



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA
REDE NORDESTE DE BIOTECNOLOGIA
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ

ATIVIDADE ANTICOAGULANTE E ANTIAGREGANTE DO ÓLEO ESSENCIAL
DE *Rosmarinus officinalis* L. E AÇÃO VASORRELAXANTE DO
MONOTERPENO γ -TERPINENO EM ARTÉRIA MESENTÉRICA DE RATOS

KALYNCA KAYLA VIANA ARAGÃO

Teresina, Piauí
2019

KALYNCA KAYLA VIANA ARAGÃO

ATIVIDADE ANTICOAGULANTE E ANTIAGREGANTE DO ÓLEO ESSENCIAL
DE *Rosmarinus officinalis* L. E AÇÃO VASORRELAXANTE DO
MONOTERPENO γ -TERPINENO EM ARTÉRIA MESENTÉRICA DE RATOS

Tese apresentada à coordenação do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Rede Nordeste de Biotecnologia - RENORBIO, ponto focal UFPI, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Biotecnologia.

Orientador: Profa. Dra. Aldeídia Pereira de Oliveira

Teresina, Piauí

2019

FICHA CATALOGRÁFICA
Universidade Federal do Piauí
Biblioteca Comunitária Jornalista Carlos Castello Branco
Serviço de Processamento Técnico

A659a Aragão, Kalynca Kayla Viana.
 Atividade anticoagulante e antiagregante do óleo
 essencial de *Rosmarinus officinalis* L. e ação
 vasorrelaxante do monoterpeno γ -terpineno em artéria
 mesentérica de ratos / Kalynca Kayla Viana Aragão. –
 2019.
 116 f.

 Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Rede Nordeste
 de Biotecnologia, Universidade Federal do Piauí,
 Teresina, 2019.

 “Orientador: Profa. Dra. Aldeídia Pereira de
 Oliveira”.

 1. Anticoagulante. 2. Antiagregante. 3. *Rosmarinus
 officinalis* L. 4. Vasorrelaxamento. I. Título.

CDD 660.6

FOLHA DE APROVAÇÃO – DEFESA DA TESE

ALUNA: KALYNCA KAYLA VIANA ARAGÃO

ATIVIDADE ANTICOAGULANTE E ANTIAGREGANTE DO ÓLEO ESSENCIAL
DE *Rosmarinus officinalis* L. E AÇÃO VASORRELAXANTE DO
MONOTERPENO γ -TERPINENO EM ARTÉRIA MESENTÉRICA DE RATOS

PROFESSORA ORIENTADORA: ALDEÍDIA PEREIRA DE OLIVEIRA

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Aldeídia Pereira de Oliveira – UFPI (Presidente)

Profa. Dra. Francilene Vieira da Silva – UEMA

Prof. Dr. Paulo Humberto Moreira Nunes – UFPI

Profa. Dra. Fernanda Regina de Castro Almeida – UFPI

Profa. Dra. Rita de Cássia Meneses Oliveira – UFPI

DATA DA AVALIAÇÃO: _____ **HORÁRIO:** _____

LOCAL: _____

REITOR

Prof. Dr. José Arimatéia Dantas Lopes

VICE-REITOR

Prof. Dra. Nadir do Nascimento Nogueira

PRÓ-REITOR DE ENSINO E PÓS-GRADUAÇÃO

Profa. Dra. Regina Lúcia Ferreira Gomes

DIRETOR DO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

Prof. Dr. Viriato Campelo

**COORDENADOR DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
BIOTECNOLOGIA RENORBIO
PONTO FOCAL PIAUÍ**

Prof. Dr. Daniel Arcanjo Dias Rufino

À minha mãe, que sempre me dedica Amor e Tempo!

AGRADECIMENTOS

Existe uma linda lenda a respeito do alecrim:

Dizem que quando a sagrada família fugiu para o Egito com Maria levando em seus braços o menino Jesus, as flores do caminho iam se abrindo à medida que eles passavam por elas. O lilás ergueu seus galhos orgulhosos e emplumados, o lírio abriu seu cálice. O alecrim, sem pétalas nem beleza, entristeceu lamentando não poder agradar o menino Jesus.

Cansada, Maria parou à beira do Rio e, enquanto a criança dormia, lavou suas roupinhas. Em seguida, olhou a seu redor, procurando um lugar para estendê-las.

- O lírio quebrará sob o peso, e o lilás é alto demais – pensou Maria.

Colocou-as então sobre o alecrim e ele suspirou de alegria, agradeceu de coração a nova oportunidade e as sustentou ao Sol durante toda a manhã.

- Obrigada, gentil alecrim! - disse Maria.

- Daqui por diante ostentará flores azuis para recordarem o manto azul que estou usando. E não só apenas flores te dou em agradecimento, mas todos os galhos que sustentaram as roupas do pequeno Jesus serão aromáticos. “Eu abençoo folha, caule e flor, que a partir deste instante terão aroma de santidade e emanarão alegria”.

Esta é uma lenda que nos inspira e nos lembra o respeito devido a todos os seres, porque todos têm algo único e bom a dar ao mundo.

A todos que me ofereceram o que têm de melhor, nessa incrível e difícil jornada do doutorado, meus sinceros agradecimentos!!

Agradeço a Deus pela vida maravilhosa que tenho e por me reerguer em todas as vezes que cai pelas “dificuldades do mundo”.

À minha orientadora Profa. Dra. Aldeídia Oliveira, obrigada por me aceitar, encorajar e ensinar.

Ao meu pai e irmãs, obrigada pela paciência, amor e torcida! Amo vocês!

Ao meu filho, obrigada por me fazer imensamente feliz!! Desde que você nasceu, nunca mais passei um dia sem sorrir ou amar!

Ao meu marido, obrigada pelo café diário que me manteve acordada e por não deixar eu desistir!

Às minhas amigas maravilhosas, obrigada pelo carinho e amizade que tornam
minha vida mais alegre e feliz!

Às professoras Rita de Cásia Oliveira e Rosimeire Santos, obrigada por me
acolherem com carinho no laboratório e pelos importantes ensinamentos.

Ao Pedro Simão, Marcelo Bezerra, Julianne Viana, Emerson Portela, Dalila
Santos e Bruno Haddad obrigada pela parceria na realização dos experimentos
e também por me fazerem sorrir. Meus dias de tensão e angústia com as
dificuldades do doutorado eram sempre melhores com vocês. Obrigada
também pelos ensinamentos!

Ao Benedito Pereira, obrigada pela realização dos exames bioquímicos.

À Alessandra Braga, obrigada por toda a ajuda nos experimentos, por me ouvir,
me apoiar nos momentos difíceis e pelas inúmeras conversas que contribuíram
para essa conquista.

