



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA**

**AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES ANTIAGREGANTE PLAQUETÁRIA E
ANTICOAGULANTE EM ESTUDO DE BIOPROSPECÇÃO DE *Operculina
macrocarpa* (L.) Urb. (JALAPA) EM PLASMA HUMANO: DETERMINAÇÃO DO
MECANISMO DE AÇÃO**

TAIANA MAGALHÃES PIERDONÁ

FORTALEZA – CE

2011

TAIANA MAGALHÃES PIERDONÁ

**AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES ANTIAGREGANTE PLAQUETÁRIA E
ANTICOAGULANTE EM ESTUDO DE BIOPROSPECÇÃO DE *Operculina
macrocarpa* (L.) Urb. (JALAPA) EM PLASMA HUMANO: DETERMINAÇÃO DO
MECANISMO DE AÇÃO**

Dissertação submetida à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Farmacologia.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Luzia Kalyne Almeida
Moreira Leal

FORTALEZA – CE

2011

TAIANA MAGALHÃES PIERDONÁ

AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES ANTIAGREGANTE PLAQUETÁRIA E
ANTICOAGULANTE EM ESTUDO DE BIOPROSPECÇÃO DE *Operculina macrocarpa*
(L.) Urb. (JALAPA) EM PLASMA HUMANO: DETERMINAÇÃO DO MECANISMO DE
AÇÃO

Dissertação submetida à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Farmacologia.

Aprovada em: 15/07/2011

BANCA EXAMINADORA

Profª Drª Luzia Kalyne Almeida Moreira Leal (orientadora)

Universidade Federal do Ceará – UFC

Prof. Dr. Vietla Satyanarayana Rao

Universidade Federal do Ceará – UFC

Profª Drª Romélia Pinheiro Gonçalves

Universidade Federal do Ceará – UFC

P674a Pierdoná, Taiana Magalhães
Avaliação das atividades antiagregante plaquetária e anticoagulante em estudo de bioprospecção de *Opercutina macrocarpa* (L.) Urb. (Jalapa) em plasma humano: determinação do mecanismo de ação. / Taiana Magalhães Pierdoná. – Fortaleza, 2011.
104f.: il.

Orientadora: Prof^a. Dr^a Luiza Kalyne Almeida Moreira Leal
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Ceará.
Faculdade de Medicina. Departamento de Fisiologia e Farmacologia.

1. *Operculina macrocarpa*. 2. Atividade antiagregante plaquetária. 3. Anticoagulante. 4. Aguardente Alemã® I. Leal, Luiza Kalyne Almeida Moreira (Orient.) II. Título.

CDD: 615.1

À minha mãe

*Temes (in memoriam),
pelo exemplo de luta e amor incondicional*

Ao meu marido e minha filha

*Alexandre e Júlia,
por fazerem tudo valer a pena*

AGRADECIMENTOS

À **Deus** por ter me dado a oportunidade de conquistar tanto, apesar de todas as dificuldades, e ter me sustentado até este momento.

Ao meu marido **Alexandre Martins**, pelo seu imenso amor, incentivo, dedicação, paciência, companherismo em todos os momentos. Obrigada por me fazer tão feliz!!

À minha orientadora **Prof^a Luzia Kalyne Almeida Moreira Leal**, por toda dedicação e confiança depositada e por tantos ensinamentos durante toda a minha vida acadêmica.

À minha tia **Clara Tânia**, por ser minha mãe, amiga, companheira, por me apoiar e estar sempre ao meu lado.

Ao meu primo e irmão **Wullo Diógenes**, pelo carinho, companherismo, atenção, cuidado, enfim por ser o irmão que sempre quis ter.

Ao **Prof. Edilberto Silveira** pelos estudos fitoquímicos, que foram essenciais para a realização deste trabalho.

Às **amigas** Suzana, Aline, Nathália, Bianca, Amanda, Sandra, Kalyane e Larisse por todo o apoio e incentivo que foram muito importantes para a realização deste trabalho.

À **Nathália, Talita e Raony** pelo auxílio na realização dos testes, que tanto contribuiu para a realização deste trabalho.

À todos do Laboratório de Farmacognosia, pelo companherismo e momentos de descontração nas horas estressantes.

À **Silésia Leal** por estar sempre disposta a ajudar.

À **Vilani e Elaine Pinheiro** pelo apoio no laboratório.

À **Prof^a Romélia e Sr. Roberto** pelo auxílio nos testes de coagulação sanguínea.

Ao **Prof. Pedro, Rodrigo e Terezinha**, do Lab. de Farmacologia do Músculo Liso, pelo auxílio nos ensaios com músculo liso.

Agradeço a todas as pessoas que se disponibilizaram em doar sangue para a realização desse estudo. Muitíssimo obrigada!

E a todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho. Muito obrigada!

“Algo só é impossível até que alguém
duvide e acabe provando o contrário”

Albert Einstein

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. A. Megacariócito com extensões pró-plaquetárias. B. Morfologia plaquetária.....	23
Figura 2. Participação das plaquetas no processo de hemostasia e formação do tampão.	25
Figura 3. Alterações na morfologia plaquetária após ativação.....	26
Figura 4. Efeitos do óxido nítrico (NO) na inibição plaquetária via monofosfato cíclico de guanosina (GMPc).	29
Figura 5. Principais agonistas plaquetários de relevância fisiológica e seus respectivos receptores.	31
Figura 6. A. Artéria e formação de trombo na trombose arterial através da ruptura de placa aterosclerótica. B. Veia e formação de trombo na trombose venosa.	36
Figura 7. Principais fármacos antiplaquetários e seus mecanismos de ação.	39
Figura 8: Parte aérea de <i>Operculina macrocarpa</i> (A e B) e <i>Operculina allata</i> (C). Tubérculos de <i>Operculina macrocarpa</i> (D e E)	44
Figura 9. Fluxograma de obtenção das frações a partir da tintura de <i>Operculina macrocarpa</i> (TOM)	53
Figura 10. Cromatograma dos padrões ácido gálico (A), ácido clorogênico (B), ácido caféico (C), da tintura de <i>Operculina macrocarpa</i> (D) e fração TOM/1-F4 (E).....	55
Figura 11. Efeito do precipitado da tintura de <i>O. macrocarpa</i> (TOM/P) na agregação plaquetária induzida por ADP em plasma humano.....	67
Figura 12. Efeito do sobrenadante da tintura de <i>O. macrocarpa</i> (TOM/S) na agregação plaquetária induzida por ADP em plasma humano.....	67
Figura 13. Efeito da tintura de <i>O. macrocarpa</i> constituída por precipitado e sobrenadante (TOM/PS) na agregação plaquetária induzida por ADP em plasma humano.....	68
Figura 14. Efeitos da TOM/1 e TOM/2 de <i>O. macrocarpa</i> na agregação plaquetária induzida por ADP em plasma humano.	70
Figura 15. Efeito da TOM/1-F de <i>O. macrocarpa</i> na agregação plaquetária induzida por ADP em plasma humano.....	71
Figura 16. Efeito da TOM/1-F1 de <i>O. macrocarpa</i> na agregação plaquetária induzida por ADP em plasma humano.....	72
Figura 17. Efeito da TOM/1-F2 de <i>O. macrocarpa</i> na agregação plaquetária induzida por ADP em plasma humano.....	72
Figura 18. Efeito da TOM/1-F3 de <i>O. macrocarpa</i> na agregação plaquetária induzida por ADP em plasma humano.....	73

Figura 19. Efeito da TOM/1-F4 de <i>O. macrocarpa</i> na agregação plaquetária induzida por ADP em plasma humano.....	74
Figura 20. Efeito da TOM/PS e da fração TOM/1-F4 na agregação plaquetária induzida por trombina em plasma humano.	76
Figura 21. Efeito da TOM/PS e da fração TOM/1-F4 na agregação plaquetária induzida por ácido araquidônico em plasma humano.	76
Figura 22. Efeito da TOM/PS e da fração TOM/1-F4 na agregação plaquetária induzida por colágeno em plasma humano.	77
Figura 23. Efeito da TOM/PS e da fração TOM/1-F4 na agregação plaquetária induzida por epinefrina em plasma humano.	77
Figura 24. Efeito da TOM/PS e da fração TOM/1-F4 na agregação plaquetária induzida por TROM, ADP, AA, EPI e COL em plasma humano: estudo comparativo.	78
Figura 25. Efeito da TOM/PS na presença ou ausência de AAS na agregação plaquetária induzida por ADP em plasma humano.....	80
Figura 26. Efeito da TOM/PS na presença ou ausência de L-ARG na agregação plaquetária induzida por ADP em plasma humano.....	81
Figura 27. Efeito da TOM/PS na presença ou ausência de PTX na agregação plaquetária induzida por ADP em plasma humano.....	82
Figura 28. Efeito da TOM/PS na presença ou ausência de TIC na agregação plaquetária induzida por ADP em plasma humano.....	83
Figura 29. Efeito da TOM/PS e SNP na presença ou ausência de ODQ na agregação plaquetária induzida por ADP em plasma humano.....	84
Figura 30. Efeito da tintura de <i>C. scammonia</i> constituída por precipitado e sobrenadante (TCS/PS) em relação à TOM/PS na agregação plaquetária induzida por ADP em plasma humano: estudo comparativo.	86
Figura 31. Efeitos das tinturas de <i>O. macrocarpa</i> (TOM/PS) e <i>C. scammonia</i> (TCS/PS) e Aguardente Alemã (AAL) na agregação plaquetária induzida por ADP em plasma humano: estudo comparativo.	87
Figura 32. Avaliação da capacidade sequestrante de radicais livres da TOM/PS (50, 100, 200, 400 e 500 µg/mL) e da vitamina E determinada pelo teste de DPPH.....	88
Figura 33. Efeito da TOM/PS ou AAS sobre tempo de sangramento segundo método de secção da cauda.	89
Figura 34. Efeito da TOM/PS na coagulação determinado através do teste de tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPa) (via intrínseca).....	91
Figura 35. Efeito da TOM/1-F4 na coagulação determinado através do teste de tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPa) (via intrínseca).....	91

Figura 36. Efeito da TOM/PS na coagulação determinado através do teste de tempo de protrombina (TP) (via extrínseca).....	92
Figura 37. Efeito da TOM/1-F4 na coagulação determinado através do teste de tempo de protrombina (TP) (via extrínseca).....	92
Figura 38. Avaliação da toxicidade da TOM/PS em neutrófilos humano mensurada através da atividade da enzima lactato desidrogenase (LDH).....	94
Figura 39. Efeito da TOM/PS sobre a citotoxicidade determinada através do teste de MTT..	94

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Composição da Aguardente Alemã®	50
Tabela 2. Metodologia empregada nos estudos farmacológicos e toxicológicos da tintura de <i>Operculina macrocarpa</i> (TOM).	57

LISTA DE ABREVIACOES

12-HETE	12-hidroxi-ácido eicosatetraico
12-HPETE	12- hidroperoxi-ácido eicosatetraico
12-LOX	Enzima 12-lipooxigenase
5-HT	Serotonina
AA	cido araquidônico
AAL	Aguardente Alemã [®]
AAS	cido acetilsalicílico
AC	Adenilato ciclase
AcN/TFA	Acetonitrila/cido trifluoracético
ADP	Difosfato de adenosina
AMPc	3',5'-monofosfato de adenosina cíclico
TTPa	Tempo de tromboplastina parcial ativada
ATP	Trifosfato de adenosina
AVC	Acidente vascular cerebral
CENAUREMN	Centro Nordestino de Aplic. e Uso da Ressonância Magnética Nuclear
COL	Colágeno
DAG	Diacilglicerol
DL50	Dose letal 50%
DMSO	Dimetilsulfóxido
DPPH	Radical 1,1-difenil-2-picrilhidrazila
E.P.M	Erro padrão da média
EPI	Epinefrina
FvW	Fator de Von Willebrand
GC	Guanilato ciclase
GMPc	Monofosfato de guanosina cíclico
GPIb-IX-V	Glicoproteína Ib-IX-V
GPIIb/IIIa	Glicoproteína IIb/IIIa
Gs	Proteína G estimulatória
Gi	Proteína G inibitória
HEMOCE	Centro de Hemoterapia e Hematologia do Estado do Ceará
IP ₃	Inositol trifosfato
Kg	Kilograma
L	Litro

LDH	Enzima lactato desidrogenase
Ltda	Limitada
min	Minuto
mL	Mililitro
mm	Milímetro
MTT	Brometo 3[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolio
NO	Óxido nítrico
ODQ	1H-[1,2,4]oxadiazolol [4,3-a] quinoxalin-1-one
OMS	Organização Mundial de Saúde
P2X ₁	Receptor ionotrópico de ADP
P2Y ₁	Receptor metabotrópico de ADP
P2Y ₁₂	Receptor metabotrópico de ADP
PAF	Fator de ativação plaquetária
PAR	Receptor de Trombina
PDE	Fosfodiesterase
PDE3	Fosfodiesterase tipo 3
PGD ₂	Prostaglandina D ₂
PGE ₁	Prostaglandina E ₁
PGG ₂	Prostaglandina G ₂
PGH ₂	Prostaglandina H ₂
PGI ₂	Prostaciclina
PI3-quinase	Fosfoinosítídeo-3-quinase
PIP ₂	Fosfatidilinositol
PKA	Proteíno-quinase A
PKC	Proteíno-quinase C
PLA ₂	Fosfolipase A ₂
PLC	Fosfolipase C
PMN	Polimorfonucleares
PPP	Plasma pobre em plaquetas
PRP	Plasma rico em plaquetas
TP	Tempo de protrombina
PTX	Pentoxifilina
SNP	Nitroprussiato de sódio

SUS	Sistema Único de Saúde
TCS	Tintura de <i>Convolvulus scammonia</i>
TCS/PS	Tintura de <i>C. scammonia</i> /precipitado e sobrenadante
TFA	Ácido trifluoracético
TIC	Ticlopidina
TOM	Tintura de <i>O. macrocarpa</i>
TOM/1	Tintura de <i>O. macrocarpa</i> - Produto 1
TOM/1-F	Fração Orgânica da Tintura de <i>O. macrocarpa</i>
TOM/1-F1	Fração 1 da Fração Orgânica da Tintura de <i>O. macrocarpa</i>
TOM/1-F2	Fração 2 da Fração Orgânica da Tintura de <i>O. macrocarpa</i>
TOM/1-F3	Fração 3 da Fração Orgânica da Tintura de <i>O. macrocarpa</i>
TOM/1-F4	Fração 4 da Fração Orgânica da Tintura de <i>O. macrocarpa</i>
TOM/2	Tintura de <i>O. macrocarpa</i> - Produto 2
TOM/P	Tintura de <i>O. macrocarpa</i> /precipitado
TOM/PS	Tintura de <i>O. macrocarpa</i> /precipitado e sobrenadante
TOM/S	Tintura de <i>O. macrocarpa</i> /sobrenadante
TROM	Trombina
TXA ₂	Tromboxano A ₂
TXB ₂	Tromboxano B ₂
TXS	Enzima tromboxano sintetase
UFC	Universidade Federal do Ceará

RESUMO

AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES ANTIAGREGANTE PLAQUETÁRIA E ANTICOAGULANTE EM ESTUDO DE BIOPROSPECÇÃO DE *Operculina macrocarpa* (L.) Urb. (JALAPA) EM PLASMA HUMANO: DETERMINAÇÃO DO MECANISMO DE AÇÃO. Taiana Magalhães Pierdoná. Orientador(a): Prof.^a Dr.^a Luzia Kalyne Almeida Moreira Leal. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia. Departamento de Fisiologia e Farmacologia, UFC, 2011.

Operculina macrocarpa (L.) Urb. (“jalapa brasileira”) (Convolvulaceae) é uma espécie comum do Nordeste brasileiro, sendo popularmente utilizada pelas suas propriedades laxativa, purgativa e “depurativa”. A tintura do tubérculo de jalapa, matéria-prima majoritária, ao lado da tintura de *Convolvulus scammonia* (TCS) compõem o fitoterápico Aguardente Alemã[®] (AAL) ou Tintura de Jalapa Composta, indicada como antitrombótico na medicina popular. O objetivo do presente trabalho foi investigar o potencial antiagregante plaquetário e anticoagulante de *O. macrocarpa* em plasma humano, incluindo estudo de bioprospecção e determinação do possível mecanismo de ação. A avaliação da atividade antiagregante plaquetária das drogas testes (tintura e frações de *O. macrocarpa*, TCS e AAL) em plasma humano rico em plaquetas (PRP) foi mensurada por método turbidimétrico, sendo a agregação induzida por vários agonistas como difosfato de adenosina (ADP), epinefrina (EPI), ácido araquidônico (AA), colágeno (COL) ou trombina (TROM). Ao contrário da TCS e da AAL, tanto a tintura de *O. macrocarpa* (TOM/precipitado(P) e sobrenadante(S)) quanto uma das frações orgânicas obtidas da planta (TOM/1-F4) mostraram atividade antiagregante plaquetária, onde a TOM/1-F4 (100 µg/mL) apresentou efeito comparável ao ácido acetilsalicílico (AAS). Caracterização físico-química (CLAE e espectrofotometria) da TOM/PS (teor de resinas 1,38g%) e da TOM/1-F4 permitiu a identificação de ácidos fenólicos (clorogênico, gálico e caféico), bem como a determinação do teor de fenóis totais da TOM (0,14g%). O efeito antiagregante plaquetário da TOM/PS e da TOM/1F-4 parece resultar de várias ações intracelulares. Contudo, a TOM/PS na presença do AAS, L-ARG, ODQ, pentoxifilina (PTX) ou ticlopidina (TIC) teve seu efeito antiagregante plaquetário modificado principalmente pela TIC, sugerindo um papel importante dos receptores purinérgicos na bioatividade da TOM/PS. A TOM/PS apresentou atividade antioxidante determinada através do teste do DPPH. Além disso, a TOM/PS e a TOM/1F-4 não mostraram ação anticoagulante em plasma humano, mas a TOM/PS aumentou o tempo de sangramento em camundongos. Foi observada uma toxicidade relativa da TOM/PS em neutrófilo humano. Dessa forma, o presente estudo comprovou, de maneira inédita, o potencial antiagregante

plaquetário da tintura e da fração orgânica de jalapa, que estão pelo menos em parte relacionados à presença de fenóis, particularmente ácidos fenólicos, e resinas na planta.

Palavras-chave: *Operculina macrocarpa*. Atividade antiagregante plaquetária. Anticoagulante. Aguardente Alemã®.

ABSTRACT

EVALUATION OF ANTIPLATELET AND ANTICOAGULANT ACTIVITIES IN BIOPROSPECTION STUDY OF *Operculina macrocarpa* (L.) Urb. (JALAPA) IN HUMAN PLASMA: DETERMINATION OF MECHANISM OF ACTION. Taiana Magalhães Pierdoná. Advisor: Profa. Dra. Luzia Kalyne Almeida Moreira Leal. Master Degree. Program of Post-Graduation in Pharmacology. Physiology and Pharmacology Department, UFC, 2011.

Operculina macrocarpa (L.) Urb ("Brazilian jalapa") (Convolvulaceae) is a common species of the Brazilian Northeast. It is popularly used because of its laxative and purgative properties. The tincture of *Operculina macrocarpa* tubers (major constituent) and *Convolvulus scammonia* composes the raw materials of Aguardente Alemã®, herbal medicine, referred to as antithrombotic in folk medicine. The objective of this study was to investigate the antiplatelet and anticoagulant potential for *Operculina macrocarpa* in human plasma, including the bioprospection study and determination of possible mechanism of action. The evaluation of antiplatelet activity of drugs (tincture and fractions of *O. macrocarpa*, tincture of *C. scammonia* and AAL) in human platelet-rich plasma (PRP) was measured by the turbidimetric method where the aggregation was induced by the addition of agonists (adenosine diphosphate (ADP), epinephrine (EPI), arachidonic acid (AA) collagen (COL) or thrombin (TROM). Unlike tincture of *C. scammonia* and AAL, both *O. macrocarpa* tincture (TOM/precipitate (P) and supernatant (S)) and one of the organic fractions obtained from *O. macrocarpa* (TOM/1-F4) showed antiplatelet activity in human plasma where TOM/1-F4 (100 µg/mL) presented comparable effect to AAS. Physicochemical characterization (HPLC and spectrophotometer) of TOM/PS (content of resins 1,38g%) and TOM/1-F4 allowed the identification of phenolic acids (chlorogenic, galic and caffeic) as well as the determination of total phenols of TOM (0,14g%). The antiplatelet effect of TOM/PS and TOM/1-F4 seems to result from many intracellular actions. However, TOM/PS in presence of AAS, L-ARG, ODQ, pentoxifilin (PTX) or ticlopidine (TIC) had its antiplatelet effect modified mainly because of TIC, suggesting an important role of purinergic receptors in TOM/PS. TOM/PS presented antioxidant activity determined by DPPH test. Furthermore, TOM/PS and TOM/1-F4 did not showed anticoagulant action in human plasma but TOM/PS increased the bleeding time in mice. It was observed a relative toxicity of TOM/PS in human neutrophil. Therefore, this study demonstrated, as never before, the antiplatelet potential of

tincture and the organic fraction of "jalapa" and that at least related to the presence of phenols, particularly phenolic acids, and resins in plant.

Keywords: *Operculina macrocarpa*, Platelet Aggregation Activity, Anticoagulant, Aguardente Alemã[®].

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	22
1.1. A Plaqueta	22
1.1.1. Morfologia plaquetária	22
1.1.2. Função plaquetária e vias de sinalização celular	24
1.2. Agonistas da agregação plaquetária	30
1.3. Trombose	34
1.4. Fármacos antiplaquetários	37
1.5. Produtos de origem vegetal como fonte de fármacos antiplaquetários.....	40
1.5.1. <i>Operculina macrocarpa</i> (L.) Urb. (Convolvulaceae).....	42
2. JUSTIFICATIVA.....	46
3. OBJETIVOS.....	48
3.1. Objetivos Gerais.....	48
3.2. Objetivos Específicos.....	48
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	49
4.1. Materiais	49
4.1.1. Aspectos éticos	49
4.1.2. Material botânico	49
4.1.3. Drogas.....	49
4.1.4. Material de estudo: produtos derivados e acabado (fitoterápico) de <i>Operculina macrocarpa</i> e/ou <i>Convolvulus scammonia</i>	50
• Tintura de <i>Operculina macrocarpa</i> (TOM)	50
• Tintura de <i>Convolvulus scammonia</i> (TCS)	50
• Aguardente Alemã®	50
• Produtos e Frações de <i>Operculina macrocarpa</i>	51
4.1.5. Animais.....	51

4.1.6.	Sangue humano	51
4.2.	Métodos.....	52
4.2.1.	Estudo fitoquímico de <i>Operculina macrocarpa</i>	52
4.2.2.	Perfil cromatográfico da tintura e fração TOM/1-F4 (CLAE – UV- DAD) de <i>Operculina macrocarpa</i>	54
4.2.3.	Determinação do teor de compostos fenólicos da tintura de <i>Operculina macrocarpa</i> (TOM).....	56
4.2.4.	Avaliação Farmacológica e Toxicológica de <i>Operculina macrocarpa</i>	58
4.2.4.2	Atividade antiagregante plaquetária	58
•	Colheita do sangue	58
•	Obtenção do plasma rico em plaquetas (PRP).....	58
•	Estudo de agregação plaquetária <i>in vitro</i> em PRP.....	58
•	Determinação da atividade das drogas testes sobre a agregação plaquetária induzida por diferentes agonistas em plasma humano <i>in vitro</i>	59
•	Avaliação do efeito antiagregante plaquetário da TOM/PS na presença de outros agentes antiplaquetários em plasma humano <i>in vitro</i>	60
•	Efeito antiagregante plaquetário da TOM/PS em plasma humano: papel do óxido nítrico/ guanilato ciclase	60
4.2.4.3	Atividade antioxidante	61
•	Teste de DPPH	61
4.2.4.4	Determinação do tempo de sangramento em camundongos.....	61
4.2.4.5	Atividade anticoagulante	62
•	Avaliação do tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPa) e tempo de protrombina (TP)	62
4.2.4.6	Avaliação dos efeitos gerais - Teste hipocrático	62
4.2.4.7	Teste de citotoxicidade em neutrófilos humano	63
•	Determinação da atividade da enzima lactato desidrogenase (LDH).....	63
•	Teste do MTT	65
4.3.	Análise Estatística.....	65

5. RESULTADOS.....	66
5.1. Estudo químico-farmacológico de <i>Operculina macrocarpa</i> guiado pela atividade antiagregante plaquetária em plasma humano	66
5.2. Efeitos da TOM/PS e TOM/1-F4 na agregação de plaquetas induzida por trombina, ácido araquidônico, colágeno ou epinefrina em plasma humano	75
5.3. Avaliação do efeito antiagregante plaquetário da TOM/PS na ausência e na presença de AAS, Ticlopidina, L-arginina ou Pentoxifilina em plasma humano.....	79
5.4. Efeito antiagregante plaquetário da TOM/PS em plasma humano: papel do NO/ GC/ GMPc	79
5.5. Estudo comparativo dos efeitos das tinturas de <i>O. macrocarpa</i> (TOM/PS) e <i>C. scammonia</i> (TCS/PS) e Aguardente Alemã® (AAL) na agregação plaquetária induzida por ADP em plasma humano	85
5.6. Avaliação da atividade antioxidante da TOM/PS no teste de DPPH.....	85
5.7. Efeito da TOM/PS sobre o tempo de sangramento em camundongos.....	85
5.8. Efeitos da TOM/PS e fração TOM/1-F4 sobre o tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPa) e tempo de protrombina (TP) em plasma humano.....	90
5.9. Avaliação preliminar da toxicidade da tintura obtida de <i>Operculina macrocarpa</i> (TOM/PS)	90
5.9.1. Efeitos gerais da TOM/PS – teste hipocrático em camundongos.....	90
5.9.2. Avaliação da citotoxicidade da TOM/PS em neutrófilos humano	93
6. DISCUSSÃO.....	95
7. CONCLUSÕES	107
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	109
ANEXOS	123

1. INTRODUÇÃO

1.1. A Plaqueta

1.1.1. Morfologia plaquetária

As plaquetas são fragmentos anucleados com 2-3 μm de diâmetro e estão em uma concentração de 150.000 - 450.000 células/ μl de sangue humano. Estes elementos são indispensáveis em eventos hemostáticos e trombóticos, além de participarem diretamente em processos inflamatórios do corpo (KLINGER, 1997). São originárias de megacariócitos da medula óssea durante o processo de megacariocitopoese, quando este sofre endomitose. Uma vez que a célula poliplóide atinge a maturação, ela forma extensões pró-plaquetárias a partir das quais as plaquetas são liberadas (ITALIANO & SHIVDASANI, 2003) (**Figura 1 A**). As plaquetas possuem um tempo de vida de aproximadamente 10 dias, quando são removidas pelas células reticuloendoteliais do baço e do fígado. Estão presentes em todo organismo humano, sendo 70% na circulação e 30% no baço (LORENZI, 2006; WHITE, 2007).

Apesar de aparência morfológica simples na microscopia ótica, as plaquetas possuem uma estrutura funcional complexa, permitindo-lhes rápido reconhecimento da lesão vascular e formação de tampão hemostático (ZAGO et al., 2005). São células altamente organizadas, ricas em diferentes organelas, e na sua estrutura são distinguidas três diferentes zonas: a zona externa ou periférica, a zona sol-gel ou citosol e a zona de organelas (LORENZI, 2006). A zona externa ou periférica é a que condiciona às plaquetas a propriedade de adesão quando estimuladas e onde se encontram antígenos, glicoproteínas e vários tipos de enzimas. Mais internamente existe a membrana plaquetária, onde estão localizadas glicoproteínas que são receptores específicos para determinados fatores de coagulação. A zona sol-gel ou citosol é portadora de microtúbulos e microfilamentos, além de ser responsável pelo esqueleto da plaqueta. Essas estruturas se conectam e orientam os movimentos da célula para a eliminação de produtos secretados e para a retração do coágulo. Já a zona de organelas é composta por grânulos alfa, grânulos densos, grânulos lisossômicos, mitocôndrias, glicogênio e um sistema de membranas internas, onde existe a síntese de prostaglandinas e tromboxano A_2 (LORENZI, 2006) (**Figura 1 B**).

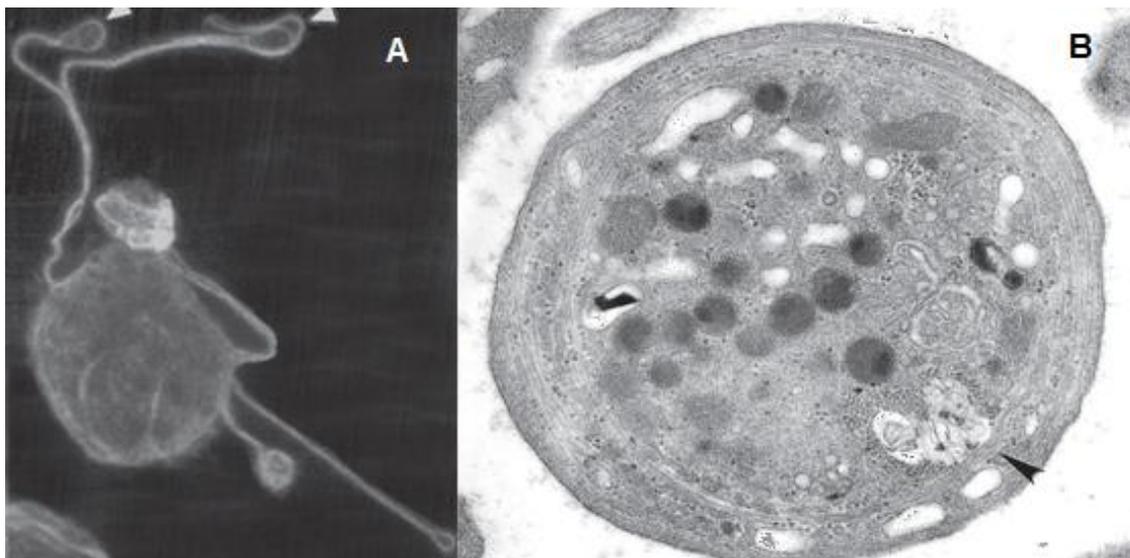


Figura 1. A. Megacariócio com extensões pró-plaquetárias. B. Morfologia plaquetária. A estrutura plaquetária é composta por diferentes organelas que estão distribuídas nas zonas externa ou periférica, na zona sol-gel ou citosol e na zona de organelas. Entre essas estruturas estão mitocôndrias, grânulos alfa, grânulos densos, glicogênio, entre outras. Fonte: ITALIANO & HARTWIG, 2007; WHITE, 2007.

Os grânulos alfa contêm diversas moléculas de adesão importantes (ex.: fator de Von Willebrand (fvW), trombospondina, vitronectina) para as interações entre as plaquetas, bem como com células sanguíneas e tecidos. Contêm ainda fatores de crescimento derivado das plaquetas, fatores mitogênicos, proteínas plasmáticas e fatores relevantes para a coagulação e fibrinólise. Os grânulos densos são capazes de estocar íons bivalentes (Ca^{2+}) e moléculas pequenas não protéicas, como o difosfato de adenosina (ADP), o trifosfato de adenosina (ATP), serotonina e pirofosfato, que são secretadas para recrutar outras plaquetas e exercerem funções centrais na amplificação da ativação e agregação plaquetárias, assim como na modulação do endotélio vascular e da função leucocitária. Já os grânulos lisossômicos contêm glicosidases, proteases e proteínas catiônicas com atividade bactericida. As enzimas hidrolíticas presentes nestes grânulos necessitam de fortes estímulos para serem secretadas, no entanto uma vez liberadas contribuem para a remodelação vascular (ZARBOCK et al., 2007; LORENZI, 2006).

As plaquetas têm um importante papel na manutenção da hemostasia do corpo. Elas carregam alguns componentes específicos através de todo o organismo e são reativas a vários estímulos, liberando o material contido em seus grânulos. A energia e os mensageiros necessários para a reatividade plaquetária são fornecidos pela

mitocôndria e pelo sistema tubular denso. Cada população de grânulos tem propriedades específicas relacionadas tanto com a estrutura quanto com o conteúdo liberado (RENDU & BROHARD-BOHN, 2001).

1.1.2. Função plaquetária e vias de sinalização celular

Acredita-se que as plaquetas evoluíram como um meio especializado de impedir vazamentos sobre alta pressão e grande fluxo sanguíneo. Dessa forma, a principal função das plaquetas pode ser creditada a manutenção da integridade funcional do sistema circulatório, evitando a perda de sangue (BRASS, 2010; HANTGAN et al., 1990).

A participação das plaquetas na hemostasia é parte fisiológica fundamental. Muitas das propriedades mais relevantes das plaquetas são ditadas pelas exigências em formar um tampão hemostático estável em condições de grande fluxo sanguíneo. Plaquetas circulantes, em condições normais, devem ser capazes de manter contato direto e repetido com a parede do vaso, sem ativação prematura, e em um momento de lesão vascular, reconhecer as características de uma parede danificada, aderir e formar um tampão estável, que permanecerá no local da lesão até que não seja mais necessário (BRASS, 2010).

Sob condições fisiológicas, as plaquetas circulam em um estado quiescente, protegidas da ativação precoce por mediadores inibitórios liberados das células endoteliais intactas, como o óxido nítrico (NO), prostaciclina (PGI₂) e adenosina, originada da ação da ectoADPase (CD39) sobre o ADP extracelular (ZARBOCK *et al.*, 2007). Em contraste com as células endoteliais, a matriz subendotelial é uma superfície altamente reativa para as plaquetas, fazendo com que um processo lesivo possa desencadear reações de ativação. A resposta plaquetária durante a ativação pode ser reconhecida através de vários eventos progressivos e superpostos que consistem em: mudança de forma das plaquetas e adesão destas no local da injúria, secreção, com liberação do conteúdo presente em seus grânulos e agregação plaquetária (**Figura 2**) (DOPHEIDE et al., 2001).

