

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

PAULA MENDONÇA LEITE

**USO DE PLANTAS MEDICINAIS E SUA POTENCIAL INTERFERÊNCIA NO
CONTROLE DA ANTICOAGULAÇÃO ORAL EM CARDIOPATAS
ATENDIDOS EM CLÍNICA DE ANTICOAGULAÇÃO DE UM HOSPITAL
UNIVERSITÁRIO**

**BELO HORIZONTE - MG
2015**

PAULA MENDONÇA LEITE

**USO DE PLANTAS MEDICINAIS E SUA POTENCIAL
INTERFERÊNCIA NO CONTROLE DA
ANTICOAGULAÇÃO ORAL EM CARDIOPATAS
ATENDIDOS EM CLÍNICA DE ANTICOAGULAÇÃO DE
UM HOSPITAL UNIVERSITÁRIO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós- Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Área de concentração: Ciências Farmacêuticas

Orientador: Dra. Rachel Oliveira Castilho
Co-orientadora: Maria Auxiliadora Parreiras Martins

**BELO HORIZONTE - MG
2015**

L533u Leite, Paula Mendonça.
Uso de plantas medicinais e sua potencial interferência no controle da anticoagulação oral em cardiopatas atendidos em clínica de anticoagulação de um hospital universitário / Paula Mendonça Leite. – 2015.

132 f. il.

Orientadora: Rachel Oliveira Castilho.
Co-Orientadora: Maria Auxiliadora Parreiras Martins.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas.

1. Anticoagulantes – Teses. 2. Cardiopatia – Teses. 3. Fitoterápicos – Teses. 4. Plantas medicinais – Teses. 5. Varfarina – Teses. I. Castilho, Rachel Oliveira. II. Martins, Maria Auxiliadora Parreiras. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Faculdade de Farmácia. IV. Título.

CDD:615.321



FOLHA DE APROVAÇÃO

"USO DE PLANTAS MEDICINAIS E SUA POTENCIAL INTERFERÊNCIA NO CONTROLE DA ANTICOAGULAÇÃO ORAL EM CARDIOPATAS ATENDIDOS EM CLÍNICA DE ANTICOAGULAÇÃO DE UM HOSPITAL UNIVERSITÁRIO"

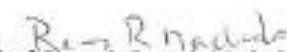
PAULA MENDONÇA LEITE

Dissertação submetida à Comissão Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS, como requisito para obtenção do grau de MESTRA em CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS, área de concentração CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS.

Aprovada em 21 de dezembro de 2015, pela Comissão constituída pelos membros:


Profa. Barchel Oliveira Castilho - Orientadora
UFMG


Prof. Adrizzo Max Moreira Reis
UFMG


Prof. Renes de Resende Machado
UFMG

Belo Horizonte, 21 de dezembro de 2015.

AGRADECIMENTOS

Ao suporte e apoio de várias pessoas que foram essenciais para o desenvolvimento e a conclusão desse trabalho.

A Professora Rachel Oliveira Castilho, orientadora, por acreditar e apoiar minhas ideias um tanto quanto diferentes, pelos seus ensinamentos, pela paciência, pela dedicação e principalmente pelo carinho e amizade desde a graduação.

A Professora Maria Auxiliadora Parreiras Martins, coorientadora, pelos ensinamentos, pela paciência, dedicação, carinho e palavras de incentivo.

A Professora Maria das Graças Carvalho, pelo interesse em iniciar este projeto tão diferente, pelo tempo e disposição em fazer cada detalhe ser entendido.

Ao Professor Doutor Manoel Otávio da Costa Rocha, pela confiança em disponibilizar seu trabalho.

A Doutoranda Aline Oliveira Magalhães Mourão, por compartilhar suas experiências e pelo apoio.

A todos os colaboradores do ambulatório de anticoagulação, que de alguma forma contribuíram para tornar o trabalho mais fácil e prazeroso e que me ensinaram um pouco mais sobre esse trabalho tão belo.

Ao Emílio Itamar de Freitas, querido aluno de iniciação científica, pelo auxílio, interesse e dedicação ao projeto e pelo carinho sempre presente.

A Aline Alves de Freitas, querida aluna de iniciação científica, por ter sido minhas mãos na finalização desse projeto. Muito obrigada pelo comprometimento e dedicação, essa vitória também é sua!

A querida colega e amiga Juliana Mendes Amorim, pelo auxílio no laboratório até tarde da noite e principalmente pelas conversas e desabafos. Você foi essencial!

Aos colegas de trabalho do Hospital Governador Israel Pinheiro, que me apoiaram e tanto se esforçaram para me substituir quando eu precisava me dedicar ao mestrado.

Aos meus pais, Eduardo Almeida Leite e Virgínia Melo Mendonça Leite, e a minha irmã, Patrícia Mendonça Leite, pela credibilidade e incentivo, pelo apoio e amor, e também pela paciência nos momentos de desespero. Sem vocês isso seria impossível!

As queridas colegas de casa, Joyce Costa Melgaço de Faria e Amanda Almeida Costa, pela alegria de todos os dias, pelas palavras positivas e por me aguentarem nos dias mais conturbados.

Ao meu namorado, Eduardo de Vilhena Parreira, por me ouvir sempre, por me apoiar mesmos nas decisões malucas e pelo amor em todos os momentos dessa jornada.

A CAPES, pelo suporte financeiro.

RESUMO

Atualmente, os distúrbios cardiovasculares têm se tornado cada vez mais comuns, decorrente da inversão da pirâmide demográfica e envelhecimento da população em conjunto com o aumento do sedentarismo e maus hábitos de alimentação. No Brasil, a situação não é diferente e por isso o uso de medicamentos para tratamento desses distúrbios têm crescido. A varfarina é um dos anticoagulantes orais mais utilizados para reduzir o risco de eventos tromboembólicos. No entanto, apesar de ser um medicamento de baixo custo, a farmacoterapia com a varfarina é complexa, pois possui índice terapêutico estreito, não segue padrão dose resposta e tem potencial para interagir com diversos medicamentos, alimentos e plantas medicinais. Plantas como alho, ginkgo e ginseng têm seus efeitos na homeostasia sanguínea bem elucidados, mas a maioria das plantas possui informações escassas. Dessa forma, o objetivo desse trabalho é descrever a utilização de plantas medicinais por pacientes de uma clínica de anticoagulação e estudar o efeito de plantas selecionadas na coagulação sanguínea *in vitro* e seu perfil fitoquímico. Uma amostra calculada de 273 pacientes foi entrevistada de maio a outubro de 2014, 67% deles relataram uso de plantas medicinais. A maior parte do uso das plantas é na forma de chá (87%) e a indicação geralmente é decorrente do conhecimento popular, passado de mãe para filho (53%). Em raras vezes a indicação foi por profissionais da saúde, revelando a falta de supervisão desse uso. Os usos mais comuns envolvem tratamento de distúrbios respiratórios (37%) e do sistema nervoso central (34%). Foram citadas 64 plantas e a maioria delas não apresentava estudos na literatura científica sobre a influência na homeostasia sanguínea. Das plantas citadas foram selecionadas, de acordo com grande número de citação e presença de poucos estudos científicos, 18 espécies, que foram extraídas por maceração em etanol. Os extratos etanólicos foram avaliados, *in vitro*, quanto a influência nos testes de protrombina (TP) e de tromboplastina parcial ativada (TTPa). A maior parte dessas plantas apresentou efeito anticoagulante, aumentando pelo menos um dos parâmetros avaliados. Dentre essas plantas, as que mostraram um efeito mais pronunciado de aumento no valor do TTPa foram *Citrus sinensis*, *Lippia*

alba, *Mentha crispa*, *Mikania laevigata* e *Nasturtium officinale*. Os óleos essenciais dessas espécies também foram avaliados e, por sua vez, mostraram atividades menos pronunciadas em comparação aos extratos, com destaque para *Lippia alba* no TP e *Citrus sinensis* no TTPa. Na avaliação fitoquímica dessas espécies foram obtidos os perfis químicos por cromatografia líquida de alta eficiência e em camada delgada. Algumas substâncias foram identificadas em experimentos de coinjeção e suas relações com a homeostase sanguínea foi discutida. O extrato etanólico de *L. alba* foi fracionado e suas frações demonstraram atividade anticoagulante, principalmente a fração em diclorometano. Portanto, há relevante uso das plantas medicinais por usuários de varfarina e um grande potencial dessas plantas em interferir em tratamentos anticoagulantes. Dessa forma, é importante monitorar o uso dessas plantas e estudar melhor seus efeitos no organismo humano.

Palavras-chave: anticoagulação, cardiopatas, fitoterápicos, interação, plantas medicinais, varfarina.

ABSTRACT

Currently, cardiovascular disorders have become increasingly common, due to the reversal of the demographic pyramid and aging population together with increased sedentary lifestyle and bad eating habits. In Brazil, the situation is no different and the use of drugs to treat these disorders has grown. Warfarin is one of the most widely used in oral anticoagulation to reduce the risk of thromboembolic events. However, in spite of being an affordable medicament, drug therapy with warfarin is complex because it has a narrow therapeutic index, it does not follow standard dose response and it has the potential to interact with various medicines, foods and medicinal plants. Plants such as garlic, ginkgo and ginseng have its effects on blood homeostasis well elucidated, but most plants have little information about. Thus, the aim of this study is to describe the use of medicinal plants in patients of an anticoagulation clinic and study the effect of selected plants in blood coagulation *in vitro* and its phytochemical profile. A calculated sample size of 273 patients were interviewed between May and October of 2014 and 67% of them reported use of medicinal plants. Most of the use of herbs is in the form of tea (87%) and the indication is usually due to the popular knowledge, passed from mother to son (53%). On rare times, this use was indicated by health professionals, revealing the lack of supervision of such use. The most common uses involved treatment of respiratory (34%) and central nervous (32%) disorders. 64 plants were cited and most of them did not have studies in the scientific literature about the influence on blood homeostasis. Of the aforementioned, 18 species plants, chosen by big number of citation and low number of scientific studies, were selected to be extracted by maceration in ethanol. The ethanol extracts were evaluated, *in vitro*, as the influence in the prothrombin time (PT) and activated partial thromboplastin time (aPTT) tests. Most of these plants demonstrated anticoagulant effect, increasing at least one of the parameters evaluated. Among these plants, which showed a more pronounced effect of increasing the value of aPTT were *Citrus sinensis*, *Lippia alba*, *Mentha crispa*, *Mikania laevigata* and *Nasturtium officinale*. The essential oil of these species were also evaluated and, in turn, showed less pronounced activities compared to the extracts, highlighting *Lippia alba* in TP and *Citrus sinensis* on APTT. In the

phytochemical evaluation of these species, the chemical profiles were obtained by high-performance liquid chromatography and thin layer chromatography. Some substances have been identified in coinjection experiments and their relationship to blood homeostasis was discussed. The ethanol extract of *L. alba* was fractionated and fractions demonstrated anticoagulant activity, mainly dichloromethane fraction. Therefore, it is clear beyond a relevant use of medicinal plants of warfarin users and a large potential of these plants to interfere in anticoagulation treatments. Thus, it is important to monitor the use of these plants and better study their effects on the human body.

Key words: anticoagulation, cardiac patients, herbal products, interactions, medicinal herbs, warfarin.

LISTA DE FIGURAS

1	Esquema da coagulação	16
2	Esquemas das vias intrínseca e extrínseca no processo de coagulação	17
3	Carboxilação dos fatores da coagulação acoplada à oxidação da vitamina K	18
4	Dicumarol	19
5	Varfarina	20
6	Vitamina K	20
7	Cálculo do RNI	22
8	Alvos potenciais da interferência de plantas medicinais e seus metabólitos na hemostasia sanguínea e na atividade da varfarina. Legenda: PAF= fator de agregação plaquetária e TXA2= tromboxano A2.	27
9	Estruturas químicas de alguns compostos isolados de <i>Citrus sinensis</i> : rutina (A), limoneno (B) e sabineno (C). Rut=rutinosídeo (ramnoglicosídeo).	29
10	Estruturas químicas de alguns compostos isolados de <i>Lippia alba</i> : aromadendreno (A), apigenina (B) e ácido rosmarínico (C).	30
11	Estruturas químicas de alguns compostos isolados de <i>Mentha sp.</i> : canfeno (A), naringenina (B) e catequina (C).	31
12	Estruturas químicas de alguns compostos isolados de <i>Mikania laevigata</i> : cumarina (A) e ácido caurenóico (B).	32
13	Estruturas químicas de alguns compostos isolados de <i>Nasturtium officinale</i> : gliconasturtiim (A) e isoramnetina (B).	33
14	Fórmula para determinação do tamanho da amostra (n) baseada na estimativa da proporção populacional de Charan e Biswas	37
15	Plantas medicinais e sua potencial interferência na farmacoterapia com a varfarina	52
16	Valores de TP do plasma incubado com os extratos comparado ao plasma controle utilizando o solvente do extrato	66
17	Valores de TPPa do plasma incubado com os extratos comparado ao plasma controle utilizando o solvente do extrato	67

18	Efeitos observados no ensaio do TP e do TTPa do plasma incubado com os extratos etanólicos das plantas estudadas.	69
19	Valores relativos ao teste T para avaliar a significância da alteração no teste TP dos óleos essenciais de <i>C. sinensis</i> , <i>L. alba</i> , <i>M. crisper</i> e <i>N. officinale</i> .	73
20	Valores relativos ao teste T para avaliar a significância da alteração no teste TTPa dos óleos essenciais de <i>C. sinensis</i> , <i>L. alba</i> , <i>M. crispae</i> <i>N. officinale</i> .	73
21	Cromatograma obtido por cromatografia em camada delgada (CCD) de gel sílica para os extratos de <i>Mikania laevigata</i> (ML), <i>Citrus sinensis</i> (CS), <i>Mentha crisper</i> (MC), <i>Nasturtium officinale</i> (NO), <i>Lippia alba</i> (LA) e suas fração aquosa (FA) e acetato de etila (FAc). Revelador seletivo para flavonoides: NP/PEG e λ 365 nm.Padrões: quercetina (Qc) e rutina (Ru).	83
22	Cromatograma obtido por cromatografia em camada delgada (CCD) de gel sílica para os extratos de <i>Mikania laevigata</i> (ML), <i>Citrus sinensis</i> (CS), <i>Mentha crisper</i> (MC), <i>Nasturtium officinale</i> (NO), <i>Lippia alba</i> (LA) e suas fração aquosa (FA) e acetato de eteila (FAc). Revelador seletivo para fenóis/taninos: FeCl ₃ 2% Padrões catequina (Cat) e ácido gálico (AG) na avaliação dos taninos.	84
23	Cromatograma obtido por cromatografia em camada delgada (CCD) de gel sílica para os extratos de <i>Mikania laevigata</i> (ML), <i>Citrus sinensis</i> (CS), <i>Mentha crisper</i> (MC), <i>Nasturtium officinale</i> (NO), <i>Lippia alba</i> (LA) e suas fração aquosa (FA) e acetato de etila (FAc). Revelador seletivo para cumarinas: KOH 10%. Padrão cumarina (Cu).	84
24	Cromatograma obtido por cromatografia em camada delgada (CCD) de gel sílica para os extratos de <i>Mikania laevigata</i> (ML), <i>Citrus sinensis</i> (CS), <i>Mentha crisper</i> (MC), <i>Nasturtium officinale</i> (NO), <i>Lippia alba</i> (LA) e suas fração aquosa (FA), acetato de etila (FAc) e diclorometano (FD). Revelador seletivo para triterpeno/esteroides: Libermman–Burchard. Padrão ácido ursólico (AU).	85
25	Perfis cromatográficos obtidos por CLAE- DAD para alguns padrões: ácido rosmarínico (A) e apigenina (B).	87
26	Perfis cromatográficos obtidos por CLAE- DAD para alguns padrões: isoorientina (C) e quercetina-3- β -D-glicosídeo (D).	88
27	Perfil cromatográfico obtido por CLAE- DAD para o extrato etanólico de <i>Citrus sinensis</i> .	89
28	Perfil cromatográfico obtido por CLAE- DAD para o extrato etanólico de <i>Mentha crisper</i> .	90

29	Perfil cromatográfico obtido por CLAE- DAD para a coinjeção do extrato de <i>Mentha crisper</i> e do padrão de ácido rosmarínico.	91
30	Perfil cromatográfico obtido por CLAE- DAD para o extrato etanólico de <i>Mikania laevigata</i> .	92
31	Perfil cromatográfico obtido por CLAE- DAD para a coinjeção do extrato de <i>Mikania laevigata</i> e dos padrões de ácido benzoil grandiflórico, ácido cinamoil grandifólico, ácido p-cumárico, cumarina e quercetina 3-β-glicosídeo.	93
32	Perfil cromatográfico obtido por CLAE- DAD para o extrato etanólico de <i>Nasturtium officinale</i> .	94
33	Perfil cromatográfico obtido por CLAE- DAD para a coinjeção do extrato de <i>Nasturtium officinale</i> e do padrão de isoorientina.	95
34	Perfil cromatográfico obtido por CLAE- DAD para o extrato etanólico de <i>Lippia alba</i> .	96
35	Perfil cromatográfico obtido por CLAE- DAD para a coinjeção do extrato etanólico de <i>Lippia alba</i> e do padrão de apigenina.	96
36	Perfil cromatográfico obtido por CLAE- DAD para fração aquosa de <i>Lippia alba</i> .	97
37	Perfil cromatográfico obtido por CLAE- DAD para fração acetato de etila de <i>Lippia alba</i> .	97
38	Perfil cromatográfico obtido por CLAE- DAD para fração diclorometano de <i>Lippia alba</i> .	98

LISTA DE TABELAS

1	Dados sociodemográficos e clínicos do pacientes entrevistados	42
2	Análise bivariada dos fatores associados ao consume de plantas medicinais	45
3	Descrição das plantas medicinais, frequência de uso reportado pelos pacientes e origem	47
4	Hábitos de consumo de plantas medicinais	49
5	Plantas e suas possíveis interações na homeostasia sanguínea	54
6	Plantas selecionadas para avaliação, <i>in vitro</i>, da atividade anticoagulante	60
7	Gradiente de eluição empregado na obtenção dos perfis por CLAE	80
8	Avaliação qualitativa das principais classes de metabólitos especiais de <i>Nasturtium officinale</i>, <i>Lippia alba</i>, <i>Mikania laevigata</i>, <i>Mentha spicata</i> e <i>Citrus sinensis</i>	85
9	Resultados dos testes de TP e TTPa para a <i>Lippia alba</i>, seu óleo essencial e frações, comparados com seu respectivo controle	99

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

ADP	Adenosina difosfato
AVEi	Acidente vascular encefálico isquêmico
CCD	Cromatografia em camada delgada
CLAE	Cromatografica líquida de alta-eficiência
Gla.	Carboxiglutamato
Glu.	Glutamato
GT	Geração de trombina
IAM	Infarto agudo do miocárdio
OMS	Organização Mundial da Saúde
NO	Número de ocorrência
PAF	Fator de agregação plaquetária
RNI	Razão normalizada internacional
rpm	Rotações por minuto
SP	Desvio padrão
TP	Tempo de protrombina
TTPA	Tempo de tromboplastina parcial ativada
TTR	Porcentagem de tempo no RNI alvo
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	16
3 OBJETIVOS.....	35
CAPÍTULO 1	36
1 MATERIAS E MÉTODOS	37
2 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	42
CAPÍTULO 2	57
1 MATERIAS E MÉTODOS	58
2 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	66
CAPÍTULO 3	77
1 MATERIAS E MÉTODOS	78
2 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	84
CONCLUSÕES	103
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	105

1 INTRODUÇÃO

Os distúrbios cardiovasculares envolvem patologias no coração ou vasos sanguíneos e são representados por uma série de condições clínicas como a trombose venosa profunda aguda, tromboembolismo pulmonar, fibrilação atrial crônica, entre outras. Estima-se que essas doenças sejam responsáveis por 30% das mortes no Brasil, são a maior causa de mortes no mundo e atingem principalmente o sexo masculino. Entretanto, um tratamento efetivo e o controle dos fatores de risco podem reduzir drasticamente esses números.

O tratamento desses distúrbios cardiovasculares envolve inicialmente a mudança de hábitos de vida, de forma a combater o sedentarismo e adotar uma dieta saudável. Em casos de não colaboração do paciente ou quando essas medidas não são efetivas, inicia-se o tratamento medicamentoso. Uma das classes medicamentosas que pode ser utilizada na prevenção de fatores de risco para distúrbios tromboembólicos, são os anticoagulantes orais. No Brasil o principal anticoagulante utilizado e distribuído pelo SUS é a varfarina, devido ao seu baixo custo, comparado com os outros anticoagulantes orais, o que facilita o acesso da população.

Esse fármaco atua inibindo a vitamina K-epóxido redutase, enzima responsável pela regeneração da vitamina K que carboxila resíduos de glutamato de alguns fatores da coagulação, de forma a ativá-los. Dessa forma, tem-se uma inibição do processo de coagulação, aumentando a fluidez sanguínea em cardiopatas.

Entretanto, a manutenção da fluidez sanguínea dentro dos vasos, resultado da homeostasia sanguínea, é, por si só, um processo influenciado por diversos outros fatores, como os treze fatores da coagulação, antitrombina, proteína C, plasminogênio, trombomodulina, prostaglandinas, tromboxanos, vitamina K, além de integridade vascular, fatores genéticos e fisiológicos. Assim, nessa farmacoterapia com anticoagulantes orais, o caráter multifatorial de controle da coagulação combinado com o baixo índice terapêutico da varfarina, seu potencial de toxicidade e a falta de um padrão dose-resposta, cria um quadro

de risco para esses pacientes, que ainda costumam possuir comorbidades e fazer uso de polifarmácia.

Nesse contexto, as clínicas de anticoagulação se destacam no auxílio desses pacientes, pois monitorizam a anticoagulação, garantindo que o medicamento se encontre dentro da faixa terapêutica, tendo maior eficácia e segurança. Para isso é monitorizado o tempo de protrombina (Relação Normalizada Internacional - RNI) com o objetivo de identificar precocemente fatores de risco, intervir apropriadamente e em tempo real em casos de complicações, supervisionar a adesão e educar o paciente.

Entretanto, apesar da monitorização desses pacientes, têm-se ainda fatores que podem interferir na anticoagulação, como por exemplo, a ingestão de alimentos com elevado teor de vitamina K e a utilização de plantas medicinais. As plantas medicinais normalmente são negligenciados nesses cuidados devido, muitas vezes, às escassas informações a respeito. Assim, o estudo das plantas é importante não só para a descoberta de novos fármacos, mas também para avaliar o potencial de interação de seus metabólitos nos processos bioquímicos, farmacocinéticos e farmacodinâmicos que ocorrem no organismo, racionalizando a farmacoterapia nessas situações.

Na literatura científica, encontram-se descritas cerca de 30 plantas/produtos naturais que interagem de diferentes formas na anticoagulação com a varfarina. A *Glycyrrhiza glabra* (alcaçuz) aumenta o risco de sangramento por inibir a trombina e a agregação plaquetária; a *Arnica montana* (arnica) aumenta o efeito anticoagulante devido a presença de derivados cumarínicos; a *Aloe vera* (babosa) inibe a formação do tromboxano e diminui a absorção da varfarina devido ao seu conteúdo antraquinônico; a *Camellia sinensis* (chá verde) é antagonista da varfarina devido ao alto teor de vitamina K; e a *Pfaffia paniculata* (ginseng brasileiro) reduz a concentração sanguínea da varfarina por aumentar sua metabolização.

Combinando a variedade de mecanismos com os quais as plantas podem interferir, com a complexidade do tratamento com a varfarina e a sensibilidade clínica dos cardiopatas e considerando-se que com o envelhecimento populacional e a melhoria de acesso da população ao serviço de saúde, o número de pacientes com diagnóstico de cardiopatia e indicação para a anticoagulação é crescente, o estudo dessa relação torna-se ainda mais importante.

Assim, foi proposta desse estudo avaliar o uso das plantas medicinais em cardiopatas em anticoagulação oral com a varfarina, tendo como objetivos: descrever o perfil de utilização dessas plantas em pacientes atendidos no ambulatório de anticoagulação do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais; avaliar as interações potenciais com base na composição química dessas plantas; investigar do ponto de vista químico as plantas com escassos relatos na literatura científica utilizadas pelos pacientes quanto à sua influência na coagulação, pela obtenção de perfis cromatográficos e quanto à coagulação em ensaios *in vitro*.

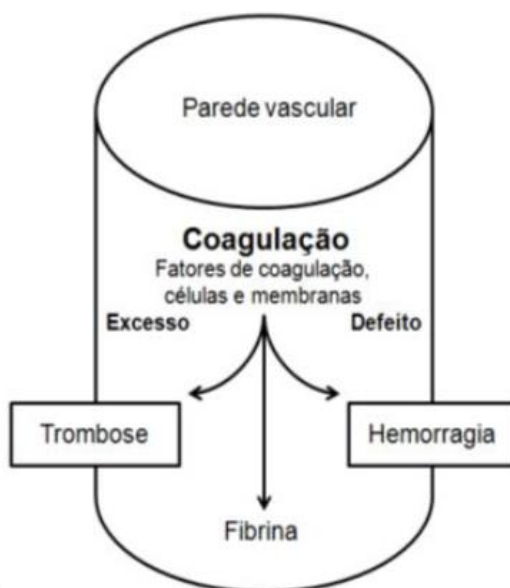
O estudo da influência das plantas medicinais nesse contexto é inovador e de extrema importância considerando que o uso dessas plantas é intrínseco ao contexto cultural brasileiro. Dessa forma, a relevância do presente projeto está na perspectiva de melhor entendimento da influência das plantas medicinais na coagulação sanguínea, o que traz consequências diretas na farmacoterapia de cardiopatas que utilizam a varfarina.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Homeostasia sanguínea

O controle da fluidez do sangue é muito complexo já que o sangue deve permanecer líquido no interior dos vasos e coagular rapidamente em casos de lesão, de modo que se deve obter um equilíbrio que evite tanto a hemorragia quanto a trombose (BRUNTON *et al.*, 2010) (Figura 1).

Figura 1 - Esquema da coagulação (SPRONK *et al.*, 2003).

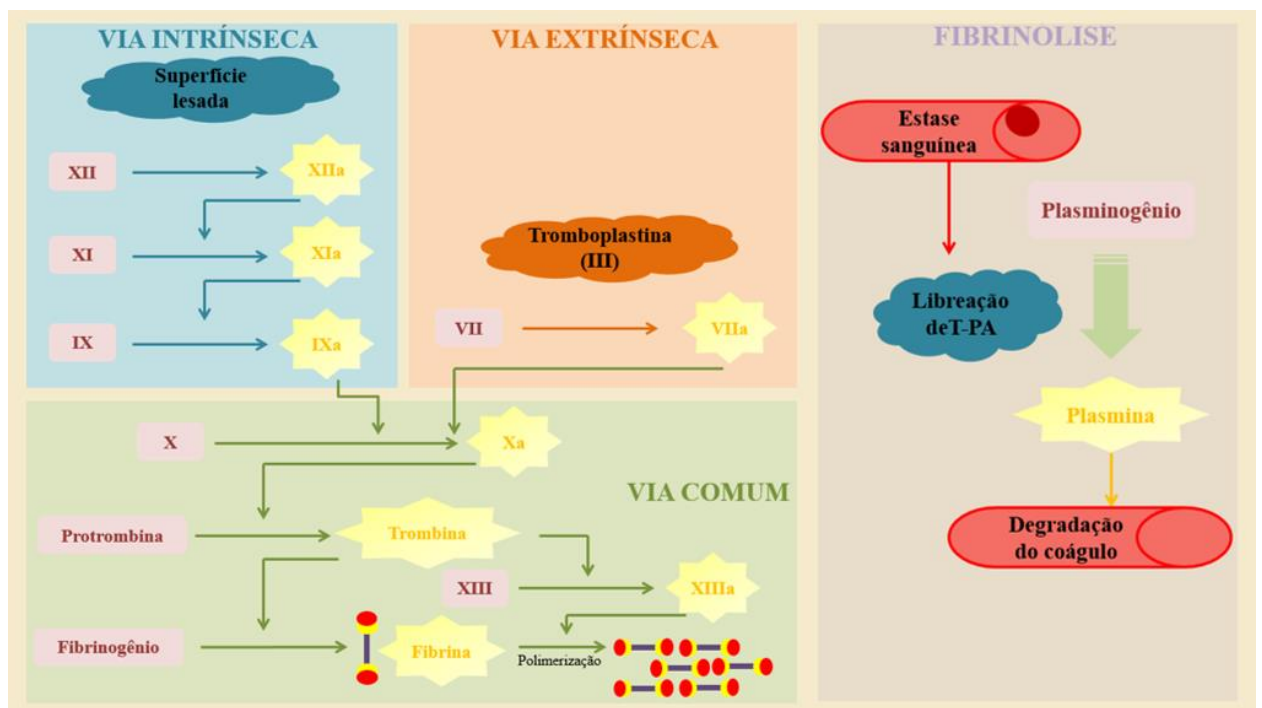


O processo da coagulação envolve duas vias, que se iniciam independentemente e convergem para um mesmo ponto: vias extrínseca e intrínseca. A via extrínseca é importante para o início da coagulação, enquanto a via intrínseca é mais importante para a sua manutenção (DAVIE *et al.*, 1991). A coagulação, de um modo geral, se inicia com a ativação das plaquetas pelo colágeno liberado do endotélio lesado. Essas plaquetas, inicialmente ativadas, liberam grânulos que por sua vez ativam ainda mais plaquetas, que se aderem ao endotélio lesado, formando um agregado que reduz temporariamente a perda de sangue, e estimulam a ativação local dos fatores plasmáticos de

coagulação (SPRONK *et al.*, 2003). Nessa etapa, há uma série de reações de ativação de zimogênios, proteínas precursoras dos fatores da coagulação, em proteases ativas, através da clivagem de ligações peptídicas.

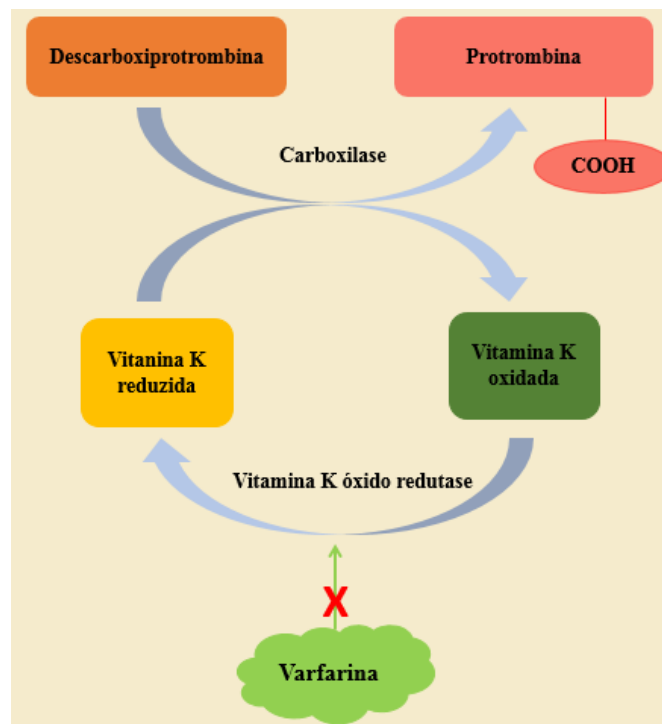
Na via extrínseca, pequenas quantidades do fator VIIa, protease ativa originada do zimogênio VII, ligam-se ao fator tecidual subendotelial que acelera a ativação do fator X pelo fator VIIa, fosfolipídeos e Ca^{2+} . Já na via intrínseca ocorre uma cascata de reações partindo da précalicreína até o fator IXa, possibilitando sua atuação na ativação do fator X, etapa na qual as duas vias se convergem para a formação da trombina (Figura 2). A trombina, por sua vez, converte o fibrinogênio em fibrina e posteriormente o fator XIIIa catalisa uma reação de transglutaminação entre suas cadeias, formando ligações cruzadas entre os monômeros de fibrina, o que aumenta a força do coágulo (BRUNTON *et al.*, 2010).

Figura 2 - Esquemas das vias intrínseca e extrínseca e fibrinólise no processo de coagulação (adaptado de ADAMS e BIRD, 2009).



Entretanto, há também no organismo, o processo de fibrinólise, que visa regular a coagulação de modo a remover os trombos de fibrina desnecessários, mantendo a fibrina nas lesões endoteliais (LIJNEN e COLLEN, 2001) (Figura 3).

Figura 3 - Carboxilação dos fatores da coagulação acoplada à oxidação da vitamina K (AGENO *et al.*, 2012).



O ativador de plasminogênio tecidual (t-PA) é liberado em resposta a sinais como estase sanguínea e catalisa a conversão de plasminogênio em plasmina, uma protease que digere os coágulos de fibrina (Figura 2). Juntas, a coagulação, a anticoagulação e a fibrinólise mantêm o delicado balanço fisiológico (SPRONK *et al.*, 2003).