À amiga Lorranya Pereira, obrigada por tudo...ajuda nos experimentos,
ensinamentos, momentos de descontração, conversas, conselhos e
principalmente pelo carinho e amizade. Muito obrigada!!!

Aos funcionários do Núcleo de Pesquisas em Plantas Medicinais, Patrícia
Costa, Jôse Borges, Carlos de Deus e Kalina da Paz obrigada pelo afetuoso
convívio, ajuda e parceria.

Ao Professor Daniel Vasconcelos, obrigada pela impressionante gentileza e
disponibilidade em ajudar e ensinar.

Aos membros da banca, obrigada por aceitarem o convite e por todas as
considerações para a melhoria do trabalho.

À professora Carla Eiras e ao Professor Daniel Arcanjo, obrigada por
compreenderem os imprevistos e colaborarem para a finalização deste
trabalho.

À CAPES, FAPEPI e à UFPI, obrigada pelo apoio financeiro e estrutural.

Todas as pessoas que você conhece estão enfrentando batalhas
que você não sabe nada a respeito.
Seja gentil. Sempre.

ARAGÃO, Kalynca Kayla Viana. ATIVIDADE ANTICOAGULANTE E ANTIAGREGANTE DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Rosmarinus officinalis* L. E AÇÃO VASORRELAXANTE DO MONOTERPENO γ -TERPINENO EM ARTÉRIA MESENTÉRICA DE RATOS. Teresina. 2019. Tese de Doutorado. Programa de Pós-graduação em Biotecnologia – RENORBIO. Universidade Federal do Piauí- UFPI.

RESUMO

Rosmarinus officinalis L. (alecrim) é uma planta medicinal, da família Lamiaceae, cujo óleo essencial, extraído de suas folhas, é um líquido aromático com ação antioxidante que tem entre seus constituintes os monoterpenos 1-8 cienol, limoneno e γ -terpineno. O objetivo deste estudo foi avaliar o potencial anticoagulante e antiagregante do óleo essencial de *Rosmarinus officinalis* L. (OERO) livre e complexado a β -ciclodextrina (β -CD) e do seu constituinte γ -terpineno, além de analisar o efeito do γ -terpineno sobre a reatividade vascular em artéria mesentérica superior isolada de rato. A avaliação do efeito anticoagulante foi realizada pelos testes, Tempo de Protrombina (TAP) e Tempo de Tromboplastina Parcialmente Ativada (TTPA), após tratamento, por via oral, durante 7 dias com OERO livre (OERO), OERO complexado em β -CD (OERO+ β CD) ou γ -terpineno (100 mg/kg). Todos os protocolos foram aprovados pelo CEUA Nº 275/16. Os resultados demonstraram um aumento significativo do TAP nos grupos OERO, OERO+ β CD, e γ -terpineno quando comparados ao grupo controle. Efeito do OERO na agregação plaquetária foi realizada por dois protocolos diferentes. No primeiro, o OERO (100 μ M), foi adicionado diretamente, na cubeta, ao plasma de animais não tratados e reduziu a agregação plaquetária induzida por ADP. No segundo protocolo, os animais tratados por via oral, durante 7 dias, com OERO ou OERO+ β CD (100 mg/kg), não apresentaram diferença na agregação induzida por ADP. Para verificar a segurança na utilização do OERO foram realizados o teste de MTT (citotoxicidade), dosagem de parâmetros bioquímicos e análise histológica (coloração H&E) de ratos tratados, por via oral, durante 7 dias com OERO ou OERO+ β CD (100 mg/kg). No teste de MTT, concentrações de 200, 400 e 800 μ g/mL apresentaram redução da viabilidade celular e avaliando a CC_{50} , as amostras foram consideradas atóxicas. Houve uma redução significativa de colesterol, glicose e ALT no grupo OERO+ β CD quando comparado ao grupo controle. Análise histopatológica não demonstrou lesão significativa nos tecidos hepático e renal. A reatividade vascular foi avaliada em anéis de artéria mesentérica superior e os resultados demonstraram que o γ -terpineno promoveu efeito vasorrelaxante, independente do endotélio vascular sobre contrações induzidas por fenilefrina. A pré-incubação com diferentes concentrações de γ -terpineno não atenuou as contrações induzidas por adição cumulativa de fenilefrina, mas observou-se uma atenuação do efeito vasorrelaxante do γ -terpineno na presença do bloqueador inespecífico de canais de potássio (TEA 3mM). Conclui-se que OERO, OERO+ β CD e γ -terpineno demonstraram efeito anticoagulante e OERO apresentou efeito antiagregante; OERO e OERO+ β CD não apresentaram toxicidade e reduziram os valores de colesterol, glicose e ALT; e o γ -terpineno apresentou efeito vasorrelaxante provavelmente por mecanismos envolvendo a participação dos canais de potássio.

Palavras-chave: Anticoagulante. Antiagregante. *Rosmarinus officinalis* L.. β -ciclodextrina. γ -terpineno. Vasorrelaxamento.

ARAGÃO, Kalynca Kayla Viana. ANTICOAGULANT AND ANTIAGREGANT ACTIVITY OF *Rosmarinus officinalis* L. ESSENTIAL OIL AND VASORRELAXING ACTION OF MONOTERPENE γ -TERPINENE IN MESENTERIC RATS ARTERY. Teresina. 2019. Doctoral Thesis. Postgraduate Program in Biotechnology - RENORBIO. Federal University of Piauí- UFPI.