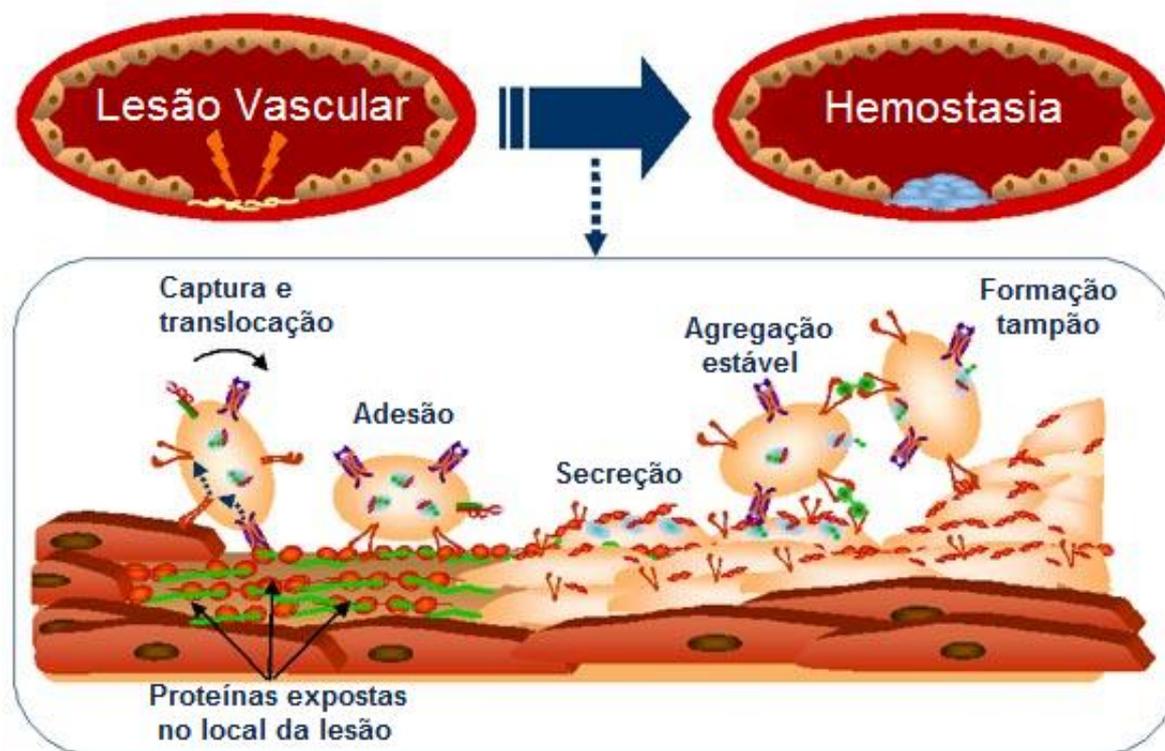


Figura 2. Participação das plaquetas no processo de hemostasia e formação do tampão. As plaquetas têm um importante papel no processo de formação do tampão hemostático. Em caso de lesão vascular, as plaquetas são rapidamente recrutadas para a área do dano e têm a função de vedar o local lesado para evitar a perda de sangue. A ruptura do revestimento endotelial de um vaso sanguíneo leva a exposição de proteínas da matriz subendotelial, onde as plaquetas são capazes de se aderir. A seguir, ocorre o processo de secreção, com liberação do conteúdo dos grânulos plaquetários e agregação, com formação do tampão hemostático. Adaptado de MONASH UNIVERSITY, 2008.

A forma discóide das plaquetas é desfavorável ao contato recíproco e ao desenvolvimento de força de coesão suficiente para induzir a sua agregação. Após a ativação, as plaquetas sofrem metamorfose, onde passam da forma discóide a uma forma esférica, irregular, com formação de grandes pseudópodes. Os microtúbulos circunferenciais e os filamentos submembranas presentes nestas se contraem, comprimindo os diversos componentes dispersos no citosol. Com isso, esses elementos são espremidos e formam uma massa no centro da plaqueta, acarretando a eliminação de diversas substâncias pelo sistema canalicular aberto, em especial, as contidas nos corpúsculos densos e nos grânulos alfa. Estas alterações facilitam a adesão e a agregação plaquetária. Na **Figura 3**, pode-se observar as alterações na morfologia plaquetária após ativação (KINLOUGH-RATHBONE et al., 1977; SIESS, 1989).

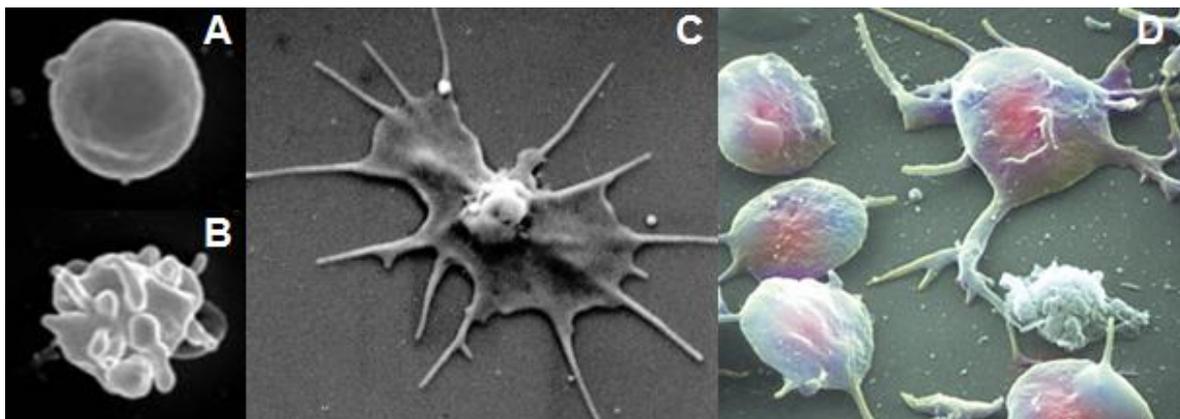


Figura 3. Alterações na morfologia plaquetária após ativação. Plaqueta em formato discóide (A), ativada (B) e aderida (C). Plaquetas ativadas e aderidas (D). Fonte: AUSTRALIAN CENTER FOR BLOOD DISEASES, 2008; STEPHENSON, 2009.

A adesão das plaquetas à matriz subendotelial é um passo importante da hemostasia primária. Após a lesão vascular, as plaquetas são capazes de formar um complexo entre o colágeno exposto e o fator de Von Willebrand (fvW). Em seguida, ocorre a ligação da glicoproteína Ib-IX-V (GPIb-IX-V) plaquetária ao fvW. Essa ligação caracteriza-se por rápida velocidade de associação, permitindo a adesão plaquetária em vasos onde o sangue circula em alta velocidade. Entretanto, a interação entre GPIb-IX-V e o fvW apresenta alta taxa de dissociação e as plaquetas aderidas à parede vascular movem-se constantemente na direção do fluxo sanguíneo. Com a ativação plaquetária, a glicoproteína IIb/IIIa (GPIIb/IIIa) torna-se capaz de se ligar ao fibrinogênio, propiciando uma adesão plaquetária irreversível ao subendotélio (JURK & KEHREL, 2005; ZAGO et al., 2005).

Uma vez ativadas, as plaquetas agem liberando mediadores químicos (adenosina difosfato, tromboxano A₂ (TXA₂), epinefrina, cálcio, entre outros) que são capazes de modular as funções plaquetárias e a interação entre as plaquetas, células sanguíneas e vasculares (JURK & KEHREL, 2005).

A formação de uma monocamada de plaquetas após a exposição do colágeno e fvW é suficiente para iniciar a formação de um tampão plaquetário, mas não é suficiente para prevenir o sangramento. Para que isso aconteça é necessário que haja uma extensão do tampão plaquetário, com recrutamento de plaquetas circulantes, com capacidade de aderir umas às outras, processo que é definido como agregação plaquetária. O recrutamento de plaquetas adicionais é possível graças ao acúmulo de

agonistas locais que são secretados das plaquetas, tais como ADP e TXA₂, e pela geração local de trombina, cuja formação é acelerada na superfície das plaquetas ativadas (BRASS et al., 2007). O ADP e TXA₂ estabelecem uma reação autocatalítica levando à construção de um grande agregado plaquetário, o tampão hemostático primário. Essa agregação primária é reversível, porém com a ativação da cascata de coagulação, é gerada a trombina. A trombina liga-se a um receptor (PARs) da superfície plaquetária e é capaz de converter o fibrinogênio em fibrina, que junto com ADP e TXA₂ causam agregação e formação de um tampão hemostático secundário definitivo (MANN et al., 2003).

A ativação e secreção plaquetárias são reguladas principalmente pelos níveis de nucleotídeos cíclicos, pelo fluxo de entrada de cálcio, pela hidrólise de fosfolipídeos e pela fosforilação de proteínas intracelulares (SIESS, 1989).

Vários receptores para ligantes biológicos foram identificados na superfície plaquetária, incluindo receptores de ligantes excitatórios (epinefrina, ADP, serotonina, fator de ativação plaquetária (PAF), TXA₂, vasopressina, trombina) e de ligantes inibitórios (adenosina, prostaglandina D₂ (PGD₂), PGI₂) (HERD & PAGE, 1995). Tais receptores agem principalmente pela associação a um sistema de proteínas reguladoras de ligação ao nucleotídeo guanina, presentes na membrana, denominadas proteínas G. As proteínas G atuam como transdutores entre os receptores e enzimas efetoras ou canais iônicos (GILMAN, 1984).

Os eventos plaquetários mediados por proteínas G ocorrem através de três vias de sinalização principais, com ativação de enzimas alvo: fosfolipase C (PLC), fosfolipase A₂ (PLA₂) e adenilato ciclase (AC). Estas enzimas controlam a estimulação da hidrólise do fosfatidilinositol, a liberação do ácido araquidônico (AA) a partir dos fosfolipídeos presentes na membrana, levando à síntese do TXA₂, bem como a síntese do 3',5'-monofosfato de adenosina cíclico (AMPc) (BRASS et al., 2007).

A ativação da fosfolipase C produz a hidrólise dos fosfolipídeos de membrana, fosfatidilinositol 4,5 bifosfato (PIP₂), liberando diacilglicerol (DAG) e inositoltrifosfato (IP₃), que atuam como segundos mensageiros. O DAG age através da ativação da proteína-quinase C (PKC) dependente de Ca²⁺, que por sua vez está envolvida na regulação da agregação e secreção dos grânulos plaquetários. Já o IP₃ intervém no

movimento de cálcio dentro do citosol plaquetário e estimulação da fosforilação das cadeias leves de miosina. Esta última interage com a actina facilitando o movimento dos grânulos e a mudança de forma das plaquetas (BRASS et al., 2007).

Quando estimulada, a PLA₂ leva a liberação do AA presente nos fosfolipídeos de membrana. A enzima ciclooxigenase (COX) metaboliza o AA com geração de diversos eicosanóides, entre eles a prostaglandina H₂ (PGH₂). Nas plaquetas, a isoforma predominante da enzima COX é a COX-1, e o principal prostanóide formado é o TXA₂ pela ação da tromboxano sintase sobre a PGH₂. O TXA₂ é um potente agente pró-agregante e vasoconstrictor, e liga-se a um receptor específico na superfície plaquetária, acoplado à proteína G_q, que ativa PLC e mobiliza Ca²⁺ intracelular. A regulação negativa é realizada pela PGI₂, principal prostanóide secretado pelas células endoteliais (SIMMONS et al., 2004; NAKAHATA, 2008).

Alguns inibidores da ativação plaquetária como PGI₂, prostaglandina E₁ (PGE₁) e prostaglandina D₂ (PGD₂), exercem seus efeitos através da estimulação da AC e formação do AMPc, que age como segundo mensageiro. Tais inibidores se ligam a receptores acoplados à proteína G estimulatória (Gs), que estimulam a ação da AC, levando ao aumento do AMPc intracelular, impedindo a agregação. Os efeitos inibitórios do AMPc são devido à fosforilação de proteínas pela proteína-quinase dependente de AMPc (PKA), que impedem a liberação do Ca²⁺ citoplasmático do sistema tubular denso e dessa forma inibem a ação de enzimas envolvidas na ativação plaquetária (SIESS et al., 1993).

O óxido nítrico (NO) também age inibindo a ativação plaquetária, porém sua ação está diretamente ligada à estimulação da guanilato ciclase, e formação do monofosfato de guanosina cíclico (GMPc). Como pode ser visto na **Figura 4**, os vários mecanismos exercidos pelo NO sobre as plaquetas dependentes da formação de GMPc são: (1) redução do nível de Ca²⁺ citoplasmático; (2) bloqueio do receptor de TXA₂; (3) modulação da expressão de P-selectina e (4) modulação da ligação de fibrinogênio via receptor GPIIb/IIIa (WALTER et al., 1993).

Em condições fisiológicas normais, as plaquetas apresentam um balanço equilibrado entre a formação e hidrólise de AMPc que alcança níveis intracelulares suficientes para impedir a ativação plaquetária. Isto implica na importância da ação das

fosfodiesterases (PDEs) neste processo, já que estas enzimas ao controlarem a hidrólise de AMPc, exercem um efeito regulatório na ativação plaquetária, mesmo na ausência de agonistas que estimulem a adenilato ciclase (FEIJGE et al., 2004).

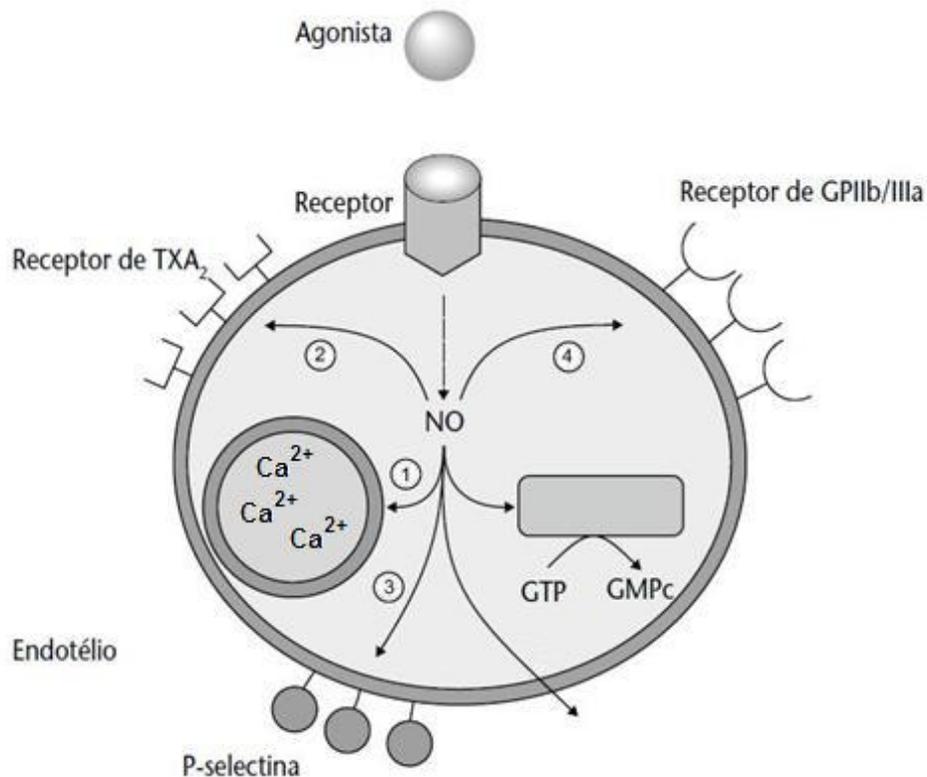


Figura 4. Efeitos do óxido nítrico (NO) na inibição plaquetária via monofosfato de guanosina cíclico (GMPc). Fonte: Adaptado de JIN et al., 2005.

1.2. Agonistas da agregação plaquetária

A ativação plaquetária pode ser modulada por diferentes tipos de agonistas que ao se ligarem em seus receptores específicos, iniciam uma série de reações bioquímicas que desencadeiam o processo de secreção granular e a formação de agregados plaquetários. Estudos *in vitro* mostram que os principais agonistas plaquetários de relevância fisiológica, parecem ser o ADP, a trombina, o colágeno, o fator de ativação plaquetária (PAF), o ácido araquidônico e a epinefrina (**Figura 5**). Estes podem ser classificados como fortes e fracos dependendo da sua capacidade em estimular a secreção de grânulos plaquetários na ausência (forte, ex.: trombina) ou somente na presença (fraco, ex.: epinefrina) de agregação plaquetária (WEISS, 1982; ZAGO et al., 2005; CHARO et al., 1977).

O ADP foi o primeiro composto descrito capaz de induzir a agregação plaquetária *in vitro* (BORN, 1962). Embora seja considerado um agonista plaquetário fraco, ele exerce uma função chave na agregação já que, uma vez secretado dos grânulos densos, amplifica a ativação plaquetária induzida por outros agonistas como: serotonina, epinefrina e quimiocinas (GACHET, 2001).

Estudos levaram à proposta de um modelo de três receptores purinérgicos que contribuem separadamente para o processo de agregação plaquetária induzida pelo ADP: os receptores P2X₁, P2Y₁ e P2Y₁₂. O receptor P2X₁ (ionotrópico) é responsável pelo rápido influxo de Ca²⁺ para o citosol e interage principalmente com o ATP, enquanto o receptor P2Y₁ (metabotrópico) é acoplado à proteína Gq, e regula a fosfolipase C (PLC) e os eventos dependentes de Ca²⁺, além de iniciar a mudança de forma da plaqueta (“shape change”). O receptor P2Y₁₂ (metabotrópico) é acoplado à proteína Gi e age através da inibição da adenilato ciclase e regulação do fosfoinositídeo-3-quinase (PI3-quinase), responsável pela amplificação da agregação iniciada por outros agonistas, pelo próprio ADP, e exposição da GPIIb-IIIa (integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$) (CATTANEO & GACHET, 2001). A secreção plaquetária e a agregação secundária normalmente observadas após estimulação de plaquetas humanas com ADP são causadas pela formação de TXA₂, que requer a coativação de ambos receptores P2Y₁ e P2Y₁₂ e a sinalização externa promovida pela interação de GPIIb-IIIa com o fibrinogênio (JIN et al., 2002).

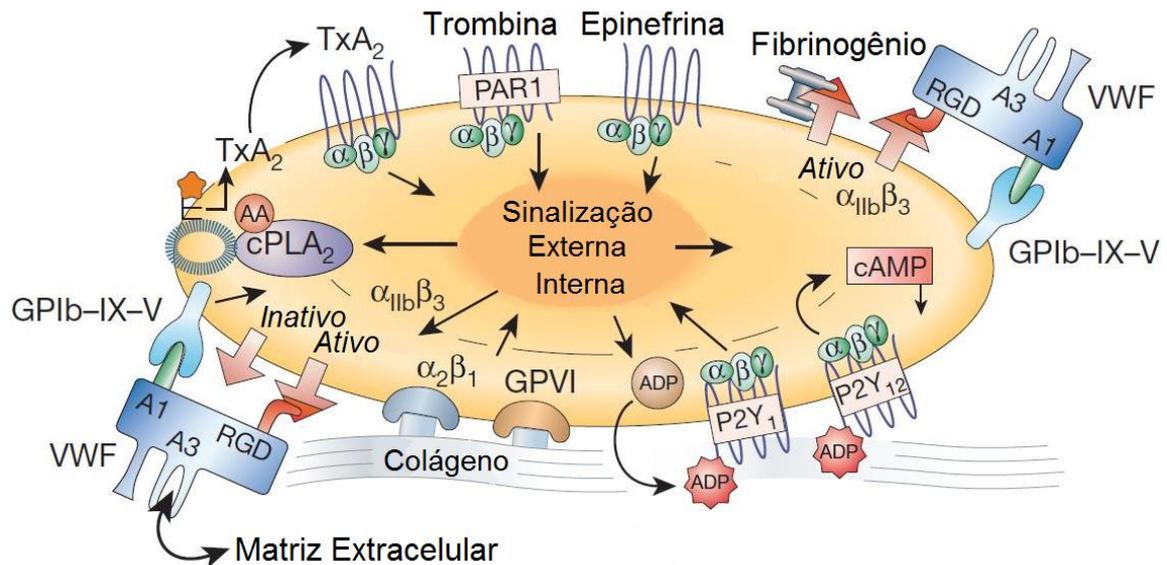


Figura 5. Principais agonistas plaquetários de relevância fisiológica e seus respectivos receptores. Agonistas plaquetários (ex.: ADP, trombina, colágeno, ácido araquidônico, epinefrina) são capazes de ativar as plaquetas ao se ligarem em receptores específicos na membrana plaquetária. Esta por sua vez é formada por diferentes tipos de receptores, como glicoproteína Ib-IX-V (GPIb-IX-V), integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$, receptores purinérgicos P2, receptores de trombina (PARs), entre outros. Muitos desses receptores desempenham um importante papel na função hemostática, que incluem a interação entre plaquetas, entre estas e o tecido vascular ou com fatores de coagulação. Fonte: Adaptado de RUGGERI, 2002.

A trombina é um dos mais potentes ativadores plaquetários, sendo capaz de estimular a secreção plaquetária em condições nas quais não há agregação. A sinalização mediada pela trombina ocorre, pelo menos em parte, através dos receptores ativados por protease ligados à proteína G (PARs). Estes receptores são capazes de converter um evento de clivagem proteolítica extracelular em um sinal transmembranar. Quatro receptores PARs distintos foram identificados até o momento (PAR-1, PAR-2, PAR-3 e PAR-4). Os receptores PAR-1, PAR-3 e PAR-4 podem ser ativados pela trombina, enquanto que o PAR-2 é ativado pela triptase derivada de mastócitos, ou mesmo pela tripsina, mas não pela trombina. As plaquetas humanas expressam os receptores PAR-1 e PAR-4. PAR-1 medeia respostas plaquetárias rápidas em baixas concentrações de trombina, enquanto PAR-4 é ativado apenas em altas concentrações (BAHOU, 2007; SAVAGE et al., 2001; HAMILTON, 2008).

Os receptores PARs, acoplados à proteína Gq, ativam a PLC levando ao aumento de Ca^{2+} e ativação da proteína-quinase C (PKC). O aumento de Ca^{2+} regula muitos eventos que levam à agregação plaquetária, inclusive a ativação da fosfolipase A₂ (PLA₂) pela via da proteína-quinase ativada por mitógeno (RUGGERI, 2002).

Além de ativar as plaquetas através da clivagem de seu receptor PAR, a trombina ainda cliva a GPV do complexo GPIb-IX-V, o que permite a sua ligação à GPIb α , processo que resulta em ativação plaquetária. A trombina (fator IIa da cascata de coagulação) também é responsável pela conversão do fibrinogênio em fibrina, via final da cascata de coagulação (KAHN et al., 1998; SAVAGE et al., 2001; WAGNER & BURGER, 2003).

Diferentes tipos de colágeno (COL) - particularmente os tipos I, III, e VI - estão entre os componentes mais trombogênicos da parede dos vasos, sendo responsáveis pelo início da adesão plaquetária. Para que este processo ocorra, várias proteínas agem como receptores para o colágeno na superfície plaquetária. Entre essas estão a GPIaIIa (integrina $\alpha_2\beta_1$), GPVI, GPIV e a proteína 65 kDa, específica para o colágeno tipo I. No entanto, estudos apontam que apenas a GPIaIIa e GPVI parecem ter um papel definido na formação de trombos (SAVAGE & RUGGERI, 2007).

A ativação plaquetária induzida por COL pode ser dividida em três etapas principais: (1) a interação das plaquetas com o complexo formado entre o colágeno e o fator de Von Willebrand (fvW), que ativa PLC e leva ao aumento do Ca²⁺ intracelular; (2) a liberação do conteúdo granular (grânulos densos e grânulos alfa) e (3) a exposição e ativação do receptor GPIIb-IIIa, levando à ativação das plaquetas adjacentes para formação do trombo plaquetário (SURIN et al., 2007).

O acetil-gliceril-éter-fosforilcolina, mais conhecido como fator de ativação plaquetária (PAF) é um lipídio biologicamente ativo que além de ser um mediador importante da resposta inflamatória e alérgica, age como um potente agente agregante plaquetário. A estimulação da PLA₂ das plaquetas por agentes como colágeno e trombina, promove a liberação de um precursor do PAF, o liso-PAF, dos fosfolipídios derivados da fosfatidilcolina de membranas plaquetárias. Este sofre uma acetilação pela acetil-transferase, dando origem ao PAF, que é capaz de promover a mudança de forma das plaquetas, agregação e liberação do conteúdo granular. Em plaquetas humanas, a liberação do conteúdo granular depende do metabolismo do AA. O PAF induz o metabolismo dos fosfolipídeos de inositol, a mobilização de Ca²⁺ e inibição da adenilato ciclase. Ele é liberado das plaquetas ativadas e as ativa, participando do complexo sistema de amplificação e sinergismo característico da resposta plaquetária (HOURANI & CUSACK, 1991).

O ácido araquidônico (AA) atua como agente agregante plaquetário através da formação de metabólitos (TXA₂ e endoperóxidos), que por sua vez, participam intensamente da ativação plaquetária. A formação de TXA₂ nas plaquetas ocorre quando o AA é liberado, em resposta a vários estímulos fisiológicos e patológicos, a partir dos fosfolípidos de membrana, pela ação da PLA₂. Tanto o AA endógeno, liberado de plaquetas ativadas por outros agonistas, quanto aquele adicionado às plaquetas, é metabolizado por duas vias. Uma delas compreende a ação da enzima 12-lipooxigenase (12-LOX) sobre o AA, com formação de 12- hidroperoxi-ácido eicosatetranóico (12-HPETE), que é rapidamente convertido em 12-hidroxi-ácido eicosatetranóico (12-HETE) e exercem suas ações como agentes quimiotáticos para polimorfonucleares (PMN). A outra via envolve a atuação da COX que transforma os fosfolípidos de membrana em endoperóxidos (prostaglandina G₂ (PGG₂), prostaglandina H₂ (PGH₂) e subsequentemente em TXA₂ pela enzima tromboxano sintetase (TXS) (SIMMONS et al., 2004; NAKAHATA, 2008).

O TXA₂ atua como um potente agonista plaquetário e vasoconstritor, que ao se ligar no seu receptor específico na superfície plaquetária é capaz de ativar a PLC e mobilizar o Ca²⁺ intracelular, exercendo seus efeitos. No entanto, o TXA₂ é um composto bastante instável, e se transforma rapidamente em tromboxano B₂ (TXB₂), seu metabólito biologicamente inativo (SIMMONS et al., 2004; NAKAHATA, 2008).

O efeito estimulatório da epinefrina (EPI) (adrenalina) sobre as plaquetas humanas foi primeiro descoberto por O'Brien (1963) que demonstrou que a indução da agregação plaquetária era precedida de uma mudança de forma, e que a EPI era a responsável por este evento. A EPI apesar de ser considerada um agonista fraco, é um importante indutor de ativação plaquetária, cuja principal função é sensibilizar as plaquetas a outros agonistas. Em concentrações fisiológicas, a EPI é capaz de aumentar tanto a agregação plaquetária dependente da alta força de cisalhamento mediada pelo fvW, como a interação plaqueta-plaqueta e plaqueta-COL. Portanto, um papel importante da EPI na regulação da formação de trombos sob condições de fluxo sanguíneo arterial é presumível (HJEMDAHL et al., 1994). Também é importante ressaltar que níveis elevados desta catecolamina pelo fumo ou estresse, podem revestir-se de importância fisiopatológica na ativação plaquetária (HJEMDAHL et al., 1991).

Assim como o colágeno e a trombina, a EPI também libera das plaquetas o AA, que por sua vez é metabolizado pela COX e TXS para produzir o TXA₂. Este leva a um aumento dos níveis de Ca²⁺ intracelular levando a exposição do receptor GPIIb/IIIa e a liberação de ADP, serotonina (5-HT), fator plaquetário 4 e vários fatores de crescimento a partir dos grânulos densos e/ou alfa das plaquetas (HERMAN, 1998).

Da mesma forma que o ADP, a EPI induz dois eventos independentes de ativação plaquetária: a hidrólise de fosfatidilinositol (via PLC, com mobilização de Ca²⁺ citoplasmático, formação de TXA₂ e resultante agregação) e redução dos níveis de AMPc (através da inibição de adenilato ciclase previamente estimulada por PGI₂ ou PGE₁). Todos os efeitos da EPI, ou seja, agregação ou potencialização da agregação induzida por outros agonistas e inibição da adenilato ciclase, são mediados através da ativação de receptores α_2 adrenérgicos presentes nas plaquetas, sendo esses do subtipo α_{2A} (MUSTONEN et al., 2000; YUN-CHOI et al., 2000). As plaquetas também possuem receptores adrenérgicos do tipo β_2 , que ao contrário dos receptores α_2 , são acoplados a estimulação da adenilato ciclase e respondem pela inibição da função plaquetária (HJEMDAHL et al., 1991).

Portanto, as plaquetas têm um importante papel na hemostasia, e sua adesão e ativação incluem diferentes vias de sinalização, bem como a participação de vários mediadores químicos. Em condições fisiológicas, o tampão hemostático formado mediante ativação plaquetária e formação de fibrina é imprescindível para a interrupção do sangramento de vasos sanguíneos lesados. Porém, quando esse processo é inadvertidamente instaurado por circunstâncias diversas, ocorre a trombose.

1.3.Trombose

A trombose refere-se a uma formação patológica de um tampão hemostático (trombo) no interior do vaso sanguíneo, na ausência de sangramento. A doença trombótica e tromboembólica é comum e tem graves consequências, tais como, infarto do miocárdio, acidente vascular cerebral, trombose venosa profunda e embolia pulmonar (ALMEIDA et al., 2010). Dados mostram que as desordens isquêmicas cardiovasculares representam a principal causa de óbito e invalidez em todo o mundo: aproximadamente 30% do número total de óbitos em 2005, segundo dados da

Organização Mundial de Saúde (OMS). No Brasil, em 2007, 29,4% do total de óbitos foram em decorrência de doenças do aparelho circulatório, correspondendo à principal causa de morte no país, segundo dados do Sistema Único de Saúde (SUS) (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2011).

O processo patológico que resulta na formação do trombo pode ser influenciado por três fatores predisponentes, conhecidos como a tríade de Virchow: lesão endotelial, fluxo sanguíneo anormal e hipercoagulabilidade. O trombo que se forma *in vivo* deve ser distinguido do coágulo que se forma no sangue estático *in vitro*. Os coágulos são amorfos e consistem em uma difusa rede de fibrina no interior da qual são sequestrados os eritrócitos e leucócitos de modo indiscriminado. No entanto, os trombos arteriais e venosos apresentam, cada um, uma estrutura distinta e sua localização caracteriza dois tipos de processos fisiopatológicos: a trombose arterial e a trombose venosa (RANG et al., 2004; MACKMAN, 2008) (**Figura 6**).

Na trombose arterial, o trombo cresce de maneira desordenada, dificultando a passagem do fluxo sanguíneo, podendo provocar a oclusão da artéria, resultando em necroses isquêmicas, infarto do miocárdio e aterosclerose. O fator desencadeador nesse tipo de trombose pode ser a ruptura de uma placa aterosclerótica, seguida de ruptura do endotélio e liberação de componentes da placa dentro do lúmen do vaso sanguíneo. O trombo arterial ou “trombo branco” é típico da trombose arterial, e diferencia-se por ser típico, firmemente aderente à parede arterial lesionada e composto por uma mistura de plaquetas, fibrina, eritrócitos e leucócitos degenerativos. Além disso, são capazes de se formar em um ambiente de alto fluxo e grande força de cisalhamento. Os trombos arteriais, em geral são oclusivos, sendo os locais de formação mais comuns, em ordem descendente, as artérias coronárias, cerebrais e femorais. São sobrepostos em geral, sobre uma placa aterosclerótica, ainda que outras formas de lesão vascular (ex.: vasculite, trauma) possam estar envolvidas (RANG et al., 2004; MACKMAN, 2008; MITCHELL, 2006).

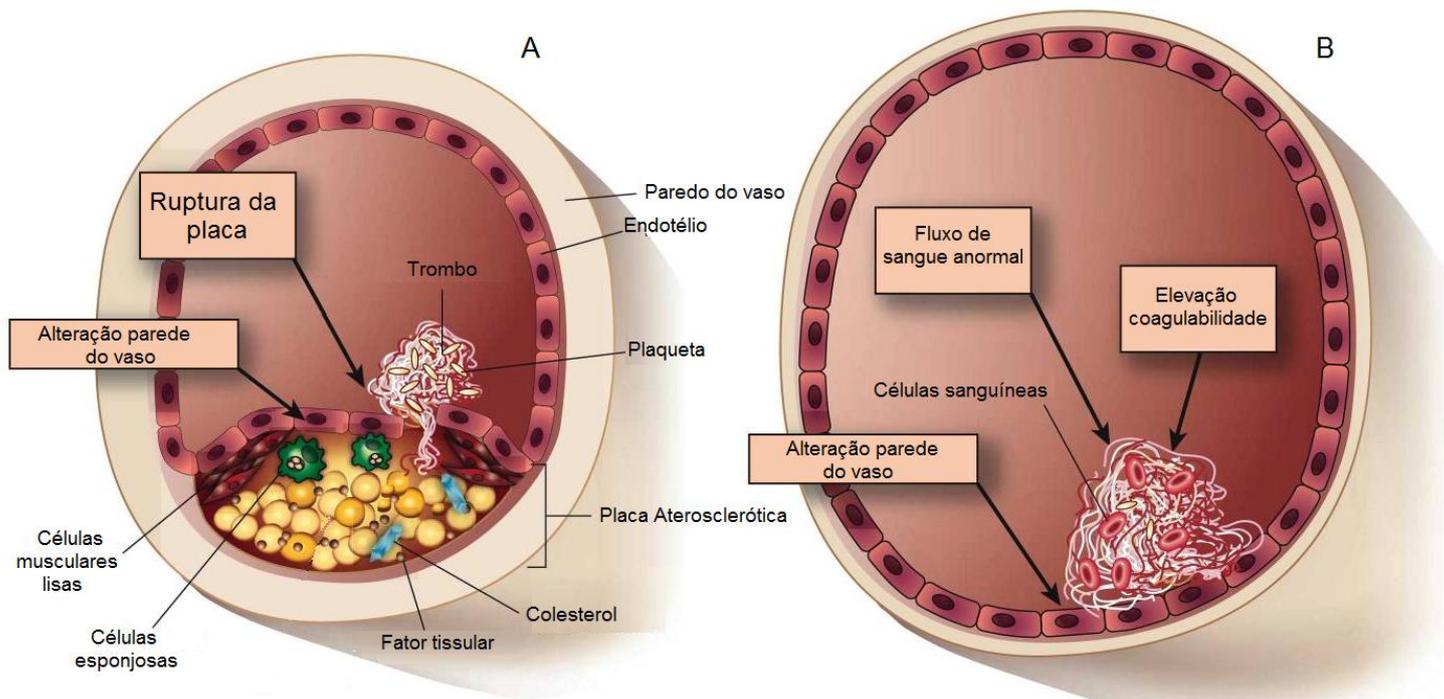


Figura 6. A. Artéria e formação de trombo na trombose arterial através da ruptura de placa aterosclerótica. B. Veia e formação de trombo na trombose venosa. Fonte: Adaptado de MACKMAN, 2008.

A trombose venosa, ou flebotrombose, é quase invariavelmente oclusiva, e afeta mais comumente as veias das extremidades inferiores, sendo menos comuns nas extremidades superiores, nos plexos periprostáticos e nas veias ovarianas ou periuterinas. Sob circunstâncias especiais os trombos venosos podem ser encontrados nos seios durais, na veia porta ou na veia hepática. O trombo venoso cria, com frequência, um molde longo no lúmen venular. Como esses trombos formam-se em um ambiente relativamente estático, eles tendem a conter mais eritrócitos misturados e são conhecidos como “trombos vermelhos ou estáticos”. A cauda trombótica formada por estes trombos possui maior rigidez, o que facilita sua fragmentação. Ao atingirem vasos de menor calibre, os fragmentos causam obstrução, promovendo embolias, principalmente a pulmonar. Além disso, na trombose venosa, o endotélio intacto com propriedades anticoagulantes, pode ser convertido para uma superfície com propriedades pró-coagulantes (MACKMAN, 2008; HAMPTON & PRESTON, 1997; MITCHELL, 2006).

