; 49 (1), p. 132-143, 2015.

ONO, M. et al. **Sesquiterpenoids, Triterpenoids, and Flavonoids from the Fruits of *Schinus molle*.** Food Sci. Technol. Res., 14 (5), p. 499 – 508, 2008.

Organización Mundial de la Salud (OMS), 2013, DISPONÍVEL EM <http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/95008/9789243506098_spa.pdf;jsessionid=94A091AE6316578813403C04F28BFAF1?sequence=1> acesso em: 10/10/2018.

PELL, S.K., MITCHELL, J.D., MILLER, A.J., LOBOVA, T.A. **The families and genera of vascular plants.** Ed. K. Kubitzki, v. X. Flowering plants. Eudicots. Sapindales, Curcubitales, Myrtales, Springer, Berlin, p. 7-50. 2011.

PIETERS, M.; MAAT, M.P.M. **Diet and haemostasis - A comprehensive overview .** REV. Blood Reviews. v. 29, Ed 4, p. 231-241, 2015.

PRABHUDESAIA, A.; SHETTYA, S.; GHOSHB, K.; KULKARNIA, B. **Dysfunctional fibrinolysis and cerebral venous thrombosis**. *Blood Cells, Molecules and Diseases*, v. 65, p. 51–55, 2017.

RAUCH, A.; PARIS, C. **Hemostasia primária**. EMC - Tratado de Medicina, v. 22, ed. 1, p. 1-12, 2018.

RAUT, J.S.; KARUPPAYIL, S.M. **A status review on the medicinal properties of essential oils**. *Industrial Crops and Products*, v.62,p.250–264, 2014.

ROBERTS, M. K.; CHANEY, S. **Heparin-induced Thrombocytopenia**. *The Journal for Nurse Practitioners*. V. 14, Issue 5, p. 402-408, 2018.

RYTEL, L. ; CALKA, J. **Acetylsalicylic acid-induced changes in the chemical coding of extrinsic sensory neurons supplying the prepyloric area of the porcine stomach**. *Neuroscience Letters*, v.617, p. 218–224, 2016.

SANGWAN, N.S.; FAROOQI, A.H.A.; SHABIH, F.; SANGWAN, R.S. **Regulation of essential oil production in plants**. *Plant Growth Regulation* v. 34, p. 3–21, 2001.

SARDENBERG, T.; DEIENNO, F.S.; MIRANDA, R.F.; VARANDA, D.; CORTOPASSI, A.C.; SILVARES, P.R.A. **Cirurgia da mão e do punho sem suspender varfarina ou antiplaquetários orais – Revisão sistemática**. *rev bras ortop.*, v.52, n^o4, p.390–395, 2017.

SEMPLE, J. W.; ITALIANO JR, J. E.; FREEDMAN, J. **Platelets and the immune continuum**. *Nature Reviews Immunology* volume11 , páginas264 – 274, 2011.

SHARIS, P.J; LOSCALZO, J.; Thienopyridines: Ticoplidine and Clopidogrel. In: LOSCALZO, J. & SCHAFER, A.I.; **New therapeutics agents in thrombosis and thrombolysis**. Chapter 03, p. 431-449, 2003.

SIMIONATTO, E. et al. **Chemical Composition and Biological Activities of Leaves Essential Oil From *Schinus Molle* (Anacardiaceae)**. *Journal of Essential Oil Bearing Plants* ISSN Print: 0972-060X Online: 0976-5026, www.jeobp.com, 2011.

SIMÕES, C. M. O.; SPITZER, V. Óleos voláteis. In: SIMÕES, C. M. O., et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6^o ed. Porto Alegre: Editora da UFRGS; Florianópolis: Editora da UFSC, 2007.

SIVAKUMAR, M.; SAKTHIVEL, M.; CHEN, S.; CHEN, Y.; PANDI, K. **One-step synthesis of porous copper oxide for electrochemical sensing of acetylsalicylic acid in the real sample**. *Journal of Colloid and Interface Science* , ed. 501, p.350–356, 2017.

TAIZ, L.; ZEIGER, E.; trad. SANTAREM et al. **Fisiologia Vegetal**. 3^a ed. Porto Alegre: Artmed, p. 313, 2004.

TAO, Y.; WANG, Y. **Bioactive sesquiterpenes isolated from the essential oil of *Dalbergia odorifera* T. Chen.** *Phytotherapy*, ed.81, 393–396, 2010.

TAYLOR, A. et al. **Assessment of the analgesic, anti-inflammatory and sedative effects of the dichloromethanol extract of *Schinus molle*.** *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, v. 20, p. 372-380, 2016.

TELES, J. S.; FUKUDA, E. Y.; FEDER, D. **Warfarin: pharmacological profile and drug interactions with antidepressants.** *Einstein*, 10 (1), p.110-5, 2012.