ABSTRACT

Rosmarinus officinalis L. (Rosemary) is a medicinal plant, of the Lamiaceae family, whose essential oil, extracted from its leaves, is an aromatic liquid with antioxidant action that has among its constituents the monoterpenes 1-8 cymenol, limonene and γ -terpinene. The objective of this study was to evaluate the anticoagulant and anti-aggregation potential of free *Rosmarinus officinalis* L. essential oil (OERO) and complexed *Rosmarinus officinalis* L. essential oil to β -cyclodextrin (β -CD) and its constituent γ -terpinene, besides analyzing the effect of γ -terpinene on vascular reactivity in isolated rat superior mesenteric artery. The evaluation of the anticoagulant effect was performed by the following tests, Prothrombin Time (PT) and Activated partially Thromboplastin Time (APTT), after oral treatment with free OERO (OERO), complexed OERO (OERO+ β CD) or γ -terpinene (100 mg/kg) for 7 days. All protocols were approved by CEUA/UFPI N^o 275/16. Results demonstrated a significant increase in PT in the OERO, OERO+ β CD, and γ -terpinene groups when compared to the control group. The effect of the OERO on platelet aggregation was achieved by two different protocols. In the first, OERO (100 μ M) was added directly into the cube, containing the plasma of untreated animals and reduced platelet aggregation induced by ADP. In the second protocol, animals treated orally for 7 days with OERO or OERO+ β CD (100 mg/kg) showed no difference in platelet aggregation induced by ADP. To check the safety of using the OERO, MTT test (cytotoxicity), dosage of biochemical parameters and histological analysis (H&E) of rats treated orally with OERO or OERO+ β CD (100 mg/kg) for 7 days. In the MTT test, concentrations of 200, 400 and 800 μ g/mL showed reduced cell viability and assessing the CC₅₀, the samples were considered non-toxic. There was a statistically significant reduction in cholesterol, glucose and ALT in the OERO+ β CD group when compared to the control group. Histopathological analysis showed no significant injury in liver and kidney tissues. Vascular reactivity was evaluated in superior mesenteric artery rings and the results demonstrated that γ -terpinene promoted an independent vasorelaxing effect of the vascular endothelium on phenylephrine-induced contractions. Pre-incubation with different concentrations of γ -terpinene did not attenuate the contractions induced by cumulative addition of phenylephrine, but there was an attenuation of the vasorelaxing effect of γ -terpinene in the presence of the non-specific potassium channel blocker (TEA 3mM). It was concluded that OERO, OERO+ β CD and γ -terpinene demonstrated an anticoagulant effect and OERO showed an anti-aggregation effect; OERO and OERO+ β CD showed no toxicity and reduced cholesterol, glucose and ALT values; and γ -terpinene displayed a vasorelaxing effect probably due to mechanisms involving the participation of potassium channels.

Keywords: Anticoagulant. Antiagregant. *Rosmarinus officinalis* L.. β -cyclodextrin. γ -terpinene. Vasorelaxation.

LISTA DE SIGLAS E ABREVIÇÕES

- ADP - Adenosina difosfato
- ALT - Alanina aminotransferase
- APC - Proteína C ativada
- AST - Aspartato aminotransferase
- AT - Antitrombina
- CC₅₀ - Concentração citotóxica média
- CD - Ciclodextrina
- CMZ - Calmidazolium
- DCVs - Doenças cardiovasculares
- DMSO - Dimetilsulfóxido
- FvW - Fator von Willebrand
- H&E - Hematoxilina e eosina
- INR - Índice internacional normalizado
- ISI - Índice de Sensibilidade Internacional
- MTT - Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-zil)2,5-difeniltetrazolio
- OERO - Óleo essencial de *Rosmarinus officinalis* L.
- OERO+βCD - Óleo essencial de *Rosmarinus officinalis* L. complexado em β-ciclodextrina
- P2Y – Receptor purinérgico 2Y
- PLG - Plasminogênio
- PPP - Plasma pobre em plaquetas
- PRP - Plasma rico em plaquetas
- PS - Proteína S
- TAP - Tempo de protrombina
- TEA – tetratilamônio
- TF - Fator tecidual
- TFPI - Inibidor da via do fator tecidual
- TTPA - Tempo de tromboplastina parcial ativada

LISTA DE FIGURAS

INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA

Figura 1	Modelo de coagulação sanguínea baseado em superfícies celulares.....	25
Figura 2	Representação esquemática dos inibidores naturais da coagulação.....	28
Figura 3	Representação esquemática do processo de fibrinólise.....	29
Figura 4	<i>Rosmarinus officinalis</i> L. (Alecrim) e γ -terpineno.....	34
Figura 5	Estrutura tronco-cônica característica das ciclodextrinas.....	37
Figura 6	Estrutura e propriedades de α , β e γ ciclodextrinas.....	38

CAPÍTULO 1

Figura 1	Receptores P2 plaquetários e seu sinal de transdução.....	55
Figura 2	Agregômetro.....	60
Figura 3	Efeito do OERO, OERO+ β CD e γ -terpineno sobre Tempo de Protrombina (TAP).....	61
Figura 4	Efeito do OERO, OERO+ β CD e γ -terpineno sobre Tempo de Tromboplastina Parcialmente Ativada (TTAP).....	62
Figura 5	Efeito do OERO, OERO+ β CD e γ -terpineno sobre o Índice Internacional Normalizado (INR)	63
Figura 6	Efeito do OERO, OERO+ β CD e γ -terpineno sobre a Atividade de Protrombina.....	63
Figura 7	Efeito do OERO sobre a agregação plaquetária induzida por ADP.....	64
Figura 8	Agregação plaquetária induzida por ADP após tratamento por via oral com OERO e OERO+ β CD.....	65

CAPÍTULO 2

Figura 1	Analisador bioquímico automático Labmax.....	80
Figura 2	Análise histológica do fígado e rim dos animais tratados com OERO (100 mg/kg) e OERO+ β CD (100 mg/kg)	85

CAPÍTULO 3

Figura 1	Curvas concentração resposta do efeito vasorrelaxante do γ -terpineno em anéis de artéria mesentérica superior pré-	
----------	--	--

	contraídos com fenilefrina na presença (●) e na ausência (■) do endotélio vascular.	102
Figura 2	Curvas concentração resposta para fenilefrina na presença de concentrações isoladas de γ -terpineno em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato.....	103
Figura 3	Curvas concentração resposta do efeito vasorelaxante do γ -terpineno em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato, pré-contraídos com fenilefrina, na ausência (●) e na presença (●) de TEA 3 mM.....	104

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 2

Tabela 1	Classificação de citotoxicidade consoante a percentagem de viabilidade celular.....	82
Tabela 2	Viabilidade celular de macrófagos murinos da linhagem Balb/c pós incubação com concentrações crescentes (6,25 - 800 $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$) de OERO e OERO+ β CD pelo ensaio de MTT.....	82
Tabela 3	Valores de CC_{50} do OERO e OERO+ β CD de macrófagos murinos.....	83
Tabela 4	Parâmetros bioquímicos de ratas tratadas, por 7 dias, com OERO e OERO+ β CD.....	84
Tabela 5	Avaliação histopatológica do fígado dos animais tratados com OERO (100 mg/kg) e OERO+ β CD (100 mg/kg)	86
Tabela 6	Avaliação histopatológica do rim dos animais tratados com OERO (100 mg/kg) e OERO+ β CD (100 mg/kg)	87