No que diz respeito à farmacoterapia da trombose, esta considera a estrutura distinta da trombose arterial e venosa. Em termos gerais, o tratamento da trombose venosa inclui o uso de medicamentos onde o alvo são as proteínas da cascata de coagulação, enquanto a trombose arterial é tratada com drogas que têm como alvo as plaquetas (MACKMAN, 2008).

1.4. Fármacos antiplaquetários

As plaquetas proporcionam a formação de um tampão hemostático inicial nos locais de lesão vascular, além de participarem em processos de trombozes patológicas, que levam ao infarto do miocárdio, acidente vascular cerebral (AVC) e trombozes vasculares periféricas. Diante da participação destas nesses processos, nos últimos anos foram desenvolvidos diversos fármacos que atuam como inibidores da função plaquetária (GOODMAN & GILMAN, 2010). Tais drogas interferem em certas etapas da ativação plaquetária mediante, por exemplo, o bloqueio seletivo de enzimas e receptores, reduzindo, assim, principalmente o risco de trombose arterial (PATRONO et al., 2004).

No entanto, estudos apontam que, até o momento, nenhum fármaco utilizado na terapia antiplaquetária é suficientemente ativo, potente e seguro por via oral para a prevenção da trombose arterial. Os fármacos mais comumente utilizados incluem o ácido acetilsalicílico (AAS), clopidogrel, dipiridamol e tirofibano, que apresentam algumas limitações, como pouca eficácia, risco significativo de hemorragias, irritabilidade gástrica, resistência, além de limitação quanto ao emprego apenas da via parenteral (HAMILTON, 2008) (**Figura 7**).

Existem relatos do uso clínico da aspirina há mais de 40 anos e até os dias atuais ainda é considerado o antiplaquetário mais utilizado (MACKMAN, 2008). O AAS age ao inibir irreversivelmente a ação da enzima ciclooxigenase (COX), impedindo a síntese de TXA₂, um importante agente pró-agregante e vasoconstritor. Tais ações são mediadas pela isoforma constitutiva da COX, a COX1, que está presente nas plaquetas. Alguns estudos sugerem um aumento de eventos cardiovasculares em indivíduos que demonstraram resistência ao AAS, no entanto, este fármaco continua sendo a terapia padrão nos eventos isquêmicos agudos e na prevenção secundária. É importante

ressaltar que a terapia com AAS pode apresentar riscos de eventos hemorrágicos e úlceras estomacais (BHATT & TOPOL, 2003; HAMILTON, 2008).

Uma outra classe importante de drogas antiagregante plaquetárias têm como alvo os receptores de ADP (P2Y₁₂). Neste grupo estão incluídos a ticlopidina e o clopidogrel, derivados das tienopiridinas. A ticlopidina é um pró-fármaco com alta biodisponibilidade oral que inibe irreversivelmente o receptor purinérgico P2Y₁₂. Assim como o AAS, possui meia-vida curta com longa duração de ação. No entanto, os efeitos adversos associados, como o desconforto gastrointestinal e, mais gravemente, o surgimento de neutropenia e trombocitopenia, limitaram sua utilização clínica. O clopidogrel, é a droga mais utilizada desta classe, sendo amplamente empregado como agente antitrombótico, em síndromes coronarianas agudas e nas intervenções coronarianas percutâneas. O clopidogrel é um pró-fármaco com lento início de ação, e exibe eficácia semelhante a do AAS na prevenção secundária ao infarto. Sua utilização em combinação com o AAS tem apresentado eficácia superior, o que se justifica pela ação desses fármacos em mecanismos antiplaquetários distintos (GOODMAN & GILMAN, 2010; HAMILTON, 2008; MACKMAN, 2008).

Os inibidores da GPIIb-IIIa, receptor do fibrinogênio e do fvW, agem na via final comum da agregação plaquetária. A ação desses fármacos bloqueia a agregação plaquetária induzida por qualquer agonista e, por isso, essa classe é constituída pelos antiplaquetários mais potentes disponíveis atualmente, como o Tirofibano, o Abciximab e a Eptifibatida. Apesar disso, eles apresentam algumas limitações, principalmente em relação à via de administração parenteral, devido à baixa biodisponibilidade oral, e pelo fato de induzirem taxas de sangramento elevadas, clinicamente relevantes e trombocitopenia (GOODMAN & GILMAN, 2010; HAMILTON, 2008).

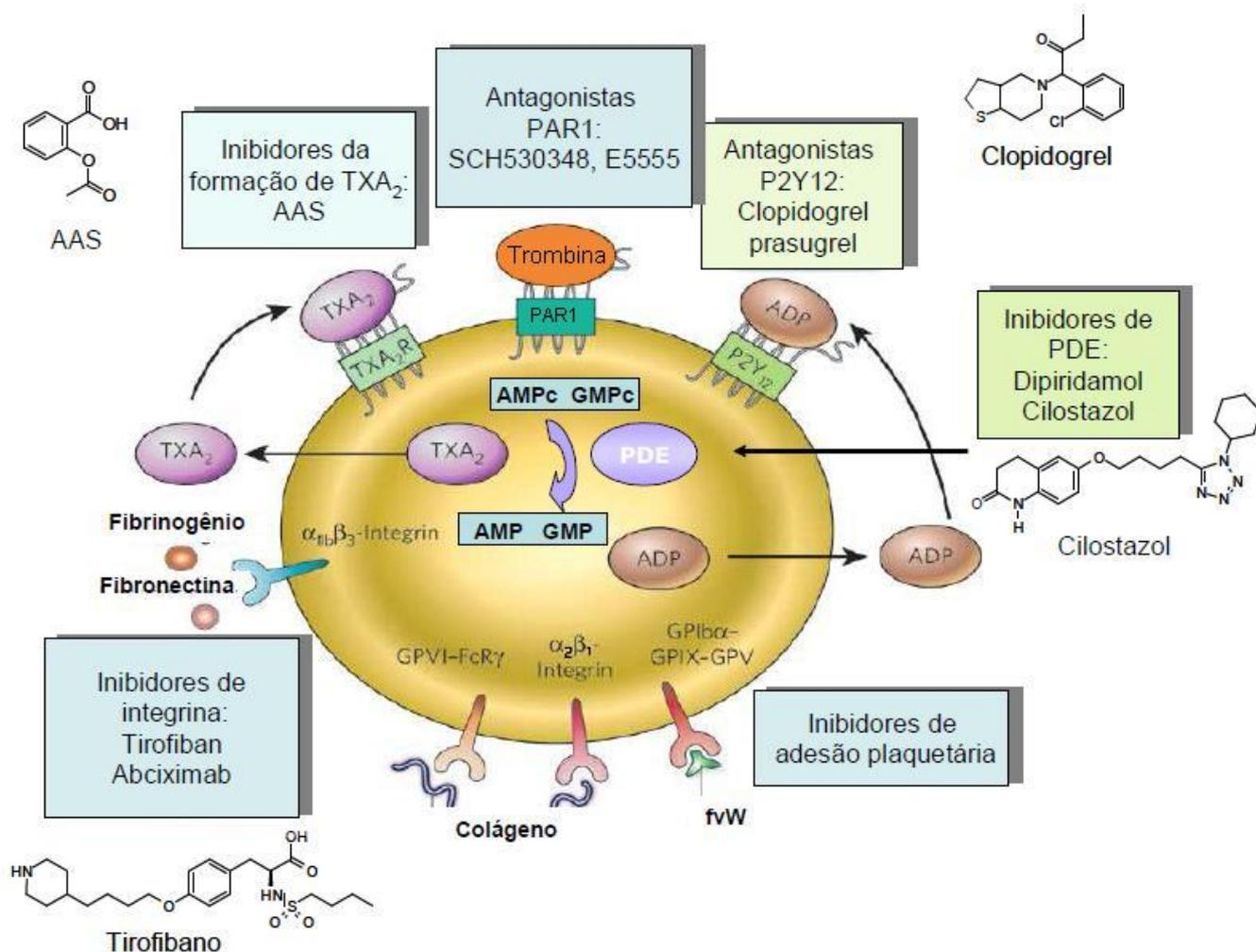


Figura 7. Principais fármacos antiplaquetários e seus mecanismos de ação. Fonte: Adaptado de MACKMAN, 2008.

Um dos mecanismos mais potentes de inibição da agregação plaquetária consiste na elevação dos níveis intracelulares de nucleotídeos cíclicos (AMPc e GMPc). A síntese de tais nucleotídeos é regulada diretamente pela estimulação da adenilato ciclase (AC) e guanilato ciclase (GC) e sua degradação está ligada a ação de fosfodiesterases. Dessa forma, inibidores de fosfodiesterases, como dipiridamol e o cilostazol, parecem ter um papel na agregação plaquetária (SCHWARZ et al., 2001).

Embora o dipiridamol tenha poucos benefícios como agente antitrombótico, atualmente é recomendado seu uso em combinação com varfarina para profilaxia pós-operatória primária de tromboembolismo em pacientes com próteses valvares cardíacas. Mais recentemente, o inibidor seletivo da fosfodiesterase tipo 3 (PDE3), o cilostazol,

passou a ter utilidade clínica no tratamento da claudicação intermitente, doença aterosclerótica dos vasos periféricos (GOODMAN & GILMAN, 2010; SCHWARZ et al, 2001).

Considerando a importância da trombina como componente da cascata de coagulação e potente estimulador da ativação plaquetária, estudos recentes mostram o grande interesse no desenvolvimento clínico de inibidores dos receptores ativado por protease (PARs) como agentes antiagregantes plaquetários. Dois antagonistas do PAR₁, E5555 e SCH 530348, estão atualmente em ensaios clínicos de fase II (MEADOWS & BHATT, 2007; MACKMAN, 2008).

Diante do exposto, a farmacoterapia atual relacionada ao emprego de fármacos antiplaquetários na prevenção ou tratamento de doenças vasculares, dispõe de medicamentos que possuem desvantagens importantes relacionadas ao seu grau de segurança e eficácia para os pacientes. Assim, o desenvolvimento de pesquisas visando a descoberta de novos medicamentos antiplaquetários que apresentem vantagens em relação aos existentes no mercado farmacêutico é oportuno e nesse contexto os produtos de origem vegetal surgem como uma fonte em potencial de novos fármacos.

1.5. Produtos de origem vegetal como fonte de fármacos antiplaquetários

O emprego de plantas medicinais como instrumento de cura passou por diferentes paradigmas ao longo da história da medicina. Utilizadas inicialmente de forma empírica, fruto do conhecimento repassado por gerações, as plantas medicinais tornaram-se alvo de interesse para as pesquisas científicas, aliando, assim, diferentes percepções sobre esse instrumento terapêutico (LEITE, 2009). As plantas são uma fonte importante de produtos biologicamente ativos, muitos dos quais foram utilizados como modelos para a síntese de um grande número de fármacos (GUERRA & NODARI, 2004).

O Brasil se destaca por ser o país com a maior diversidade genética vegetal do mundo, apresentando entre 15 a 20% da biodiversidade do planeta (CARDIN, 2006). Esse imenso patrimônio genético é de alto valor econômico e estratégico em várias atividades, inclusive no desenvolvimento de novos medicamentos, onde reside sua

maior potencialidade. Atualmente, cerca de 40% dos medicamentos disponíveis no mercado farmacêutico são derivados de produtos naturais, sendo 25% provenientes de plantas, 13% de microrganismos e 3% de animais (CALIXTO, 2003). No entanto, dados mostram que apenas 8% das espécies vegetais da flora brasileira foi estudada em busca de compostos bioativos e 1100 espécies foram avaliadas em suas propriedades medicinais (GUERRA & NODARI, 2004).

Estudos apontam que investigações baseadas em dados etnofarmacológicos são mais eficientes na identificação de plantas com atividades biológicas do que triagens de espécies selecionadas aleatoriamente (FARNSWORTH & KASS, 1981). Dessa forma, o grande número de informações sobre o uso popular de centenas de plantas em diversos lugares do mundo implica na necessidade do desenvolvimento de métodos que facilitem a tarefa de avaliar cientificamente o valor terapêutico destas espécies (MICHELIN, 2008).

Diversos autores têm demonstrado que espécies de origem vegetal são fontes em potencial para o desenvolvimento de fármacos com atividade antiagregante plaquetária e antitrombótica. Dentre desse contexto, trabalhos realizados por nosso grupo de pesquisa, demonstraram que o extrato hidroalcoólico do cumaru, *Torresea cearensis*, (LEAL, 1995) bem como a pipartina, alcalóide isolado de *Piper tuberculatum* (FONTENELE et al., 2009) possuem atividade inibitória sobre a agregação de plaquetas humanas.

O uso de plantas medicinais já é parte integrante da cultura nordestina nas suas mais diversas regiões e inúmeras são as referências sobre o seu emprego no tratamento de várias patologias (MATOS, 2007; 1997; CARRICONDE et al., 1995). Dentro desse contexto, pode-se citar como exemplo a Aguardente Alemã[®], um fitoterápico produzido por várias indústrias do Nordeste, que possui como matéria-prima ativa majoritária a Jalapa (*Operculina macrocarpa*). Estudo realizado por Carvalho e cols. (2003) avaliou o perfil de uso da Aguardente Alemã[®] em usuários na cidade de Fortaleza. Para isso, foi realizado estudo de vigilância pós-comercialização em farmácias, da Aguardente Alemã[®], que tem como matéria-prima ativa majoritária a *O. macrocarpa*. Dados mostraram que apenas 1,6% dos usuários utilizavam o produto como laxante. Por outro lado, 78,4% faziam uso crônico do produto para tratamento de problemas circulatórios, como acidente vascular cerebral, paralisia facial, dormência no corpo, coágulos e

trombose, além do dito popular para “afinar o sangue”. Contudo, não existem estudos de *Operculina macrocarpa* relacionados a segurança e eficácia da planta nas doenças do sistema sanguíneo/circulatório.

1.5.1. *Operculina macrocarpa* (L.) Urb. (Convolvulaceae)

Operculina macrocarpa é uma Convolvulaceae, termo que deriva do latim *convolvere* e significa “entrelaçar-se”. Refere-se, em termos gerais, à forma do crescimento dessas plantas, já que um grande número das espécies dessa família são trepadeiras e crescem “enroscadas” em um suporte (PEREDA-MIRANDA & BAH, 2003). A família é constituída por, aproximadamente, 55 gêneros e cerca de 1.930 espécies (AUSTIN, 1997) e possui distribuição geográfica cosmopolita (HEYWOOD, 1993).

A espécie *Operculina macrocarpa* (L.) Urb. é popularmente conhecida como “jalapa brasileira” ou “batata-de-purga”, em alusão à propriedade purgativa de suas raízes. Esta planta vem sendo usada desde a antiguidade na medicina popular nordestina, de acordo com o naturalista Feijó, em seu primeiro levantamento etnofarmacológico feito no Ceará, por volta de 1800 (MATOS, 2007). No Brasil, é encontrada em vários estados recebendo, assim, diversas sinonímias populares, dentre as mais citadas na literatura estão “batata-de-purga”, “xalapa”, “jalapa-de-São Paulo”, “purga-do-Amaro Leite”, “jalapa-do-Brasil” (CRUZ, 1980; MICHELIN & SALGADO, 2004; LORENZI & MATOS, 2008).

Operculina macrocarpa pode ser encontrada em regiões compreendidas entre as Antilhas e o Brasil, além de regiões temperadas dos Andes mexicanos entre 1500 e 2000 metros de altitude em áreas lamacentas e de solo profundo. O principal centro de comércio deste vegetal ocorria na cidade mexicana de Jalapa, de onde originou sua sinonímia oficial. A raiz da jalapa mexicana (*Ipomoea purga* ou *Exogonium jalapa*), à semelhança da jalapa brasileira é usada como purgante drástico em forma de pó ou tintura. Na Europa é encontrada em algumas regiões, porém as condições climáticas não são muito favoráveis à planta (PLANCHON & BRETIN, 1937).

A planta é uma trepadeira de aspecto ornamental, especialmente pelos seus frutos arredondados. Cada fruto contém uma a quatro sementes duras e pretas. Esta espécie é bianual (sua parte aérea morre a cada dois anos) tem folhas palmatiformes, flores com corola branca, infundibuliformes, axilares e solitárias, além de caule quadrangular, avermelhado e glabro (MATOS, 1994; BRAGA, 1976; FEIJÓ, 1799; LORENZI & MATOS, 2008).

O termo vulgar “jalapa” é empregado também para várias outras plantas convolvuláceas da América tropical com propriedades idênticas. Uma destas é a espécie silvestre *Operculina alata* Urban, muito comum no Nordeste, cujas raízes tuberosas, grandes, amiláceas e resiníferas são motivo de grande comércio para fins medicinais. Ambas são trepadeiras, porém a *O. alata* é anual, possui flores amarelas, e é encontrada no norte e nordeste do Brasil, sendo empregada indistintamente como *O. macrocarpa* em preparações medicinais (MARTINS et al., 2000; BRAGA, 1976; LORENZI & MATOS, 2008). Na **Figura 8** pode-se observar imagens da parte aérea de ambas as espécies, bem como dos tubérculos de *O. macrocarpa*.

Na medicina tradicional a parte da planta utilizada é a raiz tuberosa, onde está presente a resina, seu princípio ativo laxante (XAVIER et al., 1994; MATOS, 1994). Além da resina, a planta fornece fécula ou polvilho de cor pardo-clara conhecida pela população como goma-de-batata, que possui várias indicações na medicina tradicional como impetigo, reumatismo, furunculose, bronquite e outros (MARTINS et al., 2000; MATOS, 1982).

A droga vegetal tem característica inodora e é de sabor acre. Os tubérculos de jalapa são fusiformes ou napiformes, externamente castanho-acinzentados a castanho-negros e rugosos. O súber mostra estrutura típica, podendo, porém, possuir células espessadas tangencialmente e suberinizadas. O feloderma é sempre bem desenvolvido. Os tecidos parenquimatosos, na casca e nas faixas, formados pelos câmbios terciário e secundário, consistem de células de paredes delgadas. Na casca e na zona lenhosa existem numerosas células com resina e frequentemente células com drusas de oxalato de cálcio. As células resiníferas aparecem grandes e redondas na secção transversal e um pouco alongadas no corte longitudinal. Células pétras podem existir no feloderma e também nos parênquimas próximos do lenho (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 1959).



Figura 8: Parte aérea de *Operculina macrocarpa* (A e B) e *Operculina allata* (C). Tubérculos de *Operculina macrocarpa* (D e E). Fonte: LIMA, 2006; LORENZI E MATOS, 2008

Segundo Michelin (2008), a família Convolvulaceae possui uma grande diversidade de metabólitos, porém as glicorresinas e as substâncias fenólicas são os metabólitos característicos desta família. Possui também metabólitos secundários de baixo peso molecular contendo grupos nitrogenados, tais como: ergolínicos, pirrolidinas, tropanos lipofílicos e hidrofílicos, alcalóides indolizidínicos e pirrolizidínicos, glicosídeos cianogênicos, diferentes tipos de amidas e flavonóides. Schimming e cols. (2005) mostraram a ocorrência e distribuição de um alcalóide tropânico, Calisteginina, também nesta família, tendo sido identificado em cerca de 65 espécies, incluindo 22 gêneros. Segundo os autores, esse alcalóide pode ser útil como um marcador quimiotaxonômico para a família Convolvulaceae.

Estudos de prospecção fitoquímica dos tubérculos de *O. macrocarpa* determinaram a presença de triterpenóides e esteróides, cumarinas e açúcares redutores na planta. Ainda, análise por cromatografia em camada delgada da glicoresina da raiz da planta mostrou a presença essencialmente de rhamnose e glicose (LIMA, 2006). Segundo Costa (1982), a composição química da “jalapa do Brasil” (*O. macrocarpa*) é semelhante à da jalapa verdadeira ou jalapa do México (*Ipomoea purga*, sin. *Exogonium purga*), apresentando quantidades elevadas de resina. A planta apresenta ainda amido, saponina e ácido exogônico.

Xavier, Soares e D'Angelo (1994) isolaram das folhas de *O. macrocarpa* dois C-glicosilflavonóides. Outros autores também realizaram uma análise fitoquímica preliminar da *O. macrocarpa*, onde foi possível evidenciar a presença de saponinas e através de análise de espectros de RMN de ^{13}C foram isoladas três substâncias a partir da fração acetato de etila, os ácidos caféico e protocatecúico e um dímero do ácido caféico (MICHELIN, 2004).

Estudos anteriores (MICHELIN & SALGADO, 2004; LIMA, 2006) avaliaram o efeito de extratos obtidos dos tubérculos de *Operculina macrocarpa* sobre o trânsito intestinal de camundongos, através do modelo de carvão ativado. Resultados demonstraram o potencial laxante de *O. macrocarpa* e que este efeito pode ser associado à uma ação propulsora da motilidade gastrintestinal. Estudos mais recentes (MICHELIN, 2008) também elucidaram a atividade laxante de extratos da planta através do modelo de trânsito intestinal em gaiola metabólica. Michelin (2008) também mostrou que extratos de *O. macroparpa* possuem discreta atividade antioxidante quando avaliados pelo teste de DPPH. *Operculina macrocarapa* também apresentou atividade larvívica quando testada contra o mosquito *Aedes aegypti* (LUNA, 2005).

Segundo Fonseca (2006) em estudo toxicológico agudo da Aguardente Alemã[®], ratos administrados com uma dose de até 625 mg/kg não apresentaram alterações bioquímicas, hematológicas e comportamentais, quando administrada por via oral. Contudo, na dose de 1250 mg/kg todos os animais apresentaram fezes diarréicas a partir de uma hora do tratamento e registraram-se duas mortes. Assim, a DL50 do produto deve encontrar-se acima de 1,25 g/kg, quando administrada por via oral em ratos.

2. JUSTIFICATIVA

Diversos laboratórios instalados na região Nordeste produzem e comercializam a Aguardente Alemã[®] ou Tintura de Jalapa Composta, cuja fórmula farmacêutica inclui as tinturas de jalapa (*Operculina macrocarpa*) e de escamônia (*Convolvulus scammonia*). A Aguardente Alemã é indicada como laxante, mas seu principal uso na medicina popular é no tratamento de doenças do sistema sanguíneo/circulatório (CARVALHO et al., 2003). Contudo, não há ainda estudos científicos conclusivos que comprovem a segurança e a eficácia da Aguardente Alemã[®] quanto ao seu uso popular, ou seja, na prevenção de trombose, acidente vascular cerebral, paralisia facial, problemas circulatórios, dormência no corpo e coágulos, além do dito popular para “afinar o sangue” (MATOS, 2007; CARVALHO et al., 2003).

Operculina macrocarpa (jalapa-do-Brasil ou batata-de-purga) constitui a matéria-prima ativa majoritária da Aguardente Alemã, e apesar de ser uma espécie oficial, presente na Farmacopéia Brasileira 1^a e 2^a edição, possui poucos estudos químico-farmacológicos. A planta é rica em resinas e apresenta ainda amido, saponina e ácido exogônico (COSTA, 1982). Além disso, foram caracterizados no extrato etanólico de *O. macrocarpa* três substâncias pertencentes à classe dos compostos fenólicos, o ácido clorogênico, ácido caféico e dímero do ácido caféico (MICHELIN, 2008). Anteriormente Michelin (2004) ao realizar um estudo fitoquímico de *O. macrocarpa*, determinou através de análise de espectros de RMN de ¹³C, a presença de três substâncias na fração acetato de etila da planta, os ácidos caféico e protocatecuico e um dímero do ácido caféico. Estudo farmacológico pré-clínico (MICHELIN & SALGADO, 2004) mostrou que seu efeito laxante pode estar associado ao seu efeito propulsor da motilidade gastrointestinal, enquanto a avaliação toxicológica aguda em ratos da Aguardente Alemã[®] (FONSECA et al., 2006), mostrou que a DL₅₀ do produto encontra-se acima de 1,25 g/kg quando administrada por via oral em ratos.

Diante do exposto e considerando que o principal uso da Aguardente Alemã[®] pela população está relacionado a doenças do sistema sanguíneo/circulatório, é de fundamental importância a realização de estudos que avaliem o potencial farmacológico da jalapa. Nesse sentido, esse trabalho pretende realizar um estudo químico-farmacológico de *O. macrocarpa* através da avaliação do efeito da tintura e frações obtidas a partir dela sobre a agregação plaquetária e seus possíveis mecanismos de ação.

Além disso, estudos dessa natureza permitirão identificar possíveis marcadores a serem empregados no controle de qualidade de fitoterápicos que empreguem como matéria-prima ativa a jalapa.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivos Gerais

Avaliar o potencial antiagregante plaquetário e anticoagulante de *O. macrocarpa* através de estudo interdisciplinar (química-farmacologia), com determinação do possível mecanismo de ação.

3.2. Objetivos Específicos

- ✓ Investigar a atividade antiagregante plaquetária da tintura e frações de *O. macrocarpa* na agregação induzida por ADP em plasma humano;
- ✓ Investigar o efeito antiagregante plaquetário de produtos derivados de *Operculina macrocarpa* na agregação de plaquetas induzida por diferentes agonistas em plasma humano;
- ✓ Determinar o possível mecanismo de ação antiagregante plaquetário da tintura de *Operculina macrocarpa* (TOM);
- ✓ Investigar o efeito da tintura e fração de *O. macrocarpa* sobre o tempo de sangramento, tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPa) e tempo de protrombina (TP);
- ✓ Realizar avaliação preliminar do potencial antioxidante da TOM através do teste de DPPH;
- ✓ Avaliar os efeitos tóxicos da TOM em camundongos, através de teste hipocrático e em neutrófilos humano, através dos testes de MTT e lactato desidrogenase.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Materiais

4.1.1. Aspectos éticos

Esse projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Humana (COMEPE) (Parecer nº 169/10) e pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal (Parecer nº 63/10) da Universidade Federal do Ceará (Anexos 1 e 2).

4.1.2. Material botânico

A planta foi coletada na cidade de Parnaíba (Piauí, Brasil) situada nas coordenadas 2°54'49"S e 41°47'15"W. O material botânico foi identificado pelo Herbário Prisco Bezerra (UFC), com o número de exsicata 45489.

4.1.3. Drogas

Adenosina difosfato (ADP), dimetilsulfóxido (DMSO), tween 80, ácido acetilsalicílico (AAS), 1H-[1,2,4]oxadiazolol-[4,3-a]-quinoxalin-1-one (ODQ), L-arginina, brometo 3[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio (MTT), Triton X-100, ácido caféico, ácido clorogênico e ácido gálico foram provenientes da Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA). Trombina e ácido araquidônico foram adquiridos da Chrono-log (USA). Pentoxifilina (Trental[®]) e ticlopidina (Ticlid[®]) foram obtidas da Sanofi-aventis (Brasil). Nitroprussiato de sódio (Nitrop[®]) foi proveniente da Hypofarma (Brasil). Heparina (Liquemine[®]) foi obtida da Roche (Brasil). Colágeno e epinefrina foram provenientes do Helena Laboratories (USA). Ácido trifluoracético foi obtido da VETEC (Brasil), enquanto acetonitrila foi originária da TEDIA (Brasil).

4.1.4. Material de estudo: produtos derivados e acabado (fitoterápico) de *Operculina macrocarpa* e/ou *Convolvulus scammonia*

- **Tintura de *Operculina macrocarpa* (TOM)**

A tintura de *Operculina macrocarpa* foi fornecida pelo Laboratório Ravick Produtos Químicos e Cosméticos Ltda e padronizada pelo teor de resinas. A amostra utilizada nos ensaios apresentou um teor de $1,38 \pm 0,47\%$ (m/v).

- **Tintura de *Convolvulus scammonia* (TCS)**

A tintura de *Convolvulus scammonia* foi fornecida pelo Laboratório Ravick e dados de padronização não foram disponibilizados.

- **Aguardente Alemã[®]**

A Aguardente Alemã[®] foi cedida pelo Laboratório Ravick. Possui em sua composição as matérias-primas jalapa e escamônia em quantidades específicas, que são determinadas por cada mL de solução (**Tabela 1**).

Tabela 1. Composição da Aguardente Alemã[®]

Composição	Quantidade
<i>Operculina macrocarpa</i> (Tubérculos em pó)	0,10 g
<i>Convolvulus scammonia</i> (Tubérculos em pó)	0,05 g
Álcool	0,66 mL
Água destilada (Veículo) q.s.p.	1,00 mL

- **Produtos e Frações de *Operculina macrocarpa***

Foram obtidos produtos e frações a partir da tintura de *Operculina macrocarpa* proveniente do Laboratório Ravick. Os estudos foram realizados no Depto. de Química Orgânica e Inorgânica/ UFC, sob coordenação do Prof. Dr. Edilberto Silveira e os produtos foram gentilmente cedidos para a realização dos ensaios.

4.1.5. Animais

Para a realização deste estudo foram utilizados camundongos albinos (*Mus musculus*) variedade Swiss-Webster (25 a 30g) do sexo masculino provenientes do Biotério Central da Universidade Federal do Ceará. Os animais foram divididos em grupos e mantidos em caixas de polipropileno, à temperatura média de 26°C com ciclos naturais dia/noite de 12/12h, recebendo ração padrão (Purina Chow) e água *ad libitum*. Os animais foram mantidos no Biotério do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Faculdade de Medicina - UFC.

4.1.6. Sangue humano

As amostras de sangue foram obtidas de estudantes do curso de Farmácia e funcionários do Departamento de Farmácia da Universidade Federal do Ceará. Para realização de ensaios com leucócitos polimorfonucleares também foi utilizado sangue humano de doadores saudáveis do Centro de Hemoterapia e Hematologia do Estado do Ceará (Hemoce).

4.2.Métodos

4.2.1. Estudo fitoquímico de *Operculina macrocarpa*

Os estudos fitoquímicos foram realizados no Centro Nordestino de Aplicação e Uso da Ressonância Magnética Nuclear (CENAUREMN), no Depto. de Química Orgânica e Inorgânica/ UFC, sob coordenação do Prof. Dr. Edilberto Silveira.

Para realização desses estudos foi utilizada a tintura proveniente dos tubérculos de *Operculina macrocarpa*. A bioprospecção de composto(s) ativo(s) da planta foi desenvolvida através de um estudo guiado pela avaliação do potencial antiagregante plaquetário dos produtos obtidos, em plasma humano.

Como representado na **Figura 9**, inicialmente para o fracionamento da tintura de *O. macrocarpa* (TOM) (4L) foi evaporado o solvente, com auxílio de um rotaevaporador. Desse processo, foram obtidos um precipitado (TOM/P) e um sobrenadante (TOM/S), que foram submetidos à testes de bioatividade, separados ou associados (precipitado + sobrenadante - TOM/PS).

Prosseguindo com os estudos, a TOM foi submetida a um processamento tecnológico que resultou na obtenção de dois produtos, TOM/1 e TOM/2 que foram avaliados sobre a agregação plaquetária induzida por ADP em plasma humano. Em seguida, foi realizada partição sólido-líquido, com adição de etanol a TOM/1, que resultou na obtenção de uma fração orgânica (TOM/1-F), também avaliada quando ao seu potencial farmacológico.

Após processo cromatográfico de adsorção (sílica) e partição com solventes orgânicos, a fração TOM/1-F resultou em novas frações, denominadas TOM/1-F1, TOM/1-F2, TOM/1-F3. A fração TOM/1-F também foi submetida a uma coluna de desadsorção seletiva com obtenção da fração TOM/1-F4. Todas essas frações foram submetidas a testes de bioatividade.

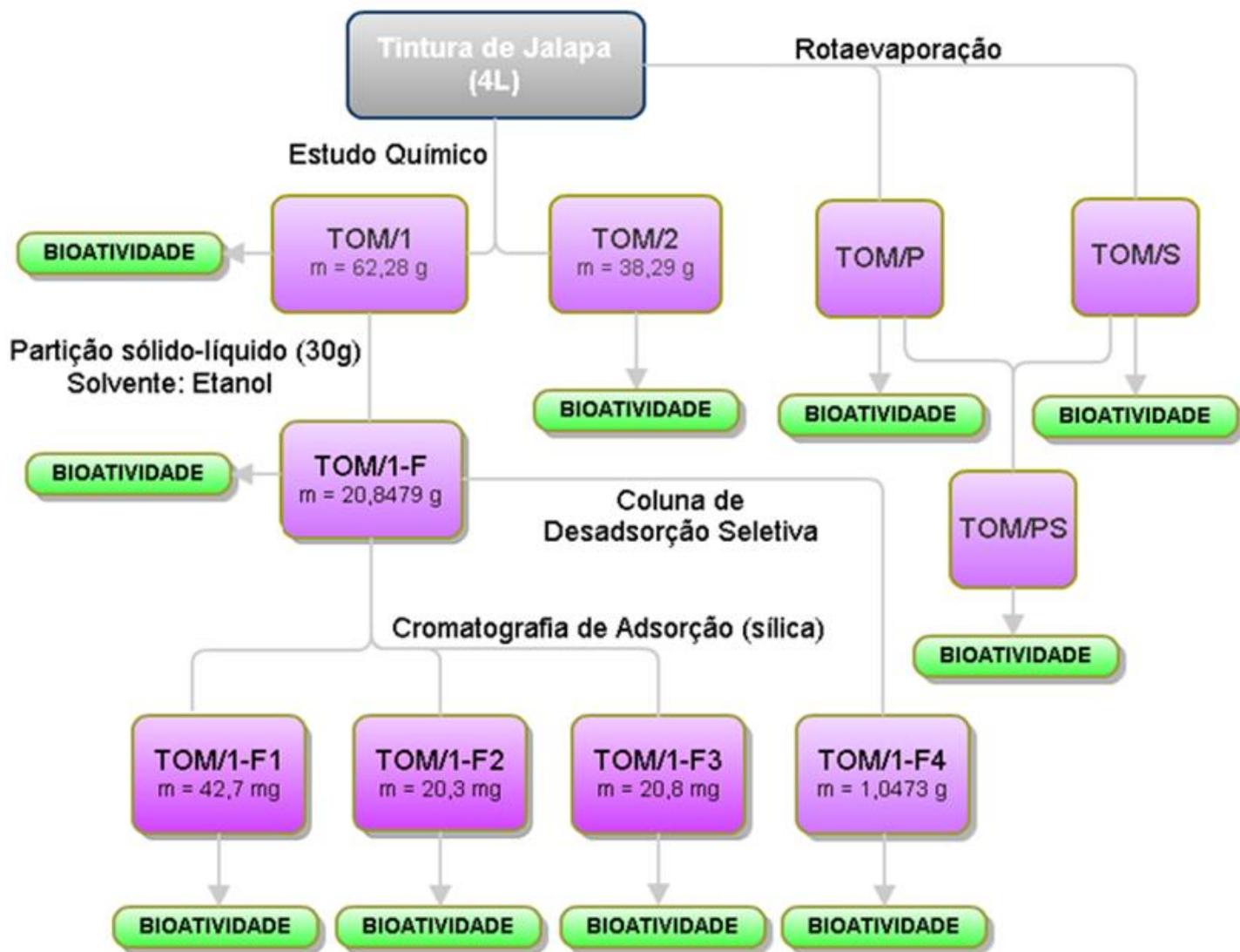


Figura 9. Fluxograma de obtenção das frações a partir da tintura de *Operculina macrocarpa* (TOM)

4.2.2. Perfil cromatográfico da tintura e fração TOM/1-F4 (CLAE – UV-DAD) de *Operculina macrocarpa*

As análises cromatográficas foram realizadas no Laboratório de Farmacognosia, no Departamento de Farmácia sob a coordenação da Profa. Dra. Luzia Kalyne Almeida Moreira Leal.