Naturalmente, há diversos mecanismos reguladores que impedem que a ativação das plaquetas e coagulação ocorra em vasos sanguíneos intactos (EDELBERG *et al.*, 2001), como a síntese de prostaciclina (prostaglandina I₂) pelas células endoteliais, que inibe a agregação e secreção plaquetárias. Há também a antitrombina - uma proteína plasmática estimulada por produtos das

células endoteliais que inibem os fatores da coagulação – e a trombina, que se auto-regula de forma que quando há no mesmo meio a trombomodulina (secretada por células endoteliais íntegras), a proteína C (zimogênio homólogo a alguns fatores da coagulação) é ativada e combina com seu co-fator, a proteína S, e degrada os fatores Va e VIIIa, reduzindo a ativação da protrombina e fator X. A tromboplastina ou fator tissular, co-fator para o início da via extrínseca, é também regulada, pelo inibidor de fator tissular (ESMON, 2003).

Além dessas formas de regulação, a coagulação também é dependente da vitamina K, produzida principalmente pelas plantas verdes e consumida na alimentação humana. Essa vitamina atua como um co-fator essencial para a γ -carboxilação de resíduos de glutamato (Glu) dos fatores II, VII, IX e X, sintetizados pelo fígado na sua forma biologicamente inativa. A carboxilação está diretamente acoplada à oxidação da vitamina K a seu epóxido (Figura 3 e 4) e a formação desses resíduos γ -carboxigluatamato (Gla) produz uma mudança conformacional cálcio-dependente que promove a ligação dos cofatores às membranas fosfolipídicas para resultar na coagulação. A enzima que catalisa essa transformação, vitamina K epóxido redutase, é o alvo de vários anticoagulantes, como a varfarina (AGENO *et al.*, 2012).

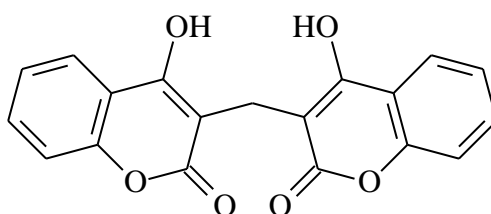
2.2 Bases farmacológicas da anticoagulação

Em 1939, a ingestão de forragem de trevo doce (*Melilotus officinalis*; Fabaceae) foi identificada como causa de hemorragia fatal no gado e o dicumarol (bis-hidroxycumarina) (Figura 4), composto presente nessa planta, foi identificado como o agente hemorrágico por Campbell e Link. A partir dessa descoberta, derivados sintéticos do dicumarol foram desenvolvidos, como por exemplo, a varfarina, inicialmente utilizada como rodenticida já que seu uso em humanos era temido devido a possível toxicidade (DEWICK, 2009). Mas, após um soldado americano tentar suicídio com essa substância e não conseguir ficou demonstrada a sua segurança relativa e esses anticoagulantes tornaram-

se a base da farmacoterapia dos distúrbios tromboembólicos (MAJERUS e TOLLEFSEN, 2006).

Os anticoagulantes orais, como a varfarina (Figura 5), inibem a vitamina K epóxido redutase, enzima que regenera a vitamina K reduzida (Figura 3) para que ela possa continuar atuando na coagulação. Desse modo, a vitamina K não pode mais atuar como co-fator na γ -carboxilação dos resíduos de

Figura 4 - Dicumarol.



glutamato (Glu) dos fatores da coagulação. Contudo, a vitamina K (Figura 6) não exerce efeito sobre as substâncias previamente carboxiladas e como os fatores da coagulação têm tempos de meia vida distintos, o efeito desses anticoagulantes orais demora alguns dias para se instalar, tempo suficiente para depuração dos fatores previamente ativados (BRUNTO *et al.*, 2010).

Figura 5 – Varfarina.

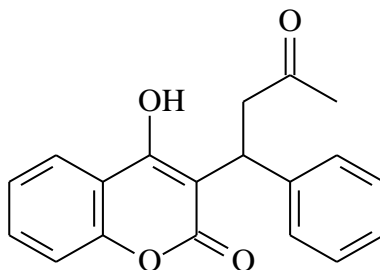
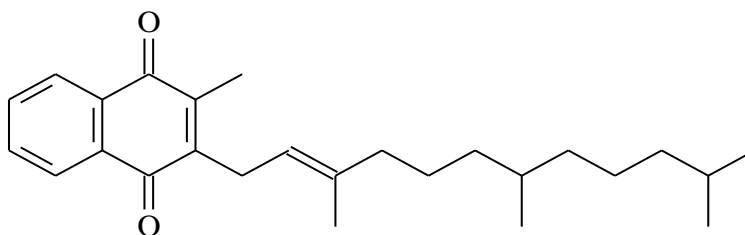


Figura 6 – Vitamina K.



Essa farmacoterapia é utilizada para a prevenção da progressão ou recidiva de trombose venosa profunda aguda ou embolia pulmonar e na prevenção do tromboembolismo venoso em paciente portadores de próteses valvares, com fibrilação atrial crônica ou tromboembolismo recorrente (SAWICKA-POWIERZA *et al.*, 2008) e ainda na prevenção de complicações tromboembólicas em pacientes chagásicos (AUGER *et al.*, 2002). Assim, o uso de anticoagulantes orais normalmente ocorre para o resto da vida dos pacientes, e por muito tempo, os inibidores da vitamina K óxido-redutase foram os únicos anticoagulantes orais disponíveis no mercado para esse fim (AGENO *et al.*, 2012).

A varfarina é comercializada na forma farmacêutica de comprimidos, nas doses de 2,5; 5; 7,5 e 10 mg, o que possibilita um tratamento ambulatorial (HIRSH *et al.*, 2003). A biodisponibilidade da varfarina é quase total e 99% dela liga-se às proteínas plasmáticas, principalmente a albumina. A varfarina é um racemato no qual a forma S é cerca de cinco vezes mais ativa que a R. Ela é biotransformada no fígado, eliminada por urina e fezes e apresenta interações diversas com medicamentos e alimentos ricos em vitamina K. O sangramento constitui sua principal forma de toxicidade em razão da exacerbação do seu efeito anticoagulante, e por isso torna-se imprescindível o monitoramento do paciente para ajuste de dose através do tempo de protrombina (TP) e da relação normalizada internacional (RNI).

O TP é um dos testes mais comuns para monitorizar a anticoagulação, no qual adiciona-se tromboplastina (fator tissular) e cálcio ao plasma. A tromboplastina

é um “extrato” que contém fator tecidual e fosfolipídico para promover a coagulação. A partir dessa amostra o tempo para que a coagulação ocorra é medido opticamente e tem-se o TP. Entretanto, há diferenças entre a tromboplastina disponível no mercado, o que gera variações na resposta do exame. Por isso, o RNI foi instituído pela Organização Mundial da Saúde (OMS), como forma de padronizar a tromboplastina comercial com a referência para que se obtenha um resultado preciso e reprodutível (Figura 7) (HIRSH *et al.*, 2003; MAJERUSU e TOLLEFSEN, 2006; SPINLER *et al.*, 2005). Assim, o RNI é uma forma de avaliar a eficácia da terapia anticoagulante (SAWICKA-POWIERZA *et al.*, 2008).

O valor alvo de RNI é entre 2,00 e 3,00, porém em casos nos quais se deseja alcançar uma anticoagulação mais intensa devido à presença de prótese valvar mecânica ou tromboembolismo recorrente, a faixa alvo pode tornar-se mais alta, sendo entre 2,50 e 3,50. A monitorização pode ser realizada com menos frequência à medida que se consegue uma estabilização do RNI. Entretanto, deve-se atentar para o fato de que a relação dose-resposta da varfarina pode ser influenciada por diversos fatores genéticos e ambientais: idade, tipo físico, dieta, interação com outros medicamentos administrados, patologias concomitantes, função renal, polimorfismos genéticos, falta de precisão nos exames laboratoriais de monitorização, uso incorreto do medicamento pelo paciente ou falha na comunicação médico-paciente. Dessa forma, torna-se essencial o acompanhamento do paciente através da monitorização do RNI para que se faça os ajustes de dose necessários e se obtenha uma resposta favorável na terapia (HIRSH *et al.*, 2003).

Figura 7 - Cálculo do RNI (MAJERUSU e TOLLEFSEN, 2006).

$$\mathbf{RNI} = \left(\frac{TP_{\text{paciente}}}{TP_{\text{referência}}} \right)^{\text{ISI}}$$

ISI = Índice de sensibilidade internacional

Dentre as formas de monitorização, as clínicas de anticoagulação têm-se destacado na melhoria da eficácia do tratamento e qualidade de vida geral do paciente (VAN WALRAVEN *et al.*, 2006). Essas clínicas são serviços especializados para monitorizar a anticoagulação de acordo com procedimentos padronizados para tratar, monitorizar e educar os pacientes em uso de anticoagulantes orais (CONNOCK *et al.*, 2007). Há diversos estudos que mostram o benefício da monitorização realizado em clínicas de anticoagulação com base na manutenção do RNI na faixa terapêutica (BISCUP-HORN *et al.*, 2008). Dessa forma, serviços que visem identificar precocemente fatores de risco, intervir apropriadamente e em tempo real em casos de complicações, supervisionar a adesão e educar o paciente, além de monitorizar seu RNI poderão proporcionar uma farmacoterapia mais efetiva e segura (NUTESCU, 2003).

Devido aos inconvenientes dessa monitorização necessária, buscaram-se outras formas de anticoagulação oral e atualmente têm-se alternativas, normalmente pouco acessíveis devido ao alto custo, como os inibidores diretos da trombina (dabigatran) e os inibidores do fator Xa (rivaroxaban, apixaban e edoxaban) (ROMERO, 2013). Esses medicamentos trazem o benefício de não requererem monitoramento laboratorial para realização frequente de ajustes de dose por serem dose-dependentes (TUN e OO, 2013). O dabigatran é um inibidor competitivo, potente e reversível que se liga ao sítio ativo da trombina livre ou do complexo trombina/fibrina, de maneira dose dependente. Os demais se ligam direta e seletivamente à trombina livre ou já complexada, impedindo a

conversão da protrombina para a trombina na via intrínseca e extrínseca, já que o fator Xa é a conversão dessas vias (TSU e DAGGER, 2013).

2.3 Distúrbios cardiovasculares

Os distúrbios cardiovasculares referem-se genericamente a quaisquer doenças que envolvam coração e/ou seus vasos. Dentre essas doenças, a trombose venosa profunda aguda, embolia pulmonar, fibrilação atrial e tromboembolismo recorrente, são alguns exemplos que podem ser tratados pelo uso de anticoagulantes orais (SAWICKA-POWIERZA *et al.*, 2008).

2.3.1 Fibrilação atrial

A fibrilação atrial é uma arritmia cardíaca na qual o estímulo para que se inicie o ciclo cardíaco deixa de acontecer no nódulo sinusal e passa a se originar no miocárdio atrial. Essa patologia normalmente surge devido ao envelhecimento (CHEN *et al.*, 1999), mas também pode ser decorrente da doença valvar mitral. Nesses indivíduos há maior tendência a eventos tromboembólicos devido à possibilidade de lesão endotelial causada pela inconstância dos batimentos cardíacos (LAVITOLA *et al.*, 2010), portanto em sua terapia pode-se empregar anticoagulantes orais (PAOLETTI *et al.*, 2011).

2.3.2 Valvulopatia reumática

A valvulopatia reumática é uma inflamação das válvulas cardíacas, proveniente de sequela importante da febre reumática (TCHOUMI e BUTERA, 2009) e resposta cumulativa do organismo a infecções frequentes causadas pelo *Streptococcus pyogenes* do grupo A (DALE *et al.*, 2013). Pacientes com esse distúrbio têm propensão a distúrbios tromboembólicos pela alteração do fluxo sanguíneo, e mesmo a substituição da válvula por uma prótese metálica nos casos mais graves não elimina o potencial tromboembólico desses pacientes, que assim devem aderir à terapia anticoagulante (HANANIA, 2003).

2.4 Uso de plantas medicinais

As plantas medicinais são utilizadas há muitos anos com a finalidade de alimentar e curar os males que vem afligindo as pessoas (TACHJIAN *et al.*, 2010) e sua contribuição é inquestionável. Além dos chás e fitoterápicos, diversos medicamentos sintéticos e semi-sintéticos utilizados atualmente originaram-se ou originam-se até hoje de plantas medicinais, como o ácido acetilsalicílico, avermectina, artemisinina, lovastatina, ciclosporina, paclitaxel, dentre outros (NEWMAN E CRAG, 2012). Isso se deve ao fato de que as plantas são uma fonte inesgotável de substâncias bioativas, já que produzem moléculas de alta complexidade estrutural que podem interagir com receptores, produzindo reações diversas (LI E VEDERAS, 2009).

No Brasil, a união dos conhecimentos indígenas com os conhecimentos trazidos por portugueses, espanhóis e africanos, além da grande biodiversidade brasileira e das plantas exóticas trazidas por esses povos, gerou o que se conhece por medicina tradicional brasileira (BRANDÃO *et al.*, 2011). Assim, tem-se no país um elevado uso popular dessas plantas medicinais sem que haja sido estabelecido e/ou comprovado sua eficácia e segurança (BRAGA E CASTILHO, 2011).

Esse é também um cenário mundial: mesmo com os avanços na medicina moderna, milhões de pessoas ainda utilizam plantas medicinais e seus derivados, tanto pelos benefícios variados (ULBRICHT *et al.*, 2008), quanto por acreditar-se que o que é natural não traz riscos (GOHIL e PATEL, 2007) e por ser uma forma de tratamento mais barato, no caso de países com assistência a saúde deficitária (SILVA *et al.*, 2006).

Contudo, devido às poucas evidências da eficácia e segurança da maioria desses produtos e a um controle de qualidade precário dessas plantas desde seu cultivo até o uso, pode-se ocorrer efeitos adversos por contaminantes ou pelo próprio metabolismo vegetal (ULBRICHT *et al.*, 2008). Outro problema está no fato de os profissionais de saúde não supervisionarem esse uso, que

pode gerar interações diversas em caso de uso concomitante com os medicamentos tradicionais (GOHIL e PATEL, 2007).

2.4.1 Uso de plantas medicinais durante a farmacoterapia da anticoagulação

Produtos naturais constituem um fator de risco adicional a pacientes tratados com varfarina uma vez que pacientes geralmente esquecem ou omitem seu uso, por não se darem conta da importância dessa informação, e os profissionais de saúde raramente perguntam sobre esse uso, pela desinformação a cerca da relevância das interações planta-medicamento (AGENO *et al.*, 2012). Isso resulta num controle inadequado do RNI sem que se determine a causa (KIDD e HANUMANTHARAYA, 2010).

Aproximadamente 30 plantas/produtos naturais foram implicados em interações com medicamentos envolvidos na anticoagulação, como a varfarina. (Ulbricht *et al.*, 2008). Entre eles estão principalmente os iniciados com G na língua inglesa: garlic (alho), ginger (gengibre), ginkgo (ginkgo) e ginseng (ginseng) (CHEN *et al.*, 2011).

Entretanto, as plantas medicinais têm suas composição e qualidade variadas, em função do tipo e ambiente de cultivo, afetando o perfil de interação, assim como a confiança dos relatos (WILLIAMSON, 2005). O risco se torna ainda maior no uso de fórmulas que contém mais de uma planta em sua composição (SAMUELS, 2005) ou no caso de pacientes com doenças cardiovasculares, que geralmente possuem comorbidades e fazem uso concomitante de vários medicamentos (MARTINS *et al.*, 2013).

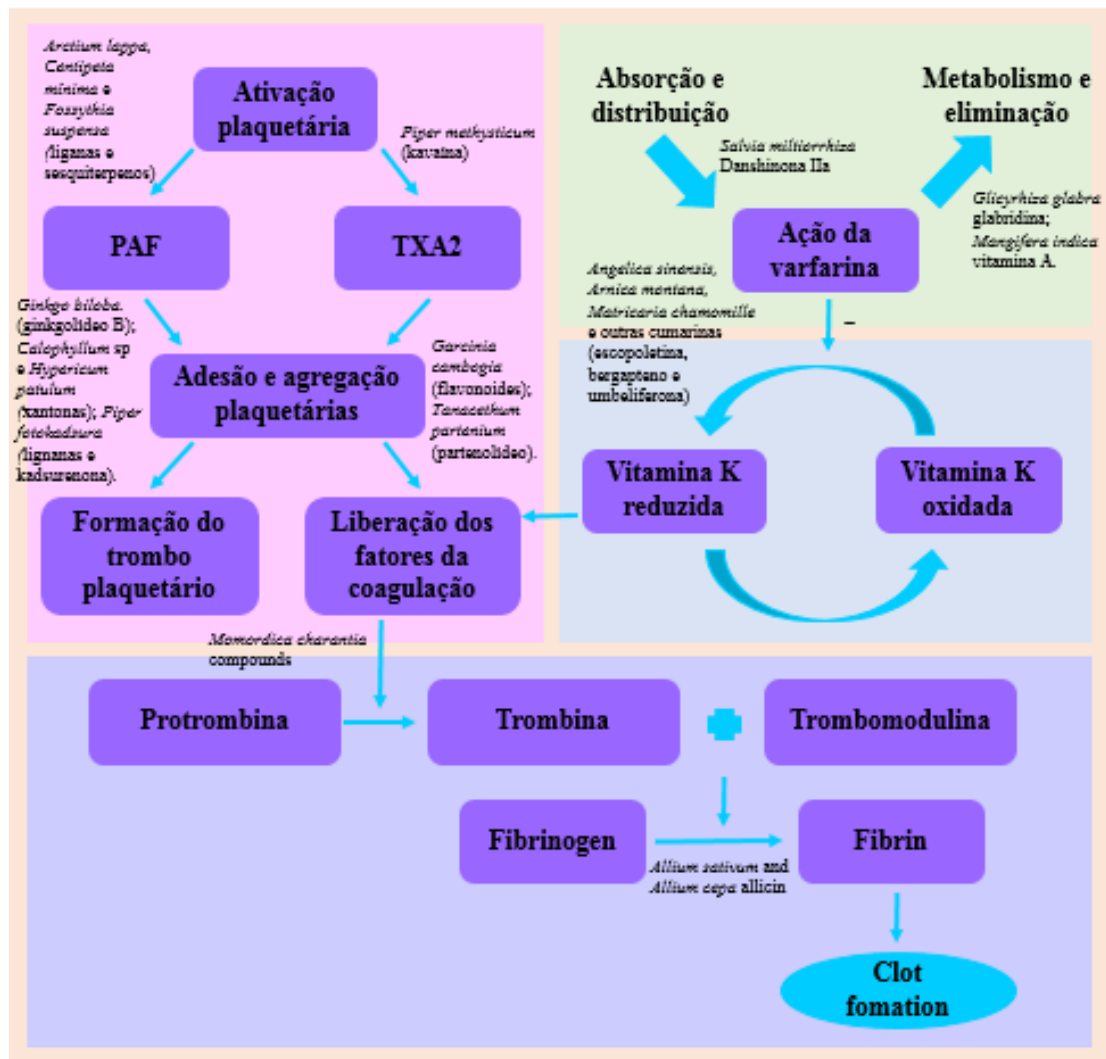
Numa revisão para determinar as possíveis interações plantas-medicamentos, a varfarina foi o fármaco cardiovascular mais envolvido (IZZO *et al.*, 2005; ARGENTO *et al.*, 2000). Falhas na obtenção de uma anticoagulação adequada já foram descritas devido a interações entre varfarina e produtos naturais (MENDOZA *et al.*, 2004), como o uso de chá verde que leva a uma diminuição

do RNI (GOHIL e PATEL, 2007). As interações de produtos naturais podem envolver mecanismos farmacocinéticos e farmacodinâmicos, afetando significativamente os níveis de princípio ativo circulante, apesar da indução ou inibição metabólica ser o mecanismo principal (CHEN *et al.*, 2011).

A complexidade da hemostasia sanguínea propicia um ambiente favorável a interações devido a existência de diversos alvos (Figura 8). Dentre os possíveis mecanismos de interação com a varfarina, destaca-se a inibição do fator de agregação plaquetário (PAF), que potencializará o efeito anticoagulante do medicamento, em plantas como matica (*Piper aduncum*) e melão de são caetano (*Momordica charantia*). A alteração do metabolismo da varfarina também ocorre devido à inibição de enzimas do citocromo P450, aumentando seu tempo de meia vida, como o romã (*Punica granatum*). Outros mecanismos citados foram ação fibrinolítica (alho – *Allium sativum* – e cebola – *Allium cepa*) e inibição da ciclooxigenase (Serenoa – *Serenoa rapens*) ou do tromboxano A2 (crataego – *Crataegus monogyna*), que atuam facilitando a agregação plaquetária (SPRONK *et al.*, 2003).

Há também estudos que identificam flavonoides, catequinas, xantonas, terpenoides e lignanas como interferentes no processo de anticoagulação. Entretanto, como não há mecanismos definidos dessas interações, não é possível extrapolar esses resultados para a classe do metabólito, como se faz com as cumarinas, mas essas informações podem fornecer indícios das classes de metabólitos relacionadas (KOSHY e VIJAYALAKSHMI, 2000; OKU *et al.*, 2005; MOORE *et al.*, 2009).

Figura 8 – Alvos potenciais da interferência de plantas medicinais e seus metabólitos na hemostasia sanguínea e na atividade da varfarina. Legenda: PAF= fator de agregação plaquetária e TXA2= tromboxano A2.



Em casos específicos, os flavonoides da garcínia (*Garcinia cambogia*) ativam a adesão e agregação plaquetárias (KOSHY e VIJAYALAKSHMI, 2000), as xantonas de espécies da família Clusiaceae (*Hypericum patulum*, *Calophyllum inophyllum* e *C. austroindium*) atuam como inibidoras do PAF (OKU et al., 2005), assim como as lignanas e sesquiterpenos da bardana (*Arctium lappa*), da forsitia (*Forsythia suspensa*) e da centrípeta (*Centipeta minima*) (IWAKAMI et al., 1992). Já as catequinas do chá verde (*Camellia sinensis*) atuam de uma forma mais geral, mantendo a função endotelial e a homeostasia vascular, de forma que seu uso contínuo diminuiria a necessidade de varfarina (MOORE et al., 2009).

Também há as interações mais conhecidas, que são causadas por plantas com grande quantidade de vitamina K - antagonizando o efeito da varfarina, como chá verde (*Camellia sinensis*). Nesse contexto, a dieta é muito importante, pois está envolvida na modificação do risco individual para o desenvolvimento de distúrbios trombóticos (PHANG *et al.*, 2011), de forma que pacientes em farmacoterapia de longa duração com varfarina são muito sensíveis a flutuações na ingestão de vitamina K na dieta, já que ela inibe os efeitos da varfarina por atuar na carboxilação dos resíduos de glutamato (AGENO *et al.*, 2012). Os vegetais de folhas verdes, por exemplo, já são conhecidos como ricos em vitamina K e por isso sua ingestão deve ser controlada. Alguns deles são couve, espinafre, nabo, acelga, salsa e mostarda (MARCASOM, 2007).

Portanto, como a atividade biológica está relacionada à composição química, o estudo dos compostos presentes nas plantas medicinais pode auxiliar a elucidar as possíveis interações na hemostasia sanguínea. As classes de metabólitos com atividade comprovada nesse controle complexo da fluidez sanguínea podem direcionar a avaliação química e biológica das espécies.

2.4.2 Espécies vegetais estudadas

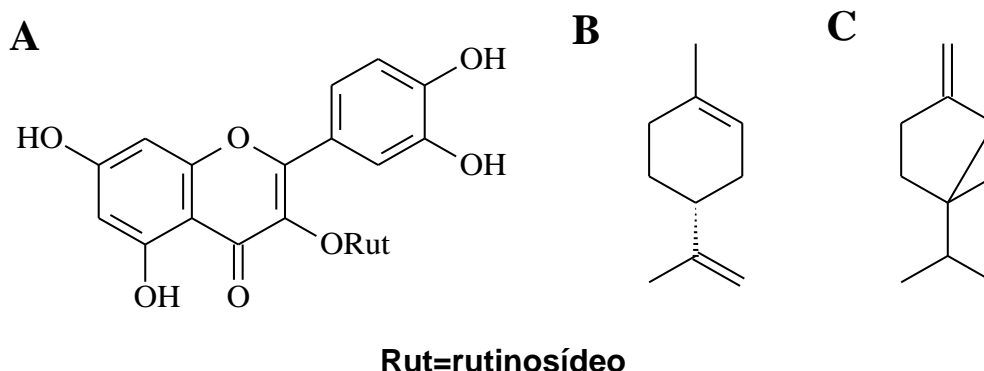
As plantas medicinais citadas pelo pacientes entrevistados foram avaliadas *in vitro* quanto a sua atividade na coagulação sanguínea e as que apresentaram maior atividade anticoagulante foram estudadas quanto a sua composição química em literatura científica para direcionamento dos estudos fitoquímicos.

2.4.2.1 *Citrus sinensis*

Citrus sinensis ou laranja, originária do sudeste asiático, é, atualmente, consumida em todo o mundo como uma fonte de substâncias antioxidantes que auxiliam o sistema imune. É uma pequena árvore que cresce em ambientes tropicais, semi-tropicais e regiões temperadas quentes. Seu fruto é muito consumido, mas suas folhas também são muito utilizadas para fazer chás. Alguns das classes de compostos comumente encontradas nessas plantas e

responsáveis pela maior parte de suas atividades biológicas são: flavonoides como hesperedina, rutina, naringina, outros polifenóis e compostos voláteis que compõe seu óleo essencial, como limoneno e sabineno (Figura 9). Esses compostos biologicamente ativos auxiliam na prevenção de aterosclerose, câncer, pedra nos rins, úlceras e redução do colesterol devido a sua ação antioxidante e anti-inflamatória (ETEBU e NWAUZOMA, 2014).

Figura 9 – Estruturas químicas de alguns compostos isolados de *Citrus sinensis*: rutina (A), limoneno (B) e sabineno (C).

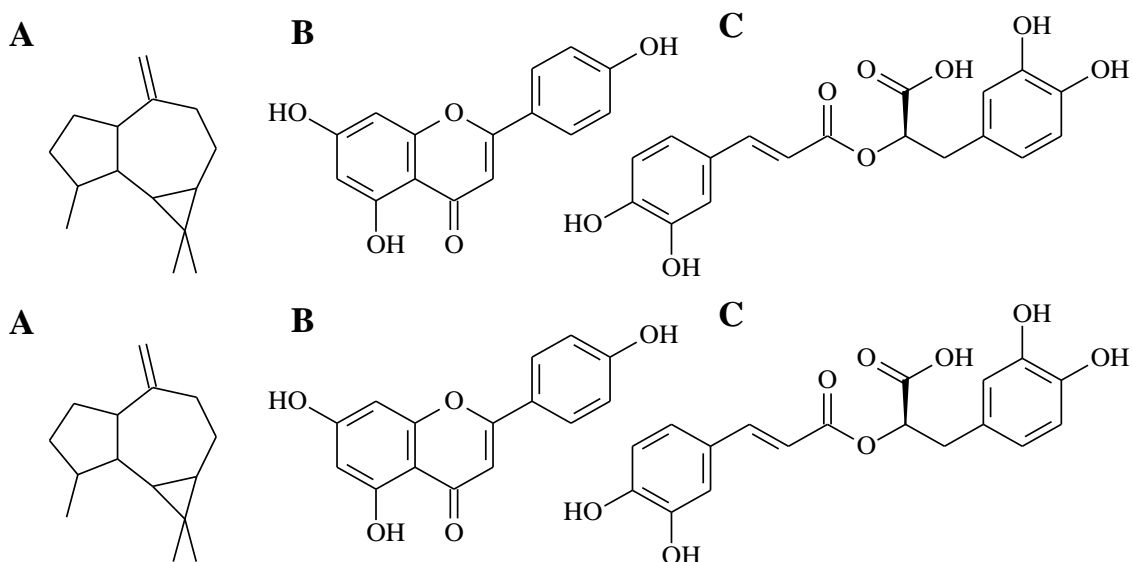


2.4.2.2 *Lippia alba*

Lippia alba é uma planta aromática que pertence a família Verbenaceae. Essa planta foi muito utilizada na França durante a escravidão e atualmente seu uso é mais comum nas Américas Central e do Sul. Ela tem diversos nomes tradicionais e no Brasil é conhecida como cidreira, bem como outras 17 espécies com usos similares. Seus principais usos tradicionais envolvem sistema gastrointestinal, respiratório, cardiovascular e como sedativo. Essa versatilidade faz com que a *L. alba* seja de grande interesse econômico, mas apesar disso há poucos estudos comprovando suas atividades. Com relação à composição química, estudou-se muito sua composição de óleo essencial, que é bastante variável, sugerindo a existência de vários quimiotipos. Seu óleo essencial é composto por monoterpenos como o cineol, sesquiterpenos como o aromadendreno (Figura 10), dentre outros. Além desses compostos, também já foram isolados flavonoides como apigenina (Figura 10), luteolina e quercetina,

fenólicos como ácido caféico e ácido rosmarínico (Figura 10) e triterpenos como ácido ursólico (HENEBELLE *et al.*, 2008).

Figura 10 – Estruturas químicas de alguns compostos isolados de *Lippia alba*: aromadendreno (A), apigenina (B) e ácido rosmarínico (C).

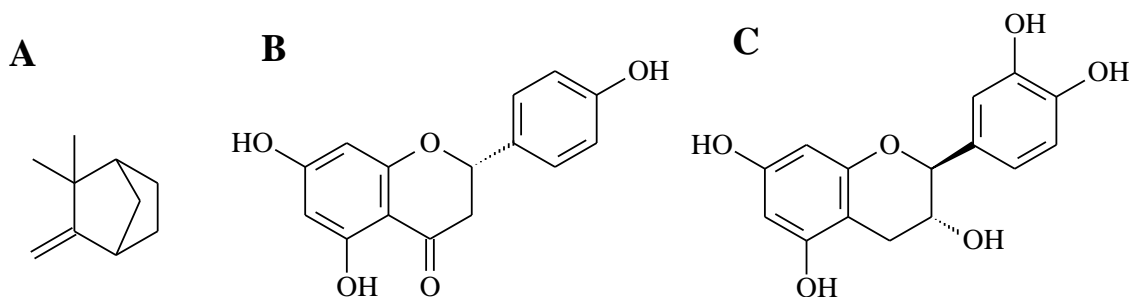


2.4.2.3 *Mentha crispata*

O gênero *Mentha* pertence a família Lamiaceae e pode ser encontrado distribuído mundialmente. A *M. crispata*, especificamente, é nativa da África, Ásia temperada e Europa. O grande número de diferentes nomes taxonômicos atribuídos às mentas/hortelãs reflete a grande variação morfológica entre as espécies. De aroma refrescante, as mentas têm, além de grande aplicação terapêutica, um vasto uso culinário. Na medicina tradicional, essas plantas tem sido popularmente usadas para tratar náusea, bronquite, flatulência, anorexia, úlcera e problemas do fígado devido a suas atividades anti-inflamatória, anti-emética, sudorífera, anti-espasmódica, analgésica e estimulante. Além de óleo essencial, rico em canfeno (Figura 11), germacreno e mirceno, foi descrita a presença de derivados do ácido cinâmico, flavonoides como apigenina, luteolina e naringenina (Figura 11), taninos como catequina (Figura 11) e epicatequina e esteroides nesse gênero. No entanto, apesar de vários tipos de compostos demonstrarem atividades biológicas, devido a sua propriedade de

sequestrador de radicais, os compostos aromáticos do hortelã tem recebido mais atenção (KUMAR et al., 20110; BARROS et al., 2015).

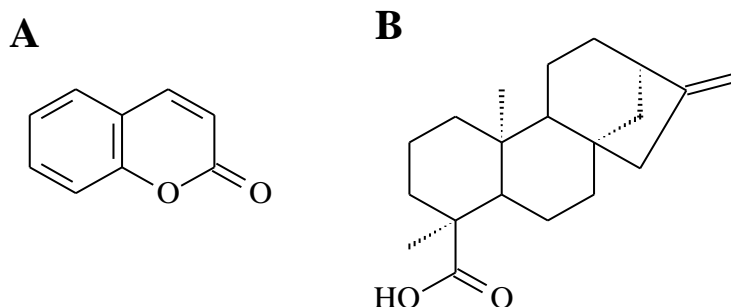
Figura 11 – Estruturas químicas de alguns compostos isolados de *Mentha sp.*: canfeno (A), naringenina (B) e catequina (C).