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	17
2. OBJETIVOS.....	22
2.1 Objetivo Geral.....	22
2.2 Objetivo Específicos.....	22
3. REVISÃO DE LITERATURA.....	23
3.1 Doenças cardiovasculares.....	23
3.2 Hemostasia.....	24
3.2.1 Coagulação sanguínea.....	24
3.2.2 Fibrinólise.....	28
3.3 Microcirculação e hemostasia.....	29
3.4 Fármacos antitrombóticos.....	31
3.5 Plantas medicinais e óleos essenciais.....	32
3.5.1 <i>Rosmarinus officinalis</i> L. (Alecrim)	33
3.6 Ciclodextrinas.....	36
3.6.1 β -Ciclodextrina.....	39
REFERÊNCIAS.....	40

CAPÍTULO 1. ATIVIDADE ANTICOAGULANTE E ANTIAGREGANTE DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Rosmarinus officinalis* L. LIVRE E COMPLEXADO EM β -CICLODEXTRINA E DO SEU CONSTITUINTE γ -TERPINENO

1. INTRODUÇÃO.....	53
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	56
2.1 Substâncias e reagentes.....	56
2.2 Complexo de inclusão de β -ciclodextrina com o óleo essencial de <i>Rosmarinus officinalis</i> L.	57
2.3 Animais e protocolo experimental.....	57
2.4 Avaliação da atividade anticoagulante.....	57
2.4.1 Tempo de Protrombina (TAP).....	58
2.4.2 Tempo de Tromboplastina Parcial Ativada (TTPA).....	58
2.5 Avaliação da atividade antiagregante	59

2.6 Análise estatística.....	61
3. RESULTADOS.....	61
3.1 Efeito do tratamento, por via oral, com óleo essencial de <i>Rosmarinus Officinalis</i> L. livre e complexado em β -ciclodextrina, e do seu constituinte γ -terpineno sobre a coagulação sanguínea.....	61
3.2 Efeito do óleo essencial de <i>Rosmarinus Officinalis</i> L. livre sobre a agregação plaquetária induzida por ADP.....	63
3.3 Efeito do tratamento, por via oral, com com óleo essencial de <i>Rosmarinus Officinalis</i> L. livre e complexado em β -ciclodextrina sobre a agregação plaquetária induzida por ADP.....	64
4. DISCUSSÃO.....	65
5. CONCLUSÃO.....	69
REFERÊNCIAS.....	69

CAPÍTULO 2. AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Rosmarinus officinalis* L. LIVRE E COMPLEXADO EM β -CICLODEXTRINA

1. INTRODUÇÃO.....	75
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	76
2.1 Substâncias e reagentes.....	76
2.2 Complexo de inclusão de β -Ciclodextrina com o óleo essencial de <i>Rosmarinus Officinalis</i> L.....	77
2.3 Animais e protocolo experimental.....	77
2.4 Teste de citotoxicidade em macrófagos	78
2.5 Avaliação de parâmetros bioquímicos.....	79
2.6 Análise histológica.....	80
2.7 Análise estatística.....	81
3. RESULTADOS.....	81
3.1 Efeito do óleo essencial de <i>Rosmarinus Officinalis</i> L. livre e complexado em β -ciclodextrina sobre a citotoxicidade em macrófagos....	81
3.2 Parâmetros bioquímicos de ratas tratadas com óleo essencial de <i>Rosmarinus Officinalis</i> L. livre e complexado em β -ciclodextrina.....	83

3.3 Características histológicas dos tecidos hepático e renal após tratamento com o óleo essencial de <i>Rosmarinus Officinalis</i> L. livre e complexado em β -ciclodextrina.....	85
4. DISCUSSÃO.....	87
5. CONCLUSÃO.....	91
REFERÊNCIAS.....	91

CAPÍTULO 3. AÇÃO VASORRELAXANTE DO MONOTERPENO γ -TERPINENO EM ARTÉRIA MESENTÉRICA SUPERIOR ISOLADA DE RATO

1. INTRODUÇÃO.....	97
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	99
2.1 Substâncias e reagentes.....	99
2.2 Animais	99
2.3 Preparação de anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato.	99
2.4 Atividade vasorrelaxante.....	100
2.5 Análise estatística.....	101
3. RESULTADOS.....	102
3.1 Efeito vasorrelaxante do γ -terpineno sobre contrações induzidas por fenilefrina em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato.....	102
3.2 Efeito do γ -terpineno, em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato, sobre a reatividade vascular à fenilefrina.....	103
3.3 Efeito do γ -terpineno sobre o vasorrelaxamento de anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato, pré-incubados com TEA.....	103
4. DISCUSSÃO.....	104
5. CONCLUSÃO	107
REFERÊNCIAS	107
CONCLUSÃO FINAL.....	112
PERSPECTIVAS	112

1. INTRODUÇÃO

As doenças cardiovasculares (DCVs) são a primeira causa de mortes em todo o mundo. Estima-se que 17,9 milhões de pessoas morreram de DCVs em 2016, representando 31% de todas as mortes globais (BENJAMIM et al., 2019). No Brasil, registro da Sociedade Brasileira de Cardiologia (2018), demonstra aumento na mortalidade ao longo dos anos, acometendo em 2017, mais de 383 mil pessoas. Indivíduos com DCVs instaladas ou com alto risco cardiovascular (devido à presença de um ou mais fatores de risco, como hipertensão, tabagismo, diabetes e/ou hiperlipidemia) precisam de detecção e tratamento precoces com aconselhamento e uso de medicamentos (BENJAMIN et al., 2018; GBD, 2018).

As DCVs têm uma etiologia complexa e são decorrentes de perturbações das funções vasculares que se manifestam de diversas formas como aterosclerose, arritmias, insuficiência cardíaca, além de disfunção endotelial, condição caracterizada pela elevação crônica e anormal da resistência vascular que pode resultar em hipertensão grave (GILES et al., 2012; HIEN et al., 2012; CHEN et al., 2015).

São consideradas DCVs: doença cardíaca coronária, doença cerebrovascular, doença arterial periférica, doença cardíaca reumática, cardiopatia congênita, trombose venosa profunda e embolia pulmonar. No entanto, 85% do total dos óbitos por DCVs é causado por doença cardíaca coronária e doença cerebrovascular (WHO, 2018). Estas são classificadas como eventos agudos e ocasionadas principalmente por alterações na passagem do fluxo sanguíneo por formação de trombos patológicos ou por ruptura dos vasos sanguíneos (RAJENDRAN et al. 2013; WHO, 2016).

A hemostasia é o processo fisiológico que interrompe o sangramento no local de uma lesão, pela formação de um tampão hemostático, mantendo o fluxo sanguíneo normal em outras partes da circulação. Este processo é rigidamente regulado de tal forma que é ativado dentro de segundos de uma lesão, mas deve ser temporário e permanecer situado no local lesionado (GURBEL et al., 2004). Para esse controle, vários mecanismos antiagregantes plaquetários e anticoagulantes atuam ativando enzimas inibidoras da coagulação,

antagonizando a ação de agonistas pró-coagulantes endógenos e aumentando a disponibilidade do óxido nítrico (NO) (PALOMO et al., 2009).