A análise do perfil químico da TOM e fração TOM/1-F4 foi realizada segundo método descrito por Michelin (2008) modificado. Os ensaios foram realizados em cromatógrafo líquido de alta eficiência (Alliance – Waters 2695, injetor automático) com detector de arranjo de foto diodos (CLAE-UV-DAD) da marca Waters 2996 com coluna analítica de fase reversa C₁₈ (Varian[®]) de 250 x 4,6 mm x 5 µm e poro com diâmetro interno de 100 Å, e uma coluna de guarda (Phenomenex[®]) de 4 x 3 mm x 5 mm.

As condições cromatográficas utilizadas foram: fase móvel (A: água/ácido trifluoracético; B: acetonitrila/ácido trifluoracético), com eluição gradiente (10-28% B de 0–20 min, 28–40% B de 20–21 min, 40–70% B de 21–31 min, 70-100% B de 31–50), fluxo 1,0 mL/min. O detector foi operado sob 310 nm e a temperatura da coluna foi de 40 °C. O volume de injeção das amostras foi de 20 µL, com tempo de corrida de 50 min. Os dados obtidos foram processados pelo programa Empower[®] (Waters, EUA) do próprio aparelho.

Na avaliação por CLAE, a TOM e a fração TOM/1-F4 tiveram identificados alguns dos seus metabólitos, com auxílio dos dados espectroscópicos de UV, por comparação do tempo de retenção e, principalmente, por co-injeção de padrões de trabalho, ácido clorogênico, ácido gálico e ácido caféico. Os testes foram realizados principalmente com o intuito de melhor caracterização físico-química dos produtos. Nesse contexto, foi determinado o “fingerprint” dos compostos, onde foram identificados na TOM e na fração TOM/1-F4 a presença dos ácidos caféico, gálico e clorogênico, além de outros compostos (Tr: 16,012; 16,751 e 18,387 min) a serem definidos quimicamente em estudo posterior. Na fração TOM/1-F4 também foi identificado outro composto (Tr: 25 min, aproximadamente), não pronunciado de maneira significativa na tintura (**Figura 10**).

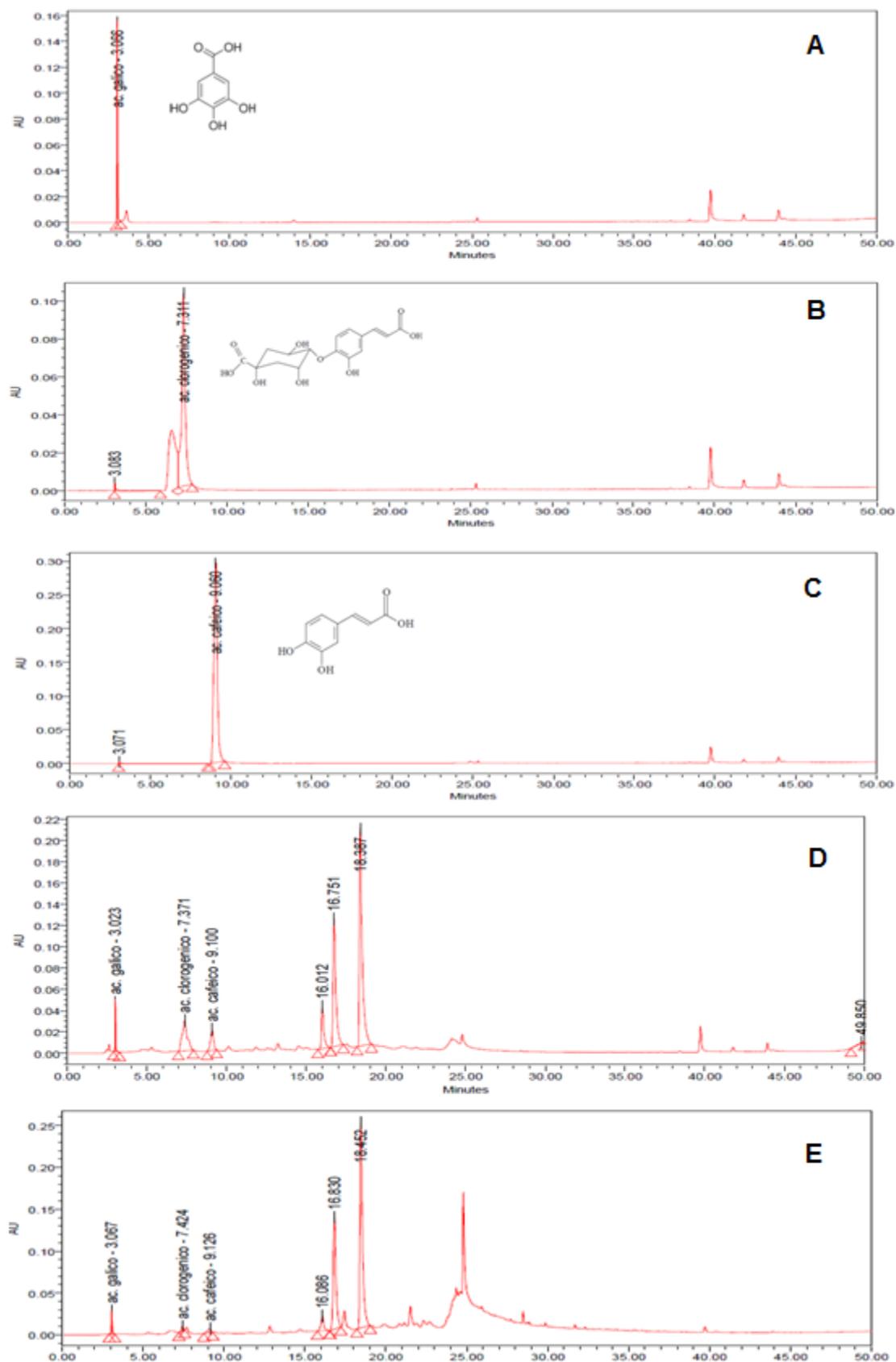


Figura 10. Cromatograma dos padrões ácido gálico (A), ácido clorogênico (B), ácido caféico (C), da tintura de *Operculina macrocarpa* (D) e fração TOM/1-F4 (E) Condições: coluna C18(250 x 4,6 mm, 5 µm), fase móvel (A: água/TFA; B: AcN/TFA), eluição gradiente, fluxo 1,0 mL/min. e comprimento de onda 310 nm.

4.2.3. Determinação do teor de compostos fenólicos da tintura de *Operculina macrocarpa* (TOM)

A concentração de fenóis totais na tintura de *Operculina macrocarpa* (TOM) foi determinada de acordo com o método colorimétrico de Folin-Ciocalteu, utilizando ácido gálico como droga padrão. O reagente de Folin-Ciocalteu é composto por uma solução de íons poliméricos complexos formados a partir dos ácidos fosfomolibdico e fosfotúngstico, que são capazes de oxidar fenolatos e, com sua redução, formar complexos de cor azul (SINGLETON e ROSSI, 1965).

Inicialmente a TOM (100 µL) foi adicionada ao reagente de Folin-Ciocalteu 1N (0,5 mL) e em seguida, a solução saturada de Na₂CO₃ (20%, 1,25 mL) foi adicionada ao meio. A solução resultante teve seu volume ajustado, com água destilada, para 10 mL. Após incubação de 40 min à temperatura ambiente e ao abrigo da luz, a absorbância da solução foi medida a 715 nm. O teor de fenóis totais (FT) foi determinado por interpolação da amostra (TOM) contra uma curva de calibração construída com ácido gálico (2 a 16 µg/mL) e expresso como miligramas (mg) de Equivalentes de Ácido Gálico (EAG) por mililitro (mL) de tintura.

Os resultados obtidos pelo método de Folin-Ciocalteu mostraram que o teor de fenóis totais da TOM foi de 0,14g% quando comparado com a curva de ácido gálico.

Tabela 2. Metodologia empregada nos estudos farmacológicos e toxicológicos da tintura de *Operculina macrocarpa* (TOM).

Metodologia	Objetivos
Estudo fitoquímico da TOM guiado pela atividade antiagregante plaquetária	Identificar na planta frações e/ou moléculas com atividade antiagregante plaquetária
Atividade antiagregante plaquetária da TOM na agregação induzida por diversos agonistas. Efeito antiagregante plaquetário da TOM na ausência ou presença de agentes antiplaquetários em plasma humano	Investigar o possível mecanismo de ação antiagregante plaquetário da TOM
Atividade antioxidante da TOM através do teste de DPPH	Avaliar o efeito antioxidante da TOM
Determinação do tempo de sangramento em camundongos e atividade anticoagulante em plasma humano	Avaliar o efeito da TOM sobre o tempo de sangramento em camundongos e coagulação sanguínea
Avaliação preliminar da toxicidade da TOM através de teste hipocrático em camundongos e citotoxicidade em neutrófilos humano	Avaliar o efeito da toxicidade da TOM <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i>

4.2.4. Avaliação Farmacológica e Toxicológica de *Operculina macrocarpa*

4.2.4.2 Atividade antiagregante plaquetária

- **Colheita do sangue**

O sangue para realização dos testes foi obtido de voluntários, estudantes e funcionários do Departamento de Farmácia, com consentimento esclarecido, aparentemente saudáveis, não fumantes, que relataram não estar fazendo uso de medicamentos por pelo menos 15 dias anteriores à colheita.

Amostras de sangue humano foram obtidas através de punção venosa da veia antecubital dos voluntários. Tubos descartáveis siliconizados, contendo citrato de sódio (3,2%) como anticoagulante (0,129 M; pH 7,5) foram utilizados para colheita do sangue na proporção 1:9. Os testes adequados para esse estudo foram realizados sempre em um período de até 3 h após a colheita da amostra.

- **Obtenção do plasma rico em plaquetas (PRP)**

O plasma humano rico em plaquetas (PRP) foi obtido através da separação das amostras de sangue humano, após centrifugação a 1000 rpm por 10 min. à temperatura ambiente. O plasma pobre em plaquetas (PPP) foi separado em seguida, após a centrifugação do restante da amostra a 1500 rpm durante 10 min. à temperatura ambiente. A separação do plasma foi realizada com cautela com o intuito de evitar ativação plaquetária.

O número de plaquetas no *pool* de PRP foi contado no aparelho automático da Roche modelo SYSMEX KX-21N e ajustado, sempre que necessário, para cerca de 249.000 plaquetas/mm³, utilizando-se o PPP.

- **Estudo de agregação plaquetária *in vitro* em PRP**

Os testes de agregação plaquetária foram realizados *in vitro* em plasma humano rico em plaquetas (PRP) segundo o método turbidimétrico descrito por Born e Cross (1963). Esse método consiste na monitoração da agregação plaquetária através da transmitância de luz.

A agregação foi estudada à 37°C em 450 µL de PRP em um agregômetro acoplado a um registrador (Mod. 450 - Chrono-log Co., USA), sendo medida através da agitação constante de um bastão magnético (1200 rpm), colocado nos tubos do agregômetro contendo PRP, após a adição do agente agregante. A turvação do PRP, devido à presença das plaquetas em suspensão, representa 0% de transmissão luminosa, pois não permite a passagem do feixe de luz. À medida que as plaquetas se agregam, há um aumento da transmitância, que é representada pela deflexão na linha vertical da curva e medida espectrofotometricamente através da passagem da luz pela suspensão das plaquetas e registrada em forma de curva que expressa a quantidade de agregação. O PPP representa 100% de transmissão luminosa.

- **Determinação da atividade das drogas testes sobre a agregação plaquetária induzida por diferentes agonistas em plasma humano *in vitro***

Inicialmente, os efeitos das drogas testes (tintura e frações de *O. macrocarpa*, tintura de *C. scammonia* e Aguardente Alemã) foram estudados utilizando como agonista o difosfato de adenosina (ADP) na concentração de 2µM.

A influência do tempo de incubação das drogas testes no plasma, sob a inibição da agregação plaquetária, foi avaliada frente ao ADP. Para isso, os compostos analisados foram adicionados 5, 10 e 15 min. antes da adição do agonista (ADP). Dentre os tempos de incubação investigados, o tempo de escolha foi de 15 min. para a fração derivada da TOM (TOM/1-F4). No entanto, para as tinturas de *O. macrocarpa* (TOM) e suas demais frações, para a tintura de *C. scammonia* (TCS) e para a Aguardente Alemã (AAL), o tempo de escolha foi de 10 min. de incubação. Para esses ensaios, foi considerando o grau de resposta do modelo experimental, em um menor espaço de tempo possível. As drogas testes foram incubadas em concentrações crescentes (12,5 - 400 µg/mL) com 450 µL do *pool* de PRP, antes da adição do agonista.

Dando continuidade aos estudos, a TOM/PS e a fração obtida dela (TOM/1-F4) também foram avaliadas através da ação de outros agonistas na agregação plaquetária, sendo estes: trombina (TROM 1U/ml), ácido araquidônico (AA 1mM), colágeno (COL 2 µg/mL) e epinefrina (EPI 40 µM).

A altura das curvas foi medida, em milímetros (mm), da linha de base onde teve início (0% de transmitância) até o ponto máximo (100% de transmitância). As curvas de agregação dos controles foram obtidas através da adição do agonista ao PRP pré-incubado com o veículo (DMSO), utilizado como solvente para solubilização da tintura e das frações.

A inibição da agregação plaquetária foi avaliada através da comparação da altura de cada uma das curvas referentes às diferentes concentrações das drogas testes, com o valor médio da altura das curvas controle (DMSO), cuja concentração no plasma não ultrapassou o limite de 1%.

- **Avaliação do efeito antiagregante plaquetário da TOM/PS na presença de outros agentes antiplaquetários em plasma humano *in vitro***

Com o intuito de esclarecer os possíveis mecanismos de ação envolvidos no efeito antiagregante plaquetário da TOM/PS, foram avaliados os efeitos potenciais desta tintura sob a ação inibitória de diversas drogas na agregação plaquetária. Para isso, a agregação plaquetária *in vitro* em plasma humano foi induzida pelo difosfato de adenosina (ADP) como agonista, na concentração de 2 μ M. As drogas utilizadas para avaliação do efeito potencial da TOM/PS (100 μ g/mL) foram: ácido acetilsalicílico (AAS 25 μ M), ticlopidina (TIC 250 μ M), L-arginina (L-ARG 10 μ g/mL) e pentoxifilina (PTX 120 μ g/mL). Os compostos foram utilizados em concentrações de modo que produzissem o menor efeito inibitório sobre a agregação plaquetária. Para a realização dos testes, as drogas foram incubadas em PRP (10 min antes do agonista) separadas ou associadas com a TOM/PS (incubada após 5 min da adição das drogas).

- **Efeito antiagregante plaquetário da TOM/PS em plasma humano: papel do óxido nítrico/ guanilato ciclase**

Para avaliação do possível papel do óxido nítrico na inibição da agregação plaquetária promovida pela TOM/PS, o inibidor seletivo da guanilato ciclase, ODQ (10 μ M) foi incubado por 5 minutos em PRP seguido da TOM/PS (100 μ g/mL) por mais 10 minutos. O ADP (2 μ M) foi empregado como agonista da agregação plaquetária e o

nitroprussiato de sódio (SNP 10 μ M), doador de óxido nítrico, como droga padrão (JANG et al., 2002).

4.2.4.3 Atividade antioxidante

- **Teste de DPPH**

O radical DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazila) é considerado um radical livre estável, no entanto, falta um elétron em sua estrutura. Este radical é utilizado como ferramenta para estudo da ação de compostos sequestradores de radicais livres, e a técnica que utiliza esse radical é independente de qualquer atividade enzimática. Uma substância ao doar um elétron para o DPPH faz com que este se torne mais estável, mude de cor, permitindo o monitoramento da reação por espectrofotômetro.

No método descrito por Saint-Cricq e cols. (1999), uma alíquota (0,1 mL) de TOM/PS (50, 100, 200, 400 ou 500 μ g/mL), vitamina E (α -tocopherol, 50 μ g/mL, droga padrão) ou veículo (DMSO 4%, controle) foi adicionada a 3,9 mL de DPPH (0,3 mM, veículo - metanol:etanol 1:1). Em seguida as soluções foram misturadas com auxílio de vórtex por 1 minuto, mantidas em temperatura ambiente por 30 minutos e a absorbância foi determinada em 517 nm.

O percentual de inibição foi calculado de acordo com a seguinte equação:

$$\% \text{ INIBIÇÃO} = \left[A_0 - \left(\frac{A_c}{A_0} \right) \right] \times 100$$

Onde A_0 representa a absorbância do controle e A_c , a absorbância da droga teste (TOM/PS).

4.2.4.4 Determinação do tempo de sangramento em camundongos

O tempo de sangramento foi determinado segundo método descrito por Huang e cols. (2007). Camundongos Swiss machos foram divididos em grupos de 10 animais e pré-tratados com TOM/PS (100, 200 400 mg/kg), com o veículo de dissolução da tintura (Tween 80 a 4%, em água) (controle), com água (normal) ou AAS (100 mg/kg)

(droga padrão, inibidor inespecífico da COX), por via oral, uma vez ao dia, durante 10 dias consecutivos. Uma hora após a última administração, a cauda do camundongo foi seccionada cerca de 1cm usando uma lâmina descartável cirúrgica. O tempo de sangramento foi medido a partir do momento de transecção completa da cauda até o momento de parada do sangramento. O sangue foi absorvido em papel de filtro em intervalos de 20 segundos durante o processo hemorrágico.

4.2.4.5 Atividade anticoagulante

- **Avaliação do tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPa) e tempo de protrombina (TP)**

Para avaliação da possível atividade anticoagulante das drogas testes foram realizados ensaios de tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPa) e tempo de protrombina (TP) em plasma humano. Os tempos de coagulação do plasma (TTPa e TP) foram medidos através do método de Yuk e cols. (2000) utilizando um coagulômetro (Teco, modelo Coatron M1, Alemanha) e kits comerciais Hemostat thromboplastin SI e Hemostat aPTT (Human, Alemanha). Para realização dos ensaios, inicialmente, o sangue coletado foi centrifugado a 3000 rpm por 15 min, para obtenção do plasma pobre em plaquetas (PPP), que por sua vez foi incubado com TOM/PS (200, 400 µg/mL), fração TOM/1-F4 (100, 200 µg/mL), DMSO (0,08%) (veículo, controle) ou heparina (0,1 ou 0,5 UI/mL, droga padrão, anticoagulante) por 10 min a 37°C. Para avaliação do TTPa, ao plasma (50 µL) foi adicionado cefalina (50 µL) e a coagulação foi iniciada com a adição de CaCl₂ (50 µL). Na avaliação do TP, o plasma (50 µL) previamente incubado, foi misturado à tromboplastina cálcica (100 µL) e então foi medido o tempo de formação do coágulo no plasma humano.

4.2.4.6 Avaliação dos efeitos gerais - Teste hipocrático

Camundongos Swiss do sexo masculino foram divididos em grupos de 6 animais. Cada grupo foi submetido ao tratamento com a TOM/PS em dose única de 50, 100, 200, 400, 600 e 800 mg/kg, administrada por via oral (v.o.) em um volume de 10mL/kg. Outro grupo foi tratado com o veículo de dissolução da tintura (Tween 80 a 4%, em água) (controle). Os animais foram observados 10, 15, 30, 60, 120, 240

minutos após o tratamento e a cada 24 horas durante 3 dias. Dentre os sinais investigados estão incluídos: alteração da motilidade, frequência respiratória, alteração na cor da urina, diarreia, analgesia, contorção abdominal, movimentos estereotipados, catatonia, piloereção, tremor, convulsão, sedação e morte (MALONE & ROBICHAUD, 1962).

4.2.4.7 Teste de citotoxicidade em neutrófilos humano

Ensaio *in vitro* podem ser bastante úteis na avaliação do perfil tóxico de substâncias químicas, além de necessitarem de pequenas quantidades da substância teste para sua execução. O potencial citotóxico da TOM/PS em neutrófilos humano, *in vitro*, foi investigado através da determinação da atividade da enzima lactato desidrogenase (LDH) no meio extracelular e da produção de sal de formazan no teste de MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2)-2,5-difeniltetrazólio).

Para a realização dos ensaios foram isolados polimorfonucleares, predominantemente neutrófilos (80-90%) a partir de fração residual originada durante o processo de obtenção do *buffy coat*, a partir de sangue humano. Esta foi cedida pelo Centro de Hemoterapia e Hematologia do Ceará – HEMOCE e o isolamento foi realizado de acordo com método descrito por Henson (1971) e modificado por Lucisano & Mantovani (1984). O sangue foi centrifugado, o plasma desprezado e o soro lavado com solução salina, utilizando solução de gelatina 2,5% (p/v) para formar um gradiente de separação dos componentes sanguíneos.

É importante ressaltar que a viabilidade celular foi determinada pelo ensaio de exclusão ao corante Azul de Tripán, a partir da contagem de 100 células em microscópio óptico Olympus CX41 (Olympus Optical®, São Paulo, SP, Brasil). A população de células empregada no presente estudo foi de $2,5 \times 10^6$ céls/ml, com viabilidade em torno de $93,0 \pm 2,9\%$, n=4.

- **Determinação da atividade da enzima lactato desidrogenase (LDH)**

Para a avaliação e determinação da atividade da enzima LDH, neutrófilos ($2,5 \times 10^6$ células/mL) foram incubados por 15 minutos a 37°C na presença da TOM/PS (1, 5,

50, 100 e 200 µg/mL), DMSO (controle 1%), Hanks (células não tratadas) ou Triton X-100 (controle positivo 0,2%).

Em seguida, os tubos de reação foram centrifugados a 755g, por 10 minutos, a 4°C e os sobrenadantes foram transferidos para outros tubos e mantidos em banho de gelo. A enzima LDH está localizada no citoplasma das células e é liberada quando estas são lesadas, além de ser responsável pela conversão do piruvato a lactato na presença de NADH. O ensaio é realizado utilizando-se o Kit LDH (Liquiform), e baseia-se na medida do decréscimo da absorbância em 340nm devido à oxidação do NADH, que é proporcional à atividade da LDH na amostra. Alíquotas de 250 µL de substrato foram pré-incubadas por 3 minutos a 37°C.

Adicionou-se 25 µL da amostra de sobrenadante, homogeneizou-se a mistura e realizou-se a leitura da absorbância em 340 nm nos tempos 1 e 3 minutos, a 37° C em espectrofotômetro. A atividade da enzima LDH nas amostras foi calculada seguindo-se as especificações do fabricante da seguinte maneira:

$$A = \left[\frac{(A_1 - A_2)}{2} \right] \times 1746,03$$

Onde:

A = atividade da LDH na amostra, em U/mL;

A₁ = absorbância inicial (1 minuto) em 340nm;

A₂ = absorbância final (3 minutos) em 340nm;

1746,03 = fator estipulado pelo fabricante para volume de amostra de 25 µL.

A citotoxicidade da TOM/PS foi avaliada em três experimentos independentes, com medidas em triplicata.

- **Teste do MTT**

Nesse ensaio, a toxicidade foi avaliada por meio de uma medida colorimétrica que mensura a capacidade das células em reduzir o MTT (sal de coloração amarela) a formazan (sal de coloração púrpura). O formazan é um pigmento insolúvel que, quando extraído das células, pode ser quantificado espectrofotometricamente. A redução do MTT é catalisada pelo sistema enzimático succinato-tetrazol redutase, presente na membrana mitocondrial, de forma que a atividade dessa enzima reflete a funcionalidade metabólica das mitocôndrias e a viabilidade celular (MOSMANN, 1983).

Neutrófilos ($2,5 \times 10^6$ células/ml) foram incubados por 30min a 37°C com TOM/PS (1, 5, 50, 100 e 200 µg/mL), DMSO (controle 1%), Hanks (células não tratadas) ou Triton X-100 (controle positivo 0,2%) em placa de 96 poços e atmosfera de CO₂. Após período de incubação, a placa foi centrifugada a 2000 rpm por 15min a 25°C e o sobrenadante foi descartado. Então foram adicionados 200µL da solução de MTT (10% v/v em NaCl 0,15M) seguido de uma incubação por 3h a 37°C. Em seguida foi realizada uma nova centrifugação nas mesmas condições, o sobrenadante foi descartado e adicionado 150µL de DMSO para a lise das células e solubilização do formazan. As placas foram agitadas por 15 minutos com o auxílio de um agitador de placas e a leitura foi realizada em leitor de microplaca a 540nm, onde a densidade óptica é diretamente proporcional ao número de células viáveis. Os experimentos foram realizados em triplicata e repetidos em três dias.

4.3.Análise Estatística

A análise estatística foi realizada com auxílio do programa GraphPad Prism versão 5.0 (USA). Os resultados foram expressos como a média ± erro padrão da média (E.P.M.). Para comparações múltiplas foi utilizada a análise de variância (ANOVA), seguida do teste de Tukey post hoc para análise dos dados paramétricos. Níveis de probabilidade inferiores a 5% foram considerados indicativos de significância (*p<0,05).

5. RESULTADOS

5.1. Estudo químico-farmacológico de *Operculina macrocarpa* guiado pela atividade antiagregante plaquetária em plasma humano

Inicialmente foi investigada a atividade antiagregante plaquetária da tintura de *Operculina macrocarpa* (TOM). Para tanto, foi eliminado o etanol do produto com auxílio de um rotaevaporador, que resultou na obtenção de um precipitado (TOM/P) e de um sobrenadante (TOM/S). A adição da TOM/P (100 e 200 µg/mL) no PRP humano reduziu a agregação de plaquetas induzida por ADP em 23 e 31% (% agreg.: $76,6 \pm 6,2$ e $68,5 \pm 8,9$, respectivamente) (**Figura 11**), enquanto a TOM/S na maior concentração (200 µg/mL) inibiu em torno de 18% (% agreg.: $81,5 \pm 2,9$) a agregação plaquetária (**Figura 12**).

Prosseguindo os estudos, a tintura de *O. macrocarpa* constituída por precipitado e sobrenadante (TOM/PS), obtidos após processamento no rotaevaporador, apresentou uma inibição significativa ($p < 0,05$) da agregação plaquetária induzida por ADP a partir da concentração de 100 µg/mL. Os valores de inibição foram de 18, 37, 40 e 55% para TOM/PS nas concentrações 100, 200, 300 e 400 µg/mL, respectivamente (% agreg.: $82,5 \pm 2,2$; $63,5 \pm 3,7$; $59,8 \pm 4,1$ e $44,6 \pm 4,1$). O AAS (50 µM, inibidor inespecífico da COX) apresentou um percentual de inibição em torno de 53% (% agreg.: $46,7 \pm 4,6$) (**Figura 13**).

Diante dos resultados obtidos com a TOM, foram iniciados estudos fitoquímicos desse produto visando identificar possíveis moléculas responsáveis pelos efeitos dessa tintura. Para tanto, a tintura foi submetida a um processamento tecnológico que resultou na obtenção de dois produtos, TOM/1 e TOM/2 que foram avaliados quanto ao seus efeitos sobre a agregação plaquetária induzida por ADP em plasma humano.

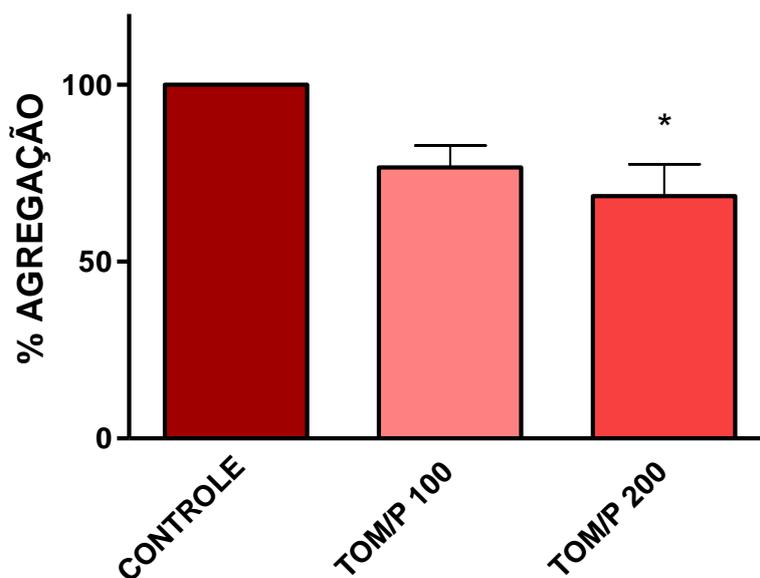


Figura 11. Efeito do precipitado da tintura de *O. macrocarpa* (TOM/P) na agregação plaquetária induzida por ADP em plasma humano. O PRP foi incubado por 10 min. com TOM/P (100 e 200 $\mu\text{g/mL}$) ou DMSO 0,08% (CONTROLE) e a agregação foi induzida por ADP (2 μM). Os resultados representam a média \pm E.P.M. das porcentagens de agregação em relação ao controle (100%) de 4 experimentos. * $p < 0,05$ vs controle (ANOVA, Tukey *post hoc*).

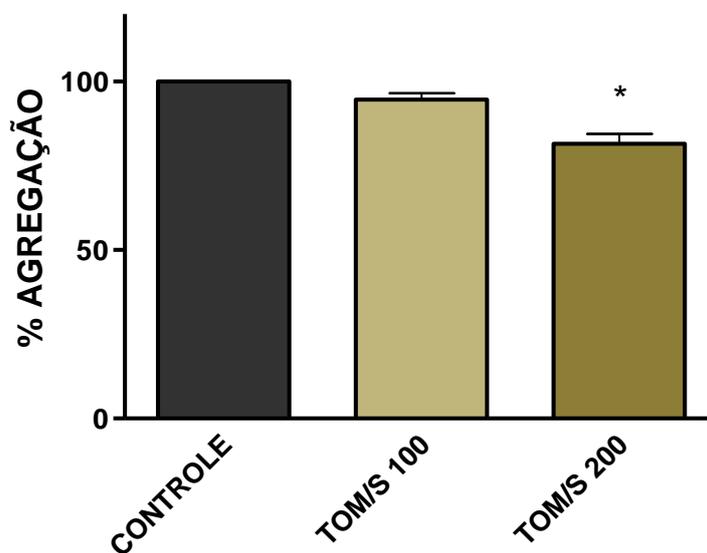


Figura 12. Efeito do sobrenadante da tintura de *O. macrocarpa* (TOM/S) na agregação plaquetária induzida por ADP em plasma humano. O PRP foi incubado por 10 min. com TOM/S (100 e 200 $\mu\text{g/mL}$) ou DMSO 0,08% (CONTROLE) e a agregação foi induzida por ADP (2 μM). Os resultados representam a média \pm E.P.M. das porcentagens de agregação em relação ao controle (100%) de 4 experimentos. * $p < 0,05$ vs controle (ANOVA, Tukey *post hoc*).

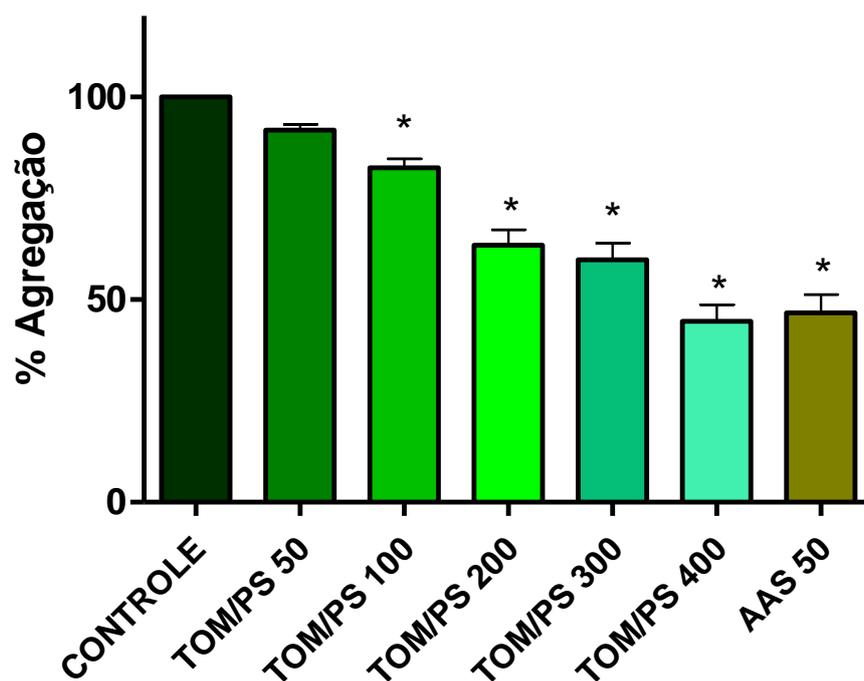


Figura 13. Efeito da tintura de *O. macrocarpa* constituída por precipitado e sobrenadante (TOM/PS) na agregação plaquetária induzida por ADP em plasma humano. O PRP foi incubado por 10 min. com TOM/PS (50, 100, 200, 300 e 400 $\mu\text{g/mL}$), DMSO 0,08% (CONTROLE) ou AAS (50 μM) e a agregação foi induzida por ADP (2 μM). Os resultados representam a média \pm E.P.M. das porcentagens de agregação em relação ao controle (100%) de 5 experimentos. * $p < 0,05$ vs controle (ANOVA, Tukey *post hoc*).

Na **Figura 14**, pode ser observado que na presença de TOM/1 (25 e 50 $\mu\text{g/mL}$) o percentual de agregação plaquetária foi reduzido significativamente (% agreg.: $79,0 \pm 4,4$; $66,9 \pm 6,8$), correspondendo a uma inibição de 21 e 33%. Por outro lado, a TOM/2 nas concentrações de 25, 50, 100 e 200 $\mu\text{g/mL}$ não foi capaz de inibir a agregação plaquetária. Dessa forma, prosseguindo os estudos fitoquímicos, a TOM/1 foi fracionada e a fração orgânica obtida (TOM/1-F) nas concentrações de 25, 50 e 100 $\mu\text{g/mL}$ inibiu em até 38% a agregação plaquetária (% agreg.: $75,4 \pm 5,7$; $77,8 \pm 5,0$ e $62,3 \pm 4,5$, respectivamente) induzida por ADP (2 μM) (**Figura 15**).

O fracionamento químico da TOM/1-F resultou na obtenção de novas frações, a TOM/1-F1, TOM/1-F2, TOM/1-F3 e TOM/1-F4.

Tanto a fração TOM/1-F1 quanto a TOM/1-F2 na concentração de até 200 $\mu\text{g/mL}$ não promoveram inibição da agregação plaquetária induzida por ADP superior a 17% (% agreg.: $86,8 \pm 3,3$ e $83,0 \pm 3,4$, respectivamente) (**Figura 16 e 17**).

Entretanto, na **Figura 18** pode ser observado que os valores médios de inibição da TOM/1-F3 na agregação induzida pelo ADP foram superiores quando comparados às frações anteriores, apresentando inibições em torno de 28 e 39% (% agreg.: $71,8 \pm 3,0$ e $61,5 \pm 1,6$) nas concentrações de 100 e 200 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente quando comparados ao grupo controle (% agreg.: 100).