TENDERA, M.; ABOYANS, V.; BARTELINK, M.L.; et al. **ESC Guidelines on the diagnosis and treatment of peripheral artery diseases: Document covering atherosclerotic disease of extracranial carotid and vertebral, mesenteric, renal, upper and lower extremity arteries: the Task Force on the Diagnosis and Treatment of Peripheral Artery Diseases of the European Society of Cardiology (ESC).** *Eur Heart J.*, 32, p. 2851 -2906, 2011.

THORMAR, H. **Lipids and Essential Oils as Antimicrobial Agents.** Faculty of Life and Environmental Sciences, University of Iceland, Reykjavik, Iceland - ed. 1. John Wiley & Sons, 2011.

TOGNOLINI, M. et al. **Comparative screening of plant essential oils: Phenylpropanoid moiety as basic core for antiplatelet activity.** *Life Sciences*, v. 78, p. 1419 – 1432, 2006.

TOGNOLINI, M. et al. **Protective effect of *Foeniculum vulgare* essential oil and anethole in an experimental model of thrombosis.** *Pharmacological Research*, v. 56, p. 254–260, 2007.

TOMAZZONI, M. I. et al. **Popular phytotherapy: the instrumental search as a therapy fitoterapia popular: la busca instrumental para el acto de la practica de la fitoterapia.** *Texto Contexto Enferm*, Florianópolis, 15 (1), p. 115-21, 2006.

TSAI, F. T. et al. **Effect of Chinese herbal medicine on stroke patients with type 2 diabetes.** *Journal of Ethnopharmacology*, ed. 200, p. 31–44, 2017.

UPTON, R., GRAFF, A., JOLLIFFE, G., LÄNGER, R., WILLIAMSON, E. **Microscopic Characterization of Botanical Medicines.** *American Herbal Pharmacopoeia: Botanical Pharmacognosy.* CRC Press, Boca Raton, 2011.

VAN DEN DOOL, H.; KRATZ, P. D. **A generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas-liquid partition chromatography.** *J. Chromatogr.*, v. 11, p. 463-471, 1963.

VIANNA, C. A.; GONZÁLEZ, D. A.; MATIJASEVICH, A. **Utilização de ácido acetilsalicílico (AAS) na prevenção de doenças cardiovasculares: um estudo de base populacional.** *Cad. Saúde Pública*, Rio de Janeiro, v.28, n°6, p.1122-1132, 2012.

VLACHOJANNIS, G. J.; DIMITROPOULOS, G.; ALEXOPOULOS, D. **Clopidogrel resistance: current aspects and future directions.** *Hell J Cardiol.* V. 52, p. 236 e 245, 2011.

WANG, D. et al. **Vasculoprotective Effects of Pomegranate (*Punica granatum L.*)**. v. 9, Article 544, 2018.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO) 2017. **Dia mundial do coração 2017**. Disponível em: < http://www.who.int/cardiovascular_diseases/world-heart-day-2017/en/> Acesso em: 13.06.2018.

WOLFFENBÜTTEL, A. N., **Mas afinal, o que são óleos essenciais**. Informativo CRQ-V, ano XI, n.º105, novembro/dezembro/2007, p.06 e 07. Disponível em <<http://www.oleoessencial.com.br/artigos.html>> Acesso em: 20.04.18.

XIA SHI-HAI; FANG DIAN-CHUN. **Pharmacological action and mechanisms of ginkgolide B**. Chin Med J. v 120 (10): 922-928, 2007.

XIA, Q.; WANG, X.; XU, D.; CHEN, X.; CHEN, F. **Inhibition of platelet aggregation by curdione from *Curcuma wenyujin* essential Oil**. Thrombosis Research, ed. 130, p. 409–414, 2012.

XIANG, Y.; KANG, L., GAO, X.; SHANG, H.; ZHANG, J.; ZHANG, B. **Strategies for antiplatelet targets and agentes**. Rev Thrombosis Research, ed. 123, p. 35-49, 2008.

ZAHED, N.; HOSNI, K.; BRAHIM, K.; SEBEI, H. **Essential oil composition of *Schinus molle L.* fruits: an ornamental species used as condiment**. Journal of Food Biochemistry, ed. 35, p. 400–408, 2011.

ZAHED, N.; HOSNI, K.; BRAHIM, N.B.; KALLEL, M.; SEBEI, H. **Allelopathic effect of *Schinus molle* essential oils on wheat germination**. Acta Physiologia e Plantarum, v. 32, p. 1221-1227, 2010.

ZHANG, Y. X.; YANG, T.T.; XIA, L.; ZHANG, W. F.; WANG, J. F.; WU, Y. P. **Inhibitory Effect of Propolis on Platelet Aggregation In Vitro**. J Healthc Eng. V. 2017, Article ID 3050895, p. 6, 2017.

ZORDOKY, B.N.M.; ROBERTSON, I.M.; DICK, J.R.B. **Preclinical and clinical evidence for the role of resveratrol in the treatment of cardiovascular diseases**. Biochimica et Biophysica Acta, ed. 1852, p.1155–1177,2015.