Fármacos que regulam disfunções no processo hemostático apresentam eficácia comprovada, mas ainda com restrições específicas e riscos associados à sua utilização. Assim a busca de novas substâncias com atividade antiagregante e anticoagulante parece ser uma importante via para a indústria farmacêutica e novos compostos com essas funções podem ser encontrados nas chamadas plantas medicinais, cuja eficácia e legitimidade de sua utilização para o tratamento de diversas doenças é conhecida desde a antiguidade. Segundo as tradições populares, elas eram capazes de aliviar ou curar enfermidades e usadas normalmente na forma de decoctos (LORGA FILHO et al., 2013; MACHADO et al., 2013).

A utilização, das plantas medicinais, desempenha um papel essencial na manutenção da saúde em todo o mundo, mas especialmente nos países em desenvolvimento, onde o acesso a saúde pública e privada é bastante restrito. Prevenção e/ou tratamento de câncer, diabetes, hipertensão, infecção e inflamação são alguns exemplos de disfunções nas quais a população faz uso de plantas medicinais (DEEPA; ANURADHA, 2011; SHUAIB; ROHIT; PIYUSH, 2016; DE OLIVEIRA; CAMBORGARGO; DE OLIVEIRA, 2019). Como exemplo de planta medicinal é descrito na literatura, o alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.). Este é um arbusto denso, ramificado, perene, nativo da região do mediterrâneo e pertencente à família Lamiaceae. A maioria dos seus efeitos medicinais advêm das características antioxidantes, antimicrobianas e anti-inflamatórias de vários dos seus constituintes, como carnosol, ácido carnósico, ácido ursólico, ácido rosmarínico e ácido cafeico (RAŠKOVIĆ et al., 2014; SATYAL et al., 2017; VILLAREAL et al., 2017; ANDRADE et al., 2018; HELAL et al., 2019).

Dentre os produtos naturais, promissores para a indústria farmacêutica, derivados de plantas medicinais, estão os óleos essenciais utilizados na medicina popular. Estes são líquidos oleosos, aromáticos, obtidos de material vegetal (flor, broto, sementes, folhas, casca, madeira, frutas e/ou raízes) e com diversas propriedades biológicas como antibacteriana, antifúngica, antiviral, anticancerígena e/ou antioxidante. Como exemplo de plantas medicinais produtoras de óleos essenciais temos a *Mentha cervina* L., *Ocimum*

basilicum, *Origanum vulgare*, *Salvia officinalis* e *Rosmarinus officinalis* L. (PEREIRA; BARROS; FERREIRA, 2017; SÁ et al., 2017; ANDRADE et al., 2018).

O óleo essencial de *Rosmarinus officinalis* L. (OERO) é um líquido incolor ou amarelo pálido, com odor característico da planta e constituído principalmente por 1,8-cineol, α -pineno, cânfora, canfeno, limoneno, borneol, cimeno e γ -terpineno (STEFFENS, 2010; FERNANDES et al., 2014; PASSOS et al., 2015). Sua utilização é frequente na indústria alimentar por apresentar características antioxidantes e antimicrobianas e assim aumentar a validade de produtos e qualidade de armazenamento (HUSSAIN et al., 2010; SELMI et al., 2017). Ainda constam como seus efeitos farmacológicos, ter atividade anti-inflamatória (QUINTAS-JÚNIOR et al., 2013), antinociceptiva, antiproliferativa (HUSSAIN et al., 2010; SIENKIEWICZ et al., 2013; PASSOS et al., 2015), antidepressiva (MACHADO et al., 2013; SAYORWAN et al., 2013; VILLAREAL et al., 2017), protetora do DNA e anticancerígena (RAŠKOVIĆ et al., 2014; DE OLIVEIRA, CAMBORGARGO; DE OLIVEIRA, 2019).

O valor medicinal atribuído ao OERO, depende da sua composição química, que é influenciada pelas condições climáticas e geográficas de plantio; e das técnicas de isolamento e armazenamento, já que o OERO exibe fraca solubilidade em água, alta volatilidade, sensibilidade a luz e meia-vida curta. (HELAL et. al., 2019). Como forma de contornar essas características de óleos essenciais, como o OERO, vários sistemas de transporte de fármacos, como lipossomas, nanopartículas ou ciclodextrinas (CDs), têm sido utilizados para aumentar o tempo de ação e reduzir a toxicidade dessas substâncias (LIMA et al. 2008).

A complexação de compostos voláteis em ciclodextrinas (CDs) é utilizada como técnica para protegê-los contra oxidação, degradação por calor e luz, evaporação e umidade (HERNÁNDEZ -SÁNCHEZ et al., 2017). Além disso, a formação desse complexo de inclusão pode inibir a irritação local e prolongar a duração e intensidade da ação de óleos essenciais. Das ciclodextrinas, a β -ciclodextrina é a mais amplamente utilizada para melhorar a disponibilidade e estabilidade de fármacos fracamente solúveis, aumentando a sua solubilidade aquosa (QUINTANS-JÚNIOR et al., 2013; SILVA, 2017).

Entre os componentes do OERO está o γ -terpineno. Este é um monoterpeno, cuja presença no OERO ocorre em concentrações que variam de 0,5 a 20% (OZCAN; CHALCHAT, 2008; STEFFENS, 2010; TADTONG et al., 2015; JARDAK et al., 2017) e que apresenta poder anti-inflamatório, antioxidante e antibacteriano (JAAFARI et al., 2007; SILVA et al., 2010; RAMOS; BORGES; TEBALDI, 2012). Estudos demonstraram a participação do γ -terpineno na redução dos níveis séricos de colesterol e triglicerídeos em ratos, processos que desempenham um papel central no desenvolvimento de aterosclerose que, por sua vez, está associada ao desenvolvimento de diversas complicações cardiovasculares (BREWER et al., 2007; TAKAHASHI; FERRAZ; VEIGA, 2012).

Além da presença de trombos, uma ineficaz regulação do tônus vascular contribui significativamente para o estreitamento dos vasos sanguíneos, principalmente nas artérias de resistência, como a mesentérica superior, gerando alterações da pressão arterial no sistema cardiovascular e contribuindo para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares tais como a hipertensão arterial, infarto do miocárdio e acidente vascular cerebral (PAIVA; FARIAS, 2005; CHRISTENSEN; MULVANY, 2011; SEGADE et al., 2016).