Prosseguindo o estudo de bioprospecção foi investigado o potencial antiagregante plaquetário em plasma humano da fração TOM/1-F4 (12,5; 25; 50; 100 e 200 $\mu\text{g/mL}$) onde foi observado que a TOM/1-F4 a partir da concentração de 50 $\mu\text{g/mL}$ (% agreg.: $71,2 \pm 3,8$; $44,7 \pm 3,9$) inibiu significativamente ($p < 0,05$) a agregação de plaquetas, sendo que na concentração de 200 $\mu\text{g/mL}$ a TOM/1-F4 foi capaz de inibir em 100% a agregação plaquetária. O AAS (50 μM) apresentou um percentual de inibição em torno de 50% (% agreg.: $50,0 \pm 5,4$) (**Figura 19**).

Dentre as frações até então investigadas no presente estudo, a fração TOM/1-F4 foi a que mostrou melhor resposta antiagregante plaquetária, o que justifica a continuidade dos estudos com esta fração.

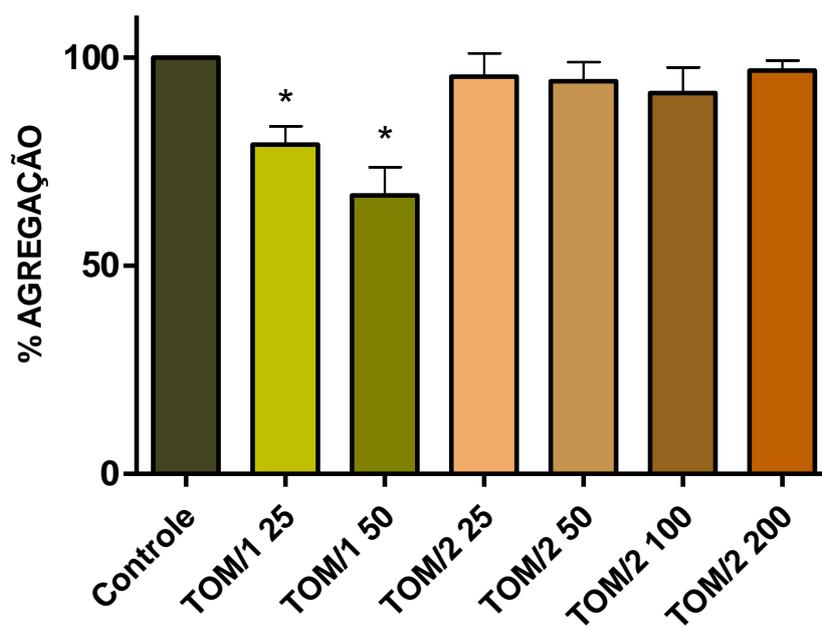


Figura 14. Efeitos da TOM/1 e TOM/2 de *O. macrocarpa* na agregação plaquetária induzida por ADP em plasma humano. O PRP foi incubado por 10 min. com TOM/1 e TOM/2 (25, 50, 100 e 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$) ou DMSO 0,08% (CONTROLE) e a agregação foi induzida por ADP (2 μM). As drogas testes foram obtidas a partir da tintura de *O. macrocarpa* (TOM) com emprego de processamento tecnológico, gerando 2 produtos, TOM/1 e TOM/2. Os resultados representam a média \pm E.P.M. das porcentagens de agregação em relação ao controle (100%) de 4 experimentos. * $p < 0,05$ vs controle (ANOVA, Tukey *post hoc*).

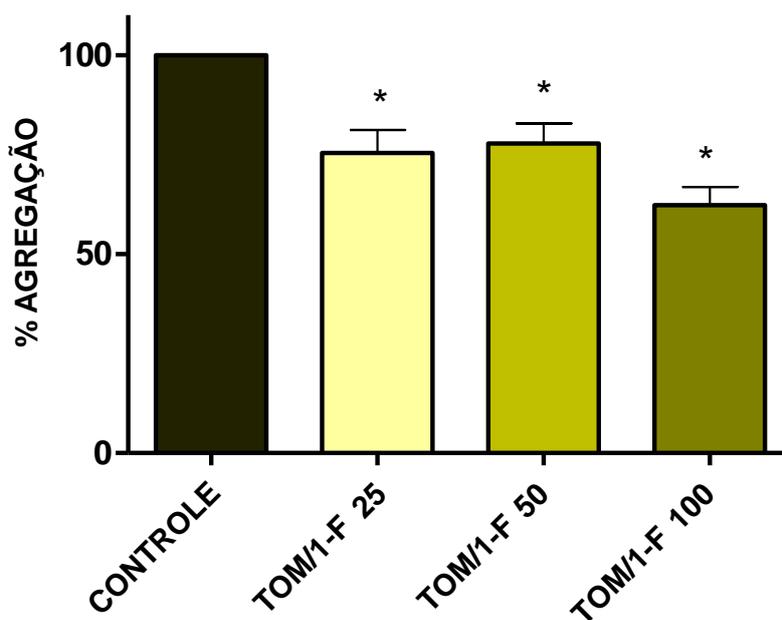


Figura 15. Efeito da TOM/1-F de *O. macrocarpa* na agregação plaquetária induzida por ADP em plasma humano. O PRP foi incubado por 10 min. com TOM/1-F (25, 50 e 100 $\mu\text{g/mL}$) ou DMSO 0,08% (CONTROLE) e a agregação foi induzida por ADP (2 μM). A TOM/1-F constitui uma fração orgânica obtida a partir do produto 1 proveniente da tintura de *O. macrocarpa* (TOM/1). Os resultados representam média \pm E.P.M. das porcentagens de agregação em relação ao controle (100%) de 4 experimentos. * $p < 0,05$ vs controle (ANOVA, Tukey *post hoc*).

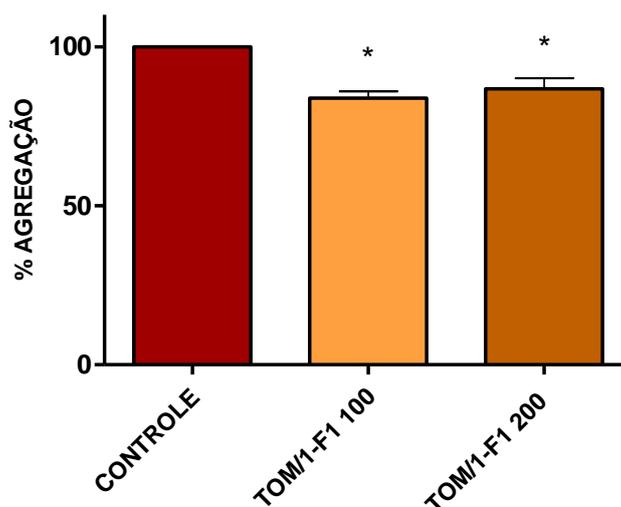


Figura 16. Efeito da TOM/1-F1 de *O. macrocarpa* na agregação plaquetária induzida por ADP em plasma humano. O PRP foi incubado por 10 min. com TOM/1-F1 (100 e 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$) ou DMSO 0,08% (CONTROLE) e a agregação foi induzida por ADP (2 μM). A TOM/1-F1 é a fração 1 da fração orgânica obtida a partir do produto 1 proveniente da tintura de *O. macrocarpa* (TOM/1). Os resultados representam média \pm E.P.M. das porcentagens de agregação em relação ao controle (100%) de 4 experimentos. * $p < 0,05$ vs controle (ANOVA, Tukey *post hoc*).

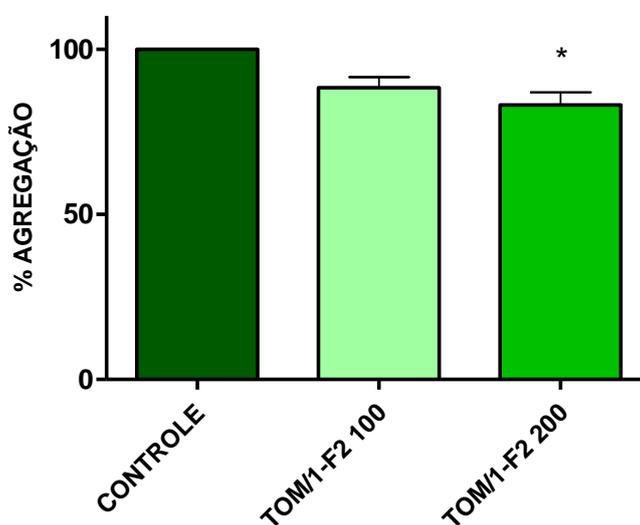


Figura 17. Efeito da TOM/1-F2 de *O. macrocarpa* na agregação plaquetária induzida por ADP em plasma humano. O PRP foi incubado por 10 min. com TOM/1-F2 (100 e 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$) ou DMSO 0,08% (CONTROLE) e a agregação foi induzida por ADP (2 μM). A TOM/1-F2 é a fração 2 da fração orgânica obtida a partir do produto 1 proveniente da tintura de *O. macrocarpa* (TOM/1). Os resultados representam média \pm E.P.M. das porcentagens de agregação em relação ao controle (100%) de 4 experimentos. * $p < 0,05$ vs controle (ANOVA, Tukey *post hoc*).

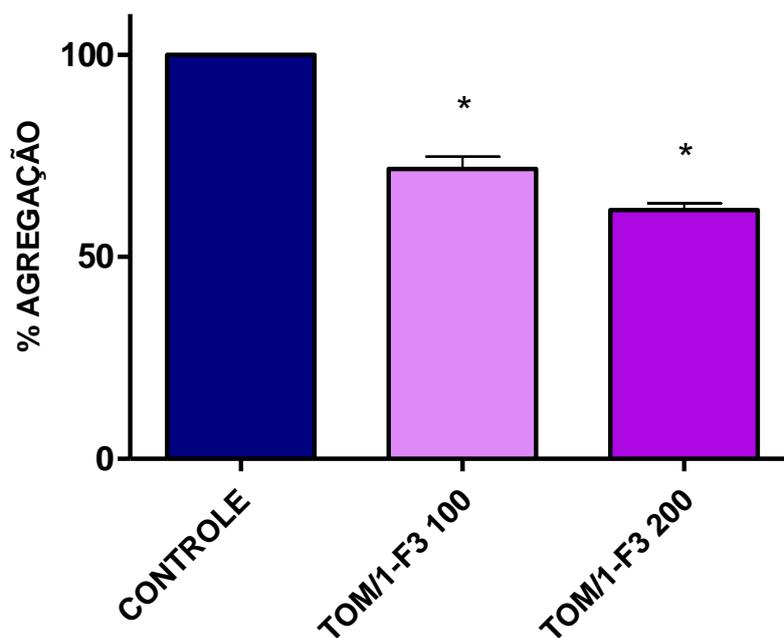


Figura 18. Efeito da TOM/1-F3 de *O. macrocarpa* na agregação plaquetária induzida por ADP em plasma humano. O PRP foi incubado por 10 min. com TOM/1-F3 (100 e 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$) ou DMSO 0,08% (CONTROLE) e a agregação foi induzida por ADP (2 μM). A TOM/1-F3 é a fração 3 da fração orgânica obtida a partir do produto 1 proveniente da tintura de *O. macrocarpa* (TOM/1). Os resultados representam média \pm E.P.M. das porcentagens de agregação em relação ao controle (100%) de 4 experimentos. * $p < 0,05$ vs controle (ANOVA, Tukey *post hoc*).

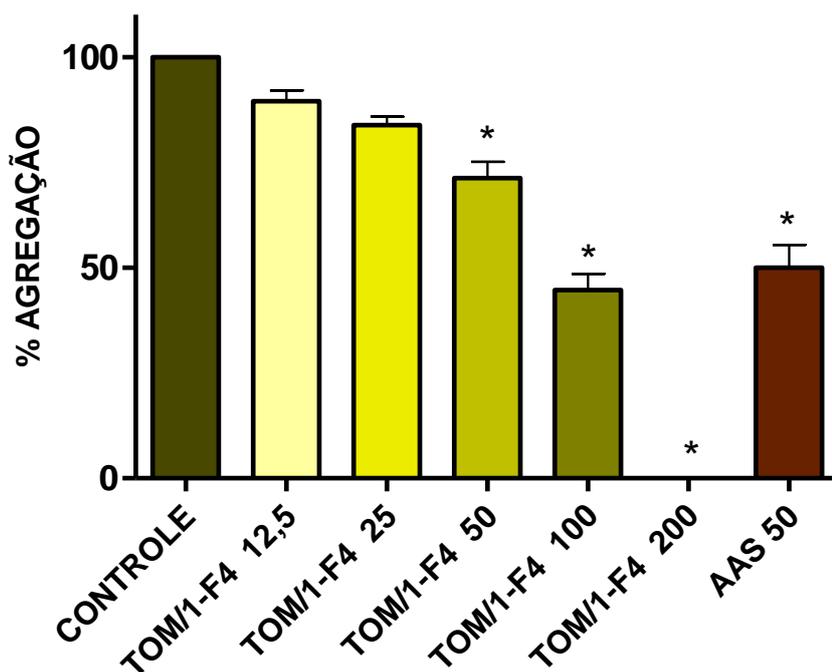


Figura 19. Efeito da TOM/1-F4 de *O. macrocarpa* na agregação plaquetária induzida por ADP em plasma humano. O PRP foi incubado com TOM/1-F4 (12,5; 25; 50; 100 e 200 µg/mL), DMSO 0,25% (CONTROLE) ou AAS (50 µM) e a agregação foi induzida por ADP (2 µM). A TOM/1-F4 é a fração 4 da fração orgânica obtida a partir do produto 1 proveniente da tintura de *O. macrocarpa* (TOM/1). Os resultados representam a média ± E.P.M. das porcentagens de agregação em relação ao controle (100%) de 6 experimentos. * $p < 0,05$ vs controle (ANOVA, Tukey *post hoc*).

5.2. Efeitos da TOM/PS e TOM/1-F4 na agregação de plaquetas induzida por trombina, ácido araquidônico, colágeno ou epinefrina em plasma humano

Prosseguindo os estudos farmacológicos da tintura (TOM/PS) e da fração orgânica (TOM/1-F4) de jalapa, foram investigados seus efeitos sobre a agregação de plaquetas humanas induzida por outros agonistas, como trombina, ácido araquidônico, colágeno ou epinefrina. Na **Figura 20**, pode ser observado que a TOM/PS (200 µg/mL) não interferiu significativamente na agregação plaquetária induzida por Trombina (1 U/ml), enquanto a TOM/1-F4 (100 µg/mL) inibiu em 21% (% agreg.: $79,6 \pm 6,9$) a agregação plaquetária. Resultados semelhantes foram observados na agregação induzida por ácido araquidônico (1mM), contudo, o efeito antiagregante plaquetário da TOM/1-F4 (100 µg/mL) foi superior (% agreg.: $60,0 \pm 5,2$) em relação àquele obtido na presença da trombina (**Figura 21**).

Dando continuidade aos estudos, pode ser observado na **Figura 22** que quando submetida à agregação por colágeno (2 µg/mL) a TOM/PS (200 µg/mL) foi capaz de inibir significativamente em 18% a agregação de plaquetas (% agreg.: $82,1 \pm 2,0$), enquanto a fração TOM/1-F4 (100 µg/mL) inibiu em 62% (% agreg.: $38,1 \pm 5,8$). Resultados superiores de inibição foram observados quando, nas mesmas concentrações, a TOM/PS e a fração TOM/1-F4 foram submetidas à presença de epinefrina como agonista, apresentando inibições em torno de 20 e 80% sobre a agregação de plaquetas em plasma humano (% agreg.: $80,2 \pm 3,1$; $20,3 \pm 4,3$, respectivamente) (**Figura 23**).

Na **Figura 24**, em um estudo comparativo, pode ser observado que a TOM/PS apresentou resultados superiores de inibição sobre agregação de plaquetas, quando esta foi induzida por ADP, enquanto a TOM/1-F4 mostrou um maior potencial antiagregante plaquetário na presença de epinefrina, seguido por colágeno e ADP, sugerindo, dessa forma, que a TOM/1-F4 possa estar agindo por diferentes mecanismos de ação.

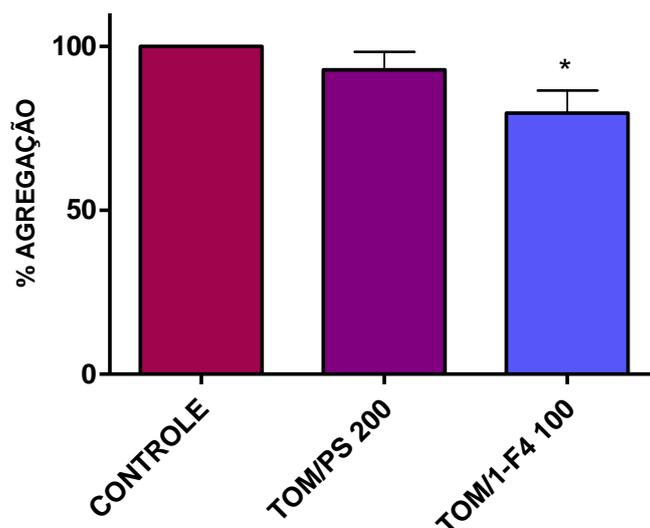


Figura 20. Efeito da TOM/PS e da fração TOM/1-F4 na agregação plaquetária induzida por trombina em plasma humano. O PRP foi incubado por 10 min com a TOM/PS (200 µg/mL) e por 15 min com a TOM/1-F4 (100 µg/mL) ou DMSO 0,08% (CONTROLE) e a agregação foi induzida pela TROM (1 U/ml). Os resultados representam média ± E.P.M. das porcentagens de agregação em relação ao controle (100%) de 4 experimentos. * $p < 0,05$ vs controle (ANOVA, Tukey *post hoc*).

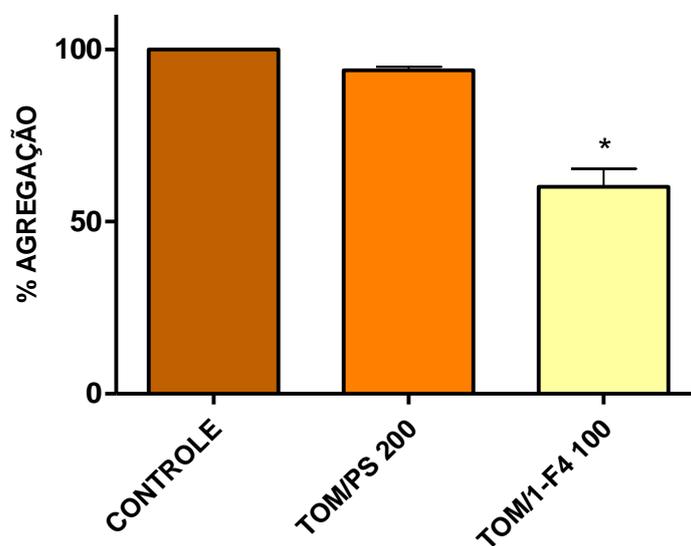


Figura 21. Efeito da TOM/PS e da fração TOM/1-F4 na agregação plaquetária induzida por ácido araquidônico em plasma humano. O PRP foi incubado por 10 min com a TOM/PS (200 µg/mL) e por 15 min com a TOM/1-F4 (100 µg/mL) ou DMSO 0,08% (CONTROLE) e a agregação foi induzida pelo AA (1 mM). Os resultados representam média ± E.P.M. das porcentagens de agregação em relação ao controle (100%) de 4 experimentos. * $p < 0,05$ vs controle (ANOVA, Tukey *post hoc*).

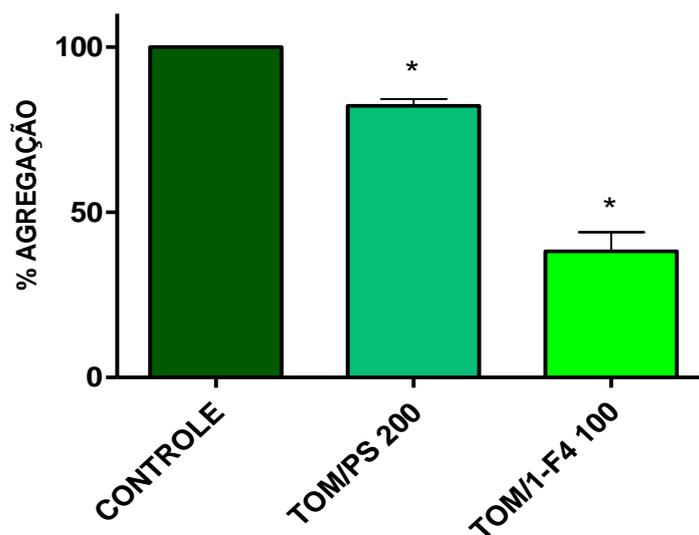


Figura 22. Efeito da TOM/PS e da fração TOM/1-F4 na agregação plaquetária induzida por colágeno em plasma humano. O PRP foi incubado por 10 min com a TOM/PS (200 µg/mL) e por 15 min com a TOM/1-F4 (100 µg/mL) ou DMSO 0,08% (CONTROLE) e a agregação foi induzida pelo COL (2 µg/mL). Os resultados representam média ± E.P.M. das porcentagens de agregação em relação ao controle (100%) de 4 experimentos. * $p < 0,05$ vs controle (ANOVA, Tukey *post hoc*).

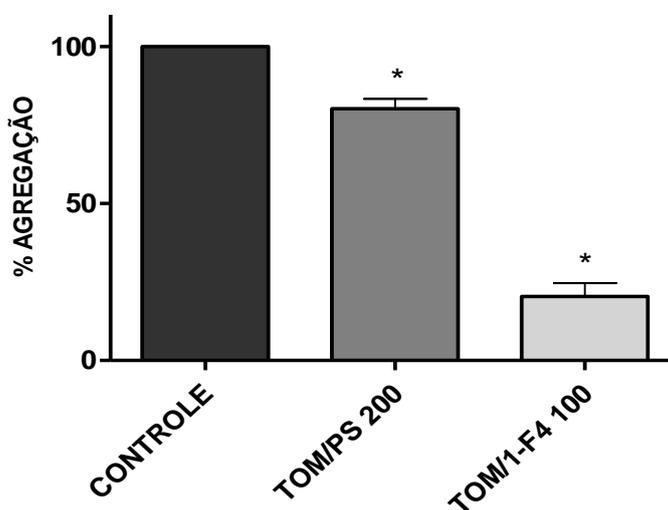


Figura 23. Efeito da TOM/PS e da fração TOM/1-F4 na agregação plaquetária induzida por epinefrina em plasma humano. O PRP foi incubado por 10 min com a TOM/PS (200 µg/mL) e por 15 min com a TOM/1-F4 (100 µg/mL) ou DMSO 0,08% (CONTROLE) e a agregação foi induzida pelo EPI (40 µM). Os resultados representam média ± E.P.M. das porcentagens de agregação em relação ao controle (100%) de 6 experimentos. * $p < 0,05$ vs controle (ANOVA, Tukey *post hoc*).

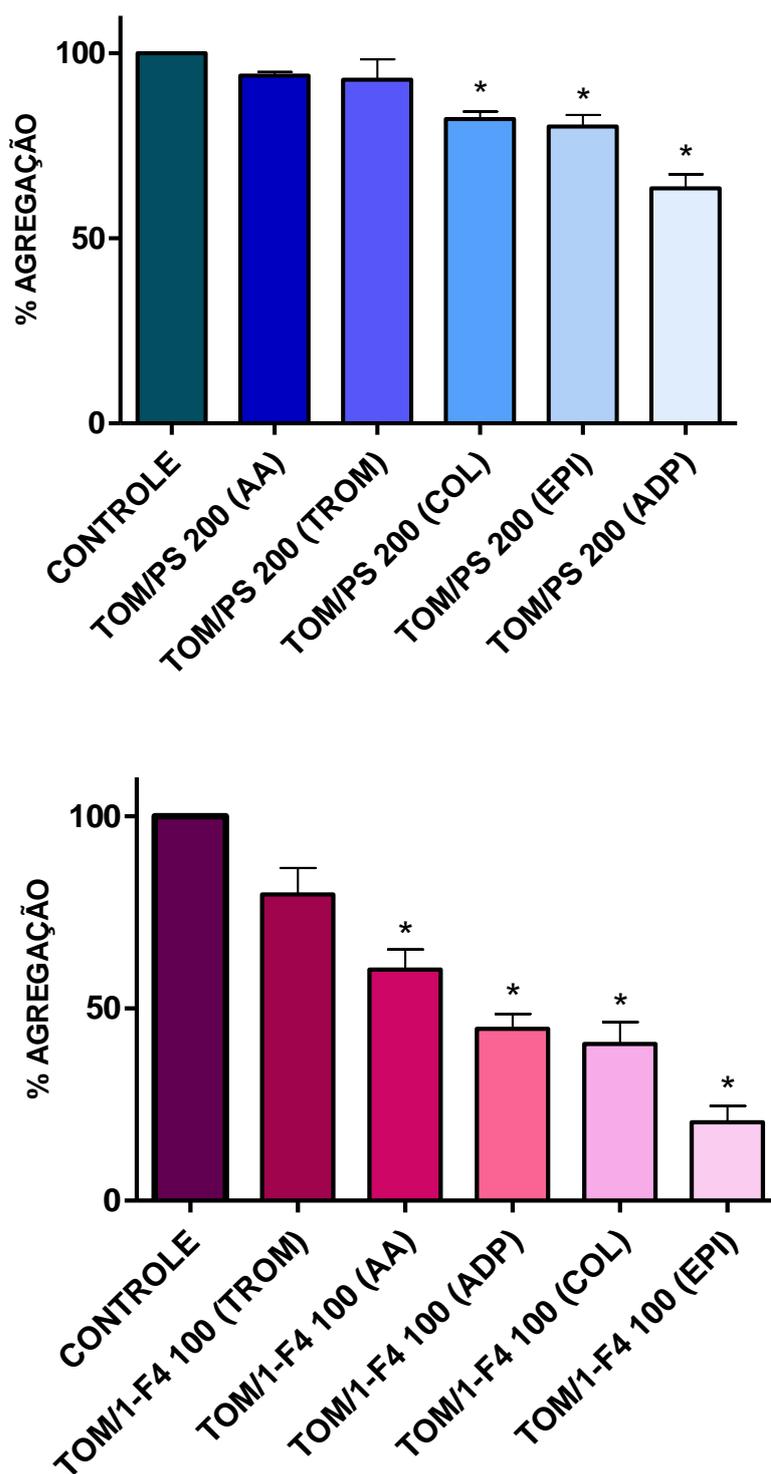


Figura 24. Efeito da TOM/PS e da fração TOM/1-F4 na agregação plaquetária induzida por TROM, ADP, AA, EPI e COL em plasma humano: estudo comparativo. O PRP foi incubado por 10 min com a TOM/PS (200 µg/mL) e por 15 min com a TOM/1-F4 (100 µg/mL) ou DMSO 0,08% (CONTROLE) e a agregação foi induzida pela TROM (1 U/ml), AA (1 mM), ADP (2 µM), COL (2 µg/mL) ou EPI (40 µM). Os resultados representam média ± E.P.M. das porcentagens de agregação em relação ao controle (100%) de 6 experimentos. * $p < 0,05$ vs controle (ANOVA, Tukey *post hoc*).

5.3. Avaliação do efeito antiagregante plaquetário da TOM/PS na ausência e na presença de AAS, Ticlopidina, L-arginina ou Pentoxifilina em plasma humano

Como pode ser observado na **Figura 25** a TOM/PS (100 µg/mL) na presença do AAS (25µM), inibidor inespecífico da COX, não mostrou alteração significativa no seu efeito antiagregante plaquetário (% agreg.: 64,5 ± 6,4) quando comparado ao grupo TOM/PS (% agreg.: 77,4 ± 2,8). Quando a TOM/PS (100 µg/mL) foi avaliada na presença de L-ARG (10 µg/mL), um substrato para a enzima óxido nítrico sintase (% agreg.: 81,6 ± 3,0) ou na presença de PTX (120 µg/mL), inibidor da fosfodiesterase (% agreg.: 72,0 ± 4,4), a tintura apresentou uma redução significativa no percentual de agregação quando comparada a TOM/PS sozinha (% agreg.: 91,9 ± 1,9; 92,7 ± 1,1, respectivamente) (**Figuras 26 e 27**).

No entanto, a adição da TIC (250 µM), antagonista de receptores purinérgicos P2Y₁₂, sucedida pela adição de TOM/PS (100 µg/mL), resultou em uma redução mais pronunciada do percentual de agregação (TOM/PS + TIC: 18,7 ± 2,8) em relação ao controle (100%), TOM/PS (% agreg.: 84,1 ± 2,6) ou TIC (57,6 ± 5,8) (**Figura 28**).

5.4. Efeito antiagregante plaquetário da TOM/PS em plasma humano: papel do NO/ GC/ GMPc

Na **Figura 29** pode ser verificado o efeito antiagregante plaquetário da TOM/PS (% agreg.: 84,1 ± 2,9) em relação ao controle (% agreg.: 100), que por sua vez não foi revertido na presença de ODQ, inibidor da guanilato ciclase (TOM/PS + ODQ: 73,3 ± 5,9). Resultados distintos foram observados para o SNP, doador de NO, que teve seu efeito antiagregante plaquetário (% agreg.: 37,8 ± 5,2) significativamente revertido pela pré-incubação do ODQ (SNP + ODQ - % agreg.: 103,6 ± 4,0).

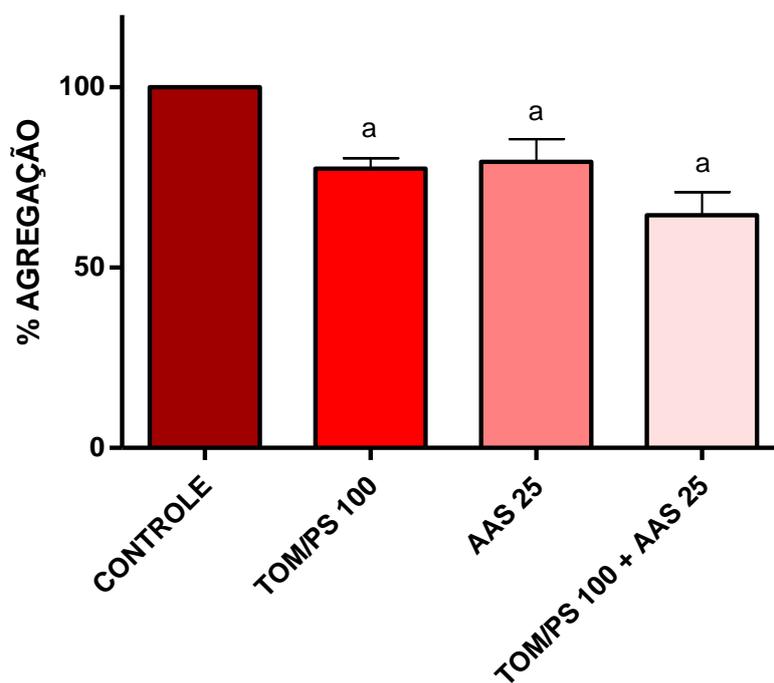


Figura 25. Efeito da TOM/PS na presença ou ausência de AAS na agregação plaquetária induzida por ADP em plasma humano. O PRP foi incubado por 10 min com a TOM/PS (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) e por 5 min com o AAS 25 μM antes da adição da TOM/PS ou DMSO 0,08% (CONTROLE) e a agregação foi induzida pelo ADP (2 μM). Os resultados representam a média \pm E.P.M. das porcentagens de agregação em relação ao controle (100%) de 4 experimentos. a vs controle; b vs TOM/PS ($p < 0,05$ ANOVA, Tukey *post hoc*).

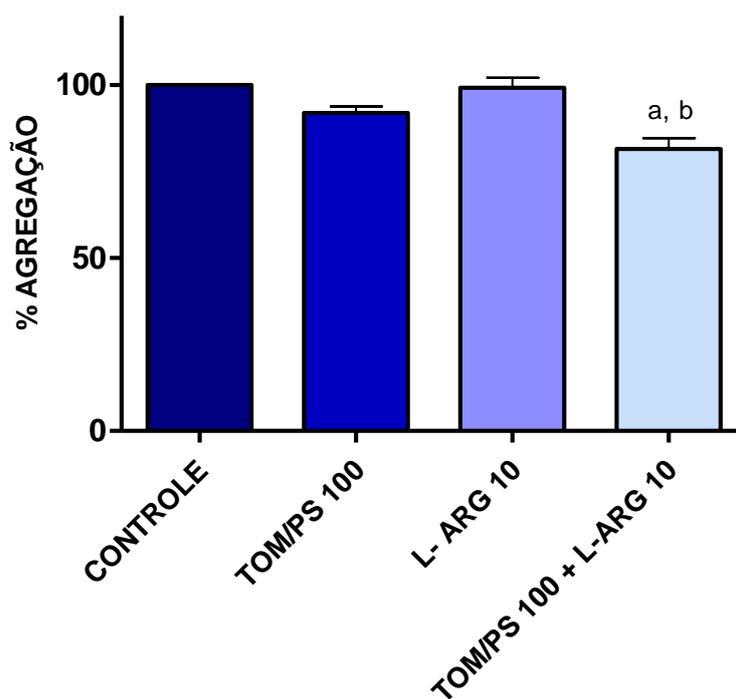


Figura 26. Efeito da TOM/PS na presença ou ausência de L-ARG na agregação plaquetária induzida por ADP em plasma humano. O PRP foi incubado por 10 min com a TOM/PS (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) e por 5 min com L-ARG 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ antes da adição da TOM/PS ou DMSO 0,08% (CONTROLE) e a agregação foi induzida pelo ADP (2 μM). Os resultados representam média \pm E.P.M. das porcentagens de agregação em relação ao controle (100%) de 4 experimentos. a vs controle; b vs TOM/PS ($p < 0,05$ ANOVA, Tukey *post hoc*).

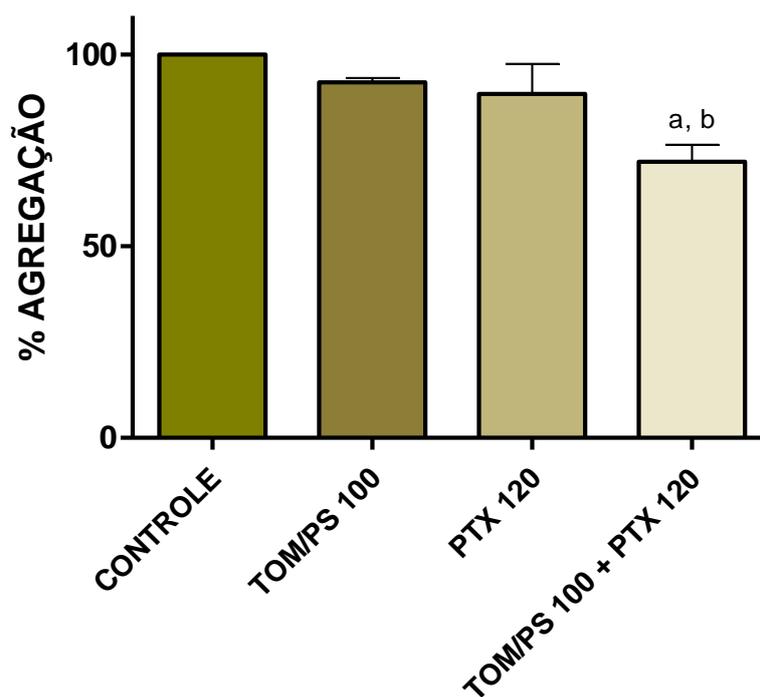


Figura 27. Efeito da TOM/PS na presença ou ausência de PTX na agregação plaquetária induzida por ADP em plasma humano. O PRP foi incubado por 10 min com a TOM/PS (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) e por 5 min com PTX 120 $\mu\text{g}/\text{mL}$ antes da adição da TOM/PS ou DMSO 0,08% (CONTROLE) e a agregação foi induzida pelo ADP (2 μM). Os resultados representam média \pm E.P.M. das porcentagens de agregação em relação ao controle (100%) de 4 experimentos. a vs controle; b vs TOM/PS ($p < 0,05$ ANOVA, Tukey *post hoc*).