2.4.2.4 *Mikania laevigata*

Mikania é um gênero pertencente à família Asteraceae, constituído principalmente por plantas de pequeno porte, como ervas e arbustos. Sua distribuição é tropical e subtropical nas Américas e grande parte das espécies é pode ser encontrada no Brasil. A *M. laevigata*, popularmente conhecida como guaco, é nativa da América do Sul, cresce espontaneamente nas margens de rios e tem boa adaptação ao cultivo doméstico, o que contribui para disseminar seu uso. O guaco é muito empregado no tratamento de condições alérgicas e inflamatórias, devido a propriedades tônicas, antipiréticas, expectorantes entre outras. Estudos pré-clínicos indicam que essa planta pode promover broncodilatação e tem atividades anticoagulantes, antitrombóticas, antiulcerogênicas, hipoalergênicas, antiespasmódicas, anti-inflamatorias, analgésicas, antiofídicas e antiparasitárias. Estudos fitoquímicos revelam a presença de álcoois, ácidos, aldeídos, ésteres e sesquiterpenos compondo seu óleo essencial, além de outros terpenos, flavonoides, taninos, saponinas e cumarinas. A cumarina, juntamente com o ácido caurenóico (diterpeno) (Figura 12), são os principais compostos relacionadas às atividades biológicas (CZELUSNIAK et al., 2012; GASPARETTO et al., 2013).

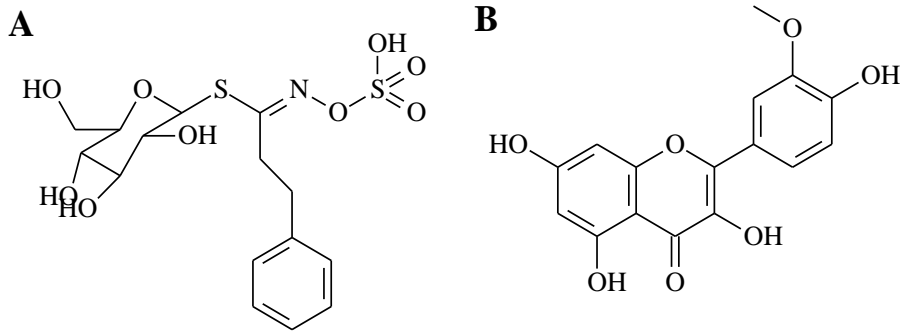
Figura 12 – Estruturas químicas de alguns compostos isolados de *Mikania laevigata*: cumarina (A) e ácido caurenóico (B).



2.4.2.5 *Nasturtium officinale*

Nasturtium officinale, conhecido no Brasil como agrião, é uma planta nativa da Europa e economicamente importante devido a sua aplicação culinária. É uma espécie de valor nutricional alto devido a presença de grandes quantidades de vitamina C, provitamina A, ácido fólico, iodina, ferro, proteínas e compostos de cálcio e enxofre. Além disso, o agrião tem um histórico de uso medicinal devido a sua atividade antioxidante e sua promissora atividade anti-cancerígena. *N. officinale* pertence à família Brassicaceae, cujos vegetais, como o agrião, representam a maior parte dos vegetais consumidos pelo homem. Além dos compostos já citados, essa família é conhecida por produzir uma classe de compostos bem específicos, os glicosinolatos, como gliconasturtiin (Figura 13), glicobracissin, gliconapin. Essas substâncias têm em sua fórmula molecular átomos de enxofre e tem grande aplicabilidade na defesa das plantas, além de ser o principal responsável pelo odor do agrião. Flavonoides (quercetina, campferol e isoramnetina (Figura 13), taninos, derivados do ácido hidroxicinâmico, fenilpropanoides e outros fenólicos também foram ser isolados do *N. officinale* e contribuem para seu sabor adstringente e sua propriedade antioxidante e anti-inflamatória (GONÇALVES et al., 2009; JAHANGIR et al., 2009).

Figura 13 – Estruturas químicas de alguns compostos isolados de *Nasturtium officinale*: gliconasturtiim (A) e isoramnetina (B).



3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Descrever o perfil de utilização de plantas medicinais e fitoterápicos em cardiopatas em uso de varfarina e avaliar suas possíveis interferências na hemostasia sanguínea e na farmacocinética/farmacodinâmica da varfarina; e o perfil fitoquímico de plantas selecionadas.

3.2 Objetivos específicos

3.2.1 Elaborar questionário sobre o uso de plantas medicinais para ser aplicado aos pacientes acompanhados;

3.2.2 Entrevistar cardiopatas atendidos no ambulatório de anticoagulação do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais sobre o uso de plantas medicinais;

3.2.3 Identificar e analisar os hábitos de consumo de plantas medicinais em cardiopatas atendidos no ambulatório de anticoagulação do Hospital das Clínicas da UFMG;

3.2.4 Selecionar as plantas medicinais menos estudadas na literatura científica a respeito da sua influência na homeostasia sanguínea;

3.2.5 Avaliar interferência das plantas medicinais selecionadas na coagulação em ensaios, *in vitro*;

3.2.6 Obter perfil fitoquímico por cromatografia líquida de alta eficiência e cromatografia em camada delgada das plantas medicinais selecionadas.

CAPÍTULO 1

Perfil e fatores associados ao consumo de plantas medicinais por cardiopatas em uso de varfarina em um ambulatório de anticoagulação

1 MATERIAS E MÉTODOS

O presente estudo é um subprojeto do projeto intitulado Fatores de Risco para Complicações da Anticoagulação Oral em Pacientes com Doenças Cardiovasculares Atendidos em Ambulatórios de Referência em Belo Horizonte: um Estudo de Coorte, cuja coordenação é de responsabilidade da Professora Maria Auxiliadora Parreiras Martins do Departamento de Produtos Farmacêuticos da Faculdade de Farmácia da UFMG (Aprovação registrada no Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG sob o código CAAE – 08136613.4.0000.5149) ANEXO V.

1.1 Desenho de estudo

Foi delineado um estudo observacional transversal para entrevista de pacientes ambulatoriais em uso de varfarina para avaliação da utilização de plantas medicinais em cardiopatas atendidos em clínica de anticoagulação do município de Belo Horizonte.

1.2 Local de realização

O estudo foi realizado na Clínica de Anticoagulação do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais (HC/UFMG). Trata-se de um hospital público universitário que desempenha papel de referência regional na assistência aos pacientes de alta e média complexidade.

1.3 Sujeitos do estudo

1.3.1 Critérios de seleção

Foram avaliados para inclusão todos os pacientes ambulatoriais, de ambos os sexos, com idade igual ou superior a 18 anos, que estivessem em uso de varfarina, e que:

- estivessem sob acompanhamento presencial e regular na clínica de anticoagulação do HC/UFMG.

- apresentassem as seguintes indicações para uso da varfarina: diagnóstico definitivo de cardiopatia com pelo menos uma indicação para uso crônico de varfarina, tais como fibrilação atrial e valvulopatia reumática com presença de prótese mecânica valvar.

1.3.2 Critérios de exclusão

Foram considerados os critérios de exclusão:

- dificuldade cognitiva que impossibilitasse a comunicação direta com o paciente e falta de cuidador disponível.

A avaliação dos critérios de inclusão / exclusão foi realizada utilizando-se formulário especificamente elaborado para essa etapa da pesquisa (Anexo II).

1.3.3 Número de participantes

O tamanho da amostra foi calculado de acordo com a fórmula baseada em Charan e Biswas (2013) (Figura 14). Atendendo ao cálculo amostral, foram incluídos 273 pacientes que atenderam aos critérios de inclusão, considerando um intervalo de 99% de confiança (Z), erro de 5% (E), população de 500 pacientes (N), proporção de uso populacional de plantas de 0,65 (\hat{p}) e de não uso de 0,35 (\hat{q}). O valor de 0,65 utilizado para a prevalência de uso de plantas medicinais foi obtido em estudo piloto na mesma população.

Figura 14 – Fórmula para determinação do tamanho da amostra (n) baseada na estimativa da proporção populacional de Charan e Biswas (2013).

$$n = \frac{N \cdot \hat{p} \cdot \hat{q} \cdot (Z_{\alpha/2})^2}{\hat{p} \cdot \hat{q} \cdot (Z_{\alpha/2})^2 + (N - 1) \cdot E^2}$$

1.3.4 Recrutamento

O recrutamento de pacientes na instituição foi realizado de forma consecutiva de maio a outubro de 2014. A captação dos pacientes foi realizada por dois entrevistadores treinados que tiveram contato direto com os mesmos na sala de espera para o atendimento à consulta de controle da anticoagulação. Durante a entrevista, foram feitos esclarecimentos sobre a pesquisa, assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) (Anexo I) e os questionamentos pertinentes.

1.4 Coleta de dados

1.4.1 Dados sócio-demográficos e clínicos

A elaboração do instrumento/questionário (Anexo II) utilizado foi baseada nas diretrizes estabelecidas do Fórum de Anticoagulação (Garcia *et al.*, 2008).

Foram coletadas as seguintes variáveis:

- sócio-demográficas: sexo, idade, cor da pele, coabitação, situação conjugal, renda familiar, escolaridade.
- clínicas: co-morbidades, uso de álcool, medicamentos em uso, auxílio para administração da varfarina, TTR.

1.4.2 Dados sobre o uso de plantas medicinais

Os dados foram coletados em entrevista com o paciente através de questionário especificamente elaborado para este trabalho (Anexo III).

Foram obtidas as seguintes variáveis: planta ou fitoterápico utilizado, forma de utilização, modo de preparo, forma de obtenção da planta, frequência de uso, indicação, finalidade, efeitos observados, associações com outras plantas.

1.4.3 Dados acerca das plantas medicinais citadas

Os dados relativos às plantas medicinais citadas pelos pacientes como nome científico, origem, uso etnobotânico e influência na homeostasia sanguínea foram pesquisados em literatura específica utilizando bases de dados como Pubmed, Medscape, Science Direct, Lilacs, Wiley Online Library, dentre outras. As palavras-chave utilizadas envolveram combinações entre as seguintes palavras: warfarin, herb, interaction, coagulation.

1.5 Análise Estatística

Os dados validados por dupla digitação no software Epi Data 3.1 foram analisados mediante uso do programa "Statistical Package of the Social Sciences" (SPSS) versão 13.0. Todos os dados quantitativos foram analisados quanto ao perfil de normalidade da distribuição pelo teste Kolmogorov-Smirnov, uma vez que a amostra contemplava mais de 50 pacientes. Os dados obtidos foram apresentados por média e desvio padrão (no caso de dados normais), ou por mediana e intervalo interquartilico (no caso de dados não normais). A análise bivariada envolveu a comparação das variáveis sociodemográficas e clínicas com o consumo de plantas e foi realizada mediante o teste t para variáveis quantitativas com distribuição normal e o teste de Mann-Whitney para variáveis quantitativas com distribuição não-normal. Para variáveis qualitativas, foi utilizado o teste do qui-quadrado e o teste exato de Fisher, quando indicado. Considerou-se nível de significância de 5%.

1.6 Aspectos éticos

Considerando-se os termos da Resolução 466/2012 do Conselho Nacional de Saúde, todos os aspectos éticos desta legislação foram preservados ao envolver seres humanos como sujeitos de pesquisa. A proposta de estudo Fatores de Risco para Complicações da Anticoagulação Oral em Pacientes com Doenças Cardiovasculares Atendidos em Ambulatórios de Referência em Belo Horizonte: um Estudo de Coorte foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG, e dos Hospitais Risoleta Tolentino Neves e Odilon Behrens (Anexo IV). O presente estudo faz parte do sétimo subitem do item 4.2 do referido projeto de pesquisa e se restringiu aos pacientes do HC-UFMG. Os objetivos da pesquisa foram informados pelos pesquisadores a cada paciente, sendo o mesmo incluído no estudo após a assinatura do TCLE. Os resultados dessa investigação estão sendo divulgados assegurando-se que nenhuma forma de identificação individual seja exposta.

Todos os sujeitos incluídos na pesquisa tiveram seu estado de saúde avaliado de maneira global e receberam todo o esclarecimento e assistência para os problemas que vieram a ser detectados, bem como encaminhamento para serviços de saúde e para a Previdência Social, sempre que necessário. Os riscos relacionados aos procedimentos dessa pesquisa puderam envolver gasto de tempo ou qualquer desconforto ao responder ao questionário de pesquisa, o que foi minimizado aproveitando-se o deslocamento do paciente para as consultas de rotina e respeitando-se a disponibilidade do paciente.

2 RESULTADOS E DISCUSSÃO

2.1 População de estudo

Foram coletados dados de 273 pacientes acompanhados na clínica de anticoagulação (Tabela 1). Dentre eles, 183 (67%) relataram pelo menos um uso de planta medicinal recentemente e 90 (33%) não relataram uso.

Um fitoterápico é um medicamento obtido empregando-se exclusivamente matérias-primas ativas vegetais, já uma planta medicinal é uma espécie vegetal utilizada tradicionalmente para fins terapêuticos. O uso de plantas medicinais para fins terapêuticos ocorre desde o período dos Neanderthal (Hodges e Kam, 2002). As pessoas têm, cada vez mais, usado as plantas para esse fim e estima-se que nos EUA em torno de 25% dos adultos utilizem suplementos e/ou plantas medicinais (COHEN E ERNST, 2010). A Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que, no países em desenvolvimento, em média 72% da população faz uso desse tipo de medicina, fato que reflete as condições sociais de países como o Brasil, onde quase 65% da população não têm acesso aos medicamentos comerciais (MAZZARI E PRIETO, 2014). No caso de pacientes com doenças crônicas como doenças cardiovasculares, esse número gira em torno de 50% de pacientes com hábitos de uso de plantas medicinais (TSAI *et al.*, 2012), criando uma situação preocupante devido a possibilidade de interações entre essas plantas e os diversos medicamentos que costumam ser usados para essas condições clínicas.

Desde a década de 1970, a Organização Mundial da Saúde (OMS) vem reconhecendo a importância das plantas medicinais como recurso terapêutico e estimulando o desenvolvimento de pesquisas que as transformem em produtos com eficácia, segurança e qualidade (RICARDO *et al.*, 2015). No Brasil, 5 milhões de pessoas necessitam de plantas medicinais, considerando apenas a atenção básica, e políticas governamentais têm buscado estimular esse uso e distribuição através do SUS (ALENCAR *et al.*, 2014).

No Brasil, as plantas medicinais são usadas tanto no meio urbano quanto rural, mas no sul do país a fitoterapia se deu principalmente com base em plantas exóticas como a camomila (*Chamomilla recutita*), hortelã (*Mentha spp.*) e erva-cidreira (*Melissa officinalis*). Essa situação é decorrente da intensa miscigenação de culturas trazidas pelos europeus e africanos que colonizaram e populararam o país, e também está relacionada ao intenso desmatamento das vegetações nativas (FAGG *et al.*, 2015). Nesse contexto, muitas das informações quanto ao uso das plantas nativas se perdeu com o passar dos anos e pode ser encontrado apenas em bibliografias antigas, favorecendo a pouca informação acerca da segurança e qualidade do uso dessas plantas (BRANDÃO *et al.*, 2009). O estudo não mostrou diferença estatisticamente significativa em relação ao uso de plantas e as variáveis sociodemográficas com gênero, idade, cor da pele, nível de escolaridade, renda mensal, presença de comorbidades, número de medicamentos usados, RNI alvo, indicação de uso de varfarina e TTR ($p>0,05$) (Tabela 2).

Tabela 1 - Dados sociodemográficos e clínicos dos participantes do estudo.

Características	Total (n = 273)
Sociodemográficas	
Sexo feminino, n (%)	160 (58.6)
Idade, média (desvio padrão)	60.84 (13.1)
Cor da pele, n (%)	
Branca	169 (61.8)
Não-branca	104 (38.2)
Coabitação, n (%)	246 (90.1)
Educação anos (Percentis 25; 50; 75)	3; 4; 7
Renda mensal – R\$ reais (Percentis 25; 50; 75)	362; 625; 724

**Tabela 1 - Dados sociodemográficos e clínicos do pacientes entrevistados
(continuação).**

	Clínicas
Indicação de varfarina	
– fibrilação atrial, n (%)	207 (75.8)
– válvula prostética, n (%)	116 (42.5)
– ambas, n (%)	54 (19.8)
RNI alvo 2-3, n (%)	193 (70.7)
RNI alvo 2,5-3,5, n (%)	79 (28.9)
Outro alvo, n (%)	1 (0.4)
Auxílio no uso de varfarina, n (%)	242 (88.6)
TTR>60, n (%)	159 (58.2)
Hipertensão, n (%)	169 (61.9)
Dislipidemia, n (%)	102 (37.4)
Insuficiência cardíaca, n (%)	91 (33.3)
Doenças reumáticas, n (%)	51 (18.7)
Chagas, n (%)	43 (15.8)
Diabetes, n (%)	37 (13.6)
Doenças neuropsiquiátricas, n (%)	36 (13.2)
Doenças respiratórias, n (%)	35 (12.8)
Hipotireoidismo, n (%)	35 (12.8)
Doenças valvares, n (%)	32 (11.7)
Doenças nos músculos cardíacos, n (%)	16 (5.9)
Doenças coronarianas, n (%)	15 (5.5)
Insuficiência renal crônica, n (%)	15 (5.5)
Doença do trato gastrointestinal, n (%)	13 (4.8)
Histórico de AVE, n (%)	11 (4.0)
Histórico de IAM, n (%)	11 (4.0)
Doenças oftálmicas, n (%)	10 (3.7)
Obesidade, n (%)	7 (2.6)
Insuficiência hepática, n (%)	5 (1.8)
Arritmia cardíaca, n (%)	4 (1.5)

Tabela 1 - Dados sociodemográficos e clínicos do pacientes entrevistados (conclusão).

Neoplasias, n (%)	4 (1.5)
Outras doenças do trato genito-urinário, n (%)	4 (1.5)
Doenças de pele, n (%)	3 (1.1)
Doenças infecciosas, n (%)	3 (1.1)
Doenças vasculares periféricas, n (%)	3 (1.1)
Doenças osteo-articulares, n (%)	3 (1.1)
Outras doenças da tireóide, n (%)	3 (1.1)
Histórico de tromboembolismo, n (%)	2 (0.7)
Déficit auditivo, n (%)	2 (0.7)
Doenças aórticas, n (%)	2 (0.7)
Doenças hematológicas, n (%)	1 (0.4)
<u>Número de medicamentos usados (Percentis 25; 50; 75)</u>	<u>4; 6; 7</u>

Legenda: *AVE – acidente vascular encefálico, IAM – infarto agudo do miocárdio, RNI – relação normalizada internacional, TTR – porcentagem de tempo no alvo terapêutico de RNI*

Em ambos os grupos, brancos são mais numerosos, o RNI alvo 2-3 predomina, a fibrilação atrial é a principal indicação para a farmacoterapia com a varfarina em comparação com a presença de prótese valvar. A porcentagem de tempo que o RNI encontra-se no alvo terapêutico (TTR) geralmente encontra-se acima de 60, o que significa que o RNI se mantém controlado. A média de idade está em torno de 61 anos em ambos os grupos e as mulheres apresentam-se em maior número. A população estudada é acometida principalmente por hipertensão e dislipidemia e 50% usam 6 medicamentos, sendo os principais medicamentos de uso contínuo a sinvastatina, furosemida enalapril e carvedilol.

Tabela 2 – Análise bivariada dos fatores associados ao consumo de plantas medicinais.

Características	Uso de plantas (n = 183)	P valor
Sociodemográficas		
Gênero, n (%)		0.947*
Feminino	107 (58.5)	
Masculino	76 (41.5)	
Idade, média (desvio padrão)	60.49 (13.6)	0.820†
Cor da pele, n (%)		0.950*
Branca	112 (61.2)	
Não-branca	71 (38.8)	
Coabitação, n (%)	167 (91.3)	0.359*
Educação em anos (Percentis 25; 50; 75)	3; 4; 7	0.922‡
Renda mensal – R\$ reais (Percentis 25; 50; 75)	362; 667; 724	0.931‡
Clínicas		
Indicação de varfarina – fibrilação atrial, n (%)	137 (74.9)	0.597*
Indicação de varfarina – válvula prostética, n (%)	83 (45.4)	0.172*
Indicação de varfarina – ambas, n (%)	38 (20.8)	0.560*
Auxílio no uso de varfarina, n (%)	20 (10.9)	0.752*
TTR>60, n (%)	104 (68.0)	0.5*
Comorbidades, n (%)	176 (96.2)	0.839*
Número de medicamentos usados (Percentis 25; 50; 75)	4; 6; 7	0.109‡

**qui-quadrado*, †*teste T* e ‡*Mann-Whitney*.

Mesmo não havendo correlação entre o uso de plantas medicinais e as características sociodemográficas e clínicas avaliadas, é importante que essa descrição seja feita para enfatizar o uso difundido das plantas por esses pacientes, em homens e mulheres, em brancos, pardos e negros, em todas as faixas etárias e em pacientes que possuem muitas comorbidades e usam vários medicamentos, revelando uma situação clínica crítica.

Alguns desses resultados podem ser vistos em outros estudos, corroborando com a conclusão do uso de plantas medicinais disseminado entre diferentes

grupos. Em um estudo realizado em Juiz de Fora – MG, sobre os hábitos de uso de plantas medicinais não houve correlação entre o uso de plantas medicinais e alguns fatores socioeconômico como idade, escolaridade e renda mensal (PAULA *et al.*, 2012). Em dois estudos realizados nos Estados Unidos (GARDINER *et al.*, 2007) e um na Uganda também sobre o hábito de uso de plantas medicinais e fatores associados (NAMUDDU *et al.*, 2011) não houve correlação entre os gêneros feminino e masculino com o consumo de plantas medicinais.

2.2 Plantas medicinais

Quanto ao consumo de plantas medicinais, fitoterápicos e produtos naturais, 64 diferentes espécies medicinais foram citadas pelo nome popular (Tabela 3). As plantas de uso mais comum foram erva-cidreira (Número de Ocorrência (NO)=72), hortelã (NO=56) e mate (32). Dentre as plantas citadas, 52% são consideradas de origem brasileira e 48% exóticas (Flora brasiliensis, 2015) Entretanto, as plantas exóticas apresentaram, individualmente, mais citações, como a erva-cidreira e o hortelã e tendem a ser mais estudadas quanto a sua influência na homeostasia sanguínea (Tabela 3). Muitas das plantas, citadas pelo seu nome popular, poderiam se referir a mais de uma espécie, e 5 nomes populares não puderam ser identificadas pelo nome científico.

A porcentagem de plantas brasileiras e exóticas foi praticamente a mesma, entretanto constatou-se pelo levantamento bibliográfico realizado que há mais informações quanto ao efeito na homeostasia referente as plantas exóticas (50%) em comparação com as brasileiras (41%). Isso demonstra que nesse contexto ainda há pouca informação quanto à segurança do uso de plantas nesses pacientes, principalmente no que diz respeito às plantas de origem brasileira.

Tabela 3 - Descrição das plantas medicinais, origem e frequência de uso relatado pelos pacientes.

Nome popular (nome científico), frequência absoluta de consumo		
Plantas de origem brasileira		
Mate (<i>Ilex paraguariensis</i> A. St.-Hil.), 32	Laranja capeta (<i>Citrus aurantium</i> Risso), 4	Erva-de-passarinho* (<i>Struthanthus marginatus</i> (Desr.) Blume), 1
Limão (<i>Citrus limonum</i> Risso), 17	Maracujá (<i>Passiflora edulis</i> Sims.), 4	Erva de são-caetano (<i>Momordica charantia</i> L.), 1
Alfavaca (<i>Ocimum gratissimum</i> L.), 11	Guaco* (<i>Mikania laevigata</i> Sch. Bip.), 3	Genipapo* (<i>Genipa americana</i> L.), 1
Guaco* (<i>Mikania glomerata</i> Spreng.), 10	Maçã (<i>Pyrus malus</i> L.), 3	Jatobá* (<i>Hymenaea courbaril</i> L.), 1
Transagem* (<i>Plantago major</i> L.), 10	Alho (<i>Allium sativum</i> L.), 2	Macaé* (<i>Leonurus sibiricus</i> L.), 1
Agrião (<i>Nasturtium officinale</i> R. Br.), 8	Beringela* (<i>Solanum melongena</i> L.), 2	Mamão (<i>Carica papaya</i> L.), 1
Cana-do-brejo* (<i>Costus spicatus</i> Sw.), 7	Chuchu* (<i>Sechium edule</i> Sw.), 2	Manga* (<i>Mangifera indica</i> L.), 1
Algodão (<i>Gossypium hirsutum</i> L.), 6	Espinheira-santa* (<i>Maytenus ilicifolia</i> Mart.), 2	Panaceia* (<i>Solanum cernuum</i> Vell.), 1
Quebra-pedra (<i>Phyllanthus niruri</i> L.), 6	Pau magro* (<i>Cupania oblongifolia</i> Mart.), 2	Saião* (<i>Kalanchoe brasiliensis</i> Cambess.), 1
Picão* (<i>Bidens pilosa</i> L.), 5	Pé de galinha* (<i>Eleusine indica</i> Gaertn.), 2	
Cebola (<i>Allium cepa</i> L.), 4	Carambola* (<i>Averrhoa carambola</i> L.), 1	

Alguns nomes populares de plantas estão relacionados a mais de uma espécie no Brasil, outros nomes populares não foram identificados e * significa que não há informação sobre o efeito dessa planta na homeostasia sanguínea.

Tabela 3 - Descrição das plantas medicinais, origem e frequência de uso relatado pelos pacientes (conclusão).

Plantas exóticas		
Erva-cidreira (<i>Lippia alba</i> Mill./ <i>Melissa officinalis</i> L.), 72	Canela* (<i>Cinnamomum zeylanicum</i> Blume), 6	Valeriana* (<i>Valeriana officinalis</i> L.), 2
Hortelã* (<i>Mentha</i> sp), 56	Gengibre (<i>Zenziber officinale</i> Roscoe), 6	Abacaxi* (<i>Ananas comosus</i> (L.) Merr.), 1
Anis* (<i>Pimpinella anisum</i> L.), 26	Poejo* (<i>Mentha pulegium</i> L.), 6	Amora* (<i>Morus nigra</i> L.), 1
Camomila (<i>Chamomille recutita</i> L.), 19	Funcho (<i>Foeniculum vulgare</i> Mill.), 5	Capeba* (<i>Piper umbellatum</i> L.), 1
Capim cidreira (<i>Cymbopogon citratus</i> Stapf), 18	Carqueja (<i>Baccharis trimera</i> (Less.) DC.), 3	Chicória* (<i>Cichorium endivia</i> L.), 1
Laranja* (<i>Citrus sinensis</i> L. Osbeck), 17	Ginkgo (<i>Ginkgo biloba</i> L.), 3	Conta de lágrima (<i>Coix lacryma-jobi</i> L.), 1
Boldo* (<i>Plectranthus barbatus</i> Andrews/ <i>Vernonia condensata</i> Backer), 13	Macela* (<i>Achyrocline satureioides</i> DC), 3	Mexirica (<i>Citrus reticulata</i> L.), 1
Alecrim (<i>Rosmarinus officinalis</i> L.), 12	Abacate (<i>Persea americana</i> L.), 2	Prímula (<i>Oenothera biennis</i> L.), 1
Menjericão (<i>Ocimum basilicum</i> L.), 9	Barbatimão* (<i>Stryphnodendron adstringens</i> Mart.), 2	Sálvia (<i>Salvia officinalis</i> L.), 1
Eucalipto* (<i>Eucalyptus</i> sp), 2		
Plantas não identificadas		
Cipó coluna, 1	Jiquiri, 1	Torante, 1
Folha de índio, 1	Tetrex, 1	

*Alguns nomes populares de plantas estão relacionados a mais de uma espécie no Brasil, outros nomes populares não foram identificados e * significa que não há informação sobre o efeito dessa planta na homeostasia sanguínea.*

2.3 Hábitos de consumo das plantas medicinais citadas

Em nossa amostra representativa de pacientes cardíacos tratados em uma clínica de anticoagulação, foi descrito um grande consumo de plantas medicinais/fitoterápicos (Tabela 4).

Tabela 4 - Hábitos de consumo de plantas medicinais em cardiopatas atendidos em clínica de anticoagulação.

Características	Total (n = 438)
Forma de uso, n (%)	
Chá	383 (87.4)
Xarope	43 (9.8)
Cápsula	8 (1.8)
Outra	4 (0.9)
Forma de preparo, n (%)	
Infusão	253 (57.8)
Decocção	117 (26.7)
Outra	15 (3.4)
Não se aplica*	53 (12.1)
Local de obtenção, n (%)	
Horta	273 (60.0)
Mercado	175 (40.0)
Frequência de uso, n (%)	
Esporadicamente	284 (64.8)
1-2 vezes na semana	5 (1.1)
3-5 vezes na semana	77 (17.6)
6-7 vezes na semana	72 (16.4)
Forma de indicação, n (%)	
Conhecimento por tradição familiar	234 (53.4)
Por conta própria	80 (18.3)
Influência da mídia	60 (13.7)
Sugestão de conhecido	57 (13.0)
Prescrição médica	7 (1.6)
Objetivo do uso, n (%)	
Tratar doenças respiratórias	147 (33.6)
Tratar doenças nervosas	139 (31.7)
Tratar doenças gastrointestinais	39 (8.9)
Tratar doenças urinárias	36 (8.2)
Como bebida (preferência)	58 (13.2)
Outra	19 (4.4)
Efeito observado, n (%)	
Melhora dos sintomas	366 (83.6)
Nenhum efeito	72 (16.4)

**Não se aplica significa que a forma de uso citada não foi o chá e a questão de preparo não se encaixa.*

A forma mais comum de utilização das plantas medicinais foi o chá (87%), seguido de xarope (10%) e cápsula (2%). Os chás são, geralmente, feitos a partir das folhas, por meio de infusão (67%) e decocção (27%), o que vai influenciar diretamente na composição química do produto a ser ingerido. As plantas são, em sua grande maioria, utilizadas de acordo com a necessidade, no entanto, algumas pessoas conservam o hábito de tomar chá com frequência por preferência. A frequência mais comum de uso das plantas medicinais é de

forma esporádica (65%), revelando uso toda vez que necessita, para o caso de alguma alteração na saúde.

Os pacientes obtinham as plantas principalmente de hortas (60%), mas a obtenção comercial (mercados, supermercados e farmácias) (40%) também é significativa. Houve 111 pacientes que reportaram uso de mais de um tipo de planta medicinal, em associação ou separadamente. O uso em associação mais comum foi em forma de xarope e alguns pacientes citaram uso de até seis plantas diferentes, como *Allium cepa*, *Chamomille recutita*, *Citrus limonum*, *Melissa officinalis*, *Mentha sp.* e *Ocimum basilicum*.

A principal forma de indicação que leva ao uso da planta é a tradição familiar (53%), demonstrando a necessidade da recuperação e conservação desse conhecimento. O poder da mídia (livros, televisão, jornais e revistas) também pode ser percebido, uma vez que 14% dos pacientes relataram que foram influenciaram pela mídia. Já quanto aos profissionais de saúde, apenas 1% do uso foi indicado por eles, sugerindo uma não familiaridade com o tema, já que eles não têm o hábito de indicar as plantas medicinais e/ou fitoterápicos.

Isso mostra que provavelmente o uso dessas plantas também não é supervisionado por eles, o que constitui um risco ao paciente. Assim, sugere-se que esse conhecimento seja disseminado entre os profissionais da saúde para que possam aproveitar dos benefícios das plantas medicinais e fitoterápicos no tratamento dos pacientes e para que saibam orientar seus pacientes quanto à segurança de uso de acordo com as condições clínicas do paciente.

As plantas medicinais citadas no estudo são usadas principalmente para distúrbios do trato respiratório (34%), para alergias, resfriados e gripes, e tratamento do sistema nervoso central (32%), como insônia e dores de cabeça. Além desses usos, outros usos comuns foram distúrbios do trato digestivo, distúrbios do trato urinário, além de serem utilizados como estimulante, desintoxicante e afrodisíaco. As plantas medicinais são usadas majoritariamente para o trato respiratório e para o sistema nervosos central.

Plantas como hortelã, manjeriço, alecrim e alho são comumente utilizadas para gripes, resfriados e tosse, enquanto camomila, erva-cidreira e capim cidreira são mais usados para distúrbios como insônia, ansiedade e dor de cabeça. Dentre os pacientes que utilizaram alguma planta ou fitoterápico, 84% descreveram uma melhora na saúde e nenhum paciente relatou piora dos sintomas.

Alguns estudos feitos em municípios brasileiros de Minas Gerais (BRASILEIRO *et al.*, 2008), Rio de Janeiro (GONÇALVES *et al.*, 2011) e São Paulo (SANTOS e SEBASTIANI, 2011) corroboram com alguns dos resultados encontrados neste trabalho. A tradição familiar é destacada como o principal incentivo a utilização de plantas medicinais, os chás predominam sobre outras formas de utilização dessas plantas medicinais e a maior parte das plantas utilizadas são provenientes das próprias hortas dos usuários. Um estudo realizado nos Estados Unidos também destaca problemas respiratórios e gastrointestinais como algumas das principais indicações para o uso de plantas medicinais (GARDINER *et al.*, 2007). Além disso, outro trabalho mostra que os profissionais da saúde (principalmente os médicos) têm resistência quanto ao uso de fitoterapia e que a automedicação com plantas medicinais é muito comum e perigosa (JUNIOR, 2008).