Com base nos fatos descritos acima, e sendo ausentes estudos que investigam o efeito antitrombótico do OERO e do seu constituinte γ -terpineno na hemostasia, o objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito antitrombótico do óleo essencial de *Rosmarinus officinalis* L. livre e complexado em β -ciclodextrina e de seu constituinte γ -terpineno, além de analisar o efeito, deste último, no tônus vascular da artéria mesentérica de rato. Tais substâncias possuem elevado poder antioxidante, podendo contribuir para prevenir e/ou limitar a formação de trombos patológicos, que estão intimamente relacionados com as doenças cardiovasculares.

Diante do exposto, o presente trabalho foi estruturado em forma de capítulos onde inicialmente foi apresentada uma revisão de literatura sobre as doenças cardiovasculares, processos de coagulação sanguínea e agregação plaquetária, e o papel das plantas medicinais nestas patologias, bem como a associação dessas plantas em complexos de inclusão. Posteriormente foram escritos três capítulos, sendo o primeiro, um estudo sobre a atividade anticoagulante e antiagregante do óleo essencial de *Rosmarinus officinalis* L. livre

(OERO) e complexado em β -ciclodextrina (OERO+ β CD) e do seu constituinte, γ -terpineno; e o segundo capítulo, avaliações de citotóxicidade e toxicidade do OERO e OERO+ β CD. O terceiro capítulo, mostra a ação do γ -terpineno sobre o tônus vascular de anéis de artéria mesentérica de ratos.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar o efeito anticoagulante e antiagregante do óleo essencial de *Rosmarinus officinalis* L. livre (OERO) e complexado em β -ciclodextrina (), assim como do seu constituinte γ -terpineno, e investigar o efeito vasorrelaxante do γ -terpineno em artéria mesentérica de ratos.

2.2 Objetivos Específicos

- Analisar o efeito anticoagulante do OERO e do OERO+ β CD, assim como, do seu constituinte γ -terpineno, através da realização dos testes de coagulação: Tempo de Protrombina (TAP) e Tempo de Tromboplastina Parcial Ativada (TTPA);
- Pesquisar o efeito antiagregante do OERO e do OERO+ β CD, por meio da realização do teste de agregação plaquetária;
- Averiguar o efeito citotóxico do OERO e do OERO+ β CD em macrófagos murinos;
- Avaliar toxicidade do OERO e do OERO+ β CD através da dosagem de parâmetros bioquímicos e análise histopatológica do rim e fígado de ratos fêmeas;
- Investigar o efeito vasorrelaxante do γ -terpineno, um dos constituintes do OERO, e um de seus prováveis mecanismos de ação em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Doenças Cardiovasculares

As Doenças cardiovasculares (DCVs) são um tipo de doença crônica não transmissível que englobam: doença cardíaca coronária, doença cerebrovascular, doença arterial periférica, doença cardíaca reumática, cardiopatia congênita, trombose venosa profunda e embolia pulmonar (WHO, 2016).

Elas são a principal causa de incapacidade e morte no mundo, sendo responsáveis por 30% das mortes anuais em países de baixa e média renda e projeções para os próximos anos indicam um aumento exponencial desse número (TSUI, et al., 2018; BENJAMIN et al., 2019).

Nos EUA estima-se que em 2035 mais de 130 milhões de adultos da população deverão ter alguma forma de DCV, e os custos totais de DCVs deverão atingir 1,1 trilhão em 2035, com custos médicos diretos projetados para atingir 748,7 bilhões e custos indiretos estimados em 368 bilhões de dólares (BENJAMIN et al., 2018).

No Brasil, o custo das internações por essas doenças é considerado o maior dentre as causas de internações hospitalares. Dados recentes do IBGE mostram que o Brasil está mudando muito rapidamente a sua estrutura etária, aumentando a proporção de idosos e a expectativa de vida do brasileiro. Esse envelhecimento tende a aumentar a incidência de DCVs e, conseqüentemente os seus custos (RODRIGUES et al., 2017; SIQUEIRA; SIQUEIRA-FILHO; GERARDIN, 2017).

Vários são os fatores de risco para tais doenças como o tabagismo, dislipidemias, hipertensão arterial (HA), diabetes mellitus (DM), obesidade e sobrepeso, sedentarismo, dieta pobre em vegetais e frutas, uso de álcool, estresse psicossocial, e idade acima de 45 anos para homens e 55 anos para mulheres (BONOTTO et al., 2016).

A etiologia da DCV é multifatorial, mas em grande parte dos casos ocorre por uma falha no mecanismo de hemostasia. Este é um processo fisiológico que atua impedindo o extravasamento inadequado de sangue após lesão em um vaso sanguíneo e/ou evitando a formação de trombos patológicos, e

consequentemente mantendo a fluidez sanguínea (ALLFORD; MACHIN, 2004; HOFFBRAND, 2013; TOMAIUOLO; BRASS; STALKER, 2017).