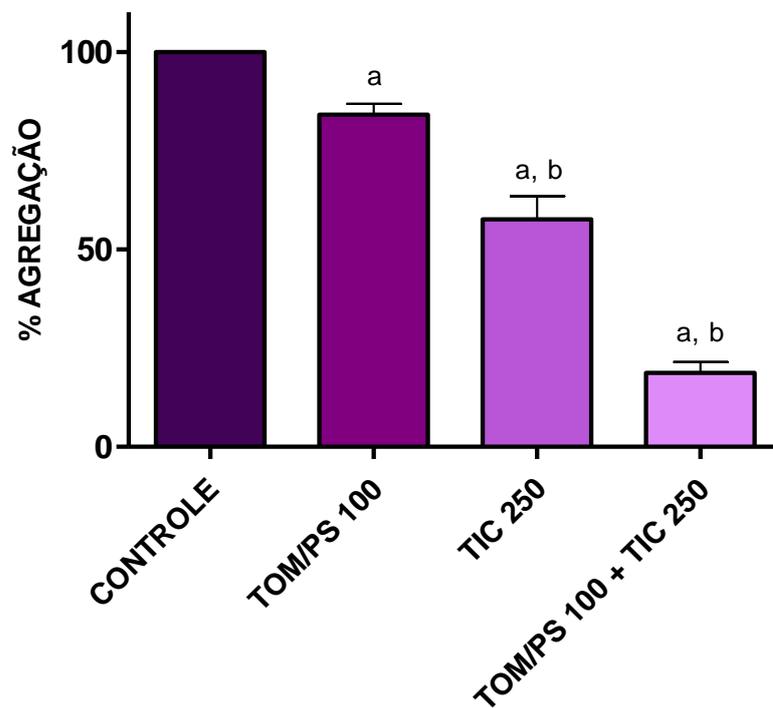


Figura 28. Efeito da TOM/PS na presença ou ausência de TIC na agregação plaquetária induzida por ADP em plasma humano. O PRP foi incubado por 10 min com a TOM/PS (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) e por 5 min com TIC 250 μM antes da adição da TOM/PS ou DMSO 0,08% (CONTROLE) e a agregação foi induzida pelo ADP (2 μM). Os resultados representam média \pm E.P.M. das porcentagens de agregação em relação ao controle (100%) de 4 experimentos. a vs controle; b vs TOM/PS ($p < 0,05$ ANOVA, Tukey *post hoc*).

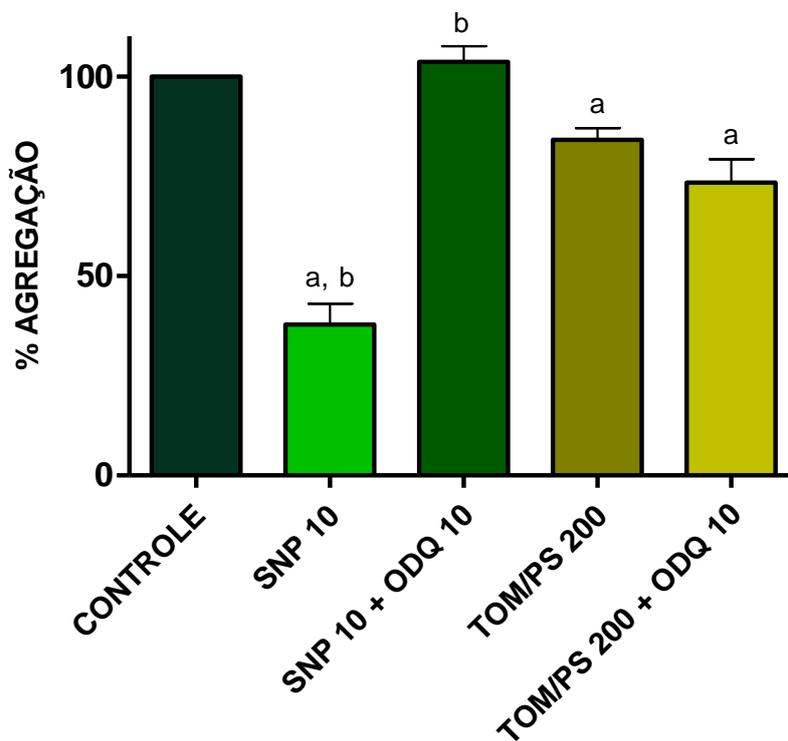


Figura 29. Efeito da TOM/PS e SNP na presença ou ausência de ODQ na agregação plaquetária induzida por ADP em plasma humano. O PRP foi incubado por 10 min com a TOM/PS (200 $\mu\text{g}/\text{mL}$) ou SNP (10 μM) e por 5 min com ODQ (10 μM) antes da adição da TOM/PS, SNP ou DMSO 0,08% (CONTROLE) e a agregação foi induzida pelo ADP (2 μM). Os resultados representam média \pm E.P.M. das porcentagens de agregação em relação ao controle (100%) de 4 experimentos. a vs controle; b vs TOM/PS ($p < 0,05$ ANOVA, Tukey *post hoc*).

5.5. Estudo comparativo dos efeitos das tinturas de *O. macrocarpa* (TOM/PS) e *C. scammonia* (TCS/PS) e Aguardente Alemã[®] (AAL) na agregação plaquetária induzida por ADP em plasma humano

Para efeito de comparação também foram realizados estudos com a tintura de *Convolvulus scammonia* (TCS) e o fitoterápico Aguardente Alemã[®] (AAL).

A TOM/PS (100, 200, 300 e 400 µg/mL) foi capaz de inibir significativamente (* $p < 0,05$) a agregação plaquetária induzida por ADP, enquanto a TCS/PS em nenhuma das concentrações (50, 100, 200, 300 e 400 µg/mL) investigadas interferiu significativamente na agregação induzida por ADP em plasma humano (**Figura 30**). Prosseguindo os estudos comparativos, também foi observado que ao contrário da TOM/PS, tanto a TCS/PS quanto a AAL não inibiram significativamente a agregação plaquetária induzida por ADP em PRP humano (**Figura 31**).

5.6. Avaliação da atividade antioxidante da TOM/PS no teste de DPPH

Dando continuidade aos estudos, pode ser observado na **Figura 32** que a TOM/PS (50, 100, 200, 400 e 500 µg/ml) a partir da concentração de 200 µg/mL apresentou atividade antioxidante, com redução significativa das absorbâncias ($2,45 \pm 0,06$; $1,87 \pm 0,08$; $1,51 \pm 0,09$) quando comparada ao controle ($3,07 \pm 0,04$). A Vitamina E 50 µg/mL, droga antioxidante, também mostrou redução significativa da absorbância (Abs.: $2,79 \pm 0,05$).

5.7. Efeito da TOM/PS sobre o tempo de sangramento em camundongos

Foi observado que o pré-tratamento de camundongos Swiss com a TOM/PS (400 mg/kg, v.o.) foi capaz de aumentar o tempo de sangramento dos animais ($10,3 \pm 1,0$ min) de forma significante (* $p < 0,05$) quando comparado ao grupo controle ($3,3 \pm 0,3$ min). Resultados semelhantes foram observados nos animais pré-tratados com AAS (100 mg/kg, v.o.) ($13,2 \pm 1,9$ min) (**Figura 33**).

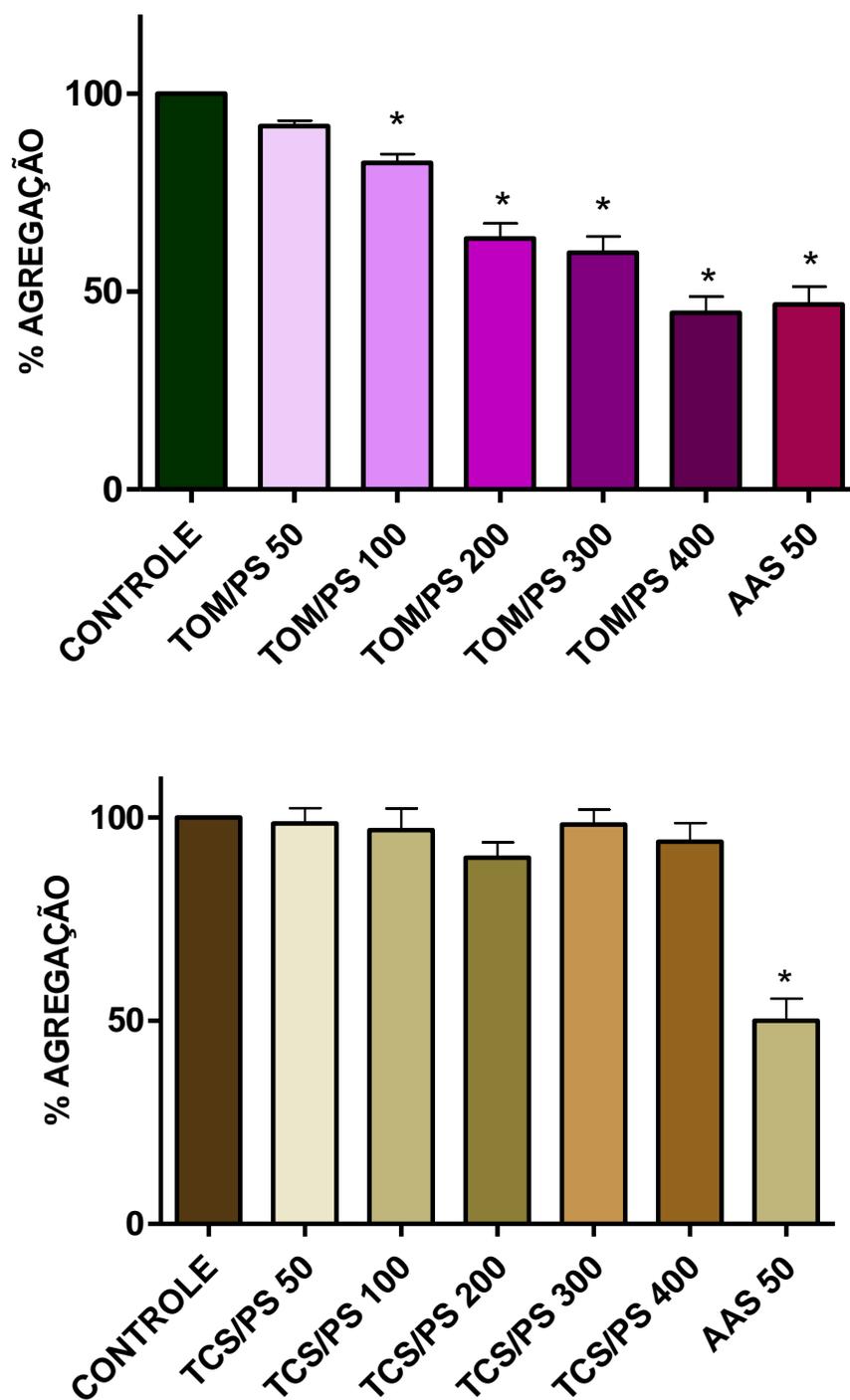


Figura 30. Efeito da tintura de *C. scammonia* constituída por precipitado e sobrenadante (TCS/PS) em relação à TOM/PS na agregação plaquetária induzida por ADP em plasma humano: estudo comparativo. O PRP foi incubado por 10 min. com TCS/PS ou TOM/PS (50, 100, 200, 300 e 400 µg/mL), AAS (50 µM) ou DMSO 0,08% (CONTROLE) e a agregação foi induzida por ADP (2 µM). Os resultados representam a média ± E.P.M. das porcentagens de agregação em relação ao controle (100%) de 8 experimentos. * $p < 0,05$ vs controle (ANOVA, Tukey *post hoc*).

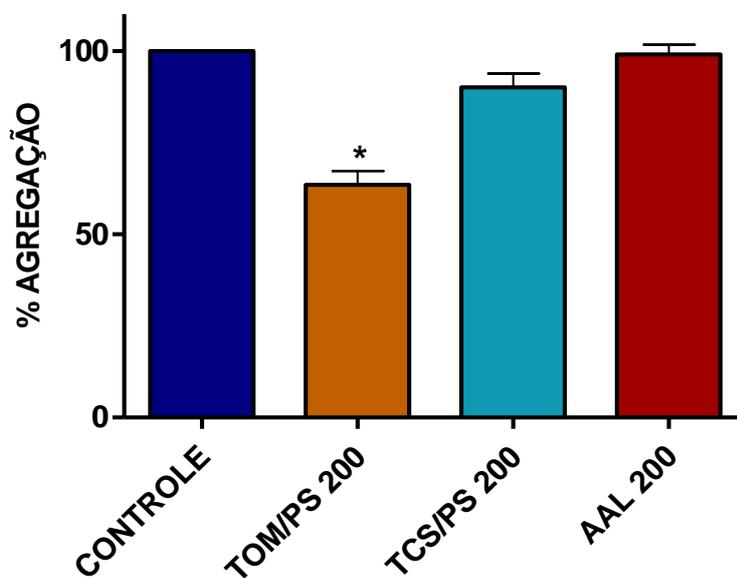


Figura 31. Efeitos das tinturas de *O. macrocarpa* (TOM/PS) e *C. scammonia* (TCS/PS) e Aguardente Alemã (AAL) na agregação plaquetária induzida por ADP em plasma humano: estudo comparativo. O PRP foi incubado por 10 min. com TCS/PS, TOM/PS ou AAL (200 µg/mL) ou DMSO 0,08% (CONTROLE) e a agregação foi induzida por ADP (2 µM). Os resultados representam média ± E.P.M. das porcentagens de agregação em relação ao controle (100%) de 5 experimentos. * $p < 0,05$ vs controle (ANOVA, Tukey *post hoc*).

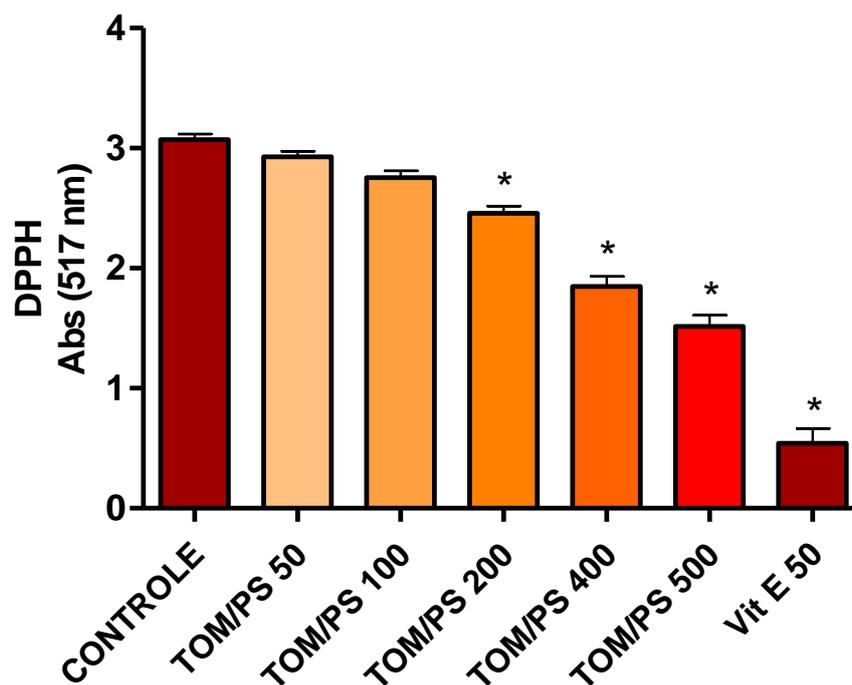


Figura 32. Avaliação da capacidade sequestrante de radicais livres da TOM/PS (50, 100, 200, 400 e 500 $\mu\text{g/mL}$) e da vitamina E determinada pelo teste de DPPH. Valores representam a média \pm E.P.M.de 4 experimentos (* $p < 0,05$, ANOVA e Tukey post hoc)

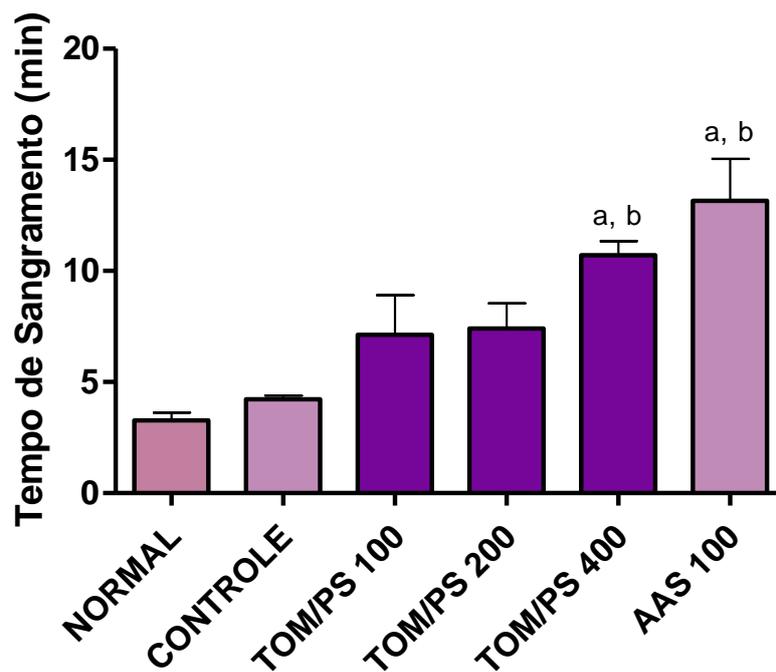


Figura 33. Efeito da TOM/PS ou AAS sobre tempo de sangramento segundo método de secção da cauda. Os animais foram tratados por 10 dias consecutivos com a TOM/PS (100, 200 ou 400mg/kg), AAS (100mg/kg), água (controle) ou Tween 80 a 4% (Controle - Veículo). Os valores representam a média \pm E.P.M. a vs normal; b vs controle ($p < 0,05$ ANOVA, Tukey *post hoc*).

5.8. Efeitos da TOM/PS e fração TOM/1-F4 sobre o tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPa) e tempo de protrombina (TP) em plasma humano

Nas **Figuras 34 e 35** foram investigados os efeitos da TOM/PS e fração TOM/1-F4 sobre a via intrínseca da coagulação, medido através do tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPa). Foi observado que a TOM/PS (200 e 400 µg/mL) não aumentou o tempo de tromboplastina parcial ativada ($46,6 \pm 1,6$ e $51,5 \pm 3,8$ s, respectivamente) em relação ao grupo controle ($40,3 \pm 1,2$ s) enquanto a Heparina (0,1 U/mL), anticoagulante, aumentou significativamente esse tempo ($100,9 \pm 7,6$ s). Resultados semelhantes foram observados na avaliação da fração TOM/1-F4.

Para investigação da via extrínseca da coagulação foi avaliado o tempo de protrombina (TP) em plasma humano. Na **Figura 36** foi demonstrado que a TOM/PS (200 e 400 µg/mL) não aumentou o TP ($12,5 \pm 0,2$ e $13,9 \pm 0,4$ s) quando comparada ao grupo controle ($11,7 \pm 0,2$ s). Da mesma forma, quando testada, a fração TOM/1-F4 (100 e 200 µg/mL) ($13,3 \pm 0,2$; $13,7 \pm 0,3$ s) não apresentou resultados significantes quando comparada ao grupo controle ($12,4 \pm 0,3$ s) (**Figura 37**).

5.9. Avaliação preliminar da toxicidade da tintura obtida de *Operculina macrocarpa* (TOM/PS)

5.9.1. Efeitos gerais da TOM/PS – teste hipocrático em camundongos

Na avaliação da toxicidade aguda da TOM/PS em camundongos Swiss, os animais (n= 6) tratados com TOM/PS (50, 100, 200, 400, 600 e 800 mg/kg, v.o) em dose única, apresentaram comportamento normal durante todo o período de observação, 3 dias, em relação ao grupo controle (veículo). Porém, a administração da TOM/PS nas doses maiores (600 e 800 mg/kg, v.o.) causou episódios diarreicos em 33 e 25% dos animais tratados. Quanto aos demais parâmetros avaliados não foram verificadas alterações, nem tampouco registro de morte. Assim a DL50 da TOM/PS encontra-se acima 800 mg/Kg.

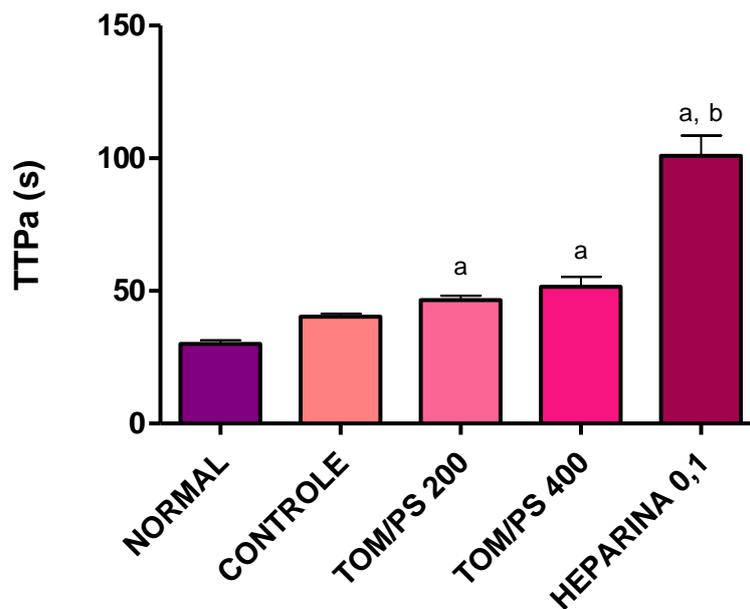


Figura 34. Efeito da TOM/PS na coagulação determinado através do teste de tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPa) (via intrínseca). O PPP foi incubado com TOM/PS (200 e 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$), Heparina (0,1U/mL) ou DMSO 0,08% (CONTROLE) por 10 min e depois foi avaliado o tempo de coagulação através do TTPa. Valores representam a média \pm E.P.M. a vs normal; b vs controle ($p < 0,05$ ANOVA, Tukey *post hoc*).

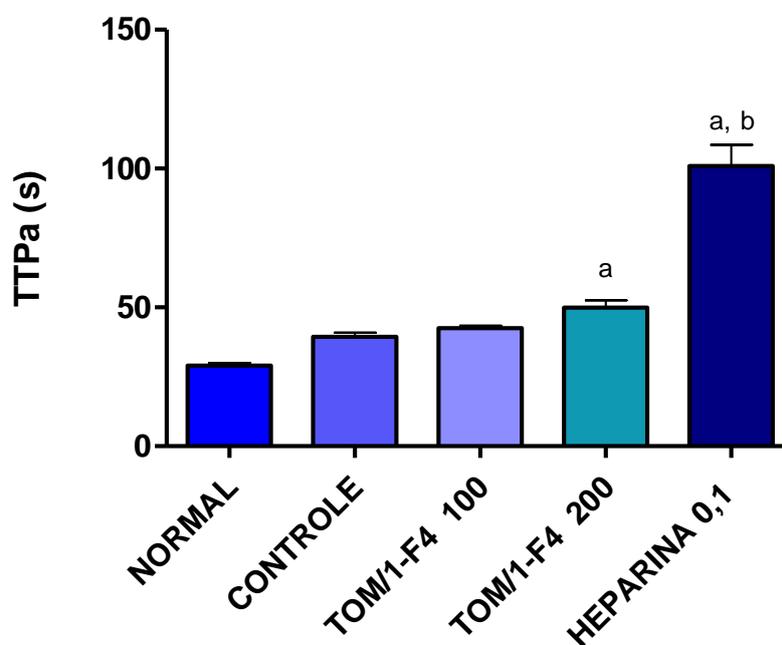


Figura 35. Efeito da TOM/1-F4 na coagulação determinado através do teste de tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPa) (via intrínseca). O PPP foi incubado com TOM/1-F4 (100 e 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$), Heparina (0,1U/mL) ou DMSO 0,08% (CONTROLE) por 10 min depois foi avaliado o tempo de coagulação através do TTPa. Valores representam média \pm E.P.M. a vs normal; b vs controle ($p < 0,05$ ANOVA, Tukey *post hoc*).

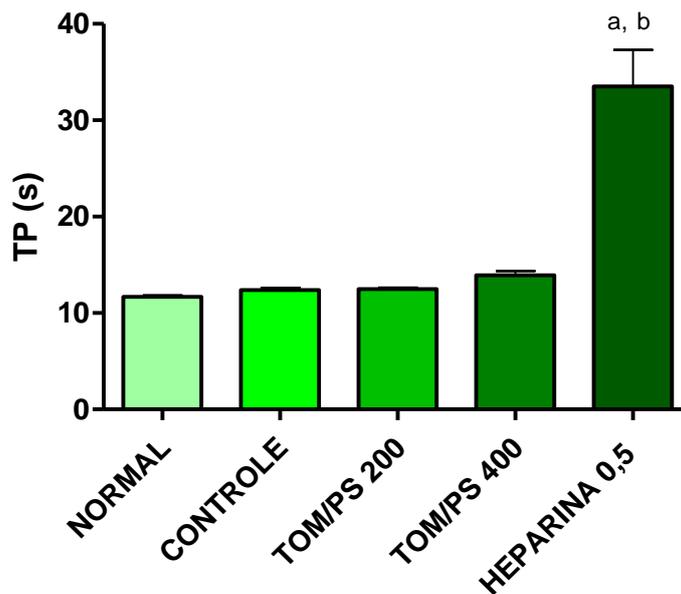


Figura 36. Efeito da TOM/PS na coagulação determinado através do teste de tempo de protrombina (TP) (via extrínseca). O PPP foi incubado com TOM/PS (200 e 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$), DMSO 0,08% (CONTROLE) ou Heparina (0,1 UI/mL) por 10 min e depois foi avaliado o tempo de coagulação através do TP. Valores representam média \pm E.P.M. a vs normal; b vs controle ($p < 0,05$ ANOVA, Tukey *post hoc*).

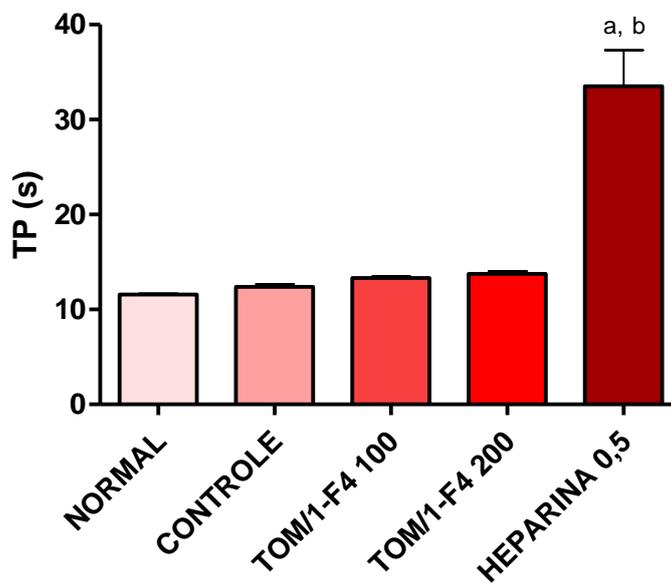


Figura 37. Efeito da TOM/1-F4 na coagulação determinado através do teste de tempo de protrombina (TP) (via extrínseca). O PPP foi incubado com TOM/1-F4 (100 e 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$) ou DMSO 0,08% (CONTROLE) ou Heparina (0,1 UI/mL) (controle positivo) por 10 min depois foi avaliado o tempo de coagulação através do TP. Valores representam média \pm E.P.M a vs normal; b vs controle ($p < 0,05$ ANOVA, Tukey *post hoc*).

5.9.2. Avaliação da citotoxicidade da TOM/PS em neutrófilos humano

A **Figura 38** representa o efeito da TOM/PS sobre a toxicidade de neutrófilos humano mensurada através da enzima LDH. Pode-se observar que a TOM/PS nas concentrações de 100 e 200 $\mu\text{g/mL}$, aumentou significativamente a atividade da LDH ($188,6 \pm 19,9$ e $251,6 \pm 22,2$ U/L, respectivamente) quando comparada ao grupo controle ($61,0 \pm 9,6$ U/L).

A citotoxicidade da TOM/PS também foi avaliada pelo teste do MTT. Pode ser observado que a adição da TOM/PS (100 e 200 $\mu\text{g/mL}$) aos neutrófilos humano causou uma redução da viabilidade celular em torno de 51,6 e 68,8%, respectivamente em relação ao grupo controle (**Figura 39**).

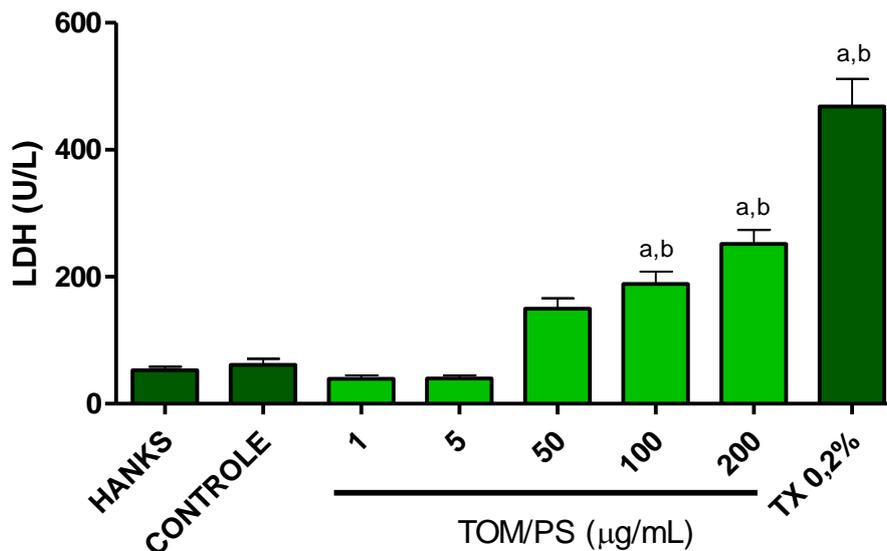


Figura 38. Avaliação da toxicidade da TOM/PS em neutrófilos humano mensurada através da atividade da enzima lactato desidrogenase (LDH). Neutrófilos ($2,5 \times 10^6$ células/mL) foram incubados com TOM/PS (1, 5, 50, 100 e 200 $\mu\text{g/mL}$) e após 15 min foi determinada a atividade da enzima LDH. Hanks: células não tratadas; Tx: Tritron X – 100 (0,2%, v/v) – padrão citotóxico; Controle – Veículo (DMSO 1%). Valores representam média \pm E.P.M. a vs. Hanks; b vs. controle; $p < 0,05$, ANOVA e Tukey *post hoc*.

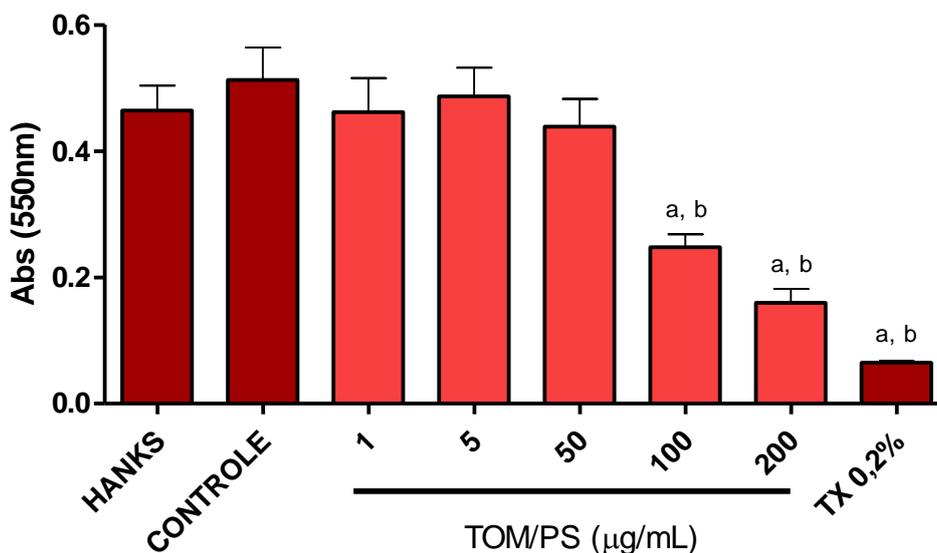


Figura 39. Efeito da TOM/PS sobre a citotoxicidade determinada através do teste de MTT. Neutrófilos ($2,5 \times 10^6$ células/mL) foram incubados com TOM/PS (1, 5, 50, 100 e 200 $\mu\text{g/mL}$) e 3h depois foi avaliada a viabilidade celular através do teste de MTT. Hanks: células não tratadas; Tx: Tritron X – 100 (0,2%, v/v) – padrão citotóxico; Controle – Veículo (DMSO 1%). Valores representam média \pm E.P.M. a vs. Hanks; b vs. controle; $p < 0,05$, ANOVA e Tukey *post hoc*.

6. DISCUSSÃO

O presente estudo interdisciplinar (química-farmacologia) investigou o potencial antiagregante plaquetário da tintura e frações de *O. macrocarpa* de forma pioneira, em plasma humano *in vitro*, com emprego de vários agonistas. Além disso, foram avaliados também o potencial anticoagulante, antioxidante e efeitos tóxicos da planta.

Operculina macrocarpa (L.) Urb. (Convolvulaceae), é uma trepadeira de aspecto ornamental mais conhecida popularmente no Nordeste como batata-de-purga ou jalapa. A raiz é utilizada na medicina popular como laxativo, purgativo e “depurativo” isto é para “afinar” e “limpar” o sangue (MARTINS et al., 2000; MATOS, 1982). No Nordeste a indústria emprega a tintura de *O. macrocarpa* na formulação de fitoterápico indicado como laxativo, embora a população utilize esse produto principalmente no tratamento de problemas circulatórios, como trombose (CARVALHO et al., 2003).

Inicialmente, a tintura de *O. macrocarpa* (TOM) (66,7 % EtOH em água) foi caracterizada quanto ao teor de resina ($1,38 \pm 0,47\text{g}\%$), perfil cromatográfico (CLAE-DAD), com identificação de três ácidos fenólicos (clorogênico, caféico e gálico), e determinação do teor de fenóis totais (0,14 g%) por espectrofotometria.