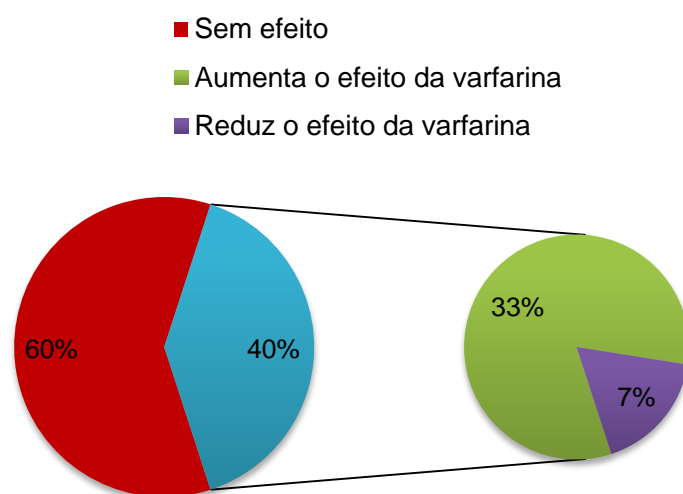
2.4 Plantas medicinais citadas e sua interferência na homeostasia sanguínea

Das 64 plantas medicinais identificadas no estudo, 26 (38%) apresentaram interações elucidadas com anticoagulantes orais, como a varfarina, por atuarem na homeostasia sanguínea ou por interferir na atuação desse medicamento. Essas plantas são: alho (*Allium sativum*), cebola (*Allium cepa*), carqueja (*Baccharis trimera*), mamão (*Carica papaya*), camomila (*Chamomilla recutita*), laranja capeta (*Citrus aurantium*), limão (*Citrus limon*), mexirica (*Citrus reticulata*), conta de lágrima (*Coix lacryma-jobi*), capim cidreira (*Cymbopogon citratus*), funcho (*Foeniculum vulgare*), ginkgo (*Ginkgo biloba*), algodão (*Gossypium hirsutum*), mate (*Ilex paraguariensis*), erva-cidreira (*Melissa officinalis*), hortelã (*Menta sp.*), melão de são caetano (*Momordica charantia*),

manjeriçao (*Ocimum sp.*), primula (*Oenothera biennis*), maracujá (*Passiflora edulis*), abacate (*Persea americana*), quebra-pedra (*Phyllanthus niruri*), maçã (*Pyrus malus*), alecrim (*Rosmarinus officinalis*), sálvia (*Salvia officinalis*) e gengibre (*Zenziber officinali*).

Basicamente, existem dois possíveis desfechos clínicos decorrentes da alteração da homeostasia pelas plantas: aumento do efeito da varfarina com aumento do risco de hemorragia e diminuição do efeito da varfarina levando a uma redução da efetividade do tratamento (Figura 15). Considerando as plantas citadas no estudo que podem interferir na farmacoterapia da varfarina, 82% delas tem potencial para aumentar seu efeito anticoagulante, aumentando o risco de efeitos adversos como hemorragia.

Figura 15 – Plantas medicinais estudadas e sua potencial interferência na farmacoterapia com a varfarina.



Os mecanismos envolvidos na alteração da homeostasia podem ser inibição da metabolização da varfarina pela citocromo P450, presença de cumarinas e derivados análogos da varfarina, interferência na produção de mediadores químicos que atuam na agregação plaquetária ou coagulação sanguínea e outros. Já entre as plantas que antagonizam o efeito da varfarina levando a

ineficácia terapêutica, encontram-se àquelas com grande quantidade de vitamina K, que aumentam o metabolismo pelas enzimas do citocromo P450 e pela eliminação do fármaco, aumento da produção de mediadores que estimulam a agregação plaquetária e coagulação sanguínea.

Algumas plantas possuem seu mecanismo de atuação, no complexo sistema de hemostasia sanguínea, bem elucidado (Tabela 5), como *Allium sativum*, *Momordica charantia* e *Ginkgo biloba*. Existem vários alvos como a síntese, ativação e liberação dos fatores da coagulação; a liberação, adesão e agregação plaquetárias; a degradação de coágulos; que permitem interações que podem afetar a homeostasia sanguínea.

O vasto número de possibilidades dificulta o estabelecimento dos mecanismos de interação, como a *Momordica charantia*, que já têm 3 mecanismos de interação possíveis elucidados. Entretanto, dentre as plantas estudadas nesse trabalho, é possível perceber que há predomínio da inibição da agregação plaquetária.

Alguns exemplos são por atuação no fator de agregação plaquetário (PAF) e inibição da formação de tromboxano A₂, por mecanismos diversos e em alguns casos o composto relacionado a essa atividade já foi isolado, como *Allium* sp., que produz compostos sulfurados como alicina que são capazes de inibir via fibrinogênio (Wang e Di, 2014) e tromboxano A₂ (Ho *et al.*, 2015), e *Ginkgo biloba*, cujos ginkgolídeos inibem a agregação plaquetária via PAF (Ge *et al.*, 2014).

A importância de estudar e elucidar os efeitos das plantas na coagulação sanguínea envolve não apenas a orientação dos pacientes e profissionais de saúde quanto ao uso das plantas na farmacoterapia com a varfarina, mas também no direcionamento para o desenvolvimento de novas anticoagulantes.

Tabela 5 – Plantas medicinais citadas no estudo de perfil de utilização em pacientes cardiopáticos e suas possíveis interações na homeostasia sanguínea.

Nome científico	Mecanismo possível de interação
Plantas com efeito anticoagulante (Implicações clínicas: aumento do RNI e risco de hemorragia)	
<i>Allium sativum</i> L.	Inibição da agregação plaquetária via fibrinogênio (Mousa, 2010; Wang e Di, 2014)
	Inibição do metabolismo da varfarina (Ho <i>et al.</i> , 2010)
<i>Allium cepa</i> L.	Inibição da agregação plaquetária via tromboxano A2 (Ro <i>et al.</i> , 2015)
<i>Ananas comosus</i> (L.) Merr.	Atividade fibrinolítica (Taussig <i>et al.</i> , 1988)
	Atividade anti-inflamatória (Taussig <i>et al.</i> , 1988)
<i>Chamomille recutita</i> L.	Inibição da agregação plaquetária via ADP (Bijak <i>et al.</i> , 2013)
<i>Coix lacryma-jobi</i> L.	Atividade fibrinolítica (Check e K'Ombut, 1995)
<i>Cymbopogon citratus</i> Stapf	Inteferência na cascata anti-inflamatória (Salim <i>et al.</i> , 2014)
<i>Foeniculum vulgare</i> Mill.	Atividade antitrombótica via retração do coágulo (Tognolini <i>et al.</i> , 2007)
<i>Ginkgo biloba</i> L.	Inibição da agregação plaquetária via PAF (Posadzki <i>et al.</i> , 2013; Tsai <i>et al.</i> , 2013; Ge <i>et al.</i> , 2014)
<i>Ilex paraguariensis</i> A. St.-Hil.	Inibição da atividade amiloidolítica da trombina e fator Xa pela saponina chikusetsusaponin IVa (Dahmer <i>et al.</i> , 2012)
	Inibição da agregação plaquetária induzida por colágeno e trombina (Dahmer <i>et al.</i> , 2012)
<i>Mentha</i> sp	Inibição do citocromo P450, que metaboliza a varfarina (Posadzki <i>et al.</i> , 2013)
	Atividade trombolítica (Sharafi <i>et al.</i> , 2010)
<i>Nasturtium officinale</i> R. Br.	Flavonoides com efeito anticoagulante (Fragoso <i>et al.</i> , 2011)
<i>Momordica charantia</i> L.	Inibição da via intrínseca da cascata da coagulação (Hayashi <i>et al.</i> , 1994)
	Inibição da agregação plaquetária via PAF (Jantan <i>et al.</i> , 2005)
	Hidrólise das cadeias alfa, beta e gama do fibrinogênio humano (Manjappa <i>et al.</i> , 2015)
<i>Ocimum</i> sp	Fenilpropanoides com atividade antiplaquetária via ADP (Cruz <i>et al.</i> , 1997; Tognolini <i>et al.</i> , 2006)
<i>Oenothera biennis</i> L.	Reduz hiperagregabilidade plaquetária (Cruz <i>et al.</i> , 1997)
<i>Pimpinella anisum</i> L.	Mecanismo desconhecido (Mousa, 2010)
<i>Phyllanthus niruri</i> L.	Inibe agregação plaquetária por via desconhecida (Izucu <i>et al.</i> , 2007)
<i>Pyrus malus</i> L.	Reduz a quantidade de fibrinogênio e fator VII (Setorki <i>et al.</i> , 2009)
<i>Rosmarinus officinalis</i> L.	Atividade antiplaquetária mediada pela mobilização do cálcio citosólico (Lee <i>et al.</i> , 2007)
	Inibição do citocromo P450, que metaboliza a varfarina (Posadzki <i>et al.</i> , 2013)
<i>Salvia officinalis</i> L.	Atividade semelhante a antitrombina III (Mousa, 2010)

Tabela 5 – Plantas medicinais citadas no estudo de perfil de utilização em pacientes cardiopáticos e suas possíveis interações na homeostasia sanguínea (conclusão).

Plantas com efeito pro-coagulante (Implicações clínicas: Redução do RNI e efetividade da farmacoterapia com a varfarina)	
<i>Baccharis trimera</i> (Less.) DC.	Atividade fibrinogenolítica (Januário e Santos, 2004)
<i>Carica papaya</i> L.	Aumenta potencial de agregabilidade (Dharmarathna <i>et al.</i> , 2013; Subenthiran <i>et al.</i> , 2013)
<i>Gossypium hirsutum</i> L.	Indução da liberação de tromboxano A2 (Rohrbach <i>et al.</i> , 1990)
<i>Persea americana</i> L.	Alto teor de lípidos que induzem o sistema microsomal (Fragoso <i>et al.</i> , 2011)
<i>Zeniber officinale</i> Roscoe.	Aumenta liberação de tromboxano (Koch, 2005; Salim <i>et al.</i> , 2014)

Embora seja questionado se a concentração sérica que os constituintes das plantas atinge, *in vivo*, é ativa (KOCH, 2005; QIU *et al.*, 2015) e os mecanismos de interação ainda precisem ser mais estudados, é importante investir no estudo da influência dessas plantas na homeostasia sanguínea visando melhorar as informações acerca desse tema para o manejo clínico dos pacientes em uso de varfarina, reduzindo o risco de efeitos adversos como hemorragia e mantendo o RNI dentro da faixa alvo.

Nesse contexto, algumas plantas dentre as citadas pelos pacientes entrevistados foram selecionada para que seu efeito na coagulação sanguínea fosse avaliado *in vitro* através dos testes de TP e TTPa. Para isso, utilizaram-se dois critérios: grande número de citações entre os pacientes e a escassez de informações a respeito da planta.

CAPÍTULO 2

Avaliação da atividade anticoagulante, *in vitro*, de plantas medicinais brasileiras

1 MATERIAS E MÉTODOS

1.1 Desenho de estudo

Estudo experimental envolvendo testes coagulométricos com sangue de pessoas saudáveis para avaliar a influência na coagulação sanguínea por meio dos testes, *in vitro*, de TP e TTPa de extratos e óleos essenciais de plantas medicinais selecionadas do estudo sobre o perfil do consumo de plantas medicinais por cardiopatas em uso de varfarina.

1.2 Local de realização

O estudo foi realizado no Laboratório de Hematologia da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais.

1.3 Aspectos éticos

Considerando-se os termos da Resolução 466/2012 do Conselho Nacional de Saúde, todos os aspectos éticos desta legislação foram preservados ao envolver seres humanos como sujeitos de pesquisa. A proposta de estudo Uso de Plantas Mediciniais e sua Potencial Interferência no Controle da Anticoagulação Oral em Cardiopatas Atendidos em Clínica de Anticoagulação de um Hospital Universitário foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG sob o CAAE 01836613.40000.5149 (Anexo VI). Os objetivos da pesquisa foram informados pelos pesquisadores a cada voluntário, sendo o mesmo incluído no estudo após a assinatura do TCLE. Os resultados dessa investigação estão sendo divulgados assegurando-se que nenhuma forma de identificação individual seja exposta.

Os riscos relacionados aos procedimentos dessa pesquisa puderam envolver pequeno desconforto na coleta da amostra, o que foi minimizado pela participação de um técnico experiente para realizar as punções.

1.4 Sujeitos do estudo

1.4.1 Critérios de seleção

Foram avaliados para potencial elegibilidade voluntários saudáveis, de ambos os sexos, com idade igual ou superior a 18 anos, não usuários de qualquer medicamento que pudesse interferir com o sistema hemostático, que integrassem os corpos discente e docente da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais (Anexo V).

1.4.2 Critérios de exclusão

Foram considerados os critérios de exclusão:

-presença de cardiopatia, e outras doenças decorrentes de distúrbios hemostáticos, tais como eventos trombóticos venosos ou arteriais, câncer, doenças auto-imunes, hepáticas ou renais

-uso de antiagregante e/ou anticoagulante

-deficiência conhecida de algum fator da coagulação

-história familiar de distúrbios ligados ao sistema hemostático

1.4.3 Número de participantes

Foram incluídas doze pessoas saudáveis dos corpos docente ou discente da Faculdade de Farmácia da UFMG que cumpriram os pré-requisitos.

1.4.4 Recrutamento

O recrutamento foi realizado na primeira semana de março de 2015 para que a coleta se realizasse no dia 13 de março de 2015. A captação desses foi realizada por meio de avisos de recrutamento espalhados pela faculdade, bem como por contato direto com os mesmos nas aulas práticas de Hematologia. Houve esclarecimentos sobre a pesquisa e assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE). Os pacientes foram recrutados consecutivamente.

1.5 Amostras biológicas

Para obtenção das amostras de plasma foram coletados 20 mL de sangue total, em citrato de sódio 0,109 mol/L em tubos VACUETTE® para coleta à vácuo. As amostras foram coletadas no período da manhã, sem exigência de jejum, no Laboratório de Hematologia da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais.

1.5.1 Preparo do pool de plasma e conservação das amostras biológicas

Após a coleta, as amostras foram centrifugadas a 2.500 rpm, durante 20 minutos, em centrífuga Jouan® modelo BR4i, e o plasma foi separado. Os plasmas dos 12 pacientes foram misturados para obtenção de um pool e alíquotas de cerca de 2 mL foram transferidas para ependorfs e armazenadas em freezer vertical -80°C Jouan® modelo VX380, até o momento do uso. Todos os testes foram realizados com amostras descongeladas uma única vez.

1.6 Plantas medicinais

1.6.1 Seleção de plantas medicinais para a realização dos testes de atividade anticoagulante

A partir do levantamento bibliográfico acerca da influência das plantas medicinais citadas no perfil de sua utilização por cardiopatas na homeostasia sanguínea e do número de vezes que a planta foi citada para uso foram selecionadas 18 espécies que apresentaram poucos estudos quanto ao efeito homeostático e apresentaram grande número de citações (Tabela 6).

Tabela 6 – Plantas selecionadas para avaliação, *in vitro*, da atividade anticoagulante, seu local de coleta e número de excicata.

Nome comum (número de relatos)	Nome científico	Número da excicata	Local de coleta
Agrião (8)	<i>Nasturtium officinale</i> R. Br.	150805	Pará de Minas
Alfavaca (11)	<i>Ocimum gratissimum</i> L.	177748	Belo Horizonte
Boldo (13)	<i>Plectranthus barbatus</i> Andr. <i>Vernonia condensata</i> Baker	132171 51013	Belo Horizonte
Capim cidreira (18)	<i>Cymbopogon citratus</i> (DC) Stapf.	50521	Belo Horizonte
Erva-cidreira (72)	<i>Lippia alba</i> (Mill) N. E. Brown <i>Melissa officinalis</i> L.	160513 178200	Belo Horizonte
Guaco (10)	<i>Mikania glomerata</i> Spreng <i>Mikania laevigata</i> Sch. Bip. <i>Mikania laevigata</i> híbrido		Lavras
Hortelã (56)	<i>Mentha crispa</i> L. <i>Mentha piperita</i> L. <i>Mentha spicata</i> L. <i>Mentha villosa</i> Huds.	174279 160534 133501 104345	Belo Horizonte
Laranja (17)	<i>Citrus sinensis</i> (L.) Osbeck	178194	Pará de Minas
Limão (17)	<i>Citrus limonum</i> Risso	178195	Pará de Minas
Manjeriço (9)	<i>Ocimum basilicum</i> L. <i>Ocimum basilicum</i> L. var <i>purpuracens</i>	69333 113249	Belo Horizonte

1.6.2 Obtenção do material vegetal, extratos vegetais e óleos essenciais

As folhas das plantas medicinais selecionadas foram coletadas em abril de 2015 de hortas na cidade de Belo Horizonte (19°50'24" S, 44°00'12" W), Pará de Minas (19°50'12" S, 44°36'13" W) e Lavras (21°13'51" S, 44°58'40" W), em Minas Gerais. As espécies vegetais foram identificadas pelo Dr. João Aguiar Nogueira Batista do Departamento de Botânica do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da UFMG. Uma excicata de cada espécie foi depositada no Herbário da Universidade Federal de Minas Gerais, cujos números de registros encontram-se na Tabela 6.

As folhas de cada espécie foram selecionadas e secas, separadamente, por um período de 24 a 48 h em estufa ventilada ($T \leq 40$ °C). Esses materiais foram posteriormente pulverizados em moinho de facas, separadamente.

Para obtenção dos extratos vegetais, 1 g do material vegetal seco e pulverizado foi macerado com 5 mL de etanol comercial (96°GL – 92,8°INPM) por um período de 10 min com o auxílio do ultrason. O solvente foi separado e reservado. O processo foi repetido mais duas vezes. Os extratos obtidos foram reunidos, centrifugados por 2 min a 2000 rpm e o sobrenadante foi evaporado em rotaevaporador ($T \leq 50$ °C) até completa eliminação do solvente. Os extratos etanólicos secos foram armazenados em freezer até sua utilização nos ensaios de atividade anticoagulante.

Para a obtenção do óleo essencial, foi utilizado arraste a vapor d'água em aparelho de Clevenger (Farmacopeia Brasileira V). Folhas frescas (30g) de *Citrus sinensis*, *Lippia alba*, *Mentha crispa* e *Nasturtium officinale* foram pesadas, separadamente, e acondicionados em balão de fundo redondo de 1000 mL com 500 mL de água ultrapura (Milli-Q Plus). O tempo de extração utilizado foi de 120 min a partir da ebulição da água. Após esse período, o óleo e o hidrolato formado foram coletados e hidrolato foi extraído por partição líquido-líquido com diclorometano. O diclorometano foi eliminado em

rotaevaporador ($T \leq 40 \text{ }^{\circ}\text{C}$) e o óleo essencial foi armazenado em freezer até sua utilização nos ensaios de atividade anticoagulante.

1.6.3 Preparo das amostras para o ensaio da atividade anticoagulante

As amostras foram preparadas para os ensaios de atividade antiocoagulante, *in vitro*, pesando-se 5 mg dos extratos etanólicos secos e dissolvendo em 1 mL solução em DMSO 2%. Para a obtenção das duas dosagens nos testes biológicos, utilizou-se 10 μL e 20 μL . Para auxílio na dissolução, os extratos foram colocados em banho de ultrassom por 15 minutos e centrifugados por 5 minutos em 15.000 rpm. Os óleos essenciais foram dissolvidos em óleo canola em uma concentração de 0,25 $\mu\text{L}/\mu\text{L}$ (v/v) (17,5 μL de óleo essencial em 70 μL de óleo de canola).

1.7 Ensaio, *in vitro*, de atividade anticoagulante

Os ensaios biológicos foram realizados com a colaboração da Professora Maria das Graças Carvalho e da Professora Luci Maria Sant'Ana Dusse, do Laboratório de Hematologia do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Farmácia da UFMG.

O efeito dos extratos das plantas medicinais selecionadas e dos óleos essenciais de 5 espécies foram avaliados sobre a coagulação nos ensaios de tempo de protrombina (TP) e tempo de tromboplastina parcial (TTPa) em plasma pobre em plaquetas (PPP) pelo método de Brown modificado por Osoniyi e Onajobi (2003).

1.7.1 Tempo de Protrombina para avaliação das vias extrínseca e comum da cascata de coagulação

A determinação do Tempo de Protrombina (TP) foi realizada com a incubação de 50 μL de plasma normal humano, por 30 minutos, com 10 μL de cada extrato de planta em duas concentrações (20 mg/mL e 40 mg/mL) e os óleos

essenciais na concentração de 0,25 $\mu\text{L}/\mu\text{L}$. Solução de DMSO 2% e o óleo de canola (10 μL) foram utilizados como controle, respectivamente. A seguir, foram adicionados à cubeta 100 μL de Thromborel[®] (tromboplastina cálcica), desencadeando o processo de coagulação. O tempo necessário para a formação do coágulo foi aferido automaticamente em coagulômetro Dade-Behring BFT II[®]. Todas as amostras foram adicionadas em volume de 50 μL e todos os reagentes foram mantidos à temperatura de 37 °C durante o ensaio. Um controle do tempo de protrombina (sem adição de amostra) foi feito previamente com o mesmo plasma humano e reagentes a fim de verificar se ambos estão normais, o que foi aferido por meio da obtenção de resultados dentro dos valores de referência, considerando o coeficiente de variação da técnica (CV) 1,29%.

1.7.2 Tempo de Tromboplastina Parcial Ativada para avaliação das vias intrínseca e comum da cascata de coagulação

Na determinação do Tempo de Tromboplastina Parcial Ativada (TTPa), 50 μL do plasma normal humano foram incubados, por 30 minutos, com 10 μL de cada extrato de planta em duas concentrações (20 mg/mL e 40 mg/mL) e os óleos essenciais na concentração de 0,25 $\mu\text{L}/\mu\text{L}$. solução de DMSO 2% e o óleo de canola (10 μL) foram utilizados como controle, respectivamente. Posteriormente, foram adicionados à cubeta 50 μL de Dade Actin[®] (cefaloplastina ativada) e, após 3 minutos, 50 μL de CaCl_2 0,02M (Dade[®] Cloreto de cálcio), desencadeando o processo de coagulação. O tempo necessário para a formação do coágulo foi aferido automaticamente em coagulômetro Dade-Behring BFT II[®]. Todas as amostras foram adicionadas em volume de 50 μL e todos os reagentes foram mantidos à temperatura de 37 °C durante o ensaio. Um controle do tempo de tromboplastina parcial ativada (sem adição da amostra) foi feito previamente com o mesmo plasma humano e reagentes a fim de verificar se ambos estão normais, o que será aferido por meio da obtenção de resultados dentro dos valores de referência, considerando o coeficiente de variação da técnica (CV) 1,49%.

1.8 Análise Estatística

Os dados foram analisados no programa "Statistical Package of the Social Sciences" (SPSS) versão 13.0. Todos os dados foram analisados quanto à distribuição (se normal ou não) pelo teste Shapiro Wilk. Uma vez que os dados seguem a distribuição normal, eles foram apresentados por média e desvio padrão e a comparação entre os resultados do controle e das diferentes concentrações testadas de extrato nos ensaios coagulométricos foi realizada mediante o teste t (para duas comparações). Foram consideradas significativas diferenças com o valor de p inferior a 0,05.

2 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os testes de tempo de protrombina e tromboplastina parcial ativada são testes que medem o tempo para a ocorrência da coagulação sanguínea. O tempo de trombina consiste na adição de tromboplastina cálcica no plasma com citrato. O cálcio irá reverter o efeito do citrato, permitindo a coagulação. A tromboplastina ativa o fator VII, desencadeando as vias extrínseca e comum da cascata da coagulação. Já o tempo de tromboplastina ativada avalia a via intrínseca da coagulação, uma vez que a cefalina adicionada ativará o fator XII da cascata da coagulação (Adaeze *et al.*, 2014).

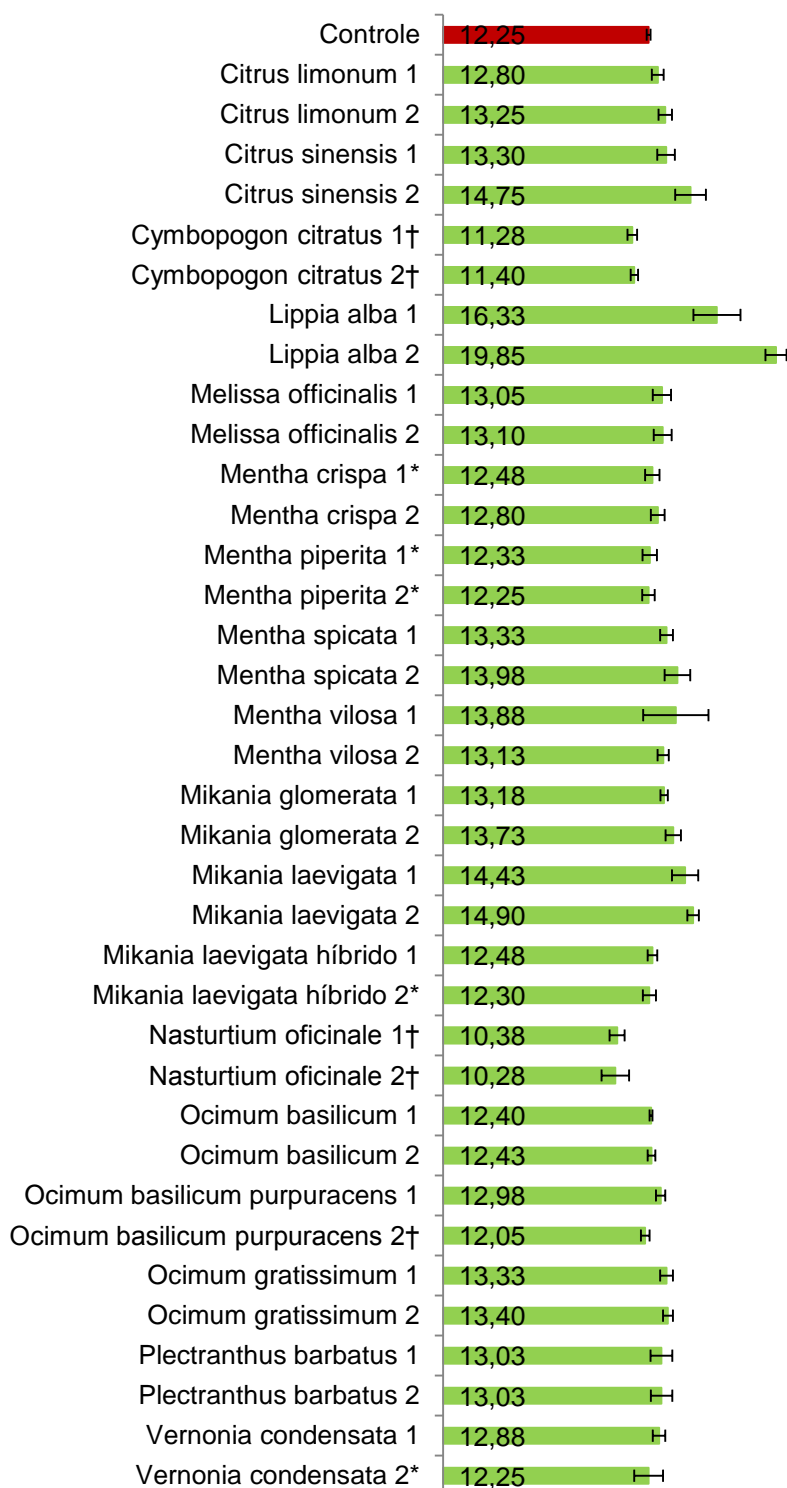
Um aumento no valor desses parâmetros laboratoriais indica um potencial para anticoagulação e uma diminuição indica um potencial para a coagulação. Dessa forma, a adição dos extratos ou óleos essenciais ao plasma e posterior medição desses parâmetros gerou um valor de TP e TTPa que, comparado com o controle, pode indicar se esse extrato ou óleo essencial demonstra atividade anticoagulante ou pró-coagulante.

2.1 Avaliação do TP e TTPa para os extratos vegetais

Em ambos os testes houve predominância do efeito anticoagulante em detrimento do efeito pró-coagulante (Figuras 16 e 17). Portanto, clinicamente, o uso dessas plantas em pacientes em uso de varfarina sugere um potencial risco de hemorragia devido a exacerbação do efeito da varfarina e em raros casos uma redução da eficácia terapêutica devido a ativação da coagulação sanguínea.

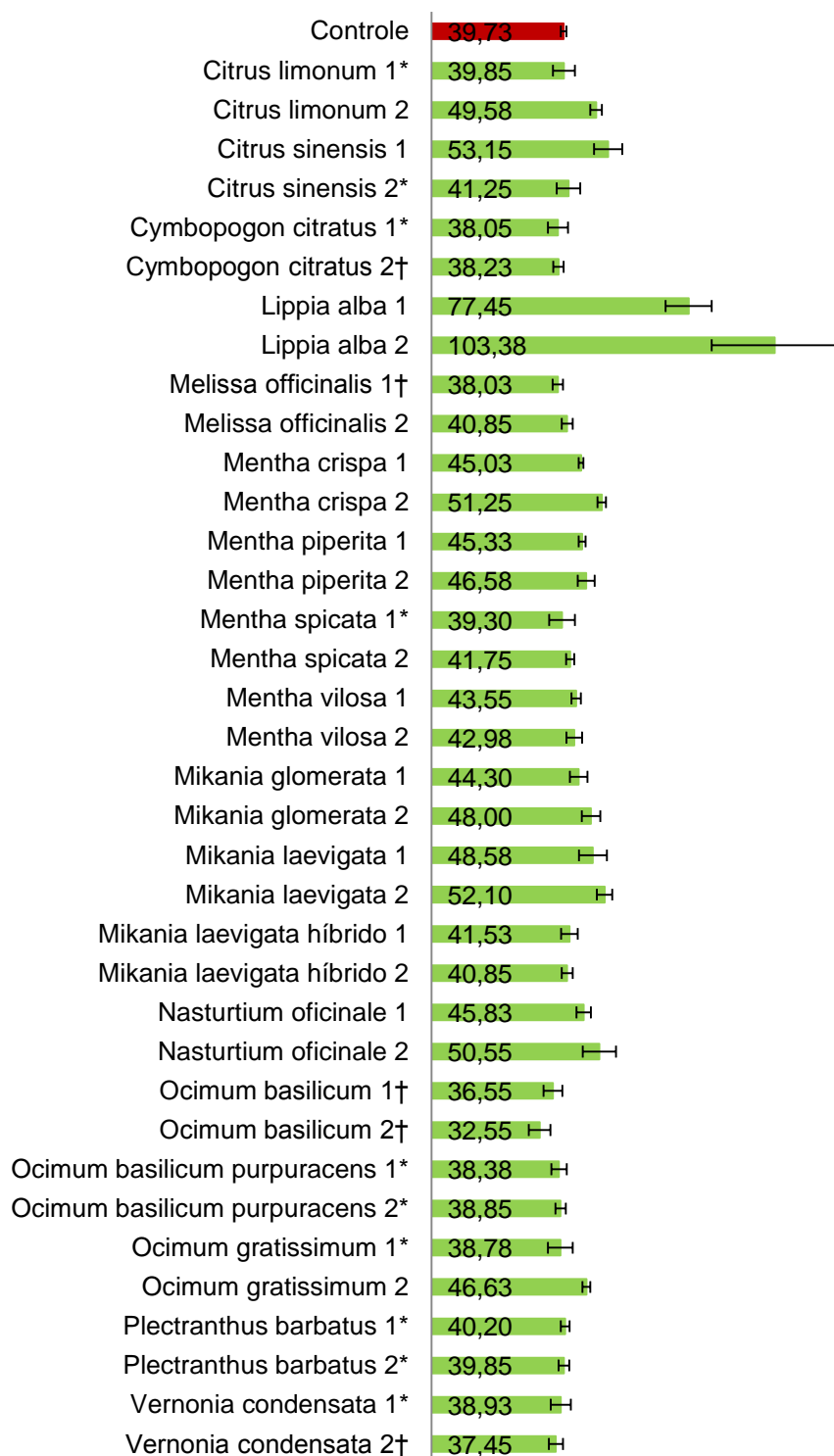
O prolongamento isolado do TTPa sugere uma deficiência ou inibição de um ou mais fatores da via intrínseca da coagulação (pré-caliceína, cininogênio de alto peso molecular, fatores XII, XI, IX e VIII). Já o prolongamento isolado do TP sugere uma deficiência ou inibição principalmente do fator VII (via extrínseca), mas também do fator X, V e II (via comum), enquanto um prolongamento do TP

Figura 16 – Valores de TP do plasma em segundos incubado com os extratos etanólicos das plantas avaliadas.



Legenda: 1 refere-se a concentração do extrato de 20 mg/mL e 2 refere-se a concentração do extrato de 40 mg/mL *Valores estatisticamente não significativos †Diminuição do TP em relação ao controle

Figura 17 – Valores de TPPa em segundos do plasma incubado com os extratos etanólicos das plantas avaliadas.