3.2 Hemostasia

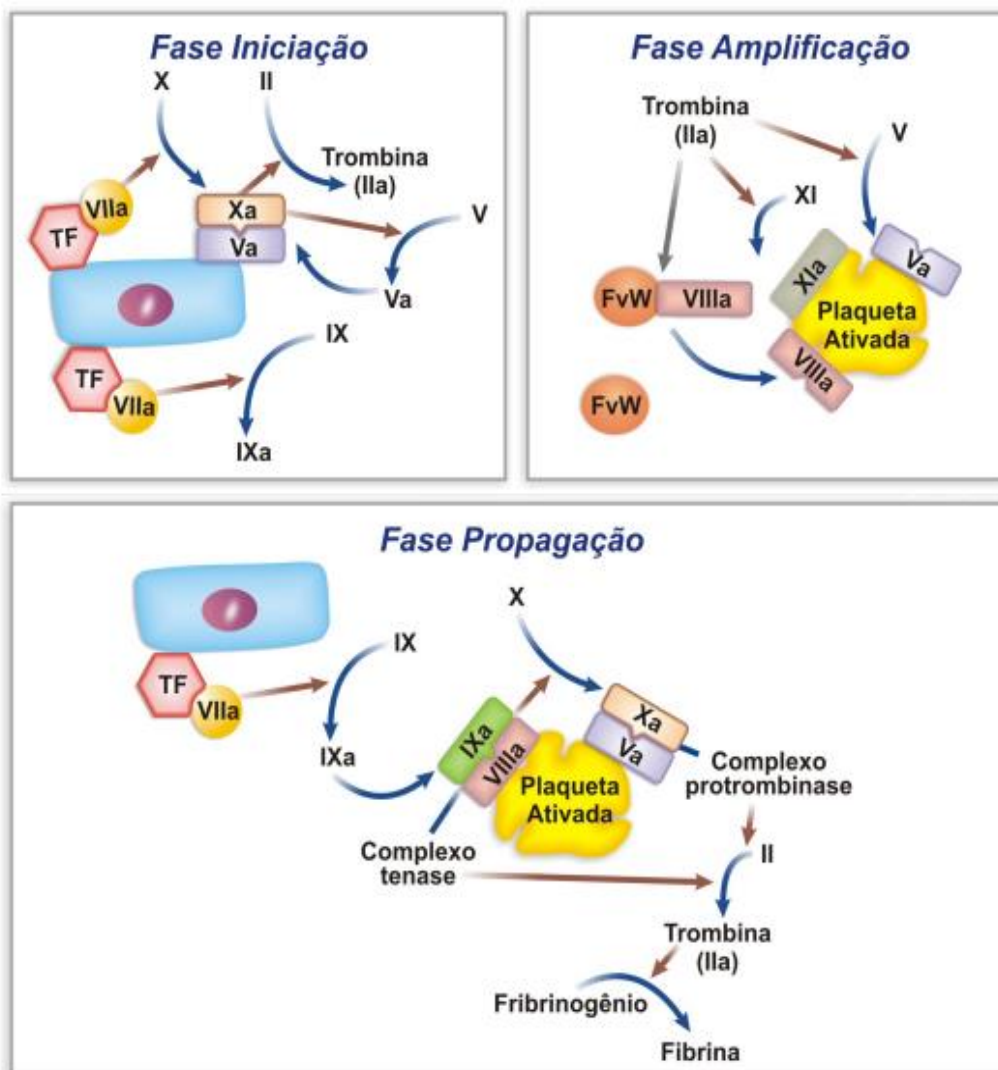
O sistema hemostático, que compreende agregação plaquetária, coagulação sanguínea e fibrinólise, é um mecanismo de defesa do hospedeiro que preserva a integridade do sistema circulatório fechado, de alta pressão, em mamíferos após danos vasculares. Em condições fisiológicas normais, a formação de trombos, controlada pelo sistema regulador, é temporária e espacial. Entretanto, quando alterações patológicas sobrecarregam o sistema regulatório da hemostasia e/ou ocorre uma mudança do equilíbrio hemostático em direção ao lado pró-coagulante, a trombose é iniciada. Sob este estado de hipercoagulabilidade, quantidades excessivas de trombos são formadas, levando ao bloqueio parcial ou total dos vasos sanguíneos (FOGELSON; HUSSAIN; LEIDERMAN, 2012; CHEN et al., 2015).

3.2.1 Coagulação sanguínea

Durante décadas, a cascata de coagulação foi considerada como tendo dois pontos de partida diferentes, que são comumente rotulados como vias extrínseca e intrínseca. Após estudos, no entanto, ficou claro que essas vias não funcionam como sistemas paralelos e/ou independentes. O novo modelo de coagulação apresenta o complexo fator VIIa da via extrínseca como ativador de ambos os sistemas, implicando uma correlação entre eles. Esses achados deram lugar ao modelo de coagulação celular que apresenta importantes reações entre as células diretamente implicadas na hemostasia (células receptoras de fator tecidual (FT), como monócitos e fibroblastos) e os fatores de coagulação (KATRANCHA; GONZALEZ; PHARMD, 2014; GUTTERMAN et al., 2016).

O novo modelo considera a coagulação como sendo um processo de três distintas fases (Figura 1) que envolvem diferentes membranas celulares e ocorrem simultaneamente: iniciação, amplificação e propagação (HOFFMAN; MONROE, 2007; SIMMONS; POWELL, 2016).

Figura 1. Modelo de coagulação sanguínea baseado em superfícies celulares.



TF: Fator Tecidual; FvW: Fator von Willebrand.
Fonte: Rodrigues (2012).

3.2.1.1 Fase de Iniciação

A fase de iniciação do processo da coagulação ocorre quando células que expressam o FT em sua superfície são expostas aos componentes do sangue no sítio da lesão. O FT liga-se ao FVII presente no sangue e rapidamente o ativa em FVIIa formando o complexo FVIIa/FT, responsável pela ativação de pequenas quantidades de FIX e FX. O FXa associado com o seu cofator, FVa, forma um complexo denominado protrombinase na superfície da célula que expressa o FT. Esse complexo transforma pequenas quantidades de protrombina (Fator II) em trombina, que são insuficientes para completar o processo de formação do

coágulo de fibrina, mas são de fundamental importância para a fase de amplificação da coagulação (HOFFMAN, 2003; GALVEZ; CORTES, 2012; KATRANCHA; GONZALEZ; PHARMD, 2014; SIMMONS; POWELL, 2016) (Figura 1).

3.2.1.2 Fase de Amplificação

Quando os vasos são lesados, plaquetas escapam de dentro dos vasos, se ligam ao colágeno e a outros componentes da matrix extracelular no sítio da lesão, onde são parcialmente ativadas, resultando em um tampão plaquetário responsável pela hemostasia primária. Neste ponto, pequenas quantidades de trombina produzidas pelas células que expressam o FT podem interagir com as plaquetas e o complexo FVIII/FvW (Figura 1). Dessa forma, inicia-se o processo hemostático culminando na formação de fibrina estável, que consolida o tampão plaquetário inicial. Este processo resulta na hemostasia secundária, em que pequena quantidade de trombina gerada pelas células que expressam o FT possuem várias funções importantes, sendo a principal a ativação máxima de plaquetas, que expõem receptores e sítios de ligação para os fatores de coagulação ativados. Como resultado dessa ativação, as plaquetas alteram a permeabilidade de suas membranas, permitindo a entrada de íons cálcio e saída de substâncias quimiotáticas que atraem os fatores de coagulação para sua superfície (KATRANCHA; GONZALEZ; PHARMD, 2014; SIMMONS; POWELL, 2016).

Também é função da trombina formada durante a fase de iniciação, a ativação de cofatores FV, FXI e FVIII na superfície das plaquetas ativadas. O complexo FVIII/FvW é dissociado, permitindo o FvW mediar a adesão e agregação plaquetárias no sítio da lesão (Figura 1). Estando os fatores ativados na superfície das plaquetas inicia-se a fase de propagação (HOFFMAN, 2003; GALVEZ; CORTES, 2012; KATRANCHA; GONZALEZ; PHARMD, 2014; SIMMONS; POWELL, 2016).