A avaliação dos produtos derivados de *O. macrocarpa* sobre a agregação de plaquetas humanas deu-se em plasma citratado rico em plaquetas, sendo empregado para tanto como agente agregante o ADP ($2\mu\text{M}$). *In vitro*, o ADP pode induzir os dois tipos de agregação, primária (reversível), em baixas concentrações (0,1 a $0,5\mu\text{M}$) e secundária (irreversível), em concentrações elevadas, que variam de 2 a $5\mu\text{M}$ (YARDUMIAN et al., 1986).

Para avaliação da bioatividade da TOM foi eliminado previamente o etanol do produto, que resultou na obtenção de um precipitado (TOM/P) e de um sobrenadante (TOM/S). O precipitado (TOM/P) na maior dose (200 $\mu\text{g}/\text{mL}$) causou uma maior redução na agregação de plaquetas induzida por ADP em relação ao sobrenadante (TOM/S), enquanto na mesma concentração, a TOM/PS mostrou um efeito antiagregante comparável a TOM/P em plasma humano. Assim, diante dos resultados obtidos foram iniciados estudos químicos da TOM, que resultou inicialmente na obtenção da TOM/1 e TOM/2, onde apenas a TOM/1 mostrou atividade antiagregante plaquetária na agregação induzida por ADP em plasma humano. O fracionamento

químico da TOM/1 resultou na obtenção de uma fração orgânica (TOM/1-F) que mostrou atividade antiagregante plaquetária. Essa fração foi submetida a novas etapas de purificação com emprego de métodos cromatográficos utilizando solventes com polaridade crescente, que resultou em quatro novas frações (TOM/1-F1-4). Dessas, a TOM/1-F4 foi a que apresentou maior atividade antiagregante plaquetária, inclusive na concentração de 100 µg/mL o efeito obtido foi comparável ao AAS (50 µM) na agregação induzida por ADP em plasma humano.

Embora o ADP seja considerado um fraco ativador de plaquetas, ele tem um papel chave na hemostasia. Uma vez secretado pelos grânulos densos das plaquetas ativadas, o ADP amplifica a própria resposta agregante, bem como de outros agonistas incluindo colágeno, TXA₂, epinefrina e serotonina (OHLMANN et al., 2000). A agregação plaquetária induzida por ADP envolve pelo menos três tipos de receptores. O receptor purinérgico P2Y₁, que é acoplado à proteína G_q e causa mobilização do cálcio intracelular, além de ser responsável pela mudança de forma da plaqueta, enquanto o P2Y₁₂, sendo acoplado proteína G_i, causa inibição da adenilato ciclase, sendo responsável pela amplificação e conclusão da resposta. Um terceiro receptor, o P2X₁ ao mediar fluxos iônicos mostrou ser mais sensível ao ATP (CATTANEO & GACHET, 2001). Assim, os resultados obtidos no presente estudo mostram de maneira inédita, que a tintura e a fração orgânica de *O. macrocarpa*, especialmente a TOM/1-F4, possuem atividade antiagregante plaquetária em plasma humano, que pode estar relacionada a um bloqueio de receptores purinérgicos ou a uma modulação na resposta promovida pela ativação das plaquetas.

Uma das características mais marcantes da família Convolvulaceae é a presença de fileiras de células secretoras de resinas glicosídicas em tecidos foliares e, especialmente, em suas raízes. Estas substâncias constituem uma das características quimiotaxonômicas desta família, e o emprego na medicina tradicional de plantas de alguns gêneros (*Convolvulus*, *Exogonium*, *Ipomoea*, *Merremia* e *Operculina*) está associado à propriedade purgativa de suas resinas (GARCIA-ARGÁEZ; PÉREZ-AMADOR, 1997; PÉREZ-AMADOR et al., 1998). Contudo, considerando o efeito antiagregante plaquetário observado pela TOM/P, TOM/1 e fração TOM/1-F4 que foram obtidos do precipitado da planta rico em resinas, é possível que essas substâncias contribuam também para o efeito antiagregante plaquetário de *O. macrocarpa*.

Corroboram com essa hipótese, estudos realizados por diversos autores, como GUH e cols. (1995), que mostraram que o gingerol, um metabólito isolado de *Zingiber officinale*, planta rica em elementos resinosos (FILHO & MURTA, 1999) foi capaz de inibir a agregação plaquetária induzida por ácido araquidônico e colágeno. Estudo recente (YI et al., 2010) também demonstrou o potencial antiagregante plaquetário *in vivo* e *in vitro* da resina de algumas plantas, como *Daemonorops draco* e *Dracaena cochinchinensis*, espécies utilizadas tradicionalmente na China para facilitar a circulação sanguínea.

Perfil cromatográfico (CLAE-DAD) da TOM/PS e da fração TOM/1-F4 realizado no nosso laboratório mostrou a presença de três ácidos fenólicos (clorogênico, caféico e gálico), além de outros compostos (Tr: 16,012; 16,751 e 18,307 min) a serem definidos quimicamente em estudo posterior. Esses dados corroboram com estudo anterior (MICHELIN, 2008), que mostrou a presença de vários compostos fenólicos no extrato etanólico do tubérculo de *O. macrocarpa*, como os ácidos clorogênico, ácido caféico e dímero do ácido caféico. Além disso, Michelin (2004) ao realizar um estudo fitoquímico de *O. macrocarpa*, determinou através de análise de espectros de RMN de ^{13}C , a presença de mais três fenóis na fração acetato de etila da planta, os ácidos caféico e protocatecúico e um dímero do ácido caféico.

Vários estudos têm mostrado o potencial antiagregante plaquetários de compostos fenólicos. Pabon e cols. (2008) mostraram que o ácido clorogênico, metabólito presente nos tubérculos da espécie *Solanum tuberosum*, da família Solanaceae, possui atividade antiagregante plaquetária em plaquetas humanas frente ao ADP, por mecanismo semelhante ao AAS. Outros autores (HSIAO et al., 2007; CHENG et al., 2007) também demonstraram que um derivado do ácido caféico é capaz de inibir a agregação plaquetária induzida por colágeno, e que esta inibição parece ser modulada pelo aumento dos níveis de GMPc. Enquanto Lim e cols. (2004) demonstraram que o ácido gálico é capaz de inibir a agregação plaquetária induzida por colágeno e ácido araquidônico.

Assim, diante do exposto, possivelmente os compostos fenólicos presentes na tintura e fração TOM/1-F4 de *O. macrocarpa*, são ao lado da resina responsáveis pelo menos em parte pela atividade antiagregante plaquetária da planta.

Diante dos resultados obtidos com a TOM e considerando que se trata da matéria-prima ativa majoritária da Aguardente Alemã® (AAL) ou Tintura de Jalapa Composta, foram investigados também o efeito antiagregante plaquetário da AAL, bem como da Tintura de *Convolvulus scammonia*, também matéria-prima ativa da AAL. Tanto a AAL quanto a TCS não interferiram na agregação de plaquetas induzida por ADP em plasma humano. Possivelmente a ausência de efeito antiagregante plaquetário da Aguardente Alemã® na agregação induzida por ADP em PRP humano, pode estar relacionado à presença da escamônia no fitoterápico, que por sua vez também não mostrou atividade antiagregante plaquetária.

Moléculas como a frangulina B isolada de *Rhamnus formosana* (TENG et al., 1993) exerce seu efeito antiagregante plaquetário por uma ação específica nos receptores de colágeno na membrana plaquetária, outros como o clopidogrel, exerce seus efeitos através da inibição de receptores purinérgicos P2Y₁₂ na plaqueta (GOODMAN & GILMAN, 2010; HAMILTON, 2008; MACKMAN, 2008). Desta forma, prosseguindo com os estudos farmacológicos de *O. macrocarpa* foram investigados os efeitos antiagregante plaquetários da TOM/PS e da fração TOM/1 –F4 sobre a agregação induzida por vários agonistas, como trombina, ácido araquidônico, colágeno e epinefrina. Ainda, foram avaliados o efeito antiagregante dessas drogas testes na presença de conhecidos inibidores da agregação plaquetária.

A TOM/PS e fração TOM/1-F4 não interferiram ou não mostraram um efeito pronunciado na agregação de plaquetas induzida por trombina em plasma humano. A trombina tem um papel fundamental na manutenção da homeostase, sendo classificada como um agonista forte, capaz de estimular a secreção de grânulos plaquetários na ausência de agregação plaquetária. A trombina ativa as plaquetas através de receptores ativados por protease ligados a proteína G (PARs), sendo conhecidos quatro subtipos, PAR-1, PAR-2, PAR-3 e PAR-4 (WEISS, 1982; BAHOU, 2007; HAMILTON, 2008).

A TOM/PS não interferiu na agregação induzida por ácido araquidônico (AA) e em relação aos demais agonistas investigados a TOM/PS mostrou maior redução da agregação plaquetária quando esta foi induzida por ADP. Por outro lado, a TOM/1-F4 interferiu significativamente na agregação de plaquetas induzida por AA, colágeno, ADP e de maneira mais pronunciada na agregação induzida por epinefrina.

O colágeno presente na região subendotelial, depois de uma lesão, é exposto à superfície da parede vascular e exerce um papel importante na ativação plaquetária, evento que inicia o processo de reparo da lesão (CLEMETSON, 1999). Como o colágeno pode interagir com diversas proteínas, uma grande variedade de receptores tem sido descritos para esse agonista (COLMAN, 1991). No entanto, estudos sugerem que a glicoproteína Ia/IIa (GPIa/IIa) e a glicoproteína VI (GPVI) parecem ter um papel importante na modulação da ativação plaquetária induzida por colágeno (SAVAGE & RUGGERI, 2007). Foi demonstrado que GPVI é especificamente necessária para a ativação de plaquetas humanas por colágeno e o estímulo pelo colágeno induz a fosforilação da tirosina da cadeia gama do receptor Fc (FcR) presente na plaqueta (MOROI et al., 1989; GIBBINS et al., 1997). Outro estudo (INOUE et al., 1999), utilizando agonistas específicos para GPVI e GPIa/IIa, permitiu comparar as vias de transdução de sinal mediada por esses receptores na plaqueta. A ativação dessas vias resultou em respostas similares: agregação, elevação do Ca^{2+} citoplasmático e fosforilação da tirosina das mesmas proteínas. No entanto, ao contrário de GPVI, a maioria dos fenômenos induzidos por estimulação de GPIa/IIa foram acentuadamente inibidos pela aspirina, indicando que a transdução do sinal via GPIa/IIa e não através de GPVI, requer a produção de TXA_2 , um produto do metabolismo do AA na plaqueta que induz a vasoconstrição e agregação plaquetária.

Estudos têm demonstrado que a epinefrina, pode exercer seus efeitos na agregação plaquetária por várias vias de sinalização: através da metabolização do AA (com formação do TXA_2 , aumento dos níveis de Ca^{2+} intracelular, exposição do receptor GPIIb/IIIa, liberação de ADP e outros fatores), ou através da hidrólise de fosfatidilinositol (via PLC, com mobilização de Ca^{2+} citoplasmático, formação de TXA_2 e resultante agregação) ou mesmo por redução dos níveis de AMPc (através da inibição da adenilato ciclase previamente estimulada por PGI_2 ou PGE_1). No entanto, é importante ressaltar que os efeitos da epinefrina, parecem ser mediados através da ativação de receptores α_2 adrenérgicos presentes nas plaquetas (YUN-CHOI et al., 2000), sendo estes do subtipo α_2A (MUSTONEN et al., 2000). Corroboram com essa fato, estudos (MUSTONEN et al., 2000) que mostram que o Atipamezole, um inibidor seletivo de receptores α_2 adrenérgicos, é capaz de inibir seletivamente a agregação plaquetária induzida por epinefrina.

Diante dos resultados obtidos, possivelmente pelo menos parte do efeito antiagregante plaquetário da TOM/1-F4 frente ao colágeno, AA e epinefrina parece estar relacionado, por exemplo, a uma modulação na resposta plaquetária induzida por esses agonistas, como a síntese de TXA₂, mobilização e influxo de cálcio. Contudo, estudos adicionais são necessários para comprovar essa hipótese.

A avaliação do efeito da TOM/PS sobre a agregação de plaquetas induzida por ADP na ausência e na presença de conhecidos inibidores da agregação plaquetária, como AAS, L-Arginina, pentoxifilina e ticlopidina, mostrou inicialmente que AAS não modificou significativamente o efeito da TOM/PS. Esse dado corrobora os resultados anteriores onde a TOM/PS não interferiu na agregação induzida por AA em plasma humano. O AAS inibe irreversivelmente a enzima ciclooxigenase, impedindo a formação de TXA₂ nas plaquetas ativadas. Assim, o efeito antiagregante plaquetário da TOM/PS parece não estar relacionado ao metabolismo do AA.

O óxido nítrico (NO) resultante de células do endotélio vascular é capaz de inibir a adesão, agregação e desagregação de plaquetas *in vivo* e *in vitro* (RADOMSKI & MONCADA, 1993), além de aumentar a expressão do receptor de fibrinogênio (GPIIb/IIIa) ativado (MICHELSON et al., 1996). Esta molécula atua como um potente inibidor da agregação plaquetária em resposta a vários agonistas, via ativação da guanilato ciclase solúvel, que leva ao aumento dos níveis intracelulares de GMPc (ANFOSSI et al., 1999).

O NO é sintetizado a partir do átomo de nitrogênio guanidino terminal fornecido pela L-ARG, por ação da enzima NO sintase (NOS). Atualmente, três isoformas da NOS foram identificadas: a NOS_n (neuronal), NOS_e (endotelial) e a NOS_i (induzível) (FORSTERMANN & KLEINERT, 1995). A NOS_n é uma isoforma constitutiva, dependente de Ca²⁺/Calmodulina e libera NO por curto período de tempo, em resposta a estimulação do receptor. A NOS_i é encontrada em macrófagos e PMN ativados e sua ativação independe de Ca²⁺ e uma vez expressa, esta é capaz de sintetizar NO por períodos de tempo prolongados (MONCADA & HIGGS, 1991). Ambas as enzimas são inibidas *in vivo* e *in vitro* por análogos da L-ARG, como o L-NAME e L-NMMA. Alguns estudos demonstraram a presença de isoformas de NOS induzível e constitutiva em plaquetas humanas (MEHTA et al., 1995; SASE & MICHEL, 1995; CHEN & MEHTA, 1996).

Em indivíduos saudáveis, a infusão sistêmica de L-ARG produz inibição da agregação plaquetária (BODE-BOGER et al., 1994), enquanto a infusão de LNMMA resulta em aumento da resposta das plaquetas à vários agonistas (BODZENTA-LUKASZYLE et al., 1994). Contudo, tais estudos não permitem a separação dos efeitos do NO derivado do endotélio ou daquele sintetizado pelas plaquetas. Diversos trabalhos demonstram que a agregação de plaquetas humanas induzida *in vitro* em resposta ao colágeno, ADP e outros agonistas, é inibida, via aumento de GMPc, pela pré-incubação com L-ARG e aumentada pela pré-incubação com L-NAME e L-NMMA, sugerindo o envolvimento do NO derivado de plaquetas no controle da função plaquetária (RADOMSKI et al., 1990; MARIETTA et al., 1997; ANFOSSI et al., 1999).

O efeito da associação da TOM/PS com L-ARG aumentou em apenas 10,4 % o potencial antiagregante da TOM/PS. Assim, para confirmar o papel do NO no efeito antiagregante plaquetário da TOM/PS foi investigado seu efeito na presença do ODQ, um inibidor seletivo da guanilato ciclase. Resultados mostraram que ao contrário do nitroprussiato de sódio, doador de NO, que inibiu a agregação e teve seus efeitos revertidos pela ação do ODQ, a TOM/PS não mostrou mudança significativa no seu efeito antiagregante plaquetário. Assim, possivelmente a via NO/GC/GMPc não tem papel importante no efeito antiagregante plaquetário da TOM/PS.

Além do GMPc, outro importante nucleotídeo cíclico, o AMPc, é capaz de modular a função plaquetária. Uma elevação nos níveis de nucleotídeos cíclicos, AMPc e GMPc, pela ativação da adenilato ou guanilato ciclase, respectivamente, ou pela inibição da fosfodiesterase (PDE), constitui a via inibitória mais potente para regular a ativação plaquetária, visto que ambos inibem a adesão e agregação induzida por diferentes agonistas, assim como a secreção do conteúdo dos grânulos das plaquetas (RADOMSKI et al., 1987; LIAO et al., 1998). Segundo HERSTRUP e cols. (1994), ambos AMPc e GMPc estão envolvidos em respostas plaquetárias como agregação, secreção de ATP, fosforilação de proteínas, mobilização de Ca^{2+} intracelular e ativação da GPIIb/IIIa. Os níveis de nucleotídeos cíclicos são mantidos pelo balanço entre a taxa de síntese pela adenilato ou guanilato ciclase e pela taxa de hidrólise pela PDE.

A pentoxifilina (PTX) é uma metilxantina, usada no tratamento de doenças vasculares periféricas. Este efeito benéfico da PTX parece ser exercido através da inibição da agregação plaquetária, como relatado por diversos autores (NENCI et al.,

1981; DE LA CRUZ et al., 1993). Um aumento nos níveis de AMPc nas plaquetas (via inibição da PDE) e um aumento na síntese de PGI₂ pelo endotélio vascular parecem ser os mecanismos pelos quais a PTX promove a inibição da agregação plaquetária (BERKENBOOM et al., 1991). A associação da TOM/PS à PTX aumentou em 20,7 % o efeito antiagregante plaquetário da TOM/PS, sugerindo que pelo menos parte do efeito da TOM/PS parece estar relacionado a participação de PDE, contudo estudos posteriores são necessários para confirmação dessa hipótese.

A agregação plaquetária induzida por ADP envolve pelo menos três tipos de receptores purinérgicos P2Y₁, P2Y₁₂ e P2X₁ (CATTANEO & GACHET, 2001). Estudos têm mostrado que a ticlopidina e o clopidogrel, drogas antiagregante plaquetárias, exercem seus efeitos através da inibição da ação do ADP no receptor P2Y₁₂ (NURDEN et al., 1995; OHLMANN et al., 2000; HOLLOPETER et al., 2001). No presente estudo foi observado que a TOM/PS teve seu efeito antiagregante plaquetário aumentado em 65,4 % quando na presença da ticlopidina. Assim, diante dos resultados obtidos até o momento acerca da atividade antiagregante plaquetária da TOM/PS, possivelmente parte de seu efeito envolve a participação de subtipos de receptores purinérgicos na plaqueta, mas a modulação de outras respostas plaquetária pela TOM/PS não podem ser descartadas.

A aterosclerose é uma doença silenciosa que pode levar o paciente a vários eventos clínicos, como angina instável, infarto do miocárdio e morte súbita. Dentro deste processo, as plaquetas desempenham um papel importante no desenvolvimento da lesão aterosclerótica, seja diretamente, quando há dano ao endotélio vascular ou através da liberação de diversos fatores que induzem o processo de coagulação. Estudos mostram que compostos com atividade antioxidante ao inibirem a liberação de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) podem atrasar o processo aterosclerótico (TZENG et al., 1991; FORMICA & REGELSON, 1995).

Corroboram com esse fato estudos que mostraram que agentes oxidantes tais como ferro e H₂O₂ podem induzir a agregação de plaquetas humanas. Também foi sugerido que associações entre a peroxidação lipídica induzida por metais e a geração de radicais livres podem modular a função plaquetária (PRINCIPE et al., 1985; INAZU et al., 1990; VILLALOBOS et al., 1990). Segundo Salvemini & Botting (1993) os radicais O₂⁻ e OH⁻ podem ser produzidos no processo de ativação plaquetária e o radical

superóxido é capaz de promover a liberação de serotonina, que tem propriedades vasodilatadora e agregante plaquetária. Além disso, o radical hidroxila induz a agregação plaquetária ativando a fosfolipase A₂ com conseqüente liberação e metabolismo do AA.

Estudos mostraram que o alfa tocoferol, além de suas propriedades antioxidantes, exerce atividade antiagregante plaquetária frente a diversos agonistas, inibindo a atividade da ciclooxigenase e formação de peróxidos de lipídios *in vitro* (STEINER & ANASTASI, 1976; AGRADI et al., 1981). Segundo Beretz & Cazenove (1991), os flavonóides, além de suas atividades antioxidantes bastante conhecidas, são bons candidatos para o desenvolvimento de fármacos antitrombóticos, visto que atuam como potentes inibidores da função plaquetária. Como exemplo, podemos relacionar a quercetina, que exerce parte de seus efeitos prevenindo a oxidação da lipoproteína de baixa densidade (FORMICA & REGELSON, 1995), que possivelmente somado a ação inibitória sobre a ciclooxigenase favorece seu efeito antiagregante plaquetário (TZENG et al., 1991; FORMICA & REGELSON, 1995).

Diante do exposto, foi avaliada a possível ação seqüestradora de radicais livres da TOM/PS através do teste do radical 1,1- difenil-2-picrilhidrazila (DPPH). O método é baseado na redução de soluções alcoólicas de DPPH na presença de um antioxidante doador de hidrogênio. A TOM/PS apresentou discreta atividade antioxidante no teste realizado, que corroboram com resultados obtidos anteriormente por Michelin (2008). Além disso, os resultados sugerem que o efeito sequestrador de radicais livres da TOM/PS, possivelmente pode estar contribuindo para sua atividade antiagregante plaquetária. No entanto, estudos adicionais delineando-se novas abordagens experimentais são necessários para confirmar seu potencial antioxidante.

O sangramento ocasionado pela incisão da cauda de ratos pode ser um exemplo de hemorragia e hemostasia provocadas por injúria mecânica, e o tempo de sangramento pode ser considerado como um indicador da atividade hemostática total (TAKAHASHI, 2000). Segundo De Gaetano e cols. (1977) a inibição da agregação plaquetária causada por ADP, mas não pelo colágeno, determina o prolongamento do tempo de sangramento em ratos. Além disso, de acordo com Maffrand e cols (1988), a ativação de plaquetas durante a hemostasia primária de ratos envolve o ADP e é sensível a defeitos, na função da plaqueta dependente de ADP ou na coagulação.

Tanaka e cols (1998) relataram que o tempo de sangramento em ratos não foi alterado pela aspirina ou pelo composto Z-335 (antagonista do receptor de TXA₂), mas foi significativamente prolongado pela ticlopidina (antagonista do receptor de ADP). Esses dados sugerem que na hemostasia primária em ratos o TXA₂ parece não estar envolvido, enquanto que o ADP pode ter um papel importante. O aumento do tempo de sangramento em ratos por ticlopidina ou clopidogrel também foi demonstrado por Takahashi e cols (2000).

Wang e cols. (1985) mostraram que a capsaicina (inibidor da ciclooxigenase) prolongou o tempo de sangramento provocado por incisão na cauda de camundongos e esse efeito foi similar ao da aspirina ou indometacina. Esses resultados foram contrários àqueles obtidos por Tanaka e cols (1998) em ratos.

Diante do exposto, o prolongamento do tempo de sangramento em camundongos provocado pela TOM/PS foi avaliado, sendo observado que a TOM/PS na dose de 400 mg/kg, foi capaz de aumentar o tempo de sangramento em camundongos de forma semelhante ao AAS 100 mg/kg, utilizado como droga padrão. Desta forma, tais resultados corroboram com o potencial antiagregante plaquetário *in vitro* apresentado pela TOM/PS. No entanto estudos adicionais são necessários para elucidação dos mecanismos de ação envolvidos nesse processo.

Como foi visto anteriormente, a hemostase é um mecanismo constituído por vários sistemas biológicos interdependentes, cuja maior finalidade é conservar a integridade do sistema circulatório. No entanto, para que este mecanismo ocorra é necessária a intervenção de 4 fases distintas: a fase vascular, a fase plaquetária, a fase de coagulação e a fase fibrinolítica. A fase da coagulação tem como objetivo a produção de trombina, que atua sobre o fibrinogênio para produzir uma rede de fibrina, que permite a estabilização do coágulo (ZAGO et al., 2005).

Existem duas vias distintas para iniciar o processo de coagulação, que depois convergem e usam uma via comum para formar o produto final, a trombina. Estas vias iniciais denominam-se via extrínseca e intrínseca (ZAGO et al., 2005). Contudo, estudo recente (FERREIRA et al., 2010) tem proposto um novo modelo da cascata de coagulação sanguínea baseado nas superfícies celulares.

O tempo de protrombina (TP), também denominado teste de Quick, mede o tempo de coagulação do plasma na presença de tromboplastina cálcica tecidual e pode ser considerado um indicador da eficiência da via extrínseca do sistema de coagulação. Embora originalmente considerada uma medida da atividade da protrombina, sabe-se hoje que depende também da reação dos fatores V, VII e X e da concentração de fibrinogênio. Já o teste para avaliação do tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPa) mede o tempo de coagulação do plasma após a ativação de fatores de contato, sem adição de tromboplastina tecidual, e é um indicador da eficiência da via intrínseca da coagulação (ZAGO et al., 2005). No presente estudo, nem a TOM/PS ou tampouco a TOM/1-F4 interferiram nos tempos de protrombina e de tromboplastina parcial, sugerindo que provavelmente estes não possuem atividade anticoagulante.

Diante do potencial farmacológico da TOM/PS e TOM/1-F4, identificado através dos estudos químico-farmacológicos, foi investigado de maneira preliminar o grau de segurança da planta através de teste hipocrático em camundongos e de citotoxicidade em células sanguíneas, neutrófilo humano.

Na avaliação da toxicidade aguda da TOM/PS em camundongos Swiss, foi observado que a tintura não alterou o comportamento dos animais, nem provocou a morte. Contudo, foi observado episódios diarréicos por parte dos animais nas maiores doses, 600 e 800 mg/Kg, v.o. Resultados semelhantes foram obtidos por Michelin (2004) que inclusive determinou a DL50 (3,8 g/Kg, v.o.) do extrato hidroalcoólico (70 % EtOH em água) do tubérculo de *O. macrocarpa*.

A citotoxicidade da TOM/PS em neutrófilo humano foi investigada através da determinação da atividade lactato desidrogenase (LDH) no meio extracelular e do teste do MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2)-2,5-difeniltetrazólio). É importante destacar que nenhum teste *in vitro* é capaz de satisfazer completamente todos os requisitos para comprovar a ação tóxica de uma droga teste, afinal estes não consideram os efeitos integrados que ocorrem no organismo como um todo, bem como o efeito da biotransformação de compostos (SLABBERT e VENTER, 1999; BRADY e GRAY, 1995). Por outro lado, é importante ressaltar que o uso de sistemas *in vitro* permite uma maior eficácia no controle das condições do ensaio, diminui a variabilidade entre as experiências, produz menor quantidade de resíduos tóxicos e geralmente proporciona a

obtenção mais rápida de resultados, além de contribuir para a elucidação do mecanismo de ação (BAKSI & FRAZIER, 1990).

A mensuração da atividade da LDH no meio extracelular permite detectar possível alteração na permeabilidade da membrana celular. A enzima LDH é um tetrâmero de quatro subunidades com quatro locais de ligação independentes (GUPTA et al., 1991). A mesma é citosólica e por isso seus níveis no soro são normalmente baixos. No entanto, quando ocorrem lesões nos tecidos, pode ocorrer um aumento desta enzima no meio extracelular e no sangue (PEAKALL, 1992). A TOM/PS a partir da concentração de 100 µg/mL aumentou significativamente a atividade da LDH, sugerindo, portanto uma relativa citotoxicidade do produto por alteração na permeabilidade da membrana plasmática.

O teste do MTT é um método de avaliação da citotoxicidade rápido, sensível e barato, onde a viabilidade celular é mensurada pela habilidade das desidrogenases mitocondriais reduzirem o sal de tetrazolium (MTT, cor amarela) a um sal de formazan, de cor roxa, sendo a intensidade desta cor proporcional a atividade metabólica celular (VERMA et al., 2010). O método também é amplamente utilizado na avaliação *in vitro* da viabilidade ou atividade metabólica de cultura de células (SIEUWERTS et al., 1995), seja de mamíferos ou de protozoários, como promastigotas (BERG et al., 1994) e amastigotas do gênero *Leishmania* (SERENO & LEMESRE, 1997). No presente estudo a TOM/PS nas concentrações de 100 e 200 µg/mL apresentou citotoxicidade significativa em relação ao controle.

Diante dos resultados obtidos, pode-se observar que a TOM/PS até a dose de 800 mg/Kg administrada por via oral em camundongos não mostrou sinais toxicidade aguda graves. Por outro lado, na avaliação *in vitro* em cultura primária de neutrófilo humano a tintura mostrou uma citotoxicidade relativa possivelmente por alterações na membrana plasmática e no sistema metabólico celular.

7. CONCLUSÕES

A realização dos estudos químico-farmacológicos de *Operculina macrocarpa* (jalapa) nos permitiu concluir que:

- ✓ A tintura de *O. macrocarpa*, matéria-prima majoritária do fitoterápico Aguardente Alemã[®], à semelhança da fração TOM/1-F4 da planta possui atividade antiagregante plaquetária em plasma humano. Por outro lado a Aguardente Alemã e a tintura de *C. scammonia* não mostraram atividade antiagregante plaquetária.
- ✓ Dentre os produtos derivados de *O. macrocarpa*, a fração TOM/1-F4 foi a que apresentou maior efeito antiagregante plaquetário, inclusive comparável ao AAS, na agregação induzida por ADP em plasma humano.
- ✓ O efeito antiagregante plaquetário da TOM/1-F4 parece resultar de uma ação através de diferentes mecanismos, podendo incluir tanto uma ação sobre receptores quanto modulação na síntese de mediadores químicos como TXA₂.
- ✓ Pelo menos parte da atividade antiagregante plaquetária da TOM/PS parece envolver a participação de receptores purinérgicos, embora outro(s) mecanismo(s) de ação possam também estar envolvidos.
- ✓ O sistema NO/GC/GMPc parece não possuir um papel importante no efeito antiagregante plaquetário da TOM/PS. Por outro lado, parte do efeito da TOM/PS pode estar relacionado a uma possível inibição da PDE.
- ✓ Estudo preliminar mostrou o potencial antioxidante da TOM/PS, que pode estar contribuindo para sua atividade antiagregante plaquetária.
- ✓ A TOM/PS apresentou prolongamento do tempo de sangramento em camundongos, corroborando com o potencial antiagregante plaquetário *in vitro*, mas não na coagulação sanguínea.
- ✓ A TOM/PS apresentou ausência de toxicidade aguda em camundongos enquanto em cultura primária de neutrófilos humano foi verificada uma citotoxicidade relativa.

O presente estudo demonstrou, de maneira inédita, a atividade antiagregante plaquetária da tintura e da fração orgânica (TOM/1-F4) obtidas do tubérculo de jalapa. Esse efeito está possivelmente relacionado à presença de resina e compostos fenólicos na planta, embora não possa ser descartada a participação de outros compostos. Por fim, os resultados obtidos corroboram com o uso popular da jalapa, mas não confirmou o potencial antiagregante plaquetário da Aguardente Alemã. Contudo, estudos químico-farmacológicos adicionais são necessários para maiores esclarecimentos acerca da natureza química da fração orgânica, bem como acerca do mecanismo de ação antiagregante plaquetário da planta.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGRADI, E.; PETRONI, A.; SOCINI, A.; GALLI, C. In vitro effects of synthetic antioxidants and vitamin E on arachidonic acid metabolism and thromboxane formation in human platelets and on platelet aggregation. **Prostaglandins.**, v.22, n. 2, p. 255-66, 1981.

ALMEIDA, D. S.; COSTA, S. S.; ALMEIDA, A. P.; FRATTANI, F.; ASSAFIM, M.; ZINGALI, R. B. Metabólitos secundários de origem vegetal: uma fonte potencial de fármacos antitrombóticos. **Quím. Nova**, v. 33, n. 1, p. 172-180, 2010.

ANFOSSI, G.; RUSSO, I.; MASSUCO, P.; MATTIELLO, L.; PERNA, P.; TASSONE, F.; TROVATI, M. L-arginine modulates aggregation and intracellular cyclic 3',5'-guanosine monophosphate levels in human platelets: Direct effect and interplay with antioxidative thiol agent. **Thromb. Res.** v. 94, p. 307-316, 1999.

AUSTIN, D. F. **Convolvulaceae (Morning Glory Family)**, 1997. Disponível em: <<http://www.fau.edu/>> Acesso em 02 jun. 2011.

AUSTRALIAN CENTER FOR BLOOD DISEASES. Thrombosis Research Unit, 2008. Disponível em: <<http://www.acbd.monash.org/research/thrombosis-research.>> Acesso em 02 jun. 2011.

BAHOU, W.F. Thrombin Receptors. In: MICHELSON, A. D. **Platelets**. California: Academic Press, 2007.

BAKSI, S. M.; FRAZIER, J. M. Isolated fish hepatocytes – model systems for toxicology research: review. **Aquat. Toxicol.**, v. 16, p. 229-256, 1990.

BERETZ, A.; CAZENAVE, J.P. Old and new natural products as the source of modern antithrombotic drugs. **Planta Med.**, v. 57, n.7, S68-72. 1991.

BERG, K.; ZHAI, L.; CHEN, M.; KHARAZMI, A.; OWEN, T.C. The use of a water-soluble formazan complex to quantitate the cell number and mitochondrial function of *Leishmania major* promastigotes. **Parasitol. Res.**, v. 80, n. 3, p. 235-239, 1994.

BERKENBOOM, G.; FANG, Z. -Y.; UNGER, P.; GOLDMAN, M.; FONTAINE, J. Endothelium-dependent effects of pentoxifylline in rat aorta. **Eur. J. Pharmacol.** v. 193, p. 81-86, 1991.

BHATT, D. L.; TOPOL, E. J. Scientific and Therapeutic advances in antiplatelet therapy. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 2, p. 15-28, 2003.

BODE-BOGER, S. M.; BOGER, R. H.; CREUTZIG, A.; TSIKAS, D.; GUTZKI, F. M. L-arginine infusion decreases peripheral arterial resistance and inhibits platelet aggregation in healthy subjects. **Clin. Sci.**, v. 87, p. 303-310, 1994.

BODZENTA-LUKASZYŁE, A.; GABRYELEWICZ, A.; LUKASZYK, M.; BIELAWIEC, J. W.; KONTUREK, J.W.; DOMSCHKE, W. Nitric oxide synthase inhibition and platelet function. **Thromb. Res.**, v. 75, p. 667-672, 1994.

BORN, G.V. Aggregation of blood platelets by adenosine diphosphate and its reversal. **Nature.**, v.194, p.927-929, 1962.

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

BRADY, M. C.; GRAY, J. A. Use of in vitro cell systems for the prediction of toxicity and mechanistic studies. **Toxicology and Ecotoxicology News**, v. 2, n. 1, p. 92-95, 1995.

BRAGA, R. **Plantas do Nordeste, Especialmente do Ceará**, 3. ed. Fortaleza: Imprensa Oficial, 1976, p. 76-77.

BRASS, L. F.; STALKER, T. J.; ZHU, L.; WOULFE, D. S. Signal Transduction During Platelet Plug Formation. **Platelets**. California: Academic Press, 2007.