Legenda: 1 refere-se a concentração do extrato de 20 mg/mL e 2 refere-se a concentração do extrato de 40 mg/mL *Valores estatisticamente não significativos †Diminuição do TPPa em relação ao controle

e TTPa sugere deficiência ou inibição dos fatores da via comum (X, V e II) ou um defeito qualitativo ou quantitativo do fibrinogênio (Hood, 2008). Assim, os resultados *in vitro* podem indicar prováveis desfechos *in vivo*.

Uma diferença de TP de 2 ou mais segundos e uma diferença de 9 ou mais segundos no TPPa indicam mudanças patológicas (Naghadeh *et al.*, 2011). De acordo com os resultados, observa-se que *Lippia alba* e *Mikania laevigata* aumentaram o TP em mais de 2 unidades, indicando potencial risco para pacientes com alterações na coagulação sanguínea ou uso de medicamentos que já predispõe à hipocoagulabilidade por possível redução ou inibição dos fatores de coagulação das vias extrínseca e comum.

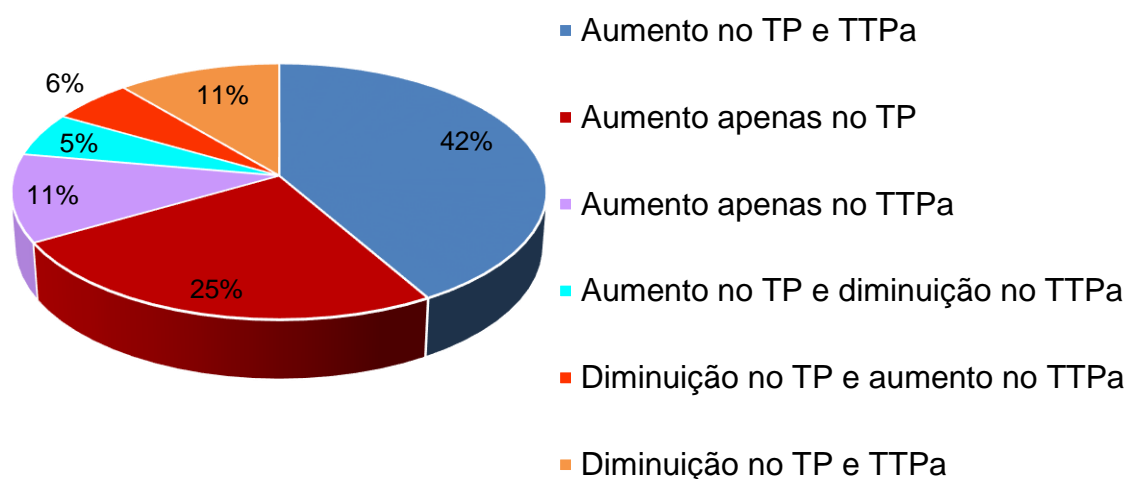
Já com relação ao TPPa, observa-se um aumento de mais de 8 unidades em vários extratos vegetais avaliados: *Citrus limonum* na sua maior concentração, *Citrus sinensis* em ambas as concentrações, *Lippia alba* em ambas as concentrações, *Mentha crispa* na maior concentração, *Mikania glomerata* na maior concentração, *Mikania laevigata* em ambas as concentrações e *Nasturtium officinale* em ambas as concentrações. Esses resultados indicam que essas plantas têm potencial para reduzir ou inibir fatores da coagulação da via intrínseca, uma vez que, em geral, o TTPa foi mais sensível aos extratos etanólicos das espécies estudadas do que o TP.

De acordo com os resultados da avaliação do TP e do TTPa, temos várias situações possíveis para os extratos avaliados: aumento apenas do TP, aumento apenas do TTPa, aumento de ambos, redução do TP e aumento do TTPa, aumento do TP e redução do TTPa e diminuição de ambos (Figura 18). Uma análise dos resultados dos extratos das plantas estudadas sobre o sistema hemostático revela que a situação predominante foi aumento dos dois parâmetros (42%) seguido pelo aumento apenas do TP (25%).

Com base nos resultados, pode-se inferir que o aumento no tempo do TP e do TTPa sinalizaria para uma maior inibição da ativação da cascata da

coagulação. Isto posto, haveria um efeito anticoagulante exacerbado e, conseqüentemente potencialmente perigoso, desde que a adição do extrato

Figura 18 - Efeitos observados no ensaio do TP e do TTPa do plasma incubado com os extratos etanólicos das plantas estudadas.



vegetal provocasse alteração/inibição de fatores das vias intrínseca, extrínseca e comum. Alternativamente, tais aumentos poderiam indicar apenas na via comum, o que provocaria prolongamento dos dois testes, TP e TTPa. O aumento de apenas um desses parâmetros indicaria uma inibição mediana da cascata da coagulação, conseqüente à alteração/inibição de fatores da via intrínseca (pré-caliceína, cininogênio de alto peso molecular, fatores XII, XI, IX e VIII) ou, ainda da via extrínseca (fator VII). O aumento de um dos parâmetros juntamente com a diminuição do outro poderia ser conseqüente à ativação de fatores da via intrínseca no caso de redução do TTPa ou de ativação da via extrínseca no caso de redução no TP. Por outro lado, a diminuição do tempo de ambos os testes, sinalizaria para uma ativação da cascata da coagulação, o que poderia reduzir, em teoria, a eficácia terapêutica da varfarina. Obviamente, essas interpretações teóricas são passíveis de grande variabilidade quando se considera as condições *in vivo*, entretanto, esses dados podem direcionar

estudos mais aprofundados da atividade dessas plantas na homeostasia sanguínea.

Dentre as plantas que aumentaram o TP e o TTPa, com provável inibição da via intrínseca, via extrínseca, via comum de coagulação ou anormalidade no fibrinogênio temos *Citrus limonum* 40 mg/mL, *Citrus sinensis* 20 mg/mL, *Lippia alba* 20 e 40 mg/mL, *Melissa officinalis* 40 mg/mL, *Mentha crispa* 40 mg/mL, *Mentha spicata* 40 mg/mL, *Mentha vilosa* 20 e 40 mg/mL, *Mikania glomerata* 20 e 40 mg/mL, *Mikania laevigata* 20 e 40 mg/mL, *Mikania laevigata* híbrido 20 e 40 mg/mL e *Ocimum gratissimum* 40 mg/mL. Assim, essas, dentre as plantas estudadas, sugere-se que deveriam ser as mais evitadas quanto ao consumo por parte dos pacientes em uso de varfarina e possivelmente, deveriam ser as mais estudadas para a confirmação da interação na homeostase sanguínea e no tratamento com varfarina.

Considerando o aumento apenas do TP encontramos *Citrus limonum* 20 mg/mL, *Citrus sinensis* 40 mg/mL, *Melissa officinalis* 20 mg/mL, *Mentha spicata* 20 mg/mL, *Ocimum basilicum* purpuracens 20 mg/mL, *Ocimum gratissimum* 20 mg/mL, *Plectranthus barbatus* 20 e 40 mg/mL e *Vernonia condensata* 20 mg/mL, e considerando apenas o aumento do TTPa temos *Mentha crispa* 20 mg/mL, *Mentha piperita* 20 e 40 mg/mL e *Mikania laevigata* híbrido 40 mg/mL. Sugere-se que essas plantas deveriam ter seu uso restrito e supervisionado de perto, bem como as plantas que se mostraram capazes de reduzir tanto TP quanto TTPa, com potencialidade reduzir o efeito da varfarina: *Cymbopogon citratus* 20 e 40 mg/mL, *Ocimum basilicum* purpuracens 40 mg/mL e *Vernonia condensata* 40 mg/mL.

As demais plantas apresentaram aumento de um dos parâmetros e diminuição do outro. *Nasturtium officinale* reduziu o TP, sugerindo possivelmente a ativação do fator VII, enquanto foi observado aumento do TTPa, sugerindo inibição da via intrínseca. Já a *Ocimum basilicum* teve efeitos contrários, aumentou o TP e reduziu o TTPa. Dessa forma, pode-se inferir que a ativação de uma das vias e a inibição da outra poderiam ser, de certa forma, conferir equilíbrio hemostático, *in vivo*.

Não há dados na literatura científica a respeito da influência das 18 espécies estudadas no TP e TTPa, com exceção do limão (*Citrus limon*) que foi relacionado a inativação da trombina, devido ao seu potencial de reduzir o fibrinogênio (RIAZ, 2014), resultando na inibição do final da cascata de coagulação. Entretanto, há sobre algumas das demais plantas, informações acerca da possível influência na hemostasia sanguínea.

O agrião (*Nasturtium officinale*) pode induzir a metabolização fase 1 e 2 da CYP 450 (FRAGOSO *et al.*, 2011). Já o capim cidreira (*Cymbopogon citratus*) apresenta potencial anti-inflamatório, reduzindo a liberação de tromboxano e consequentemente ativação de plaquetas e logo fatores da coagulação (SHAH *et al.*, 2011; BOUKHATEM *et al.*, 2014). Algumas espécies de hortelã (*Mentha* sp.), por sua vez, também demonstraram atividade no citocromo P450, além de atividade trombolítica (POZADSKI *et al.*, 2012 e SHARAF, 2014). A laranja (*Citrus sinensis*) produz flavonoides antiplaquetários e também tem potencial para inibir CYP3A4 (TRIPOLI *et al.*, 2007 e FRAGOSO *et al.*, 2011), enquanto o limão (*Citrus limon*), além de inativar a trombina (RIAZ, 2014), também tem ação antiplaquetária (TRIPOLI, 2007). Por fim, o manjeriço (*Ocimum basilicum*), tem efeito antiplaquetário devido a presença de fenilpropanoides (TOGNOLINI, 2006; AMRANI, 2009; TOHTI, 2006).

Dentre as plantas estudadas quanto ao efeito do TTPa, as que apresentaram maior atividade anticoagulante potencial foram *Citrus sinensis*, *Lippia alba*, *Mentha crispera*, *Mikania laevigata* e *Nasturtium officinale*. A composição química destas 5 espécies com maior potencial para afetar a coagulação sanguínea foi pesquisada em literatura científica na busca de indícios de classes de metabólitos que podem afetar a hemostasia sanguínea como os flavonoides, xantonas e fenilpropanoides citados anteriormente. Em *Citrus sinensis* encontrou-se a presença de muitos flavonoides, compostos voláteis e terpenos (ETEBU e NWAUZOMA, 2014). *Lippia alba* revelou-se rica flavonoides e óleos essenciais (HENEHELLE *et al.*, 2008). *Mentha crispera* apresentou principalmente óleos essenciais com algumas citações de flavonoides isolados (KUMAR *et al.*, 2011; BARROS *et al.*, 2015). *Mikania laevigata* apresentou cumarinas, fenólicos e alguns flavonoides (CZELUSNIAK *et al.*, 2012; GASPARETTO *et al.*, 2013) e em *Nasturtium officinale* foram encontrados

principalmente glicosinolatos e alguns compostos voláteis (GONÇALVES et al., 2009; JAHANGIR et al., 2009). Essas informações direcionaram a avaliação da composição química e o estabelecimento das classes de metabólitos secundários presentes nas cinco espécies e potencialmente relacionados a atividade anticoagulante.

À luz dos dados obtidos no presente estudo, o uso dessas plantas deve ser rigorosamente supervisionado, dado o potencial de interação de componentes destes extratos com a varfarina, interferindo em seu efeito terapêutico, seja potenciando ou inibindo o mesmo. Em suma, atenção especial e orientação adequada devem ser dadas aos pacientes em uso de varfarina para a obtenção e manutenção do alvo terapêutico ideal e prevenção de eventos indesejáveis que oferecem risco à vida.

2.2 Avaliação do TP e TPPa para os óleos essenciais

Os óleos essenciais são compostos voláteis que geralmente pertencem às classes dos sesquiterpenos, monoterpenos e fenilpropanóides. Eles costumam apresentar grande potencial para exercer atividades farmacológicas, como atividade anti-inflamatória, antimicrobiana e analgésica (DEWICK, 2009). Dentre as plantas estudadas quanto ao efeito do TP e TPPa, as que apresentaram maior atividade anticoagulante potencial foram *Citrus sinensis*, *Lippia alba*, *Mentha crisper* e *Nasturtium officinale* e todas, com exceção de *N. officinale*, apresentam em sua composição componentes de óleos essenciais.

Dessa forma, os óleos essenciais dessas espécies foram extraídos e avaliados quanto a atividade anticoagulante, utilizando o ensaio do TP e do TPPa. Os resultados destes ensaios são apresentados nas Figuras 19 e 20. Considerando o TP do controle 12,07 s e o TPPa do controle 39,63 s: resultados com o valor de T entre T observado (-2,201 e 2,201) não apresentaram diferença estatisticamente significativa em relação ao controle e por isso, não tem potencial anti nem pro-coagulante. Já resultados de T menores que -2,201 mostraram ter potencial para reduzir o tempo de

coagulação, revelando possível atividade pro-coagulante, enquanto resultado de T maiores que 2,201 mostraram ter potencial para aumenta o tempo de coagulação, demonstrando provável atividade anticoagulante.

Figura 19 – Valores relativos ao teste T para avaliar a significância da alteração no teste TP dos óleos essenciais de *C. sinensis*, *L. alba*, *M. crispa* e *N. officinale*.

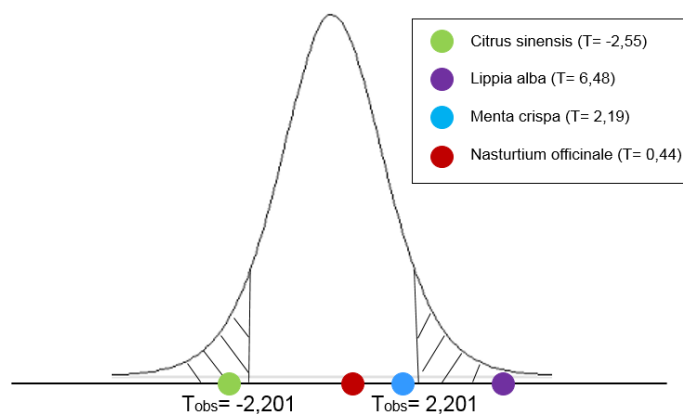
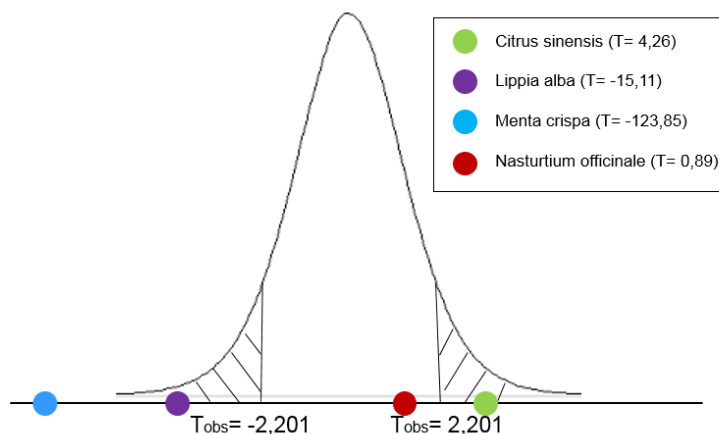


Figura 20 – Valores relativos ao teste T para avaliar a significância da alteração no teste TTPa dos óleos essenciais de *C. sinensis*, *L. alba*, *M. crispa* e *N. officinale*.



As folhas da laranja (*Citrus sinensis*) mostrou potencial de reduzir o TP (11,80 s) e aumentar o TTPa (40,57 s). Esse efeito antagônico pode ser explicado pela presença de compostos no óleo essencial da *C. sinensis* que estimulam o fator VII (via extrínseca) e/ou fatores X, V e II (via comum), e também pela presença de outros compostos que inibem um ou mais fatores da via intrínseca da coagulação (pré-caliceína, cininogênio de alto peso molecular, fatores XII, XI, IX e VIII). Uma vez que o efeito do extrato como um todo é de aumentar o valor tanto o TP quanto o TTPa, pode-se concluir que os demais compostos dessa planta estão muito relacionados ao efeito anticoagulante geral observado. Dessa forma, é necessário um aprofundamento no estudo das frações do extrato para melhor entendimento dos compostos relacionados ao efeito.

A erva-cidreira (*Lippia alba*) demonstrou efeito contrário, aumento no TP (13,77 s) e redução no TTPa (36,53 s). Assim, podemos inferir que há compostos no óleo essencial da *L. alba* que inibem o fator VII (via extrínseca) e/ou fatores X, V e II (via comum), mas também há compostos que estimulam um ou mais fatores da via intrínseca da coagulação (pré-caliceína, cininogênio de alto peso molecular, fatores XII, XI, IX e VIII). Bem como a *C. sinensis*, o efeito resultante da *Lippia alba* é anticoagulante, com grande aumento de TP e TTPa após incubação com extrato, e por isso, as outras frações de compostos dessa planta devem ser avaliadas para maiores conclusões.

Já o óleo essencial do hortelã (*Mentha crispa*), por sua vez, não apresentou atividade estatisticamente significativa em relação ao TP (12,53 s), mas apresentou grande potencial para reduzir o TTPa (37,57 s). Essa atividade do óleo essencial não corrobora com a atividade do extrato, que apresentou aumento significativo do TP e pequeno aumento do TTPa, dessa forma, podemos concluir que a atividade da *M. crispa* na via extrínseca é decorrente dos compostos não voláteis, bem como, em menor escala, sua atividade nas vias intrínseca e comum.

Por fim, o óleo essencial do agrião (*Nasturtium officinale*) não apresentou atividade estatisticamente significativa em nenhum dos dois testes e por isso, sua atividade na homeostasia sanguínea provavelmente se deve aos compostos não voláteis, o que já era esperado já que o *N. officinale* não é rico em óleos essenciais, mas é rico principalmente em glicosinolatos, compostos polares que contem enxofre (GONÇALVES et al., 2009; JAHANGIR et al., 2009). Já o óleo essencial da *Mikania laevigata* não foi extraído devido a indisponibilidade da planta fresca.

Em análise aos resultados, as espécies *L. alba*, *N. officinale*, *M. laevigata*, *C. sinensis* e *M. crispata* mostraram potencial em interferir no complexo controle da homeostasia sanguínea. Entretanto, é importante que o mecanismo de interação seja elucidado e, para isso, é essencial que se investigue quais os compostos envolvidos nessa ação. Portanto, é necessário um aprofundamento na composição fitoquímica dessas espécies vegetais.

CAPÍTULO 3

Perfil fitoquímico por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e por cromatografia em camada delgada (CCD) de plantas selecionadas com atividade anticoagulante

1 MATERIAS E MÉTODOS

1.1 Prospecção Fitoquímica

Foi realizada a prospecção fitoquímica dos extratos etanólicos de *Citrus sinensis*, *Lippia alba*, *Mentha crispa*, *Mikania laevigata* e *Nasturtium officinale* e das frações diclorometano, acetato de etila e aquosa de *L. alba* por cromatografia em camada delgada (CCD) de sílica gel. Foram obtidos perfis cromatográficos em CCD para a avaliação de flavonoides, taninos, cumarinas e triterpenos/esteroides. Diferentes sistemas eluentes e reveladores foram utilizados para cada classe de produto natural, conforme descrito abaixo (WAGNER et al., 1984).

1.1.1 Identificação de flavonoides

Solubilizou-se exatamente 0,1 g de extrato etanólico seco (item 1.6.2 do capítulo 2) de *Citrus sinensis*, *Lippia alba*, *Mentha crispa*, *Mikania laevigata* e *Nasturtium officinale* e das frações de *L. alba* em 3 mL de etanol e 2 mL de acetona, com o auxílio de banho de ultra-som, por 15 minutos. Utilizou-se a solução resultante para a CCD.

- Fase móvel: butanol: clorofórmio: acetona: ácido fórmico (75:16,5:8,5).
- Reveladores: UV λ 365 nm e NP/PEG.
- Substâncias de referência: quercetina (Qc) e rutina (Ru) (Sigma-Audrich (soluções a 1 mg/mL em etanol e acetona).
- Identificação: flavonoides se apresentam como manchas de cor amarela, azul ou verde em UV λ 365 nm. O NP/PEG aumenta a fluorescência no comprimento de onda utilizado.

1.1.2 Identificação de taninos

Utilizou-se as mesmas soluções de amostra preparadas para a caracterização de flavonoides.

- Fase móvel: clorofórmio: acetona: ácido fórmico (50:40:10).
- Revelador: solução de cloreto férrico a 2% m/v.
- Substância de referência: catequina e ácido gálico (Sigma-Aldrich (1 mg/mL em etanol e acetona)).
- Identificação: taninos se apresentam como manchas negro azuladas ou negro esverdeadas no visível.

1.1.3 Identificação de cumarinas

Utilizou-se as mesmas soluções de amostra preparadas para a caracterização de flavonoides.

- Fase móvel: acetato de etila:hexano (1:1).
- Reveladores: solução de KOH a 10% m/v em etanol.
- Substância de referência: cumarina (Cu) (Sigma-Aldrich (1 mg/mL em etanol e acetona)).
- Identificação: cumarinas se apresentam como manchas de fluorescência verde azulada ou amarela esverdeada em UV λ 365 nm.

1.1.4 Identificação de triterpenos e esteroides

Utilizou-se as mesmas soluções de amostra preparadas para a caracterização de flavonoides.

- Fase móvel: hexano: acetato de etila (1:1).
- Revelador: reagente de Libermann–Burchard e aquecimento a 100 °C até o aparecimento das manchas.
- Padrão de referência: ácido ursólico (Sigma-Aldrich).
- Identificação: manchas pardas a vermelhas ou róseas escuras indicam resultado positivo para triterpenos pentacíclicos livres. Manchas azuis que mudam para um verde persistente indicam a presença de esteróis livres.

1.1.5 Preparo das soluções reveladoras

Solução de Produtos Naturais + polietilenoglicol 4000 (NP/PEG): Dilui-se 1 g de ácido difenilbórico em 100 mL de metanol para preparo do Reagente de Produtos Naturais (NP). Para preparo da solução de polietilenoglicol 4000 (PEG), 5 g deste foram diluídos em 200 mL de etanol. Para revelação das placas primeiramente era borrifada a solução de NP seguida de PEG.

Solução de cloreto férrico a 2 % m/v: dissolveram-se 2 g de FeCl_3 em 100 mL de etanol.

Solução de hidróxido de potássio a 10 % m/v: dissolveram-se 10 g de KOH em 100 mL de etanol.

Reagente Lieberman–Burchard: Adicionaram-se 2 gotas de ácido sulfúrico concentrado à 10 mL de anidrido acético.

1.2 Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

A fim de obter perfis cromatográficos por cromatografia Líquida de alta eficiência (CLAE) foram preparadas soluções utilizando 10 mg de extrato etanólico seco de *Citrus sinensis*, *Lippia alba*, *Mentha crispa*, *Mikania laevigata* e *Nasturtium officinale* (item 1.6.2 do Capítulo 2) e 5 mg das frações aquosa, acetato de etila e diclometano (item 1.3) de *Lippia alba* em 1 mL de metanol grau CLAE (Tédia Brasil). A dissolução foi realizada com o auxílio de um banho de ultra-som por 20 minuto. Após esse tempo, as soluções obtidas foram centrifugadas a 10.000 rpm por 10 minutos e o sobrenadante foi transferido para *vials* de vidro de 2 mL. Os perfis foram obtidos utilizando coluna de fase reversa e detector de arranjos de diodo (CLAE-FR-DAD). Foi utilizada coluna Lichrospher® 100 18 RP (partículas de 5 µm, 125 x 4mm d.i., Merck), e pré-coluna LiChrospher® 100 RP-18 (5 µm) e fluxo de 1mL/min e a temperatura da coluna foi mantida em 40 ± 5 °C. Foram injetados 10 µL de cada solução e o fluxo foi de 1 mL/minuto. A leitura foi realizada em λ 210 nm sendo registrados numa faixa espectral de λ 200 a 600 nm. Empregou-se como fase móvel uma mistura de água:acetonitrila em gradiente linear em 60 min (perfil exploratório) (Tabela 7).

Tabela 7 – Gradiente de eluição empregado na obtenção dos perfis por CLAE.

Tempo (min)	Fase móvel		Temp. (°C)	Fluxo (mL/min)
	ACN	H ₂ O 0,1% H ₃ PO ₄		
0	5	95	40	1
60	95	5		
65	95	5		
70	5	95		

Substâncias de referência também foram avaliadas por CLAE, utilizando as mesmas condições cromatográficas usadas na análise dos extratos. Essa

etapa visou a identificação dessas substâncias de referência nos extratos e frações por meio da comparação do tempo de retenção, perfil de absorção e co-injeção. As substâncias de referência utilizadas foram ácido rosmarínico, ácido vanílico, apigenina beta-caroteno, campferol, cianina, epigallocatequina, isorientina, isovitexina, luteolina, mentol, quercetina, quercetina-3-β-D-glicose, quercitrina, rutina e cumarina (Sigma-Aldrich, USA). A escolha foi feita de acordo com a disponibilidade de padrões no laboratório e com base no levantamento da química micromolecular de cada espécie estudada. Os experimentos de co-injeção foram realizados adicionando-se 100 µL de solução de 1 mg/mL de cada padrão, separadamente, na solução metanólica a 10 mg/mL de cada extrato preparada para injeção no cromatógrafo. As análises foram realizadas nas mesmas condições cromatográficas utilizadas para os extratos (item 1.2).

1.3 Fracionamento da *Lippia alba* e atividade anticoagulante de suas frações

1.3.1 Fracionamento de *Lippia alba*

O fracionamento preliminar do extrato etanólico das folhas de *Lippia alba* teve como objetivo obter frações de complexidade menor, utilizando o princípio de afinidade entre as substâncias presentes e o solvente utilizado, para aprofundar no estudo da atividade desta planta na coagulação sanguínea.

Para esse fracionamento procedeu-se a uma partição líquido-líquido com solventes imiscíveis. O extrato etanólico seco de *Lippia alba* (250 mg) foi dissolvido em 10 mL de mistura água/etanol na proporção de 9:1. Essa solução foi transferida para funil de separação e submetida a partições sucessivas com diclorometano e acetato de etila. Utilizou-se porções de 10 mL e o procedimento foi repetido 3 vezes para cada solvente. As frações em diclorometano e em acetato de etila foram secas em rotaevaporador, até a completa retirada do solvente ($T < 50\text{ }^{\circ}\text{C}$). A fase aquosa foi liofilizada. As

frações foram acondicionadas no freezer até o momento dos testes de atividade anticoagulante.

1.3.2 Testes coagulométricos com as frações de *Lippia alba*

O método de execução dos testes de TP e TTPa foi previamente descrito no item 1.7 do capítulo 2. Para as frações utilizou a mesma diluição dos extratos 5 mg de fração em 1 mL de metanol.

2 RESULTADOS E DISCUSSÃO

2.1 Perfil fitoquímico

2.1.1 Perfil cromatográfico obtido por cromatografia em camada delgada (CCD): Prospecção fitoquímica

A prospecção fitoquímica dos extratos etanólicos de *L. alba*, *M. laevigata*, *M. crispera*, *C. sinensis* e *N. officinale* teve como objetivo investigar as principais classes de metabólitos especiais presentes. Foram obtidos perfis cromatográficos em CCD de gel de sílica para os extratos etanólicos estudados, utilizando-se reveladores seletivos para as principais classes de metabólitos secundários. Foi avaliada a presença de flavonoides (Figura 21), fenóis/taninos (Figura 22), cumarinas (Figura 23) e terpenoides e/ou esteroides (Figura 24). Os resultados da prospecção fitoquímica encontram-se na Tabela 8.

Figura 21 - Cromatograma obtido por cromatografia em camada delgada (CCD) de gel sílica para os extratos de *Mikania laevigata* (ML), *Citrus sinensis* (CS), *Mentha crispera* (MC), *Nasturtium officinale* (NO), *Lippia alba* (LA) e suas fração aquosa (FA) e acetato de etila (FAc). Revelador seletivo para flavonoides: NP/PEG e λ 365 nm. Padrões: quercetina (Qc) e rutina (Ru)

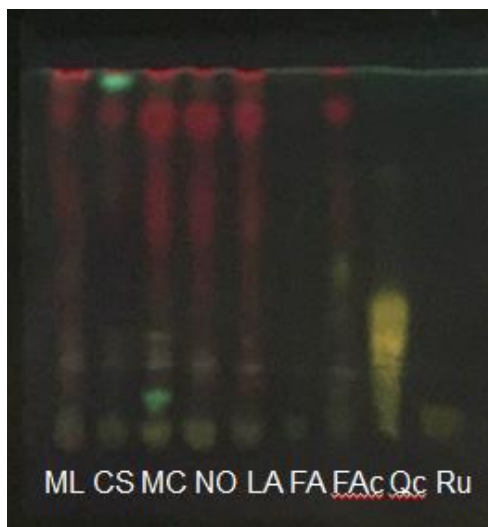


Figura 22 - Cromatograma obtido por cromatografia em camada delgada (CCD) de gel sílica para os extratos de *Mikania laevigata* (ML), *Citrus sinensis* (CS), *Mentha crispera* (MC), *Nasturtium officinale* (NO), *Lippia alba* (LA) e suas fração aquosa (FA) e acetato de etila (FAc). Revelador seletivo para fenóis/taninos: FeCl_3 2% Padrões catequina (Cat) e ácido gálico (AG) na avaliação dos taninos.

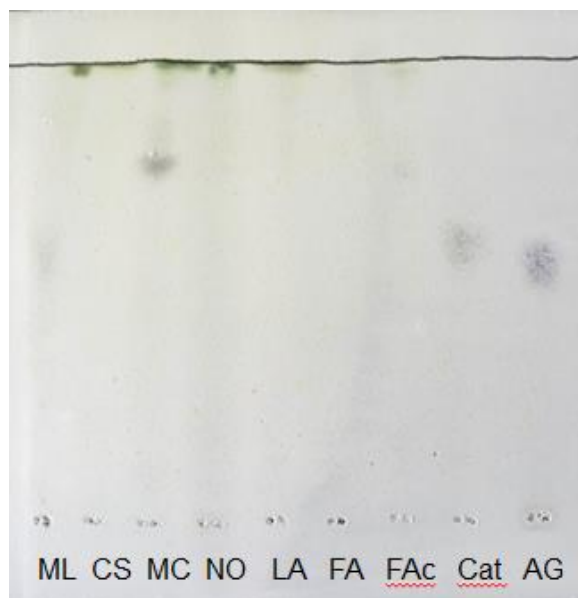


Figura 23 - Cromatograma obtido por cromatografia em camada delgada (CCD) de gel sílica para os extratos de *Mikania laevigata* (ML), *Citrus sinensis* (CS), *Mentha crispera* (MC), *Nasturtium officinale* (NO), *Lippia alba* (LA) e suas fração aquosa (FA) e acetato de etila (FAc). Revelador seletivo para cumarinas: KOH 10%. Padrão cumarina (Cu).

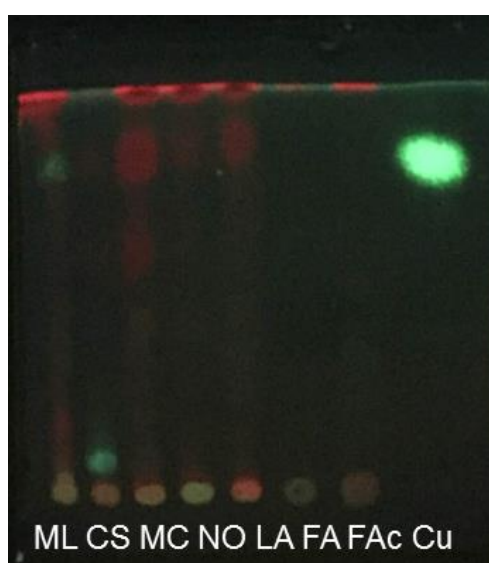


Figura 24 - Cromatograma obtido por cromatografia em camada delgada (CCD) de gel sílica para os extratos de *Mikania laevigata* (ML), *Citrus sinensis* (CS), *Mentha crispa* (MC), *Nasturtium officinale* (NO), *Lippia alba* (LA) e suas fração aquosa (FA), acetato de etila (FAc) e diclorometano (FD). Revelador seletivo para triterpeno/esteroides: Libermman–Burchard. Padrão ácido ursólico (AU).

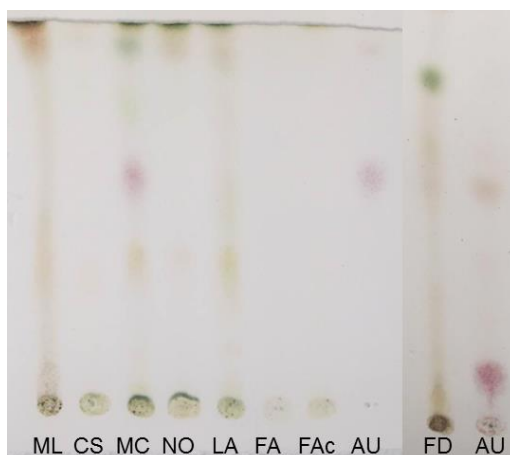


Tabela 8 – Avaliação qualitativa por cromatografia em camada delgada das principais classes de metabólitos especiais de *Nasturtium officinale*, *Lippia alba*, *Mikania laevigata*, *Mentha crispa* e *Citrus sinensis* e das frações aquosa, acetato de etila e diclorometano de *L. alba*.