BRASS, L. F. Understanding and evaluating platelet function. **Hematology Am Soc Hematol Educ Program.**, p. 387-96, 2010

CALIXTO, J. B. Biodiversidade como fonte de medicamentos. **Ciênc. Cultura**, v. 55, n.3, 2003.

CARDIN, V. S. G. Das plantas medicinais e a biopirataria. **Disputationes**, v. 1, p. 345-375, 2006.

CARRICONDE, C.; MORES, D.; FRITSCHEN, M.V. et al. **Plantas medicinais & plantas alimentícias**. Olinda: Centro Nordestino de Medicina Popular, Universidade Federal Rural de Pernambuco, v.1, p. 153, 1995.

CARVALHO, D. M. S.; VENERANDA, A. L. F.; SILVEIRA, P.; FRANCELINO, E.; COELHO, H. L. L.; FONTELES, M. M. F. Post-marketing surveillance of the Aguardente Alemã product. In: PHARMATECH, 7th, 2003, João Pessoa. **Anais**, João Pessoa, 2003, p. 87.

CATTANEO, M.; GACHET, C. The platelet ADP receptors. **Haematologica**, v. 86, p. 346-348, 2001.

CHARO, I.F.; FEINMAN, R.D.; DETWILER, T.C. Interrelations of platelet aggregation and secretion. **J Clin Invest.**, v. 60, n. 4, p. 866-873, 1977.

CHENG, T.G.; LEE, J.J.; LIN, K.H.; SHEN, C.H.; CHOU, D.S.; SHEU, J.R. Antiplatelet activity of caffeic acid phenethyl ester is mediated through a cyclic GMP-dependent pathway in human platelets. **Chin J Physiol.**, Jun v. 50, n.3, p. 121-126, 2007.

CHEN, L. Y.; MEHTA, J. L. Further evidence of the presence of constitutive and inducible nitric oxide synthase isoforms in human platelets. **J. Cardiovasc. Pharmacol.** v. 27, n. 1, p. 154-158, 1996.

CLEMETSON, K. J. Platelet collagen receptors: a new target for inhibition. **Haemostasis**, v. 29, n. 1, p. 16 - 26, 1999.

COLMAN, R. W. Receptors that activate platelets. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.** v. 197, n. 3, p. 242-248, 1991.

COSTA, A. F. **Farmacognosia**. 2. ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 1982.

CRUZ, G. L. **Dicionário das plantas úteis do Brasil**. 4. ed. Rio de Janeiro: Bertrand Brasil, 1980.

DE GAETANO, G.; CAVENAGHI, A.E.; STELLA, L. Ditzazole and platelets. II. Effect of ditzazole on in vivo platelet aggregation and bleeding time in rats. **Haemostasis.**, v. 6, n.3, p. 190-196, 1977.

DE LA CRUZ, J. P.; ROMERO, M. M.; SANCHEZ, P.; SANCHEZ DE LA CUESTA, F. Antiplatelet effect of pentoxifylline in human whole blood. **Gen. Pharmacol.**, v. 24, p. 605-609, 1993.

DOPHEIDE, S. M.; YAO, C. L. and JACKSON, S. P. Dynamic aspects of platelet adhesion under flow. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v. 28, p. 355-363, 2001.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA. 1. ed. São Paulo: Siqueira, 1926.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA. 2. ed. São Paulo: Siqueira, 1959.

FARNSWORTH, N.R.; KAAS, C.J. An approach utilizing information from traditional medicine to identify tumor-inhibiting plants. **J Ethnopharmacol.** v. 3, n. 1, p. 85-99, 1981.

FEIJGE, M. A.; ANSINKA, K.; VABSCHOONBEEK, K.; HEEMSKERK, J. W. M. Control of platelet activation by cyclic AMP turnover and cyclic nucleotide phosphodiesterase type-3. **Biochemical Pharmacology**, v. 67, p. 1559–1567, 2004.

FEIJÓ, J. S. Coleção descritiva das plantas da Capitania do Ceará, *In*: Nobre, G. **Estudo da coleção descritiva das plantas da Capitania do Ceará**, Fortaleza: ed. do autor, p 281, 1799.

FERREIRA, C. N.; SOUSA, M. O.; DUSSE, L. M. S.; CARVALHO, M. G. O novo modelo da cascata de coagulação baseado nas superfícies celulares e sua implicações. **Rev. Bras. de Hemat. e Hemot.** v. 32, n. 5, p. 416-421, 2010.

FILHO, A. Z.; MURTA, A. L. Extração do óleo e resinas de gengibre encontrado no litoral paranaense (*Zingiber officinale* Roscoe) **Boletim Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**. Curitiba, v. 17, n. 2 , 1999.

FONSECA, F. N.; FERREIRA, M. A.; NUNES, O. D.; FUJIMURA, A. H.; PESSOA, O. D.; LEMOS, T. L.; VIANA, G. S.; PEREIRA, R. F. ; QUEIROZ, M. G.; FERREIRA, M. A. D.;VIANA, G. S. B. ; LEAL, L. K. A. M. Avaliação Toxicológica Pré-clínica da Aguardente Alemã. **In: SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL**, 19., 2006, Salvador.

FONTENELE, J. B.; LEAL, L. K. A. M.; SILVEIRA, E. R.; FELIX, F. H., FELIPE, C. B.; VIANA, G. S. B. Antiplatelets effects of pipartine, an alkamide isolated from *Piper tuberculatum*: possible involvement of cyclooxygenase blockade and antioxidant activity. **Journal of Pharmacy and Pharmacology (JPP)**, v. 61, p. 1-5, 2009.

FORMICA, J.V.; REGELSON, W. Review of the biology of Quercetin and related bioflavonoids. **Food Chem Toxicol.**, v. 33, n. 12, p. 1061-1080, 1995.

FORSTERMANN, U.; KLEINERT, H. Nitric oxide synthase: expression and expressional control of the three isoforms. *Naunyn Schmiedebergs. Arch. Pharmacol.*, v. 352, p. 351-364, 1995.

FURCHGOTT, R.F.; ZAWADZKI, J.V. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. **Nature.**, v. 27;288(5789), p. 373-376, 1980.

GACHET, C. ADP Receptors of platelets and their inhibition. **Thromb. haemost.**, v. 86, p. 222-232, 2001.

GIBBINS, J. M.; OKUMA, M.; FARNDAL, R., BARNES, M.; WATSON, S. P. Glycoprotein VI is the collagen receptor in platelets which underlies tyrosine phosphorylation of the Fc receptor gamma – chain. **FEBS Lett.**, v. 413, n. 2, p. 255 - 259, 1997.

GILMAN, A.G. G-proteins and dual control of adenylate cyclase. **Cell.**; v. 36, p. 577-579, 1984.

GOODMAN & GILMAN. **As Bases Farmacológicas da Terapêutica**. 11ª edição, Rio de Janeiro: McGraw-Hill Interamericana, 2010.

GUERRA, M. P.; NODARI, R. O. Biodiversidade: aspectos biológicos, geográficos, legais e éticos. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; PALLAZO-DE-MELLO, J. C.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Porto Alegre/Florianópolis, 5a ed., Ed. Universidade-UFRGS, Ed. UFSC, cap. 1, p. 13-24, 2004.

GUH, J.H.; KO, F.N.; JONG, T.T.; TENG, C.M. Antiplatelet effect of gingerol isolated from *Zingiber officinale*. **J Pharm Pharmacol.**, v. 47, n. 4, p. 329-332, 1995.

GUPTA, R. C.; GOAD, J. T.; KADEL, W.L. In vivo alterations in lactate dehydrogenase (LDH) and LDH isoenzymes patterns by acute carbofuran intoxication. **Arch. Environ. Contam. Toxicol.**, v. 21, n. 2, p. 263-269, 1991.

HAMILTON, J. R. Protease-activated receptors as targets for antiplatelet therapy. **Blood Reviews**. v.23, n.2, p. 61-65, 2008.

HAMPTON, K. K.; PRESTON, F. E. Bleeding disorders, thrombosis and anticoagulation. **British Med. J.**, n. 314, p. 1026, 1997.

HANTGAN, R.; HINDRIKS, C.; TAYLOR, R.; SIXMA, J.; DE GROOT, P. Glycoprotein Ib, Von Willebrand factor, and glycoprotein IIb:IIIa are all involved in platelet adhesion to fibrin in flowing whole blood. **Blood.**, v. 76, n. 2, p. 345-353, 1990.

HENSON, P.M. The immunology release of constituents from neutrophils leukocytes. **The Journal of Immunology**, Baltimore, v.107, n.6, p.1535, 1971.

HERD, C.; PAGE, C. P. Do platelets have a role as inflammatory cells? In: **Immunopharmacology of Platelets**, Michel Joseph, Academic Press, capítulo 1 p. 1-20, 1995.

HERMAN, A. G. Rationale for the combination of anti-aggregating drugs. **Thromb. Res.** v. 92, p. S17-21, 1998.

HERSTRUP, K.; JABLONKA, B.; HONIG-LIEDL, P.; JUST, M.; KOCHSIEK, K. Phosphorylation of focal adhesion vasodilator-stimulated phosphoprotein at Ser 157 in human platelets correlates with fibrinogen receptor inhibition. **Eur. J. Biochem.**, v. 225, p. 21-27, 1994.

HEYWOOD, V. H. **Flowering plants of the world**. New York: Oxford University Press, 1993. p. 229-230.

HJEMDAHL, P.; CHRONOS, N. A. F.; WILSON, D. J.; BOUYLOUX, P.; GOODALL, A.H. Epinephrine sensitizes human platelets in vivo and in vitro as studied by fibrinogen binding and p-selectin expression. **Arterioscler. Thromb.** v. 14, p. 77-84, 1994.

HJEMDAHL, P.; LARSSON, T.; WALLEN, N. H. Effects of stress and β -blockade on platelet function. **Circulation.** v. 84, p. VI44-VI58, 1991.

HOLLOPETER, G.; JANTZEN, H. M.; VINCENT, D.; LI, G.; ENGLAND, L.; RAMAKRISHMAN, V.; YANG, R. B.; NURDEN, P.; NURDEN, A. T.; JULIUS, D. Identification of the platelet ADP receptor targeted by antithrombotic drugs. **Nature**, v. 409, p. 202-207, 2001.

HOURLANI, S.M. O.; CUSACK, N. J. Pharmacological Receptors on Blood Platelets. **Pharmacological Reviews**, v. 43, n. 3, p. 243-285, 1991.

HSIAO, G.; LEE, J.J., LIN, K.H.; SHEN, C.H.; FONG, T.H.; CHOU, D.S.; SHEU, J.R. Characterization of a novel and potent collagen antagonist, caffeic acid phenethyl ester, in human platelets: in vitro and in vivo studies. **Cardiovasc Res.**, v. 75, n.4, p. 782-792, 2007.

HUANG, J.; WANG, S.; LUO, X.; XIE, Y.; SHI, X. Cinnamaldehyde reduction of platelet aggregation and thrombosis in rodents. **Thrombosis Research**, v. 119, p. 337-342, 2007.

INAZU, T.; TANIGUCHI, T.; YANAGI, S, YAMAMURA H. Protein-tyrosine phosphorylation and aggregation of intact human platelets by vanadate with H₂O₂. **Biochem Biophys Res Commun.**, v. 170, n. 1, p. 259-263, 1990.

INOUE, K.; OZAKI, Y.; SATOH, K.; WU, Y.; YATOMI, Y.; SHIN, Y.; MORITA, T. Signal transduction pathways mediated by glycoprotein Ia/IIa in human platelets: comparison with those of glycoprotein VI. **Biochem Biophys Res Commun.**, v. 256, n.1, p.114-120, 1999.

ITALIANO, J. E.; SHIVDASANI, R.A. Megakaryocytes and beyond: the birth of platelets. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, v.1, n.6, p. 1174-1182, 2003.

ITALIANO, J. E.; HARTWIG, J. H. Megakaryocyte development and platelet formation. In: MICHELSON, A. D. **Platelets**. California: Academic Press, 2007.

JANG, E. K.; AZZAM, J. E.; DICKINSON, N. T.; DAVIDSON, L. M. M. AND HASLAM, R. J. Roles for both cyclic GMP and cyclic AMP in the inhibition of collagen-induced platelet aggregation by nitroprusside. **British Journal of Haematology**, v. 117, p. 664-675, 2002.

JIN, J.; DANIEL, J. L.; KUNAPULI, S. P. Molecular basis for ADP-induced platelet activation. II. The P2Y1 receptor mediates ADP-induced intracellular calcium mobilization and shape change in platelets. **J. Biol. Chem.**, v. 273, n. 4, p. 2030-2034, 1998.

JIN, J.; QUINTON, T. M.; ZHANG, J.; TIYYENHOUSE, S.E. AND KUNAPULI, S. P. Adenosine diphosphate (ADP)-induced thromboxane A₂ generation in human platelets requires coordinated signaling through integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ and ADP receptors. **Blood**, v. 99, p. 193-198, 2002.

JIN, R.C.; VOETSCH, B.; LOSCALZO, J. Endogenous mechanisms of inhibition of platelet function. **Microcirculation**, v. 12, n. 3, p. 247-58, 2005.

JURK, K.; KEHREL, B.E. Platelets: physiology and biochemistry. **Semin Thromb Hemost.**, v. 31, n.4, p. 381-92, 2005.

KAHN, M.L.; ZHENG, Y.W.; HUANG, W. A dual thrombin receptor system for platelet activation. **Nature**, v. 394, p. 690-694, 1998.

KINLOUGH-RATHBONE, R.L.; PACKHAM, M.A.; REIMERS, H.J., CAZENAVE, J.P., MUSTARD JF. Mechanisms of platelet shape change, aggregation, and release induced by collagen, thrombin, or A23,187. **J Lab Clin Med.**, v. 90, n. 4, p. 707-719, 1977.

KLINGER, M.H. Platelets and inflammation. **Anat Embryol (Berl)**, v. 196, n. 1, p. 1-11, 1997.

KO, F.N.; WU, T.S.; LU, S.T.; WU, Y.C.; HUANG; T.F.; TENG, C.M. Antiplatelet effects of protopine isolated from *Corydalis tubers*. **Thromb Res.**, v. 56, n. 2, p. 289-298, 1989.

LEITE, J. P. V. Desenvolvimento da fitoterapia. In: LEITE, J. P. V. **Fitoterapia: bases científicas e tecnológicas**. São Paulo, 1^a Ed. Ed. Atheneu, cap 1, p. 3-20, , 2009.

LEAL, L. K. A. M. **Estudo Farmacológico do extrato hidroalcoólico e constituintes químicos de *Torresea cearensis* Fr. All. (cumaru)**. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) – Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, Ceará, 1995.

LIAO, C. H.; TZENG, C. C.; TENG, C. M. Cyclic AMP and cyclic GMP phosphodiesterase inhibition by an antiplatelet agen 6-[(3-methylene-2-oxo-5-phenyl-5-tetrahydrofuran-2-yl)methoxy] quinolinone (CCT-62). **Eur. J. pharmacol.** v. 349, p. 107-114, 1998.

LIM, M.Y.; PARK, Y.H.; KIM, M.K. Antiplatelet Activity of Gallic Acid and Methyl Gallate. **Food Science and Biotechnology** , v. 13, n. 6, p. 806-809, 2004.

LIMA, L. R. **Tecnologia de obtenção de comprimidos à base de resina/extrato de Jalapa do Brasil – *Operculina macrocarpa* (L.) Urban e validação da metodologia analítica.** Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Centro de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2006.

LORENZI, H.; MATOS, F.J.A. **Plantas Medicinais no Brasil: Nativas e Exóticas.** 2ª Ed, Nova Odessa, São Paulo: Instituto Plantarum, 2008. 544p.

LORENZI, T. F. **Manual de Hematologia Propedêutica e Clínica.** 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006.

LUCISANO, Y.M.; MANTOVANI, B. Lysosomal enzyme release from polymorphonuclear leukocytes induced by immune complexes of IgM and IgG. **The Journal of Immunology**, Baltimore, v.132, n.4, p.2015-2020, 1984.

LUNA, J. S.; SANTOS, A.F.; LIMA, M.R.; OMENA, M.C.; MENDONÇA, F.A.; BIEBER, L.W.; SANT'ANA, A.E. A study of the larvicidal and molluscicidal activities of some medicinal plants from northeast Brazil. **J Ethnopharmacol.**, v. 97, n. 2, p. 199-206, 2005.

LUSCHER, T.F.; VANHOUTTE, P.M. Endothelium-dependent contractions to acetylcholine in the aorta of the spontaneously hypertensive rat. **Hypertension**, v. 8, p. 344-348, 1986.

MACKMAN, N. Triggers, targets and treatments for thrombosis. **Nature**, v. 451, p. 914-918, 2008.

MAFFRAND, J.P.; BERNAT, A.; DELEBASSÉE, D.; DEFREYN, G.; CAZENAVE, J.P.; GORDON, J.L. ADP plays a key role in thrombogenesis in rats. **Thromb Haemost.**, v. 59, n. 2, p. 225-30, 1988.

MALONE, M.H.; ROBICHAUD, R.C. A Hippocratic screen for pure or crude drug materials. **Lloydia**, v. 25, p. 320-332, 1962.

MANN, K.G.; BUTENAS, S.; BRUMMEL, K. The dynamics of thrombin formation. **Arterioscler Thromb Vasc Biol.**, v. 23, n. 1, p. 17-25, 2003.

MARIETTA, M.; FACCHINETTI, F.; NERI, I.; PICCININI, F. L-arginine infusion decreases platelet aggregation through an intraplatelet nitric oxide release. **Thromb. Res.**, v. 88, p. 229-235, 1997.

MARTINS, E. R.; CASTRO, D. M.; CASTELLANI, D. C.; DIAS, J. E. **Plantas Medicinais.** Viçosa: UFV, 2000.

MATOS, F. J. A. Aproveitamento de plantas medicinais da região nordeste. **Rev. Bras. Farm.**, v. 63, n.3/4, p.132-140, 1982.

- MATOS, F. J. A. **Farmácias vivas**. 2. ed. Fortaleza: EUFC, 1994. p. 62-65.
- MATOS, F. J. A. **Plantas Medicinais**: guia de seleção e emprego de plantas usadas em fitoterapia no nordeste do Brasil. 3. ed. Fortaleza: Imprensa Universitária, 2007.
- MATOS, F.J.A. **O formulário do professor Dias da Rocha**: informações sobre o emprego na medicina caseira, de plantas do Nordeste, especialmente do Ceará .2 ed. Fortaleza: EUFC, 1997. 260p.
- MEADOWS, T.A.; BHATT, D.L. Clinical aspects of platelet inhibitors and thrombus formation. **Circ Res.**, v. 100, n. 9, p. 1261-1275, 2007.
- MEHTA, J. L.; CHEN, L. Y.; KONE, B. C.; MEHTA, P.; TURNER, P. Identification of constitutive and inducible forms of nitric oxide synthase in human platelets. **J. Lab. Clin. Med.**, v. 125, n. 3, p. 370-377, 1995.
- MICHELIN, D. C. **Análise fitoquímica e ensaios biológicos da raiz de *Operculina macrocarpa* (L.) Urb. (Convolvulaceae)**. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Centro de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Araraquara, São Paulo, São Paulo, 2004.
- MICHELIN, D. C. **Estudo químico-farmacológico de *O. macrocarpa* L. Urb. (Convolvulaceae)**. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – Centro de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Araraquara, São Paulo, São Paulo, 2008.
- MICHELIN, D. C.; SALGADO, H. R. N. Avaliação da atividade laxante de *Operculina macrocarpa* L. Urban (Convolvulaceae). **Rev. Bras. Farmacogn.**, v.14, p. 105-109, 2004.
- MICHELSON, A. D.; BENOIT, S. E.; FURMAN, M. I.; BRECKWOLDT, W. L.; ROHRER, M. J.; BARNARD, M. R.; LOSCALZO, J. Effect of endothelium derived relaxing factor/nitric oxide on platelet surface glycoproteins. **Am. J. Physiol.**, v. 270, p. H1640-H1648, 1996.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Painel de Indicadores do SUS**, n. 7, 2011.
- MITCHELL, R. N.; KUMAR, V. A., Abul K., FAUSTO, Nelson. **Fundamentos de Robbins & Cotran: Patologia**. 7ª edição. Rio de Janeiro: Elsevier, 2006.
- MONASH UNIVERSITY. Platelet and Leucocyte Biology Laboratory, 2008. Disponível em <<http://www.med.monash.edu.au/medicine/boxhill/research/blood-platelet>> Acesso em: 02 jun 2011.

MONCADA, S.; HIGGS, E. A. Endogenous nitric oxide: physiology, pathology and clinical relevance. **Eur. J. Clin. Invest.** v. 21, p. 361-374, 1991.

MOROI, M.; JUNG, S. M.; OKUMA, M.; SHINMYOZU, K. A patiente with platelets deficient in glycoprotein VI that lack both collagen – induced aggregation and adhesion. **J. Clin. Invest.**, v. 84, n. 5, p. 1440 - 1445, 1989.

MOSMANN T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J Immun Meth.**, v. 65, p. 55-63, 1983.

MUSTONEN, P.; SAVOLA, J.-M.; LASSILA, R. Atipamezole, an imidazolinetype α_2 -adrenoceptor inhibitor, binds to human platelets and inhibits their adrenaline-induced aggregation more effectively than yohimbine. **Thromb. Res.**, v. 99, p. 231-237, 2000.

NAKAHATA, N. Thromboxane A2: Physiology/pathophysiology, cellular signal transduction and pharmacology. **Pharmacol. Therap.**, v. 118, p. 18-35, 2008.

NENCI, G. G.; GRESELE, P.; AGNELLI, G.; BALLATORI, E. Effect of pentoxifylline on platelet aggregation. **Pharmatherapeutica.** v. 2, p. 532-538, 1981.

NURDEN, P.; SAVI, P.; HEILMANN, E.; BIHOUR, C.; HERBERT, J. M.; MAFFRAND, J. P.; NURDEN, A. T. An inherited bleeding disorder linked to a defective interaction between ADP and its receptor on platelets. **J. Clin. Invest.**, v. 95, p. 1616-1622, 1995.

O'BRIEN, J.R. Some effects of adrenaline and anti-adrenaline compounds on platelets in vitro and in vivo. **Nature.** v. 200, p. 763-764, 1963.

OHLMANN, P.; ECKLY, A.; FREUND, M.; CAZENAVE, J. P.; OFFERMANN, S.; GACHET, C. ADP induces partial platelet aggregation without shape change and potentiates collagen-induced aggregation in the absence of $G_{\alpha q}$. **Blood**, v. 96, n. 6, p. 2134-2139, 2000.

PABON, M. F. G.; JAVIER RINCON, DIANA MARACELA BUITRAGO RAMIREZ, GLORIA RAMOS, "Perfil antiagregante plaquetario del ácido clorogénico, metabolito activo presente en la especie Solanum tuberosum" . En: Colombia Salud Uis ISSN: 0121-0807 ed: Universidad Industrial de Santander v.40 fasc.2 p.146 - 148 ,2008

PATRONO, C.; COLLER, B.; FITZGERALD, G.A.; HIRSH, J.; ROTH, G. Platelet-active drugs: the relationships among dose, effectiveness, and side effects: the Seventh ACCP Conference on Antithrombotic and Thrombolytic Therapy. **Chest.**, v. 126, n 3, p.234S-264S, 2004.

PEAKALL, D. **Animal Biomarkers as Pollution Indicators**. 1. ed. London: Chapman and Hall, 1992. 291 p.

PEREDA-MIRANDA, R.; BAH, M. Biodynamic constituents in the Mexican morning glories: purgative remedies transcending boundaries. **Cur. Top. Med. Chem.**, v.3, p.1-20, 2003.

PLANCHON, L.; BRETIN, P. **Précis de Matière Médicale**. Paris: Librairie Maloine, 1937. p.1224-1235.

PRINCIPE, D. D.; MENICHELLI, A.; DE MATTEIS, W.; DI CORPO, M.L; DI GIULIO, S; FINAZZI-AGRO, A. Hydrogen peroxide has a role in the aggregation of human platelets. **FEBS Lett.** v.185, n. 1, p. 142-6, 1985.

RADOMSKI, M. W.; PALMER, R. M.; MONCADA, S. Endogenous nitric oxide inhibits human platelet adhesion to vascular endothelium. **Lancet.** v. 7, p. 1057-1058, 1987.

RADOMSKI, M. W.; MONCADA, S. The biological and pharmacological role of nitric oxide in platelet function. **Adv. Exp. Med. Biol.**, v. 344, p. 251-264, 1993.

RADOMSKI, M. W.; PALMER, R. M. J.; MONCADA, S. Characterization of the L-arginine/nitric oxide pathway in human platelets. **Br. J. Pharmacol.**, v. 101, p. 325-328, 1990.

RANG, H.P.; DALE, M.M.; RITTER, J.M.; MOORE, P.K. **Farmacologia**. 5a ed. São Paulo: Editora Elsevier; 2004. p. 574- 86.

RENDU, F.; BROHARD-BOHN, B. The platelet release reaction: granules' constituents, secretion and functions. **Platelets**, v. 12, p. 261-273, 2001.

RUGGERI, Z. M. Platelets in atherothrombosis. **Nature Medicine**, v. 8, p. 1227-1234, 2002.

SAINT-CRICQ, G. N.; PROVOST, C.; VIVAS, N. Comparative study of polyphenol scavenging activities assessed by different methods. **J Agric Food Chem.**, v. 47, n. 2, p. 425-31, 1999.

SALVEMINI, D.; BOTTING, R. Modulation of platelet function by free radicals and free-radical scavengers. **Trends Pharmacol Sci.** v. 14, n. 2, p. 36-42, 1993.

SASE, K.; MICHEL, T. Expression of constitutive endothelial nitric oxide synthase in human blood platelets. **Life Sci.**, v. 57, p. 2049-2055, 1995.

SAVAGE, B.; CATTANEO, M.; RUGGERI, Z. M. Mechanism of platelet aggregation. **Curr. Opin. Hematol.**, v. 8, p. 270-276, 2001.

SAVAGE, B.; RUGGERI, Z.M. Platelet Thrombus Formation in Flowing Blood. In: MICHELSON, A. D. **Platelets**. California: Academic Press, 2007.

SCHIMMING, T.; JENETT-SIEMS, K.; MANN, P. A.; TOFERN-REBLIN, B. Calystegines as chemotaxonomic markers in the Convolvulaceae. **Phytochemistry**, v. 66, p. 469-480, 2005.

SCHWARZ, U.R.; WALTER, U.; EIGENTHALER, M. Taming platelets with cyclic nucleotides. **Biochem Pharmacol.**, v. 62, n. 9, p. 1153-1161, 2001.

SERENO, D.; LEMESRE, J. L. Use of an enzymatic micromethod to quantify amastigote stage of *Leishmania amazonensis* in vitro. **Parasitol. Res.**, v. 83, n. 4, p. 401-403, 1997.

SIESS, W. Molecular mechanisms of platelet activation. **Physiol. Rev.**, v. 69, n. 1, p. 158-178, 1989.

SIESS, W.; GRÜNBERG, B.; LUBER, K. Functional Relationship between cyclic AMP-dependent protein phosphorylation and platelet inhibition. In: AUTHI, K. S.; WATSON, S. P.; KAKKAR, V. V. **Mechanisms of Platelet Activation and Control**. New York: Plenum Press, p. 229- 231, 1993.

SIEUWERTS, A. M.; KLIJN, J. G.; PETERS, H. A.; FOEKENS, J. A. The MTT tetrazolium salt assay scrutinized: how to use this assay reliably to measure metabolic activity of cell cultures in vitro for the assessment of growth characteristics, IC50-values and cell survival. **Eur. J. Clin. Chem. Clin. Biochem.**, v. 33, n. 11, p. 813-823, 1995.

SIMMONS, D. L.; BOTTING, R. M.; HLA, T. Cyclooxygenase isozymes: the biology of prostaglandin synthesis and inhibition. **Pharmacol. Rev.**, v. 56, n. 3, p. 387-437, 2004.

SINGLETON, V. L.; ROSSI, J. A. Jr. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. **Amer. J. Enol. Viticult.** v.16, p. 144-158, 1965.

SLABBERT, J. L.; VENTER, E. A. Biological assays for aquatic toxicity testing. **Wat. Sci. Tech**, v. 39, n. 10-11, p. 367-373, 1999.

STEINER, M.; ANASTASI, J. Vitamin E. An inhibitor of the platelet release reaction. **J Clin Invest.** v.57, n. 3, p. 732, 1976.

STEPHENSON, J. Platelets and Malaria **The Journal of the American Medical Association**, v. 301, n. 13, p. 1329, 2009.

SURIN, W. R.; BARTHWAL, M. K.; DIKSHIT, M. Platelet collagen receptors, signalling and antagonism: Emerging approaches for the prevention of intravascular thrombosis. **Thrombosis Research**, v. 122, n. 6, p. 786-803, 2007.

TAKAHASHI, O. Characteristics of rat platelets and relative contributions of platelets and blood coagulation to haemostasis. **Food Chem Toxicol.** v. 38, n. 23, p. 203-18, 2000.

TANAKA, T.; ITO, S.; HIGASHINO, R.; FUKUTA, Y.; FUKUDA, Y.; TAKEI, M.; KURIMOTO, T.; TAMAKI, H. A new thromboxane receptor antagonist, Z-335, ameliorates experimental thrombosis without prolonging the rat tail bleeding time. **Thromb Res.** v. 91, n. 5, p. 229-35, 1998.

TENG, C.M.; LI, H.L.; WU, T.S.; HUANG, S.C.; HUANG, T.F. Antiplatelet actions of some coumarin compounds isolated from plant sources. **Thromb Res.** v. 66, n. 5, p. 549-57, 1992.

TZENG, S.H.; KO, W.C.; KO, F.N.; TENG, C.M. Inhibition of platelet aggregation by some flavonoids. **Thromb Res.** v.64, n. 1, p.91-100, 1991.

VERMA, A.; PRASAD, K. N.; SINGH, A. K.; NYATI, K. K.; GUPTA, R. K.; PALIWAL, V. K. Evaluation of the MTT lymphocyte proliferation assay for the diagnosis of neurocysticercosis. **J. Microbiol. Methods.**, v. 81, n. 2, p. 175-178, 2010.

VILLALOBOS, M.A., DE LA CRUZ, J.P.; SMITH-AGREDA, J.M.; SANCHEZ DE LA CUESTA, F. Morphological aspects of ferrous salts-induced lipid peroxidation and platelet aggregation in human blood. **Methods Find Exp Clin Pharmacol.** v.12, n. 9, p. 637-40, 1990.

WAGNER, D. D.; BURGER, P. C. Platelets in Inflammation and Thrombosis. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.**, v. 23, p. 2131-2137, 2003.

WALTER, U.; EIGENTHALER, M.; GEIGER, J.; REINHARD, M. Role of cyclic nucleotide-dependent protein kinases and their common substrate VASP in the regulation of human platelets. **Adv. Exp. Med. Biol.**, p. 237-249, 1993.

WANG JP, HSU MF, HSU TP, TENG CM. Antihemostatic and antithrombotic effects of capsaicin in comparison with aspirin and indomethacin. **Thromb Res.** 1985 Mar 15;37(6):669-79.

WEISS, H. J. **Platelets:** Pathophysiology and antiplatelet drug therapy. New York: Alan. R. Liss, 1982.

WHITE, J.G. Platelet Structure In: MICHELSON, A. D. **Platelets. California: Academic Press**, 2007.

XAVIER, H. S.; SOARES, L. A. L.; D'ANGELO, L. C. A. C-glicosilflavonóides de *Operculina macrocarpa* Urban (Convolvulaceae). **In: SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL**, 13., 1994, Salvador.

YARDUMIAN, D. A.; MACKIE, I. J.; MACHIN, S. J. Laboratory investigation of platelet function: a review of methodology. **J. Clin. Pathol.**, v. 39, p. 701-712, 1986.

YUK DY; RYU CK; HONG JT; CHUNG KH; KANG WS; KIM Y; YOO HS; LEE MK; LEE CK, YUN YP. Antithrombotic and Antiplatelet Activities of 2-Chloro-3-[4-(ethylcarboxy)-phenyl]-amino-1,4-naphthoquinone (NQ12), a Newly Synthesized 1,4-Naphthoquinone Derivative. **Biochemical Pharmacology**, v. 60, p. 1001–1008, 2000.

YUN-CHOI, H. S.; PARK, K. M.; PYO, M. K. Epinephrine induced platelet aggregation in rat platelet-rich plasma. **Thromb. Res.**, v. 100, p. 511-518, 2000.

ZAGO, M.A.; FALCÃO R.P.; PASQUIN R. **Hematologia: fundamentos e prática**. 1ed. São Paulo. Ed. Atheneu, 2005.

ZARBOCK, A.; POLANOWSKA-GRABOWSKA, R. K.; LEY, K. Platelet-neutrophil-interactions: Linking hemostasis and inflammation. **Blood Rev.**, v. 21, n. 2, p. 99-111, 2007.

ANEXOS**ANEXO 1**

Universidade Federal do Ceará
Comitê de Ética em Pesquisa

Of. Nº 178/10

Fortaleza, 18 de agosto de 2010

Protocolo COMEPE nº 169/ 10

Pesquisador responsável: Taiana Magalhães Pierdoná

Título do Projeto: "Avaliação das atividades antiagregante plaquetária e vasodilatadora de extratos, frações e moléculas obtidas de operculina macrocarpa (L.) Farwel- Jalapa"

Levamos ao conhecimento de V.S^a. que o Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Ceará – COMEPE, dentro das normas que regulamentam a pesquisa em seres humanos, do Conselho Nacional de Saúde – Ministério da Saúde, Resolução nº 196 de 10 de outubro de 1996 e complementares, aprovou o protocolo e o TCLE do projeto supracitado na reunião do dia 05 de agosto de 2010.

Outrossim, informamos, que o pesquisador deverá se comprometer a enviar o relatório final do referido projeto.

Atenciosamente,

A handwritten signature in blue ink that reads "Mirian Parente Monteiro".

Dra. Mirian Parente Monteiro
Coordenadora Adjunta do Comitê
de Ética em Pesquisa
COMEPE/UFC

ANEXO 2



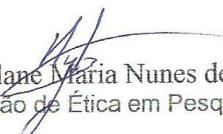
Universidade Federal do Ceará
Comissão de Ética em Pesquisa Animal – CEPA
Rua: Coronel Nunes de Melo, 1127 Rodolfo Teófilo
Cep: 60430-970 Fortaleza-CE
Tel: (85) 3366.8331 Fax: (85) 3366.8333

DECLARAÇÃO

Declaramos que o protocolo para uso de animais em experimentação nº 63/10, sobre o projeto intitulado: **“AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES ANTIAGREGANTE PLAQUETÁRIA E VASODILATADORA DE EXTRATOS, FRAÇÕES E MOLÉCULAS OBTIDAS DE *OPERCULINA MACROCARPA* (L) FARWEL-JALAPA.”**, de responsabilidade da Profª. Luzia Kalyne Almeida Moreira Leal, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

Declaramos ainda que o referido projeto foi aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa Animal – CEPA – em reunião realizada em 24 de março de 2011.

Fortaleza, 17 de maio de 2011.


Profª. Dra. Nylane Maria Nunes de Alencar
Coordenadora da Comissão de Ética em Pesquisa Animal – CEPA