Metabólitos avaliados	Flav	Fen/Tan	Cumar	Trit/Est
<i>Nasturtium officinale</i>	+	-	+	+
<i>Lippia alba</i>	+	-	-	+
<i>Mikania laevigata</i>	+	+	+	+
<i>Mentha crispa</i>	+	+	-	+
<i>Citrus sinensis</i>	+	-	+	-
Fração aquosa de <i>L. alba</i>	+	-	-	-
Fração acetato de etila de <i>L. alba</i>	+	-	-	-
Fração de diclorometano de <i>L. alba</i>	NA	NA	NA	+

Nota: Flav: flavonoides; Fen/Tan: fenóis/taninos; Cumar: cumarinas; Trit/Est: triterpenos/esteroides. A fração de diclorometano foi avaliada apenas para a presença de triterpenos (NA=não se aplica).

Flavonoides são um grupo de metabólitos secundários da classe dos polifenóis encontrados em diversas espécies vegetais. Eles possuem grande potencial de atividade antioxidante e anti-inflamatória (DEWICK, 2009) e alguns já foram descritos com atividades na homeostasia sanguínea, como flavonoides da *Garcinia cambogia* (KOSHY e VIJAYALAKSHMI, 2000). Dentre as espécies analisadas, há dados na literatura sobre o isolamento de substâncias pertencentes a essa classe em todas as 5 espécies analisadas. Os taninos, por sua vez, também fazem parte do grupo de polifenóis e alguns de seus representantes como catequina e epicatequina já foram isolados em *Mentha crispera*, *Mikania glomerata* e *Nasturtium officinale*. Essa classe já foi relacionada à aceleração da coagulação sanguínea (CHUNG *et al.*, 2008).

As cumarinas são lactonas do ácido o-hidroxi-cinâmico amplamente distribuídos nos vegetais, como o guaco e o agrião. Essa classe originou a varfarina, anticoagulante oral mais utilizado e em geral apresenta atividade antibiótica, broncodilatadora, fungicida, anticoagulante, vasodilatador, espasmolítica e antitrombótica (GASPARETTO *et al.*, 2013). Já os terpenos, apesar de não terem sido encontrados na literatura científica sua possível atividade na homeostasia sanguínea, são substâncias amplamente difundidas no reino vegetal e de grande variedade estrutural (DEWICK, 2009).

2.1.2 Perfil cromatográfico obtido por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

Análises por CLAE permitiram avaliar qualitativamente a composição química de *Citrus sinensis*, *Lippia alba*, *Mentha crispera*, *Mikania laevigata* e *Nasturtium officinale* e das frações de *L. Alba* (Figuras 29 a 36), e portanto, foi possível compará-las com os padrões (Figura 25 e 26) através do tempo de retenção de seus picos e respectivos espectros de absorção no ultravioleta.

De modo geral todos os extratos mostraram predominância de compostos polares (picos entre 0 e 20 minutos) (Figuras 29 a 31). Foram identificados principalmente flavonoides, pois apresentam dois grandes cromóforos, um em comprimento de onda de aproximadamente 250 nm e outro em 350 nm,

denominados banda II e I respectivamente (MABRY, 1970). A identificação dos compostos nos extratos por meio de comparação com os padrões são suposições que podem ser comprovadas por meio da coinjeção do extrato e do padrão seguindo as mesma condições cromatográficas ou pelo isolamento e identificação das substâncias presentes. Assim para identificar compostos ou classes de compostos responsáveis pelos efeitos estudados é essencial um fracionamento do extrato, isolamento e identificação das substâncias majoritárias.

Figura 25 - Perfis cromatográficos obtidos por CLAE- DAD para alguns padrões: ácido rosmarínico (A) e apigenina (B). Condições cromatográficas: vide Materiais e Métodos item 1.2.

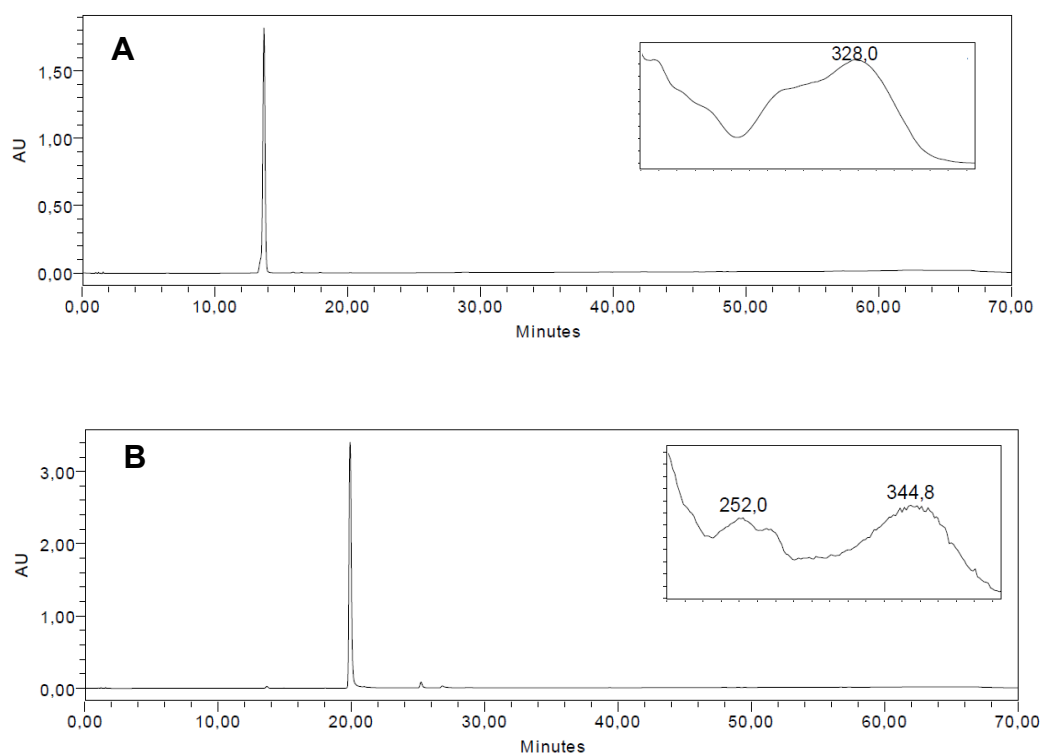
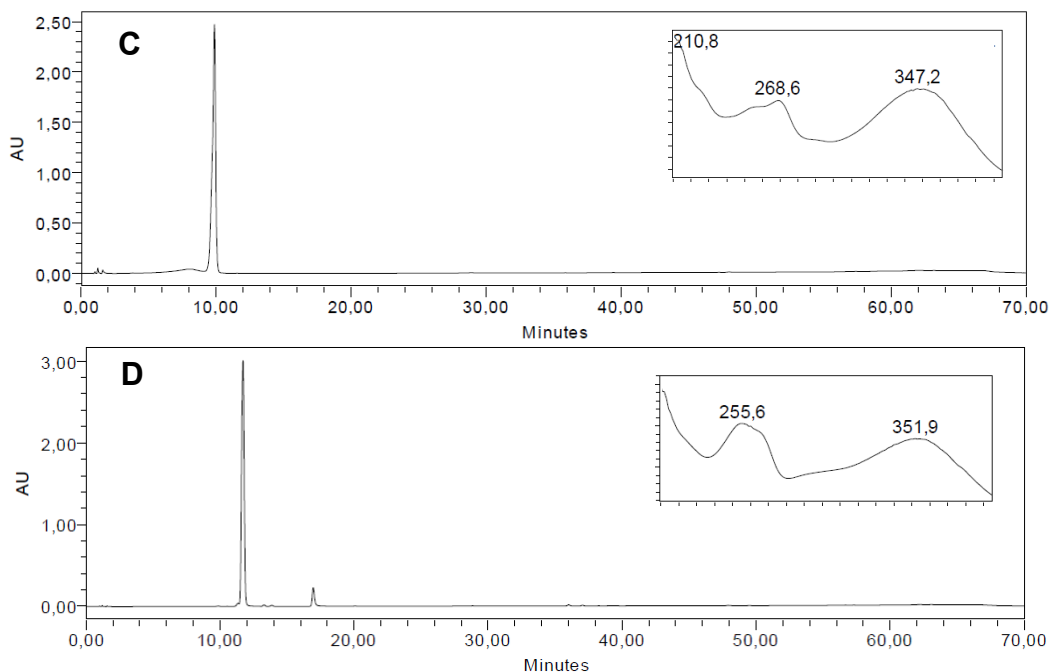


Figura 26 - Perfis cromatográficos obtidos por CLAE- DAD para alguns padrões: isoorientina (C) e quercetina-3- β -D-glicosídeo (D). Condições cromatográficas: vide Materiais e Métodos item 1.2.

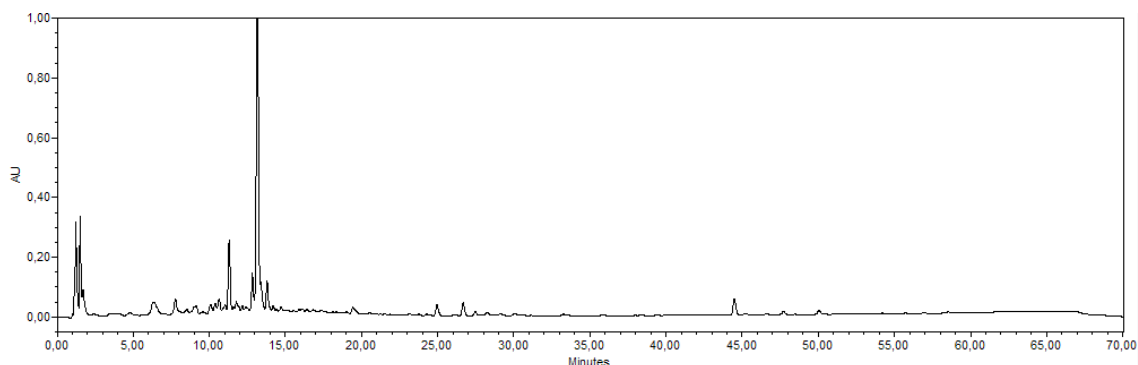


2.2 *Citrus sinensis*

A prospecção fitoquímica revelou a presença de flavonoides e cumarinas nessa espécie (Figuras 21 e 23). A cumarina apresentou-se com uma mancha fluorescente verde de Rf diferente do padrão aplicado, já os flavonoides se apresentaram como duas manchas amarelo-claras com Rf compatível aos dois padrões aplicados: quercetina e rutina. *C. sinensis* é conhecida, na literatura científica (ETEBU e NWAUZOMA, 2014), por ser rica em flavonoides e os espectros de absorção no UV obtidos por CLAE-DAD confirmam esse fato (Figura 27), uma vez que existem picos com tempo de retenção entre 7 (máximos de absorção em λ 269 e 343 nm) e 30 minutos (máximos de absorção em λ 254 e 344 nm), cujos espectros de ultravioleta são característicos de flavonoides, apresentando dois grandes cromóforos, um em

comprimento de onda de aproximadamente 250 nm e outro em 350 nm, denominados banda II e I respectivamente (MABRY, 1970).

Figura 27 – Perfil cromatográfico obtido por CLAE- DAD para o extrato etanólico *Citrus sinensis*. Condições cromatográficas: vide Materiais e Métodos item 1.2.



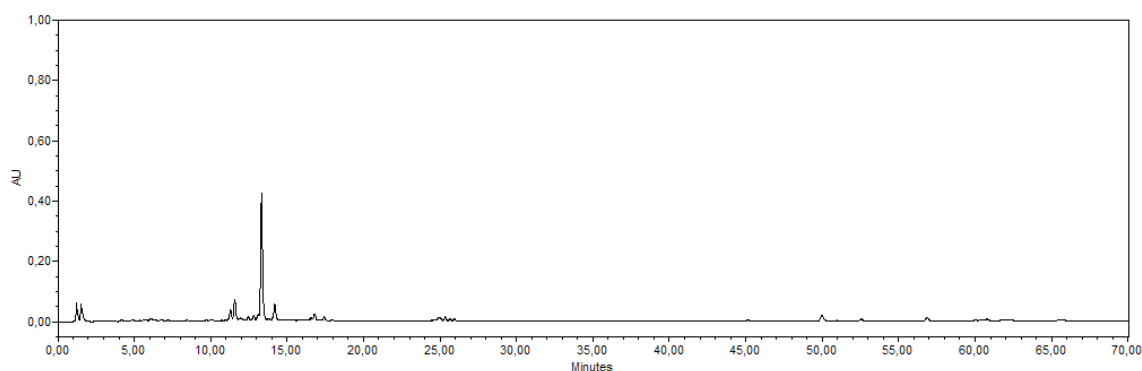
A análise completa do perfil cromatográfico da *C. sinensis* (Figura 27) revela grande predominância de picos em tempo de retenção entre 0 e 15 minutos, indicando que o perfil cromatográfico é constituído majoritariamente por substâncias polares. Há alguns picos menores com tempo de retenção entre 25 e 27 minutos, indicando presença de algumas substâncias de polaridade um pouco menor, e ainda, alguns picos com tempo de retenção entre 45 e 50 minutos com espectros de absorção variados, que representam os compostos de polaridade entre média e baixa. Utilizando a conieção alguns flavonoides, nenhum composto pôde ser identificado no extrato de *C. sinensis*.

Esse resultado nos revela duas possíveis classes que podem estar relacionadas ao efeito hemostático do extrato de *C. sinensis*. Os flavonoides apresentam atividade elucidada na literatura na agregação plaquetária, já as cumarinas podem afetar especificamente a coagulação sanguínea, inibindo a ativação de fatores da coagulação, como a varfarina.

2.3 *Mentha crispera*

Corroborando com a informação da literatura científica (KUMAR et al., 20110; BARROS et al., 2015) a respeito dos compostos isolados da *M. crispera*, a CCD apresentou resultados positivos para flavonoides, taninos e triterpenos/esteroides (Figuras 21, 22 e 24). Na avaliação dos flavonoides podemos observar diversas manchas amarelo-claras e uma mancha verde indicando a presença de compostos dessa classe, sendo que os dois padrões (quercetina e rutina) puderam ser identificados no extrato da *M. crispera* de acordo com a cor da mancha e comparação de Rf. E mais uma vez a CLAE-DAD confirma essas informações pela existência de dois picos com tempo de retenção acima de 11 minutos que têm espectro de absorção no UV característico de flavonoides (Figura 28).

Figura 28 - Perfil cromatográfico obtido por CLAE- DAD para o extrato etanólico de *Mentha crispera*. Condições cromatográficas: vide Materiais e Métodos item 1.2.



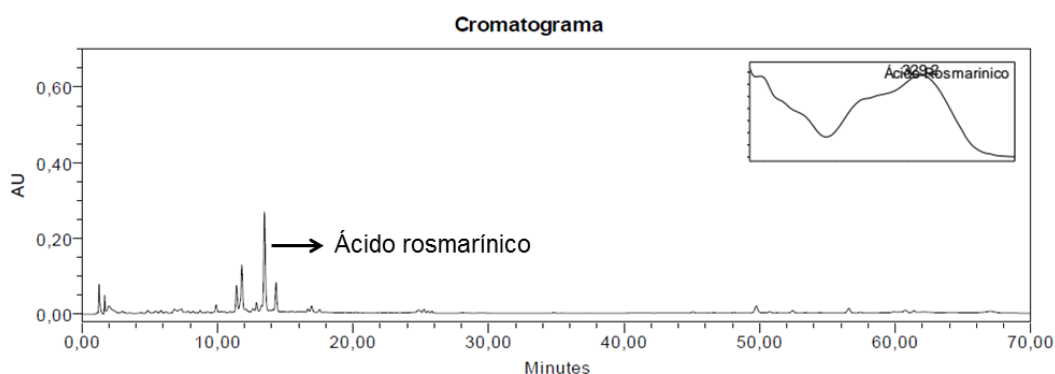
No que se refere aos taninos, podemos observar a existência de uma mancha roxa acima das manchas referentes aos padrões. E em relação aos triterpenos/esteroides, podemos ver manchas marrons e roxas referentes a triterpenos livres e uma mancha verde referente a um esterol. A mancha roxa pode ser identificada como ácido ursólico uma vez que a apresentação da mesma coloração e com mesmo Rf que o padrão.

A análise do perfil cromatográfico da *M. crispera* (Figura 28) mostra que os picos mais pronunciados estão em tempo de retenção entre 0 e 15 minutos, onde se situam os compostos mais polares. No entanto, observamos também que a grande maioria dos picos encontram-se acima de 40 minutos, onde espera-se

que estejam os compostos menos polares como terpenos, incluindo os constituintes dos óleos voláteis e esteroides. A presença desses compostos foi confirmada por CCD. A partir da coinjeção do extrato da *M. crispata* foi possível identificar o ácido rosmarínico, que apresentou máximo de absorção em λ 328 nm e tempo de retenção de 13,68 min, apresentando coincidência total entre os picos do extrato e do padrão (Figura 29). Essa substância já foi descrita na literatura científica para a espécie.

Portanto, com relação à atividade na hemostasia sanguínea, identificamos em *M. crispata* duas classes de compostos que, segundo literatura científica, podem afetar esse complexo sistema: flavonoides e taninos. De qualquer maneira, a atividade relatada por esses compostos é referente à agregação plaquetária e a atividade avaliada é relativa à coagulação sanguínea. Assim, por mais que *in vivo* o uso dessas plantas culmine no sentido de fornecer maior fluidez ao sangue, ainda é necessário um estudo mais aprofundado sobre os compostos dessa planta na coagulação, especificamente.

Figura 29 – Perfil cromatográfico obtido por CLAE- DAD para a coinjeção do extrato de *Mentha crispata* e do padrão de ácido rosmarínico. Condições cromatográficas: vide **Materiais e Métodos** item 1.2.

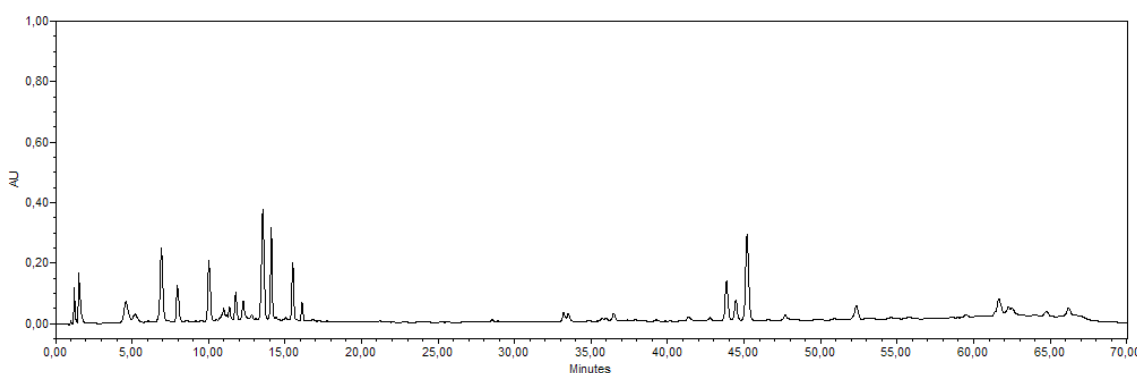


2.4 *Mikania laevigata*

A *Mikania laevigata*, como visto na breve revisão bibliográfica realizada (CZELUSNIAK *et al.*, 2012; GASPARETTO *et al.*, 2013), é uma espécie rica em

diversas classes de metabólitos. A presença de flavonoides, taninos, cumarinas e triterpenos (Figuras 21 a 24), mostrada na revisão da literatura, foi comprovada pela CCD. A *M. laevigata* apresentou algumas manchas amareladas referentes a flavonoides e uma delas tem Rf comparável ao do padrão utilizado: rutina. A CLAE-DAD confirma a presença dessa classe de metabólitos devido a presença de alguns espectros característicos de flavonoides em picos com tempo de retenção próximos a 11 minutos (Figura 30).

Figura 30 – Perfil cromatográfico obtido por CLAE- DAD para o extrato etanólico de *Mikania laevigata*. Condições cromatográficas: vide Materiais e Métodos item 1.2.

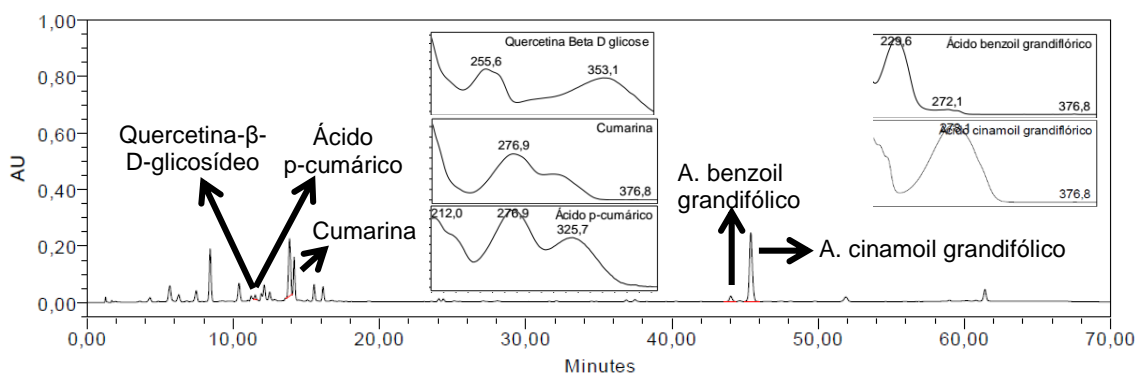


Com relação a taninos, observa-se uma mancha roxa bem clara (Figura 22) compatível com o ácido gálico utilizado como padrão e no que se refere as cumarinas, essa planta também apresentou uma mancha fluorescente verde comparável com a cumarina padrão. Na CCD de triterpenos/esteroides observou-se a presença de triterpenos devido a mancha marrom que se estendeu por toda a placa e na CLAE-DAD, é de se esperar que eles sejam os compostos eluídos em tempo de retenção maiores que 45 minutos, apresentando padrões de absorção variados.

A análise do perfil cromatográfico da *M. laevigata* (Figura 30), revelou predominância de picos com tempo de retenção entre 0 e 15 minutos, indicando presença principalmente de compostos polares. Inclusive, próximo de 5

minutos, há um pico com espectro de absorção compatível com arilpropanóides: $\lambda_{\text{máx}}$. com quatro bandas de absorção: II (216-218 nm), IIa (244-246 nm), I (290-292 nm) e Ia (329-333 nm) (GADZA, 2004). A partir da coinjeção com padrões, foram identificados no extrato de *M. laevigata* ácido benzoil grandiflórico, ácido cinamoil grandifólico, ácido p-cumárico, cumarina e quercetina 3- β -glicosídeo (Figura 31) (BERTOLUCCI et al., 2013). O pico cromatográfico do ácido cinamoil grandifólico apresentou máximo de absorção em λ 273 nm e tempo de retenção de 45,3 min; o ácido benzoil grandiflórico apresentou dois máximos de absorção em λ 229 e 272 nm e tempo de retenção de 43,9 min; a cumarina, por sua vez, apresentou dois máximos de absorção em λ 214 e 276 nm e tempo de retenção em 13,7; o ácido p-cumárico apresentou tempo de retenção de 12,0 min e vários máximos de absorção em λ 210, 265, 287 e 320 nm; e a quercetina 3- β -glicosídeo apresentou tempo de retenção de 11,71 min e máximos de absorção em λ 255 e 353 nm, característicos de flavonoides (MABRY, 1970).

Figura 31 – Perfil cromatográfico obtido por CLAE- DAD para a coinjeção do extrato de *Mikania laevigata* e dos padrões de ácido benzoil grandiflórico, ácido cinamoil grandifólico, ácido p-cumárico, cumarina e quercetina 3- β -glicosídeo. Condições cromatográficas: vide Materiais e Métodos item 1.2.



Relacionando esses resultados fitoquímicos com a atividade biológica dessa planta, observamos a presença de três classes químicas com histórico de alteração da homeostasia sanguínea: flavonoides, taninos e cumarinas. Flavonoides e taninos atuam em diferentes pontos da agregação plaquetária

e as cumarinas atuam na coagulação sanguínea, culminando para um deslocamento do equilíbrio hemostático, aumentando a fluidez sanguínea, criando assim, risco de hemorragia.

2.5 *Nasturtium officinale*

Os flavonoides, apesar de não haver referência de isolamento nessa espécie, já foram encontrados na família Brassicaceae e o presente estudo revelou a presença dessa classe de compostos devido à presença de manchas amarelo claras de Rf semelhante à quercetina e rutina (Figura 21), padrões avaliados. Esse resultado é corroborado por alguns espectros de absorção no UV vistos na análise por CLAE que apresentaram perfil característico de flavonoide, próximo ao tempo de retenção de 10 minutos. Não foi evidenciada a presença de taninos, mas de cumarinas e terpenos, como já era esperado de acordo com o levantamento da literatura (GONÇALVES et al., 2009; JAHANGIR et al., 2009). As cumarinas apresentaram-se como uma mancha verde opaca de Rf pequeno (Figura 23) e o terpeno como uma mancha amarelada bem clara no meio da placa (Figura 24). Nenhum dos padrões de cumarina e triterpeno foram identificados por CCD.

A análise do perfil cromatográfico do *N. officinale* (Figura 32) mostrou a maior parte dos picos, incluindo os picos majoritários, em tempo de retenção entre 0 e 15 minutos, indicando que o mesmo é constituído principalmente por substâncias polares. Possivelmente, os tão característicos glicosinolatos encontram-se nessa região do cromatograma, devido à presença de átomos muito polares em sua composição, como enxofre e oxigênio. Os ácidos hidrocínâmicos e os fenilpropanóides isolados em trabalhos anteriores encontram-se nessa região também, já que são compostos de baixa massa molecular. A partir da coinjeção, o flavonoide isoorientina (Figura 33), composto com atividade anti-nociceptiva, anti-inflamatória e gastroprotetora (KUPELI et al., 2004), pôde ser identificado com tempo de retenção de 8,9 min e 2 máximos de absorção em λ 268 e 348 nm, havendo coincidência total entre os picos do extrato e do padrão utilizado. Esse composto parece ter sido isolado pela primeira vez do *N. officinale*.

Em geral, essa espécie possui duas classes de compostos previamente relacionados à hemostasia sanguínea (flavonoides e taninos). No entanto, a presença de glicosinolatos pode estar relacionada aos resultados observados

Figura 32 – Perfil cromatográfico obtido por CLAE- DAD para o extrato etanólico de *Nasturtium officinale*. Condições cromatográficas: vide Materiais e Métodos item 1.2.

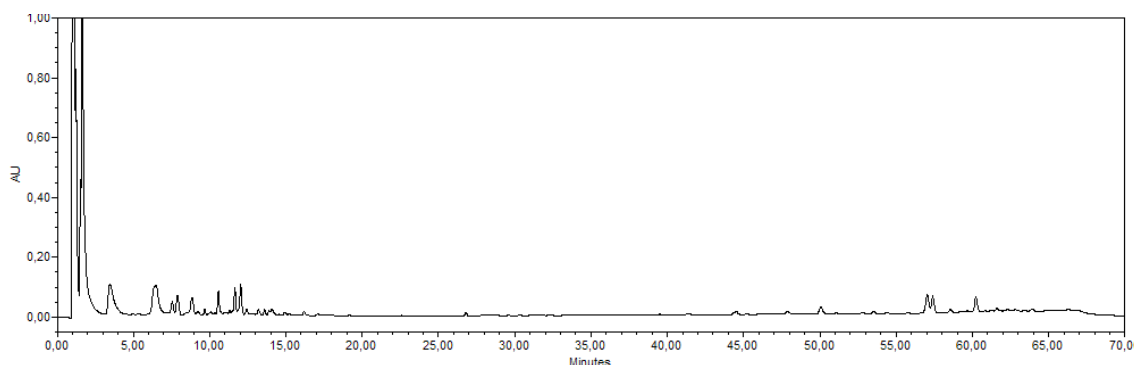
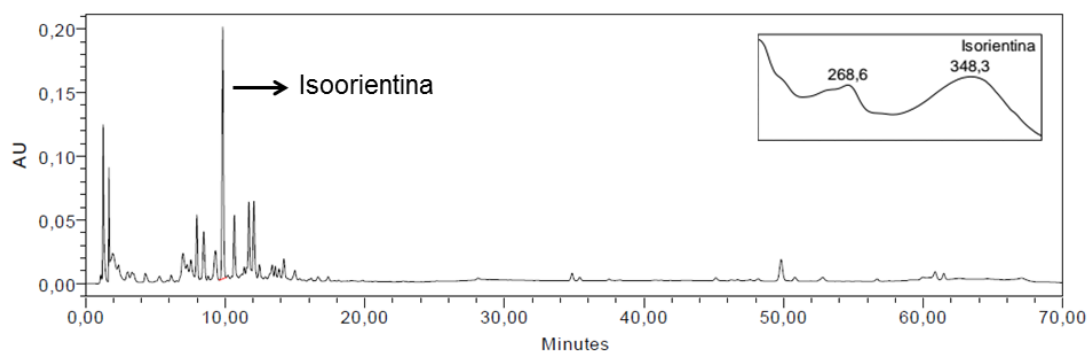


Figura 33 – Perfil cromatográfico obtido por CLAE- DAD para a coinjeção do extrato etanólico de *Nasturtium officinale* e do padrão de isoorientina. Condições cromatográficas: vide Materiais e Métodos item 1.2.



nos testes biológicos, uma vez que são compostos bem específicos dessa família, e não foram tão estudados na homeostase sanguínea.

2.6 *Lippia alba*

No extrato de *Lippia alba*, confirmando os dados da literatura científica (HENEBELLE *et al.*, 2008), observou-se a presença de flavonoides (Figura 21), representados por manchas amarelo-claras no extrato e de tom amarelo mais pronunciado nas frações aquosa e acetato de etila. A fração em acetato de etila parece conter os dois padrões utilizados: quercetina e rutina (Figura 21). Já na fração em diclorometano, pode-se observar manchas roxas e marrons referentes a triterpenos, uma mancha verde referente a esteroide e também pôde-se identificar o padrão ácido ursólico (Figura 24).

Pela CLAE-DAD também podemos identificar presença de flavonoides devido a alguns picos com tempo de retenção próximos de 12 minutos e de 20 minutos que apresentam espectros de absorção no UV característicos dessa classe (MABRY, 1970). Segundo a literatura, essa planta também produz ácido ursólico, que não foi identificado por coinjeção. Isso pode estar relacionado à baixa concentração desse composto no extrato e sua presença na fração diclorometano, devido a sua baixa polaridade.

A análise do perfil cromatográfico da *L. alba* (Figura 34) revela que a maior parte dos picos têm tempo de retenção entre 0 e 20 minutos, indicando que o mesmo também é constituído principalmente por substâncias polares, como os fenólicos de menor massa molecular e flavonoides. Entretanto, há alguns picos significantes em tempo de retenção entre 45 e 65 minutos, revelando também a presença de compostos menos polares, como triterpenos e esteroides. Utilizando a coinjeção com padrões, foi possível identificar no extrato de *L. alba* o padrão do flavonoide apigenina, composto previamente relatado na literatura (Figura 35). Os picos cromatográficos do extrato e do padrão de apigenina apresentaram coincidência total e essa substância apresentou tempo de retenção de 19,4 min e máximos de absorção em λ 266 e 336 nm, característicos de flavonoides (MABRY, 1970). A apigenina já foi isolada dessa planta de acordo com dados da literatura (CHIES *et al.*, 2013).

Figura 34 - Perfil cromatográfico obtido por CLAE- DAD para o extrato etanólico de *Lippia alba*. Condições cromatográficas: vide Materiais e Métodos item 1.2.

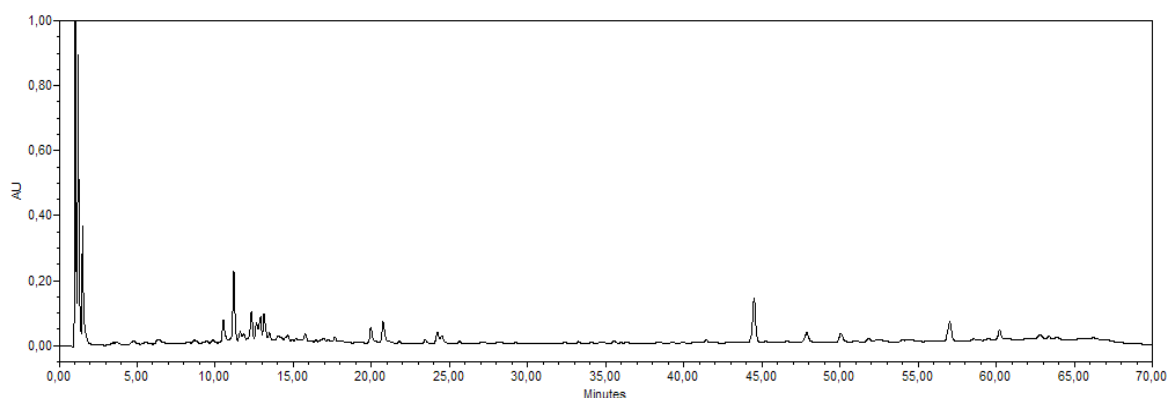
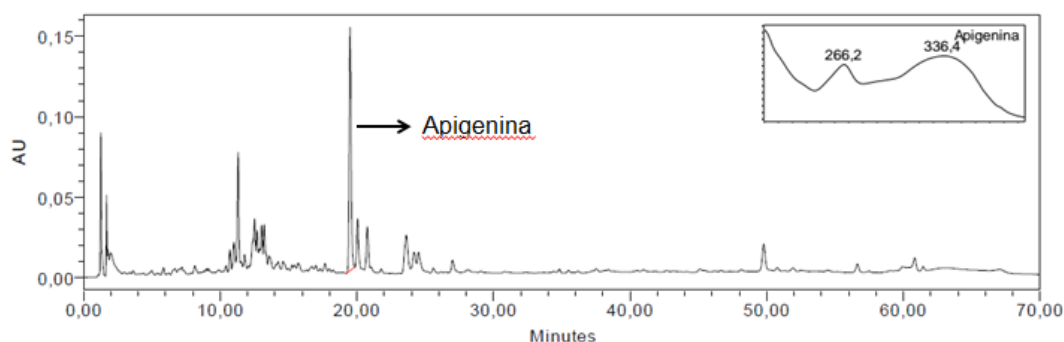


Figura 35 – Perfil cromatográfico obtido por CLAE- DAD para a coinjeção do extrato etanólico de *Lippia alba* e do padrão de apigenina. Condições cromatográficas: vide Materiais e Métodos item 1.2.



Nos perfis cromatográficos obtidos das frações de *Lippia alba*, observamos que o fracionamento realizado por partição líquido-líquido foi eficiente em fracionar o extrato etanólico (Figuras 35 a 37). A fração em diclorometano, normalmente é composta de hidrocarbonetos, ácidos graxos, acetofenonas, terpenos/esteroides, lignanas, lactonas, cumarinas, flavonoides metoxilados, já a fração em acetato de etila é composta por flavonoides, taninos de baixo peso molecular, xantonas, ácidos triterpênicos, saponinas e substâncias fenólicas. Enquanto a fração aquosa é constituída comumente por flavonoides heterosídicos, taninos de alto peso molecular, saponinas e carboidratos (YUNES e CALIXTO, 2001).

Figura 36 - Perfil cromatográfico obtido por CLAE- DAD para fração aquosa de *Lippia alba*. Condições cromatográficas: vide Materiais e Métodos item 1.2.

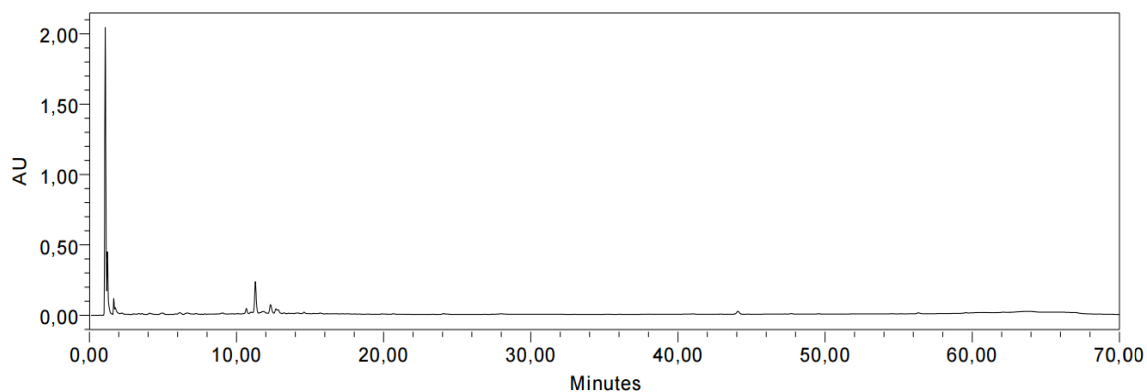


Figura 37- Perfil cromatográfico obtido por CLAE- DAD para fração acetato de etila de *Lippia alba*. Condições cromatográficas: vide Materiais e Métodos item 1.2.

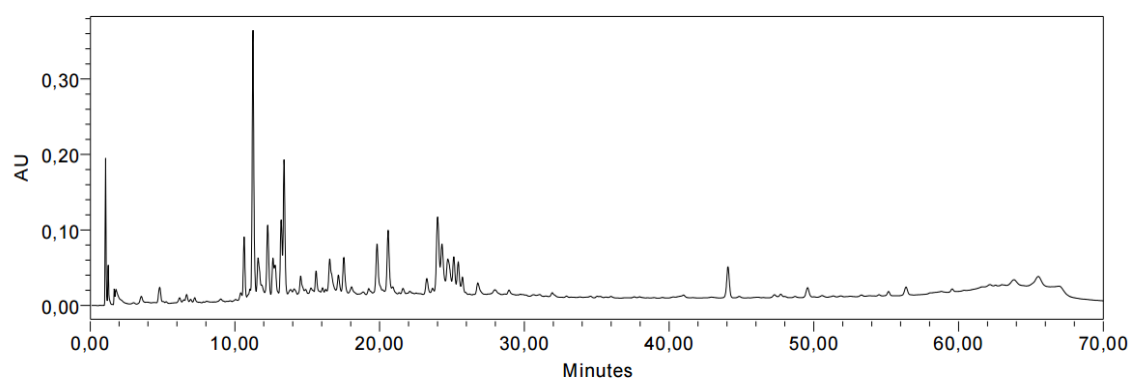
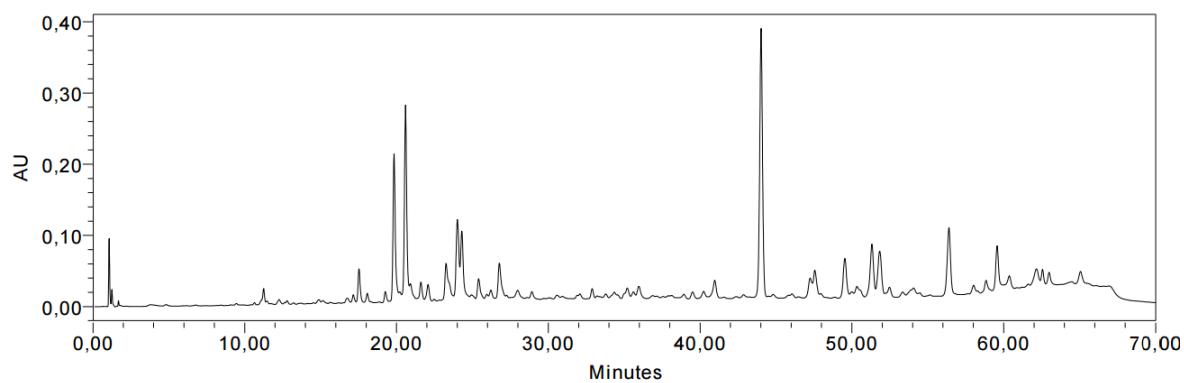


Figura 37- Perfil cromatográfico obtido por CLAE- DAD para fração diclorometano de *Lippia alba*. Condições cromatográficas: vide Materiais e Métodos item 1.2.



A fração mais representativa do extrato etanólico de *L. alba*, é a fração em diclorometano, fração menos polar. O cromatograma dessa fração mostra picos com tempo de retenção entre 18 e 60 min, com destaque para os picos com tempo de retenção superior a 45 min. Os espectros de absorção no UV referentes a esses picos mostraram-se bastante variados e provavelmente são dos triterpenos, esteroides e outros compostos mais apolares.

A fração em acetato de etila apresentou cromatograma com picos em tempo de retenção entre 10 a 30 min. Alguns picos são comuns ao cromatograma da fração em diclorometano, mas com absorvidade molar inferior, como os picos com tempo de retenção em aproximadamente 18, 20 e 24 min. O espectro de absorção no UV referente aos picos em tempo de retenção de aproximadamente 11 min. mostra perfil de fenilpropanóides (GADZA, 2004), enquanto o de 13 min de flavonoide, com dois máximos de absorção, um em comprimento de onda de aproximadamente 254,4 nm e outro em 348,3 nm, referente a flavona. (MABRY, 1970). A apigenina identificada no extrato etanólico de *L. alba*, também foi identificada nas frações em diclorometano e acetato de etila ($T_r \approx 20$ min), com destaque para a fração em diclorometano, no qual esse pico apresenta maior absorvidade molar e área.

A fração aquosa apresentou picos com tempo de retenção inferior a 1 min e um pico com tempo de retenção de aproximadamente 11 min., comum a fração em acetato de etila, porém com menor absorvidade molar e área. O espectro de absorção no UV foi igual ao obtido para a fração em acetato de etila, com perfil de arilpropanóide: $\lambda_{m\acute{a}x.}$ com quatro bandas de absorção: II (216-218 nm), IIa (244-246 nm), I (290-292 nm) e Ia (329-333 nm) (GADZA, 2004), Essa análise nos mostra a importância do fracionamento, uma vez que a análise do extrato etanólico mostrou uma predominância de substâncias mais polares, com principais picos entre 10 e 25 min no cromatograma.

2.6.1 Ensaio, *in vitro*, da atividade anticoagulante das frações de *Lippia alba*

A atividade das frações na coagulação sanguínea foi avaliada por meio dos testes de TP e TTPa. Os resultados foram expressos por meio de média e desvio padrão (Tabela 9).

Tabela 9 – Resultados dos testes de TP e TTPa para as frações e óleo essencial de *Lippia alba*

	Extrato	Controle (óleo de canola)	Fração de diclorometano	Controle (DMSO 2%)	Fração acetato (s)	Fração aquosa (s)
TP	16,33±1,41*	13,77±0,66	Erro	12,25±0,12	12,37±0,30	11,97±0,25*
TTPa	77,45±6,96*	39,63±1,96	46,03±2,58*	39,73±0,85	43,03±0,80*	41,53±2,15*

* Resultados cuja diferença estatística foi significativa.

A *Lippia alba* destacou-se quanto a sua atividade anticoagulante e visando identificar a classe responsável pela atividade anticoagulante, o extrato etanólico foi fracionado e as frações avaliadas separadamente nos ensaios de TP e TTPa. Os controles utilizados variaram conforme a solubilidade da fração.

O extrato etanólico de *Lippia alba*, apresentou TP médio de 16,33 e um TTPa médio de 77,45, na concentração de 10 mg/mL. Em relação ao TP, teste que avalia as vias extrínseca e comum, não foi possível chegar a um resultado quanto à influência da fração de diclorometano, pois o equipamento apresentou erro em todas as vezes que essa fração foi avaliada. Ao adicionar o reagente tromboplastina cálcica ao plasma com a fração, o plasma mudou de textura, nos levando a crer que houve alguma incompatibilidade entre eles.

Já a fração aquosa demonstrou pequena redução no tempo de protrombina e a fração de acetato não alterou o TP de forma estatisticamente significativa

(Tabela 9). Portanto, nota-se que as frações isoladas não apresentaram o efeito esperado de acordo com o resultado prévio do teste com o extrato etanólico. Isso pode ser decorrente do efeito sinérgico das substâncias presentes em *L. alba* para a inibição dos fatores de coagulação relacionados às vias extrínseca e comum. Entretanto, como o óleo essencial, analisado anteriormente, apresentou atividade significativa em aumentar o TP (Figura 18), pode-se também inferir que a atividade é decorrente principalmente dos compostos voláteis, que podem ter sido perdidos durante a extração e o fracionamento de *L. alba*.

No ensaio do TTPa, por sua vez, as frações de *L. alba* mostraram-se mais sensíveis. Todas as três frações avaliadas foram capazes de aumentar seu valor em comparação com o controle, revelando uma atividade anticoagulante na via intrínseca da coagulação, com destaque à fração de diclorometano, que contém os compostos menos polares do extrato. Em análise aos resultados, observa-se que com o aumento da polaridade do solvente houve uma diminuição da atividade anticoagulante. Outro ponto a chamar atenção, é que o efeito anticoagulante das frações frente ao TTPa é menos expressivo que o do extrato, mostrando mais uma vez o efeito sinérgico entre os componentes de *L. alba*.

CONCLUSÕES

O consumo de plantas medicinais entre os pacientes entrevistados foi alto e relevante. A maior parte desse consumo é na forma de chás e as folhas são geralmente obtidas de hortas. Pode-se destacar a tradição familiar como principal fator incentivador desse uso, que quase nunca é indicado e/ou supervisionado por profissionais da saúde. Essas plantas são usadas para diversos fins, com destaque para o tratamento dos distúrbios do trato respiratório, do sistema nervoso central e do trato gastrointestinal.

As plantas consumidas são nativas do Brasil e exóticas e há poucas informações acerca da segurança desse uso em literatura científica. Entretanto, mesmo com pouca informação, observa-se que as plantas medicinais tem um grande potencial para interferir na farmacoterapia da anticoagulação com a varfarina. Na anticoagulação com varfarina, as plantas estudadas podem aumentar ou diminuir o efeito desse medicamento, sendo que a potencialização desse efeito, aumentando o risco de hemorragias, é bem mais frequente. Todos esses fatores revelam a importância de aprofundar nos estudos sobre o uso dessas plantas e sua segurança.

Dentre as plantas citadas, foram escolhidas 18 para serem estudadas experimentalmente por meio dos testes coagulométricos de TP e TTPa. Todas as plantas mostraram potencial para interferir na coagulação sanguínea, mas o efeito anticoagulante mostrou-se mais comum. Também se estudou, *in vitro*, na coagulação sanguínea, o efeito do óleo essencial das cinco plantas que aumentaram o TTPa em maior extensão e o resultado mostrou que os extratos tiveram efeito mais pronunciados nos testes coagulométricos do que o óleo essencial. A *L. alba* foi a planta que mais se destacou quanto a sua atividade anticoagulante e por isso, suas frações também foram analisadas. O efeito do extrato também foi superior ao das frações isoladamente, revelando um sinergismo de ação das frações na coagulação sanguínea.

Das cinco plantas com resultados mais expressivos no teste de TTPa: *Citrus sinensis*, *Lippia alba*, *Mentha crispa*, *Mikania laevigata* e *Nasturtium officinale* foram obtidos os perfis químico por cromatografia líquida de alta eficiência e em camada delgada. A classe de flavonoides foi identificada em todas as espécies avaliadas, enquanto os taninos, cumarinas e triterpenos mostram-se restritos a algumas espécies. Foram identificados por coinjeção o ácido rosmarínico de *M. crispa*; o ácido benzoil grandiflórico, ácido cinamoil grandifólico, ácido p-cumárico, cumarina e quercetina 3- β -glicosídeo de *M. laevigata*; isoorientina de *N. officinale*; e apigenina de *L. alba*. No entanto, são necessários mais testes para possível relação entre as substâncias presentes nos extratos e frações e a atividade anticoagulante.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, R. L.; BIRD, R. J. Review article: Coagulation cascade and therapeutics update: relevance to nephrology. Part 1: Overview of coagulation, thrombophilias and history of anticoagulants. **Nephrology**. v. 14, n. 5, p. 462-479, 2009.

ADAEZE, N. N.; EMERIBE, A. U.; NASIRU, I. A.; BOBAYO, A.; UKO, E. K. Evaluation of Prothrombin time and Activated Partial Thromboplastin Time in Hypertensive Patients Attending a Tertiary Hospital in Calabar, Nigeria. **Advances in Hematology**. v. 2014, p. 1-7, 2014.

Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Farmacopeia Brasileira V. 2010. http://www.anvisa.gov.br/hotsite/cd_farmacopeia/pdf/volume1%2020110216.pdf Acesso em: 01 nov 2015

AGENO, W.; GALLUS, A. S.; WITTKOWSKY, A.; CROWTHER, M.; HYLEK, E. M.; PALARETI, G. Antithrombotic Therapy and Prevention of Thrombosis, 9th ed: American College of Chest Physicians Evidence-Based Clinical Practice Guidelines. **Chest**. v. 141, n. 2, p. 44-75, 2012.

ALENCAR, N. L.; SANTORO, F. R., ALBUQUERQUER, U. P. What is the role of exotic medicinal plants in local medical systems? A study from the perspective of utilitarian redundancy. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v. 24, n. 5, p. 506-515, 2014.

ARGENTO, A.; TIRAFERRI, E.; MARZALONI, M. Oral anticoagulants and medicinal plants. An emerging interaction. **Annali Italiani di Medicina Interna**. v. 15, n. 2, p. 139-143, 2000.

AUGER, S.; STORINO, R.; ORDONEZ, O. I.; URRUTIA, M. I.; SANMARTINO, M.; ROMERO, D.; JORG, M. Emergencies in patients with Chagas` disease in Buenos Aires city, Argentina. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 35, n. 6, p. 609-616, 2002.

BARROS, A.S.; MORAIS, S. M.; FERREIRA, P. A. T.; VIEIRA, I. G. P.; CRAVEIRO, A. A.; FONTENELLE, R. O. S.; MENEZES, J. E. S. A.; SILVA, F. W. F.; SOUSA, H. A. Chemical composition and functional properties of essential oils from *Mentha* species. **Industrial Crops and Products**. v. 76, p. 557-564, 2015.

BERTOLUCCI, S. K. V.; PEREIRA, A. B. D.; PINTO, J. E. B. P.; OLIVEIRA, A. B.; BRAGA, F. C. Seasonal variation on the contents of coumarin and kaurane-type diterpenes in *Mikania laevigata* and *M. glomerata* leaves under different shade levels. **Chemistry and Biodiversity**. v. 10, p. 288-295, 2013.

BIJAK, M.; SALUK, J.; MANIECKA, M. T.; KOMOROWSKA, H.; WACHOWICZ, B.; ZACZYNSKA, E. The influence of conjugates isolated from *Matricaria chamomilla* L. on platelets activity and cytotoxicity. **International Journal of Biological Macromolecules**. v. 61, p. 218-229, 2013.

BISCUP-HORN, P. J.; STREIFF, M. B.; ULBRICH, T. R.; NESBIT, T. W.; SHERMOCK, K. M. Impact of an Inpatient Anticoagulation Management Service on Clinical Outcomes. **The Annals of Pharmacotherapy**. v. 42, p. 6, 2008.

BOUKHATEM, M. N.; FERHAT, M. A.; KAMELI, A.; SAIDI, F.; KEBIR, H. T. Lemon grass (*Cymbopogon citratus*) essential oil as a potent anti-inflammatory and antifungal drugs. **Libyan Journal of Medicine**. v. 9, p. 1-10, 2014.

BRAGA, F. C.; CASTILHO, R. O. Potencialidades do Cerrado como Fonte de Substâncias Bioativas e de Espécies Medicinais para o Desenvolvimento de Fitoterápicos. In: SOUZA, G. H. B; MELLO, J. C. P.; LOPES, N. P. **FARMACOGNOSIA Coletânea Científica**. Ouro Preto: Editora UFOP, 2011. P. 295-318.

BRANDÃO, M. G. L.; COSENZA, G. P.; GRAEL, C. F. F., JUNIOR, N. L. N, MONTE-MOR, R. L. M. Usos tradicionais das plantas americanas presentes na 1ª Edição da Farmacopéia Brasileira. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v. 19, n. 2, p. 478-487, 2009.

BRANDÃO, M. G. L.; GRAEL, C. F. F.; FAGG, C. W. European Naturalists and Medicinal Plants of Brazil. In: GRILLO, O.; VENORA, G. **Biological Diversity and Sustainable Resources Use**. InTech, 2011. p. 101-120.

BRASILEIRO, B. G.; PIZZILOLO, V. R.; MATOS, D. S; GERMANO, A. M.; JAMAL, C. M. Plantas medicinais utilizadas pela população atendida no “Programa de Saúde da Família”, Governador Valadares, MG, Brasil. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**. v. 44, n. 4, p. 629-637, 2008.

BRUNTON, L. L.; LAZO, J. S.; PARKER, K. L. **Goodman e Gilman: As Bases Farmacológicas da Terapêutica**. Porto Alegre: AMGH, 2010. 1844p.

Centro de Referência em Informação Ambiental. Flora brasiliensis. <http://florabrasiliensis.cria.org.br/index> Acesso em: 01 ago 2015.

CHARAN, J.; BISWAS, T. How to Calculate Sample Size for Different Study Designs in Medical Research? **Indian Journal of Psychology Medicine**. v. 35, n. 2, p. 121-126, 2013.

CHIES, C. E.; BRANCO, C. S.; SCOLA, G.; AGOSTINI, F.; GOWER, A. E.; SALVADOR, M. Antioxidant effect of *Lippia alba* (Miller) N. E. Brown. **Antioxidants**. v. 2, p. 194-205, 2013.

CHECK, J. B.; K'OMBUT, F. O. The effect on fibrinolytic system of blood plasma of Wister rats after feeding them with Coix mixed diet. **East African Medical Journal**. v. 72, n. 1, p. 51-55, 1995;72.

CHEN, C.; CHOU, T.; CHENG, L.; HO, C. In vitro anti-adenoviral activity of five Allium plants. **Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers**. v. 42, n. 2, p. 228-232, 2011.

CHEN, S. A.; HSIEH, M. H.; TAI, C. T.; TSAI, C. F.; PRAKASH, V. S.; YU, W. C.; HSU, T. L.; DING, Y. A.; CHANG, M. S. Initiation of Atrial Fibrillation by Ectopic Beats Originating of the Pulmonary Veins: Electrophysiological Characteristics, Pharmacological Responses, and Effects of Radiofrequency Ablation. **Journal of the American heart Association**. v. 100, p. 1879-1886, 1999.

CHEN, X. W.; SERAG, E. A.; SNEED, K. B.; LIANG, J.; CHEW, H.; PAN, S. Y.; ZHOU, S. F. Clinical herbal interactions with conventional drugs: from molecules to maladies. **Current Medicinal Chemistry**. v. 18, n. 31, p. 4836-4850, 2011.

CHUNG, K. T.; WONG, T. Y.; WEI, C.I.; HUANG, Y. W.; LIN, Y. Tannins and human health: a review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**. v. 38, n. 6, p. 421-464, 1998.

COHEN, P. A.; ERNST, E. Safety of herbal supplements: a guide for cardiologists. **Cardiovascular Therapy**. v. 28, n. 8, p. 246-253, 2010.

CONNOCK, M.; STEVENS, C.; FRY-SMITH, A.; JOWETT, S.; FITZMAUCE, D.; MOORE, D.; SONG, F. Clinical effectiveness and cost-effectiveness of different models of managing long-term oral anticoagulation therapy; a systematic review and economic modeling. **Health Technology Assessment**. v. 11, n. 38, p. 86, 2007.

CRUZ, J. P.; ROMERO, M. M.; CARMONA, J. A.; VILLALOBOS, M. A.; CUESTA, F. S. Effect of evening primrose oil on platelet aggregation in rabbits fed an atherogenic diet. **Thrombosis Research**. v. 87, n. 1, p. 141-149.

CZELUSNIAK, K. E.; BROCCO, A.; PEREIRA, D. F.; FREITAS, G. B. L. Farmacobotânica, fitoquímica e farmacologia do Guaco: revisão considerando *Mikania glomerata* Sprengel e *Mikania laevigata* Schulyz Bip. ex Baker. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**. v.14, n.2, p.400-409, 2012.

DAHMER, T.; BERGER, M.; BARLETTE, A. G.; RECK, J. JR.; SEGALIN, J.; VERZA, S. Antithrombotic effect of chikusetsusaponin IVa isolated from *Ilex paraguariensis* (Mate). **Journal of Medicinal Food**. v. 15, n. 12, p. 1073-1080, 2012.

DALE, J. B.; FISCHETTI, V. A.; CARAPETIS, J. R.; STEER, A. C.; SOW, S.; KUMAR, R.; MAYOSI, B. M.; RUBIN, F. A.; MULHOLLAND, K.; HOMBACH, J. M.; SCHODEL, M.; HENAO-RESTREPO, A. M. Group A streptococcal vaccines: Paving a path for accelerated development. **Vaccine**. v. 31, p. 216-222, 2013.

DAVIE, E. W.; FUJIKAWA, K.; KISIEL, W. The Coagulation Cascade: initiation, maintenance, and regulation. **Biochemistry**. V. 30, n.43, p. 10363-10370, 1991.

DEWICK, P. M. Medicinal natural product – a biosynthetic approach. 3. ed. Suíça: Department of Ecology - Swedish University of Agricultural Science, 2009. 520p.

DHARMARATHNA, S. L.; WICKRAMASINGHE, S.; WADUGE, R. N.; RAJAPAKSE, R. P.; KULARATNE, S. A. Does *Carica papaya* leaf-extract increase the platelet count? An experimental study in a murine model. **Asian Pacific journal of tropical biomedicine**. v. 3, n. 9, p. 720-724, 2013.

EDELBERG, J. M.; CHRISTIE, P. D.; ROSENBERG, R. D. Regulation of vascular bed-specific prothrombotic potential. **Circulation research**. v. 89, p. 117-124, 2001.

ESMON, C. T. Inflammation and Thrombosis. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**. v. 1, n. 7, p. 1343-1348, 2003.

ETEBU, E.; NWAUZOMA, A. B. A Review On Sweet Orange (*Citrus Sinensis* L Osbeck): Health, Diseases And Management. **American Journal of Research Communication**. v. 2, n. 2, p. 33-70, 2014.

FAGG, C. W.; LUGHADHA, E. N., MILLIKEN, W; HIND, D. J. N.; BRANDÃO, M. G. L. Useful Brazilian plants listed in the manuscripts and publications of the Scottish medic and naturalist George Gardner (1812–1849). **Journal of Ethnopharmacology**. v. 161, p. 18-29, 2015.

FRAGOSO, L. R.; ARISMENDI, J. L. M.; BUSTOS, D. O.; ESPARZA, J. R.; TORRES, E; BURCHIEL; S. W. Potential risks resulting from fruit/vegetable-drug interactions: effects on drug-metabolizing enzymes and drug transporters. **Journal of Food Sciences**. v. 76, n. 4, p. 112-124, 2011.

GADZA, V. E. *Abordagem química e estudo da atividade biológica das raízes de Chiococca alba Hitchc (Rubiaceae)*. Dissertação apresentada ao Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio de Janeiro. 164p. 2004.

GARCIA, DA, WITT, DM, HYLEK, E, WITTKOWSKY, AK, NUTESCU, EA, JACOBSON, A, MOLL, S, MERLI, GJ, CROWTHER, M, EARL, L, BECKER, RC, OERTEL, L, JAFFER, A, ANSELL, JE. Delivery of Optimized Anticoagulant Therapy: Consensus Statement from the Anticoagulation Forum. **The Annals of Pharmacotherapy**. v. 42, p. 979-987, 2008.

GARDINER, P.; GRAHAM, R.; LEGEDZA, A. T.; AHN, A. C.; EISENBERG, D. M. PHILLIPS, R. S. Factors associated with herbal therapy use by adults in the United States. **Alternative Therapies in Health Medicine**. v. 13, n. 2, p. 22-29, 2007.

GARDINER, P.; KEMPER, K. J.; LEGEDZA, A.; PHILLIPS, R. S. Factors Associated with herb and dietary supplement use by young adults in the United States. **Complementary and Alternative Medicine**. v. 7, p. 39-46, 2007.

GASPARETTO, J. C.; FRANCISCO, T. M. G.; PONTAROLO, R. Chemical constituents of Mikania glomerata Spreng and Mikania laevigata Sch. Bip. ex Baker. **Journal of Medicinal Plants Research**. v. 7, n. 13, p.753-765, 2013.

GE, B.; ZHANG, Z.; ZUO, Z. Updates on the clinical evidenced herb-warfarin interactions. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**. v. 2014, p. 1-18, 2014.

GOHIL, K. J.; PATEL, J. A. Herb-drug interactions: A review and study based on assessment of clinical cases reports in literature. **Indian Journal of Pharmacology**. v. 39, n. 3, p. 129-139, 2007.

GONÇALVES, E.M.; CRUZ, R.M.S.; ABREU, M.; BRANDÃO, T. R. S.; SILVA, C.L.M. Biochemical and colour changes of watercress (*Nasturtium officinale* R. Br.) during freezing and frozen storage. **Journal of Food Engineering**. v. 93, p. 32–39, 2009.

GONÇALVES, N. M. T.; GERENUTTI, M.; CHAVES, D. S. A.; VILA, M. M. D. C. A tradição popular como ferramenta para a implantação da fitoterapia no

município de Volta Redonda – RJ. **Revista Brasileira de Farmácia**. v. 92, n. 5, p. 346-351, 2011.

HANANIA, G. Which heart valve prosthesis for patients aged between 60 and 70 years? **Heart**. v. 89, p. 481-482, 2003.

HAYASHI, K.; TAKEHISA, T.; HAMATO, N.; TAKANO, R.; HARA, S.; MIYATA, T. Inhibition of serine preteases of the blood-coagulation system by squash family protease inhibitors. **Journal of Biochemistry**. v. 116, n. 5, p. 1013-1018, 1994.

HEMKER HC, GIESEN P, AI DIERI R. Calibrated automated thrombin generation measurement in clotting plasma. **Pathophysiol Haemost Thromb**. v. 33, p. 4–15, 2003.

HENNEBELLE, T.; SAHPAZ, S.; JOSEPH, H.; BAILLEUL, F. Ethnopharmacology of Lippia alba. **Journal of Ethnopharmacology**. v., 116, p. 211-222, 2008.

HERREN, T.; STRICKER, H.; HAEBERLI, A.; DO, D. D.; STRAUB, P. W. Fibrin formation and degradation in patients with atherosclerotic disease. **Journal of the American Heart Association**. v. 98, n. 6, p. 2679-2686, 2013.

HIRSH, J.; FUSTER, V.; ANSELL, J.; HALPERN, J. L. American Heart Association/American College of Cardiology Foundation Guide to Warfarin. Boston: **Circulation**, 2003. p. 1692-1711.

HO, B. E.; SHEN, D.D.; MCCUNE, J. S.; BUI, T.; RISLER, L.; YANG, Z. Effects of Garlic on Cytochromes P450 2C9- and 3A4-Mediated Drug Metabolism in Human Hepatocytes. **Scientia Pharmaceutica**. v. 78, n. 3, p. 473-481, 2010.

HODGES, P. J.; KAM, P. C. The peri-operative implications of herbal medicines. **Anaesthesia**. v. 57, n. 9, p. 889-899, 2002.

HOOD, J. L.; EBY, C. S. Evaluation of a Prolonged Prothrombin Time. **Clinical Chemistry**. v. 54, n. 4, p. 765-768, 2008.

IIZUKA, T.; NAGAI, M.; TANIGUCHI, A.; MORIYAMA, H.; HOSHI, K. Inhibitory effects of methyl brevifolincarboxylate isolated from *Phyllanthus niruri* L. on platelet aggregation. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**. v. 30, n. 2, p. 382-384, 2007.

IWAKAMI, S.; WU, J. B.; EBIZUKA, Y.; SANKAWA, U. Platelet activating factor (PAF) antagonists contained in medicinal plants: lignans and sesquiterpenes. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**. v. 40, n. 5, p. 1196-1198, 1992.

IZZO, A. A.; DI CARLO, G.; BORRELLI, F.; ERNST, E. Cardiovascular pharmacotherapy and herbal medicines: the risk of drug interaction. **International Journal of Cardiology**. v. 98, n. 1, p. 1-14, 2005.

JANTAN, I.; RAFI, I. A.; JALIL, J. Platelet-activating factor (PAF) receptor-binding antagonist activity of Malaysian medicinal plants. **Phytomedicine**. v. 12, n. 1, p. 88-92, 2005.

JANUARIO, A. H.; SANTOS, S. L.; MARCUSSI, S.; MAZZI, M. V.; PIETRO, R. C.; SATO, D. N. Neo-clerodane diterpenoid, a new metalloprotease snake venom inhibitor from *Baccharis trimera* (Asteraceae): anti-proteolytic and anti-hemorrhagic properties. **Chemico-biological Interactions**. v. 150, n. 4, p. 243-251, 2004.

JAHANGIR, M.; KIM, H. K.; CHOI, Y. H.; VERPOORTE, R. Health-Affecting Compounds in Brassicaceae. **Comprehensive Reviews In Food Science And Food Safety**. v. 8, p. 31-43, 2009.

JUNIOR, V. F. V. Estudo do consumo de plantas medicinais na Região Centro-Norte do Estado do Rio de Janeiro: aceitação pelos profissionais de saúde e modo de uso pela população. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v. 18, n. 2, p. 308-313, 2008.

KIDD, L. R.; HANUMANTHARAYA, D. H. Sprouting a warfarin interaction. **BMJ**. p. 341, 2010.

KLEIN, A. D.; PENNEYS, N. S. *Aloe vera*. **Journal of American Academy of Dermatology**. v. 18, n. 4, p. 714-720, 1988.

KOCH, E. Inhibition of platelet activating factor (PAF)-induced aggregation of human thrombocytes by ginkgolides: considerations on possible bleeding complications after oral intake of *Ginkgo biloba* extracts. **Phytomedicine**. v. 12, n. 1, p. 10-16, 2005.

KOSHY, A. S.; ANILA, L.; VIJAYALAKSHMI, N. R. Flavonoids from *Garcinia cambogia* lower lipid levels in hypercholesterolemic rats. **Food Chemistry**. v. 72, n. 3, p. 289-294, 2001.

KUMAR, P.; MISHRA, S.; MALIK, A.; SATYA, S. Insecticidal properties of *Mentha* species: A review. **Industrial Crops and Products**. v. 34, p. 802-817, 2011.

KUPELI, E.; ASLAN, M.; GURBUZ, I.; YESILADA, E. Evaluation of *in vivo* biological activity profile of isoorientin. **Zeitschrift für Naturforschung C. A Journal of Biosciences**. v. 59, p. 787-790, 2004.

LAVITOLA, P. L.; SAMPAIO, R. O.; OLIVEIRA, W. A.; BÔER, B. N.; TARASOUTCHI, F.; SPINA, G. S.; GRINBERG, M. Varfarina ou Aspirina na Prevenção de Fenômenos Embólicos na Valvopatia Mitral com Fibrilação Atrial. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**. v. 95, n. 6, p. 749-755, 2010.

LEE, J. J.; JIN, Y. R.; LEE, J.H.; YU, J. Y.; HAN, X. H.; OH, K. W. Antiplatelet activity of carnosic acid, a phenolic diterpene from *Rosmarinus officinalis*. **Planta Medica**. v. 73, n. 2, p. 121-127, 2007.

LI, J. W. H.; VEREDAS, J. C. Drug Discovery and natural products: end of an era or an endless-Fronter? **Science**. v. 325, p. 161-165, 2009.

LIAO, Y. R.; LEU, Y. L.; CHAN, Y. Y.; KUO, P. C.; WU, T. S. Anti-platelet aggregation and vasorelaxing effects of the constituents of the rhizomes of *Zingiber officinale*. **Molecules**. v.17, n. 8, p. 8929-8937, 2012.

LIJNEN, H. R.; COLLEN, D. Fibrinolysis and the control of hemostasis. In: STAMATOYANNOPOULOS, G.; MAJERUS, P. W.; PERLMUTTER, R. M.; VARMUS, H. **The Molecular Basis of Blood Diseases**. 3. ed. Philadelphia: W. B. Saunders Co, 2001. p. 740-763.

LORENZI. H.; MATOS, F. J. A. **Plantas Medicinai no Brasil**. 2. ed. São Paulo: Instituto PLantarium de Estudos da Flora LTDA, 2008. 544p.

MABRY, T. J.; MARKHAM K. R.; THOMAS, M. B. *The systematic identification of flavonoids*. New York: Springer, 1970, 354p.

MAJERUS, P. W.; TOLLEFSEN, D. M. Blood coagulation and anticoagulant, thrombolytic, and antiplatelet drugs. In: GOODMAN, GILMAN. **As Bases Farmacológicas da Terapêutica**. 11ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hil Interamericana do Brasil, 2006. p. 1329-1333.

MANJAPPA, B.; GANGARAJU, S.; GIRISH, K. S.; KEMPARAJU, K.; GONCHIGAR, S. J.; SHANKAR, R. L. *Momordica charantia* seed extract exhibits strong anticoagulant effect by specifically interfering in intrinsic pathway of blood coagulation and dissolves fibrin clot. **Blood Coagulation and Fibrinolysis**. v. 26, n. 2, p. 191-199, 2015.

MARCASOM, W. Vitamin K: what are the current dietary recommendations for patients taking coumadin? **Journal of American Dietetic Association**. v. 107, n. 11, p. 1022, 2007.

MARTINS, M. A. P.; RIBEIRO, D. D.; NOBRE, V. A.; PEREIRA, F. R.; CÉSAR, C. C.; ROCHA, M. O. C.; RIBEIRO, A. L. P. Agreement among four drug information sources for the occurrence of warfarin drug interactions in Brazilian heart disease patients with a high prevalence of *Trypanosoma cruzi* infection. **European Journal of Clinical Pharmacology**. v. 69, n. 4, p. 919-928, 2013.

MAZZARI, A.L.; PRIETO, J. M. Herbal medicines in Brazil: pharmacokinetic profile and potential herb-drug interactions. **Frontiers in Pharmacology**. v. 5, p. 162, 2014.

MENDOZA, C. E.; FERREIRA, A. C.; MARCHENA, E. Warfarin and herbal products interaction causing prosthetic aortic valve thrombosis presenting as acute myocardial infarction. **Journal of Heart Valve Disease**. v. 13, n. 1, p. 22-24, 2004.

MOORE, R. J.; JACKSON, K. G.; MINIHANE, A. M. Green tea (*Camellia sinensis*) catechins and vascular function. **British Journal of Nutrition**. v. 102, p. 1790-1802, 2009.

MOUSA, S. A. Antithrombotic effects of naturally derived products on coagulation and platelet function. **Methods on Molecular Biology**. v. 663, p. 229-240, 2010.

NAGHADEH, H. T.; MAGHSUDLOO, M.; TABATABAEI, M. R. Coagulation factors V, VIII, and X, prothrombin time and activated partial thromboplastin time test results in thawed plasma store at 1-6°C for 5 days. **Blood Transfusion**. v. 9, n. 1, p. 95-98, 2011.

NAMUDDU, B.; KALYANGO, J. N.; KARAMAGI, C.; MUDIOPE, P.; SUMBA, S.; KALENDE, H.; WOBUDEYA, E.; KIGOZI, B. K.; WAAKO, P. Prevalence and factors associated with traditional herbal medicine use among patients on highly active antiretroviral therapy in Uganda. **Public Health**. v. 11, p. 855-894, 2011.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural Products and Sources of New Drugs over the Last 30 Years from 1981 to 2010. **Journal of Natural Products**. v. 75, n. 3, p. 311-335, 2012.

NUTESCU, E. A. The Future of Anticoagulation Clinics. **Journal of Thromb and Thrombolysis**. v. 16, n. 1/2, p. 61-63, 2003.

OKU, H.; UEDA, Y.; IINUMA, M.; ISHIGURO, K. Inhibitory effects of xanthenes from guttiferae plants on PAF-induced hypotension in mice. **Planta medica**. v. 71, n. 1, p. 90-92, 2005.

OSONIYI, O.; ONAJOBI, F. Coagulant and anticoagulant activities in *Jatropha curcas* latex. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 89, p. 101-105, 2003.

PAOLETTI, A.; GALLO, E.; BENEMEI, S.; VIETRI, M.; LAPI, F.; VOLPI, R.; MENNITI-IPPOLITO, F.; GORI, L.; MUGELLI, A.; FIRENZUOLI, F.; VANNACCI, A. Interactions between Natural Health Products and Oral Anticoagulants: Spontaneous Reports in the Italian Surveillance System of Natural Health Products. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**. v. 2011, p. 1-5, 2011.

PAULA, J. S.; RESENDE, A. M.; MIALHE, F. L. Factors associated with the use of herbal medicines for oral problems by patients attending the clinics of the School of Dentistry, Federal University of Juiz de Fora, Brazil. **Brazilian Journal of Oral Science**. v.11, n. 4, p. 445-450, 2012.

PHANG, M.; LAZARUS, S.; WOOD, L. G.; GARG, M. Diet and thrombosis risk: nutrients for prevention of thrombotic disease. **Seminars in Thrombosis and Hemostasis**. v. 37, n. 3, p. 199-208, 2011.

POSADZKI, P.; WATSON, L.; ERNST, E. Herb-drug interactions: an overview of systematic reviews. **British Journal of Clinical Pharmacology**. v. 75, n. 3, p. 603-618, 2013.

QIU, J. X.; ZHOU, Z. W.; HE, Z. X.; ZHANG, X.; ZHOU, S. F.; ZHU, S. Estimation of the binding modes with important human cytochrome P450 enzymes, drug interaction potential, pharmacokinetics, and hepatotoxicity of ginger components using molecular docking, computational, and pharmacokinetic modeling studies. **Drug Design, Development and Therapy**. v. 9, p. 841-866, 2015.

RIAZ, A.; KHAN, R. A.; MIRZA, T.; MUSTANSIR, T.; AHMED, M. *In vitro/in vivo* effect of *Citrus limon* (L. Burm. f.) juice on blood parameters, coagulation and anticoagulation factors in rabbits. **Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences**. v. 27, n. 4, p. 907-915, 2014.

RICARDO, L. M.; GOULART, E. M. A., BRANDÃO, M. G. L. Plantas medicinais da Bacia do Rio das Velhas: avaliação das condições para produção e uso em saúde pública. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v. 17, n. 3, p. 398-406, 2015.

RO, J. Y.; RYU, J. H.; PARK, H. J.; CHO, H. J. Onion (*Allium cepa* L.) peel extract has anti-platelet effects in rat platelets. **SpringerPlus**. v. 4, n. 1, p. 17, 2015.

ROHRBACH, M. S.; KREOFISKY, T. J.; CHAN, B. G. Structural determinants of the platelet agonist activity of cotton bract condensed tannin. **Environmental Research**. v. 52, n. 2, p. 199-209, 1990.

ROMERO, J. M. C.; RODRIGUEZ, E. M. L. New oral anticoagulants in the treatment of venous thromboembolic disease. **Semergen**. v. 39, n. 3, p. 146-149, 2013.

SALIM, E.; KUMOLOSASI, E.; JANTAN, I. Inhibitory effect of selected medicinal plants on the release of pro-inflammatory cytokines in lipopolysaccharide-stimulated human peripheral blood mononuclear cells. **Journal of Natural Medicines**. v. 68, n. 3, p. 647-653, 2014.

SAMUELS, N. Herbal remedies and anticoagulant therapy. **Thrombosis and Haemostasis**. v. 93, n. 1, p. 3-7, 2005.

SANTOS, P. V.; SEBASTIANI, R. Plantas medicinais utilizadas por uma comunidade universitária no Município de São Paulo, SP. **Journal of Health Sciences Institute**. v. 29, n. 1, p. 11-15, 2011.

SAWICKA-POWIERZA, J.; ROGOWSKA-SZADKOWSKA, D.; OLTARZEWSKA, A. M.; CHLABICZ, S. Factors influencing activity of oral anticoagulants. Interactions with drugs and food. **Polski Merkuriusz Lekarski**. v. 24, n. 143, p. 458-462, 2008.

SETORKI, M.; ASGARY, S.; EIDI, A.; ROHANI, A. H.; ESMAEIL, N. Effects of apple juice on risk factors of lipid profile, inflammation and coagulation, endothelial markers and atherosclerotic lesions in high cholesterolemic rabbits. **Lipids in Health and Disease**. v. 8, p. 39, 2009.

SHAH, G.; SHRI, R.; PANCHAL, V.; SHARMA, N.; SINGH, B.; MANN, A. S. Scientific basis for the therapeutic use of *Cymbopogon citratus*, stapf (Lemon grass). **Journal of Advanced Pharmaceutical Technology and Research**. v. 2, n. 1, p. 3-8, 2011.

SHARAFI, S.M.; RASOOLI, I.; OWLIA, P.; TAGHIZADEH, M.; ASTANEH, S. D. Protective effects of bioactive phytochemicals from *Mentha piperita* with multiple health potentials. **Pharmacognosy Magazine**. v. 6, n. 23, p. 147-153, 2010.

SILVA, M. I. G.; GONDIM, A. P. S.; NUNES, I. F. S.; SOUSA, F. C. F. Utilização de fitoterápicos nas unidades básicas de atenção à saúde da família no município de Maracanaú (CE). **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v. 16, n. 4, p. 455-462, 2006.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **FARMACOGNOSIA: da planta ao medicamento**. 6. ed. Trindade: Editora UFRGS, 2007. 1102p.

SOUSA, A. S.; XAVIER, S. S.; FREITAS, C. R.; HASSLOCHER-MORENO, A. Estratégias de Prevenção de Acidente Vascular Encefálico Cardioembólico na Doença de Chagas. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**. v. 91, n. 5., p. 306-310, 2008.

SPINLER, S. A.; NUTESCU, E. A.; SMYTHE, M. A.; WITTKOWSKY, A. K. Anticoagulation Monitoring Part 1: Warfarin and Parenteral Direct Thrombin Inhibitors. Detroit: **The Annals of Pharmacotherapy**, 2005. v. 39, p. 1049-1055.

SPRONK, H. M. H.; GOVERS-RIEMSLAG, J. W. P.; CATE, H. The blood coagulation system as a molecular machine. **Bioessays**. v. 25, p. 1220-1228, 2003.

SPRONK, H. M. H.; VOORT, D.; CATE, H. Blood coagulation and the risk of atherothrombosis: a complex relationship. **Thrombosis Journal**. v. 2, n. 12, p. 1-10, 2004.

SUBENTHIRAN, S.; CHOON, T. C.; CHEONG, K. C.; THAYAN, R.; TECK, M. B.; MUNIANDY, P. K. *Carica papaya* Leaves Juice Significantly Accelerates the Rate of Increase in Platelet Count among Patients with Dengue Fever and Dengue Haemorrhagic Fever. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**. v. 2013, p. 1-7, 2013.

TACHJIAN, M. D. A.; VIQAR, M.; ARSHAD, J. Use of Herbal Products and Potential Interactions in Patients With Cardiovascular Diseases. **Journal of American College of Cardiology**. v. 55, n. 6, p. 515-523. 2010.

TAUSSIG, S. J.; BATKIN, S. Bromelain, the enzyme complex of pineapple (*Ananas comosus*) and its clinical application. An update. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 22, n. 2, p. 191-203, 1988.

TCHOUMI, J. C. T.; BUTERA, G. Rheumatic valvulopathies occurrence, pattern and follow-up in rural area: the experience of the Shisong hospital, Camerron. **Bulletin de la Société de pathologie exotique**. v. 102, n. 3, p. 155-158, 2009.

TOGNOLINI, M.; BAROCELLI, E.; BALLABENI, V.; BRUNI, R.; BIANCHI, A.; CHIAVARINI, M. Comparative screening of plant essential oils: phenylpropanoid moiety as basic core for antiplatelet activity. **Life Sciences**. v. 78, n. 13, p. 1419-1432, 2006.

TOGNOLINI, M.; BALLABENI, V.; BERTONI, S.; BRUNI, R.; IMPICCIATORE, M.; BAROCELLI, E. Protective effect of *Foeniculum vulgare* essential oil and anethole in an experimental model of thrombosis. **Pharmacological Research**. v. 56, n. 3, p. 254-260, 2007.

TRIPOLI, E.; LA GAURDIA, M.; GIAMMANCO, S.; DI MAJO, D.; GIAMMANCO, M. *Citrus* flavonoids: Molecular structure, biological activity and nutritional properties: A review. **Food Chemistry**. v. 104, n. 2, p. 466-479, 2007.

TSAI, H. H.; LIN, H. W.; SIMON-PICKARD, A.; TSAI, H. Y.; MAHADY, G. B. Evaluation of the documented drug interactions and contraindications associated with herbs and dietary supplements: a systematic literature review. **International Journal of Clinical Practive**. v. 66, n. 11, p. 1056-1078, 2012.

TSAI, H. H.; LIN, H. W.; LU, Y. H.; CHEN, Y. L.; MAHADY, G. B. A review of potential harmful interactions between anticoagulant/antiplatelet agents and Chinese herbal medicines. **Plos One**. v. 8, n. 5, p. 642-655, 2013.

TSU, L. V.; DAGER, W. E. Safety of new oraç anticoagulants with dual antiplatelet therapy in patients with acute coronary syndromes. **Annals of Pharmacoterapy**. v. 47, n. 4, p. 573-577, 2013.

TUN, N. M.; OO, T. H. Prevention and treatment of venous thromboembolism with new oral anticoagulants: a practical update for clinicians. **Thrombosis**. v. 2013, p. 1-10, 2013.

ULBRICHT, C.; CHAO, W.; COSTA, D.; RUSIE-SEAMON, E.; WEISSNER, W.; WOODS, J. Clinical Evidence of Herb-Drug Interactions: A systematic Review by the Natural Standard Research Collaboration. **Current Drug Metabolism**. v. 9, p. 1063-1120, 2008.

YUNES, R. A.; CALIXTO, J. B. Plantas Mediciniais sob a ótica da química medicinal moderna. Capecó: Argos, 2001, 253 p.

VAN WALRAVEN, C. V.; JENNINGS, A.; OAKE, N.; FERGUSON, D.; FORSTER, A. J.; Effect of Study Setting on Anticoagulation Control: A Systematic Review and Metaregression. **Chest**. v. 129, n. 5, p. 1155-1166, 2006.

WANG, X. H.; DI, Y. H. Mechanism of cooked blanched garlic leaves against platelet aggregation. **Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi**. v. 22, n. 3, p. 753-757, 2014.

WAGNER, H.; BLADT, S.; ZGAINSKI, E.M. **Plant drug analysis**. Springer-Verlag. Berlin Heidelberg: New York Tokyo, 1984.

WILLIAMSON, E. M. Interactions between herbal and conventional medicines. **Expert Opinion on Drug Safety**.

ANEXO I

1 de 6

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Projeto de pesquisa: "Fatores de Risco para Complicações da Anticoagulação Oral em Pacientes com Doenças Cardiovasculares Atendidos em Ambulatórios de Referência em Belo Horizonte: um Estudo de Coorte"

Prezado(a) Senhor(a),

Algumas pessoas com doenças que aumentam a coagulação do sangue precisam usar remédio anticoagulante para evitar trombose e derrame. O excesso de efeito desse remédio pode causar sangramento. Por isso, o uso dos comprimidos precisa ser acompanhado por um exame chamado RNI (Relação Normalizada Internacional) que ajuda na escolha da dose certa. Estamos realizando uma pesquisa para conhecer os fatores de risco para complicações do tratamento com varfarina que é um anticoagulante. Queremos convidá-lo(a) para participar como voluntário(a). Não haverá custos nem ressarcimento para participar no estudo. Se você não quiser participar, você poderá desistir em qualquer momento e por qualquer motivo, sem prejuízo na assistência recebida pelo profissional de saúde.

Para realizar este estudo, precisamos colher 10 mL do seu sangue, com agulhas e tubos descartáveis, para fazer exames de sangue e exames genéticos quando você vier fazer seu exame de rotina do RNI. A coleta de sangue poderá levar a dor localizada associada à picada da agulha ou pequena reação local. Para reduzir essa reação local, a coleta de sangue será realizada por um profissional experiente, empregando rotina padronizada. Outro risco associado à coleta de sangue, embora raro, é a sensação momentânea de tontura. Nesse caso, o profissional adotará as medidas pertinentes, para as quais está habilitado. Seu prontuário médico será consultado em busca de informações sobre sua doença e exames laboratoriais. Quando você vier fazer sua consulta de rotina, faremos uma entrevista de cerca de 20 minutos. Se necessário, forneceremos declaração de comparecimento. A pesquisa terá a duração de no mínimo dois anos e você será informado sobre os resultados de todos os exames.

Depois que os exames forem feitos, o sangue será descartado segundo normas da Vigilância Sanitária, mas se você permitir, seu DNA ficará congelado em um banco de amostras biológicas (autorizado pelo COEP-UFMG ETIC 0216/06) e poderá ser usado em pesquisas futuras. Toda nova pesquisa que usar suas informações e amostras de DNA será realizada apenas se ela for aprovada novamente por um Comitê de Ética em Pesquisa.

Se você quiser participar, por favor, escolha uma das opções abaixo:

() Aceito participar dessa pesquisa, mas não concordo com o armazenamento do DNA.

() Aceito participar dessa pesquisa e concordo com o armazenamento do DNA. No futuro, se o DNA for usado em novas pesquisas, quero que entrem em contato comigo para eu escolher e vou concordar ou não com a nova pesquisa.

Telefone: _____

Endereço: _____

() Aceito participar dessa pesquisa e concordo com o armazenamento do DNA. No futuro, se o DNA for usado em novas pesquisas, os pesquisadores não precisam entrar em contato comigo para eu escolher se vou concordar ou não com a nova pesquisa.

É possível que você venha a se beneficiar diretamente dos resultados desse projeto, mas certamente contribuirá para que novos pacientes se beneficiem no futuro. Seu nome e os resultados dos exames serão mantidos em segredo. No entanto, os pesquisadores e, algumas vezes, o COEP-UFMG, poderão ter acesso aos dados. Os resultados desse estudo serão publicados e/ou apresentados em encontros científicos, sendo que, em qualquer publicação, seu nome não será revelado.

Declaro que tive oportunidade de ler esse documento, discutir os procedimentos, escolher minha forma de participação e esclarecer todas as minhas dúvidas. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que tenho garantia do acesso ao meu tratamento. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, sem prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou do meu atendimento neste serviço.

Nome completo _____

Assinatura _____

Pesquisador _____

Belo Horizonte, _____ de _____ de _____.

Este termo foi elaborado em duas vias, que serão rubricadas em todas as suas páginas e assinadas, ao seu término, por você e pelo pesquisador responsável, sendo que uma das vias ficará sob sua guarda.

Se você tiver dúvidas em relação aos procedimentos desse estudo, você poderá entrar em contato com os pesquisadores:

UFMG - Faculdade de Farmácia, Departamento de Produtos Farmacêuticos. Endereço: Av. Antônio Carlos, 6627, Campus Pampulha, Belo Horizonte, MG, CEP 31270-901. Telefones: (31) 8540-3558 (Marcus Praxedes) - (31) 3409-8937 - (31) 9643-8625 (Profa. Maria Auxiliadora) / (31) 3409-9379 (Dr. Antônio) / (31) 9977-6773 (Dr. Manoel) / (31) 9831-0004 (Dr. Vandack)

Em caso de dúvidas sobre aspectos éticos, você poderá entrar em contato com o comitê de ética em pesquisa da instituição:

COEP-UFMG - Endereço: Av. Antônio Carlos, 6627, Unidade Administrativa II – 2º. Andar – sala 2005, Campus Pampulha, Belo Horizonte, CEP 31270-901. Telefone: (31) 3409-4592

CEP-Hospital Municipal Odilon Behrens - Endereço: Rua Formiga, 50, sala 108, B. São Cristóvão, Belo Horizonte, MG, CEP 31110-430. Telefone: (31) 3277-6120.

CEP-Secretaria Municipal de Saúde de Belo Horizonte - Endereço: Av. Afonso Pena, 2336, 9º. andar, B. Funcionários, Belo Horizonte, MG, CEP 30130-007. Telefone: (31) 3277-5309.

ANEXO II

PROTOCOLO PARA RECRUTAMENTO DE PACIENTES

- 1 - Data _____ / _____ / _____
- 2 - Número de registro na pesquisa _____ / _____
- 3 - Número do prontuário _____
- 4 - Nome _____
- 5 - Critérios de inclusão
- | | | |
|--|---------|---------|
| Uso de varfarina por pelo menos 2 meses | (0) Não | (1) Sim |
| Em acompanhamento no ambulatório por pelo menos 2 meses | (0) Não | (1) Sim |
| Idade igual ou superior a 18 anos | (0) Não | (1) Sim |
| Fibrilação atrial/flutter (qualquer tipo) | (0) Não | (1) Sim |
| Prótese mecânica de válvula cardíaca (aórtica ou mitral) | (0) Não | (1) Sim |
- 6 - Critérios de exclusão
- | | | |
|--|---------|---------|
| Previsão de uso da varfarina por menos de 12 meses | (0) Não | (1) Sim |
|--|---------|---------|
- 7 - Paciente aceita participar após apresentação do TCLE? (0) Não (1) Sim
- 8 - Motivo de recusa _____

**PROTOCOLO PARA COLETA DE DADOS
A PARTIR DA ENTREVISTA DO PACIENTE**

- | | |
|---|--------------------------------|
| 1 - Sexo | (0) M (1) F |
| 2 - RNI | (0) 2,0 a 3,0
(1) 2,5 a 3,5 |
| 3 - Data de nascimento | ___/___/___ |
| 4 - Escolaridade (anos) | _____ |
| 5 - Renda mensal <i>per capita</i> (reais) | _____ |
| 6 - Coabitação (paciente reside com uma ou mais pessoas) | (0) Não (1) Sim |
| 7 - Uso de bebidas alcoólicas | (0) Não (1) Sim |
| 8 - Necessidade de auxílio para administração da varfarina | (0) Não (1) Sim |
| 9 - Tromboembolismo (entre agosto de 2009 e agosto de 2014) | (0) Não (1) Sim |
| Número de eventos (total) | _____ |
| Tipo de evento _____ | _____ |
| 10 - Hemorragia grave (entre agosto de 2009 e agosto de 2014) | (0) Não (1) Sim |
| Número de eventos (total) | _____ |
| Tipo de evento _____ | _____ |

**PROTOCOLO PARA COLETA DE DADOS
A PARTIR DO PRONTUÁRIO DO PACIENTE**

1 - Indicação da anticoagulação oral		
Fibrilação atrial/flutter (qualquer tipo)	(0) Não	(1) Sim
Prótese mecânica de válvula cardíaca aórtica	(0) Não	(1) Sim
Prótese mecânica de válvula cardíaca mitral	(0) Não	(1) Sim
Prótese biológica de válvula cardíaca aórtica	(0) Não	(1) Sim
Prótese biológica de válvula cardíaca mitral	(0) Não	(1) Sim
Trombose venosa profunda (TVP)	(0) Não	(1) Sim
Tromboembolismo Pulmonar (TEP)	(0) Não	(1) Sim
Acidente vascular encefálico (AVE) isquêmico	(0) Não	(1) Sim
Trombo intracardíaco	(0) Não	(1) Sim
Insuficiência cardíaca com fração de ejeção reduzida (FEVE < 40%)	(0) Não	(1) Sim
2 – Data de início do tratamento com a varfarina	_____	
3 - Comorbidades	(0) Não	(1) Sim
Doença de Chagas	(0) Não	(1) Sim
Afecções dermatológicas	(0) Não	(1) Sim
Alterações oftalmológicas	(0) Não	(1) Sim
Arritmias	(0) Não	(1) Sim
Déficit auditivo	(0) Não	(1) Sim
Diabetes	(0) Não	(1) Sim
Dislipidemia	(0) Não	(1) Sim
Doença aórtica (DAO)	(0) Não	(1) Sim
Doença artério-coronariana (DAC)	(0) Não	(1) Sim
Doenças trato gastrointestinal (TGI)	(0) Não	(1) Sim
Doenças hematológicas	(0) Não	(1) Sim
Doenças infecciosas	(0) Não	(1) Sim
Doenças neuropsiquiátricas	(0) Não	(1) Sim
Doenças valvares	(0) Não	(1) Sim
Doenças vasculares periféricas (DVP)	(0) Não	(1) Sim
Doenças do endocárdio, miocárdio e pericárdio	(0) Não	(1) Sim
Doenças osteoarticulares	(0) Não	(1) Sim
Doenças respiratórias	(0) Não	(1) Sim
Doenças reumáticas	(0) Não	(1) Sim
Hipertensão arterial sistêmica (HAS)	(0) Não	(1) Sim
Hipotireoidismo	(0) Não	(1) Sim
Insuficiência cardíaca	(0) Não	(1) Sim
Insuficiência hepática	(0) Não	(1) Sim
insuficiência renal	(0) Não	(1) Sim
Neoplasias	(0) Não	(1) Sim
Obesidade	(0) Não	(1) Sim
Outras doenças da tireoide	(0) Não	(1) Sim
Outras doenças do trato geniturinário	(0) Não	(1) Sim
Outras doenças hepáticas	(0) Não	(1) Sim
4 - Medicamentos em uso crônico (igual ou superior a 30 dias contínuos)	(0) Não	(1) Sim
Amiodarona	(0) Não	(1) Sim
Sinvastatina	(0) Não	(1) Sim
Hidroclorotiazida	(0) Não	(1) Sim
Furosemida	(0) Não	(1) Sim
Enalapril	(0) Não	(1) Sim
Captopril	(0) Não	(1) Sim
Losartana	(0) Não	(1) Sim
Propranolol	(0) Não	(1) Sim
Carvedilol	(0) Não	(1) Sim
Metoprolol	(0) Não	(1) Sim
Espironolactona	(0) Não	(1) Sim
Digoxina	(0) Não	(1) Sim
Ácido acetil salicílico 100 mg	(0) Não	(1) Sim
Outro _____	(0) Não	(1) Sim
5 - Número de medicamentos em uso crônico (incluindo a varfarina)	_____	

ANEXO III

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
FACULDADE DE FARMÁCIA
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas

Projeto: Uso de plantas medicinais e sua potencial interferência no controle da anticoagulação oral em cardiopatas atendidos em clínica de anticoagulação de um Hospital Universitário

Paciente:

PROTOCOLO PARA COLETA DE DADOS A PARTIR DA ENTREVISTA DO PACIENTE

- | | | |
|---|--|----------------------------------|
| 1 – Uso de planta medicinal e/ou fitoterápico (se sim, qual(is)?) | (0) Não | (1) Sim |
| 2 – Forma de utilização (Se outra, especificar) | (1) Chá
(3) Xarope | (2) Cápsula
(4) Outra |
| 3 – Preparo (Se outro, especificar) | (1) Infusão
(3) Outro | (2) Decocto
(4) NA |
| 4 – Obtenção (Se outra, especificar) | (1)Horta de amigos
(3) Farmácia
(5) Supermercado | (2) Horta de casa
(4) Mercado |
| 5 – Frequência de uso semanal | (1) 1-2
(3) 6-7 | (2) 3-5
(4) Esporad. |
| 6 – Indicação (Se outra, especificar) | (1) Amigos
(3) Mídia
(5) Por conta própria | (2) Médico
(4) Tradição |
| 7 – Finalidade (Especificar) | (1) TGI
(3) TU
(5) Gosta | (2) TR
(4) SNC
(6) Outra |
| 8 – Efeitos observados | (1) Melhora
(3) Piora | (2) Nenhum |

ANEXO IV



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - COEP

Projeto: CAAE -08136613.4.0000.5149

Interessado(a): **Profa. Maria Auxiliadora Parreiras Martins**
Departamento de Produtos Farmacêuticos
Faculdade de Farmácia- UFMG

DECISÃO

O Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG – COEP aprovou, no dia 18 de dezembro de 2013, o projeto de pesquisa intitulado "**Fatores de risco para complicações da anticoagulação oral em pacientes com doenças cardiovasculares atendidos em ambulatórios de referência em Belo Horizonte: um estudo de coorte**" bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

O relatório final ou parcial deverá ser encaminhado ao COEP um ano após o início do projeto.

Profa. Maria Teresa Marques Amaral
Coordenadora do COEP-UFMG

ANEXO V
FORMULÁRIO DE SELEÇÃO DOS PACIENTES

DADOS DO PACIENTE

Nome completo:

Data de nascimento:

Sexo: F () M ()

CRITÉRIOS DE INCLUSÃO (respostas devem ser SIM para a inclusão na pesquisa)

Saudável: S () N ()

Idade superior a 18 anos: S () N ()

Não usuários de qualquer medicamento com potencial impacto sobre o sistema hemostático (anticoagulantes, antiagregantes, anticoncepcionais, etc): S () N ()

Integra corpo docente ou discente da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais: S () N ()

Assinou o TCLE de livre e espontânea vontade: S () N ()

CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO (respostas devem ser não para a inclusão na pesquisa)

Presença de cardiopatias: S () N ()

Ocorrência de eventos trombóticos venosos ou arteriais: S () N ()

Presença de câncer: S () N ()

Presença de doenças auto-imunes: S () N ()

Presença de doenças hepáticas: S () N ()

Presença de doenças renais: S () N ()

Uso de antiagregante e/ou anticoagulante: S () N ()

Presença de deficiência conhecida de algum fator da coagulação: S () N ()

Presença de história familiar de distúrbios ligados ao sistema hemostático: S () N ()

ANEXO VI



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - COEP

Projeto: CAAE – 37870914.0.0000.5149

Interessado(a): **Profa. Rachel Oliveira Castilho**
Departamento de Produtos Farmacêuticos
Faculdade de Farmácia - UFMG

DECISÃO

O Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG – COEP aprovou, no dia 15 de dezembro de 2014, o projeto de pesquisa intitulado **"Uso de plantas medicinais e sua potencial interferência no controle de anticoagulação oral em cardiopatas atendidos em clínica de anticoagulação de um hospital universitário"** bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

O relatório final ou parcial deverá ser encaminhado ao COEP um ano após o início do projeto através da Plataforma Brasil.

Profa. Dra. Telma Campos Medeiros Lorentz
Coordenadora do COEP-UFMG