3.2.1.3 Fase de Propagação

A fase de propagação é caracterizada pelo recrutamento de um grande número de plaquetas para o sítio da lesão e pela produção dos complexos tenase

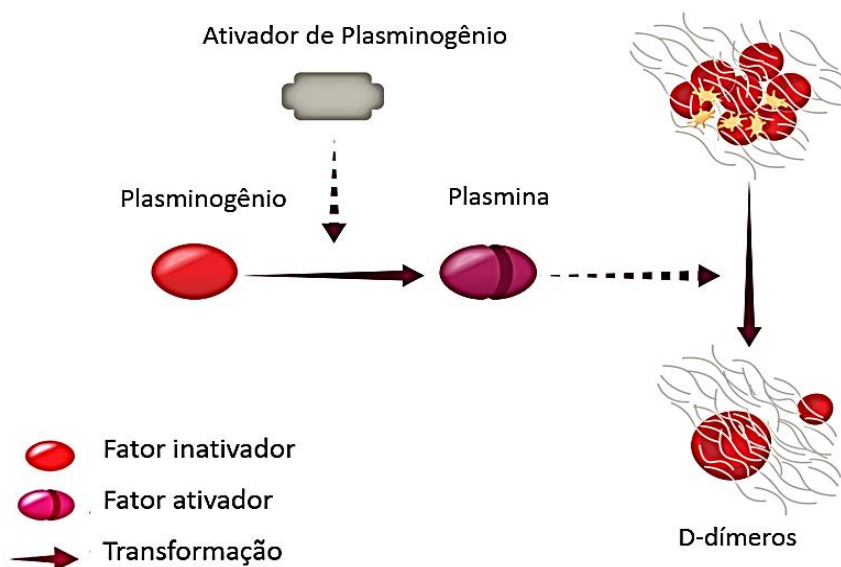
e protrombinase na superfície das plaquetas ativadas (Figura 1). Primeiramente, o FIXa ativado durante a fase de iniciação associa-se ao FVIIIa na superfície das plaquetas formando o complexo tenase. Uma quantidade adicional de FIXa pode também ser produzida pelo FXIa ligado às plaquetas. O complexo tenase, por sua vez, ativa o fator X. Finalmente, o FXa rapidamente se associa ao FVa ligado à plaqueta durante a fase de amplificação, resultando na formação do complexo protrombinase, o qual converte grande quantidade de protrombina em trombina. Esta é responsável pela clivagem do fibrinogênio em monômeros de fibrina, que polimerizam para consolidar o tampão plaquetário inicial (HOFFMAN, 2003; GALVEZ; CORTES, 2012; KATRANCHA; GONZALEZ; PHARMD, 2014; SIMMONS; POWELL, 2016).

3.2.1.4 Regulação da coagulação sanguínea

O controle da ativação e propagação da coagulação sanguínea é realizado principalmente por quatro anticoagulantes naturais, o inibidor da via do fator tecidual (TFPI), a proteína C (PC), a proteína S (PS), e a antitrombina (AT) (CHEN et al., 2015), representados na figura 2.

O TFPI é uma proteína secretada pelo endotélio, que forma um complexo quaternário FT/FVIIa/FXa/TFPI inativando os fatores ativados e, portanto, limitando a coagulação. A proteína C é uma glicoproteína plasmática dependente de vitamina K, que promove a proteólise dos cofatores Va e VIIIa. Ela é ativada pela trombina, que está ligada à proteína transmembrânica trombomodulina (TM) na superfície das células endoteliais intactas e sua atividade é aumentada por outro cofator inibidor, a proteína S (PS). Um outro anticoagulante natural é a antitrombina (AT), a qual inibe a atividade da trombina e outras serino proteases, tais como FIXa, FXa, FXIa e FXIIa. (CHEN et al., 2015; GUREWICH, 2016) (Figura 2).

Figura 3. Representação esquemática do processo de fibrinólise



Fonte: www.trombosisadviser.com

Além de alterações no sistema hemostático, a microcirculação controlada especialmente por modificações do tônus do músculo liso vascular tem papel importante na patogênese de doenças cardiovasculares (TAFNER, et al., 2017).

3.3 Microcirculação e hemostasia

A microcirculação humana apresenta aspectos que a tornam única em relação à sua importante capacidade de ajustar a oferta de oxigênio e nutrientes às demandas metabólicas de todas as células do organismo, promovendo ajustes no tônus vascular e a liberação de diferentes substâncias vasoativas. Esses ajustes variam conforme idade, vaso sanguíneo envolvido e presença ou não de doença aterosclerótica prévia (GUTTERMAN et al., 2016).

A regulação da resistência vascular protege o organismo contra alterações excessivas de fluxo para os tecidos perfundidos e elevação ou redução aguda da pressão sanguínea. Comprometimento intenso da função vascular ocorre após isquemia prolongada, manifestada como redução do fluxo máximo que tem causa multifatorial, incluindo obstrução anatômica (formação de trombo; edema

perivascular e/ou edema celular), redução da vasorreatividade ou necrose microvascular (RAJENDRAN et al. 2013; GUTTERMAN et al., 2016).

O endotélio é a monocamada celular que reveste o interior dos vasos sanguíneos, incluindo artérias, veias e as câmaras do coração, atuando como uma camada protetora entre os demais tecidos e o sangue circulante. Sua função inclui controle da homeostase vascular, participando da regulação de sinais intracelulares, permeabilidade e tônus vascular, cascata de coagulação e angiogênese, entre outros. Uma das principais funções do endotélio é a liberação de substâncias frente a estímulos, que atuam de forma autócrina e/ou parácrina. Essas ações são exercidas principalmente por substâncias como óxido nítrico, prostaciclina e fator hiperpolarizante derivado do endotélio (CARVAJAL, 2017; STORCH et al., 2017).

Existe também os fatores contráteis do endotélio como endotelinas, angiotensina II, prostaglandinas e espécies reativas de oxigênio (EROs) (HSIEH, 2014; CAHILL; REDMOND, 2016). Dessa forma, agressões ao endotélio geram uma resposta inflamatória, com atuação de diversos tipos celulares (linfócitos, monócitos, plaquetas e células musculares lisas), levando a um quadro de disfunção da célula endotelial, enrijecimento da parede vascular e formação da placa de aterosclerose (FAVERO et al., 2014; STORCH et al., 2017, SI et al., 2017).

Assim, a avaliação da função microvascular através da investigação da reatividade vascular dependente ou independente de endotélio é essencial para a investigação de alterações da homeostasia e consequente fisiopatologia das doenças cardiovasculares. Segundo Cracowski e Roustit (2016), a resposta vasodilatadora dependente de endotélio da microcirculação cutânea está reduzida em pacientes com doença arterial coronariana de início precoce, em comparação com indivíduos saudáveis. Além disso, a resposta microvascular relacionada com a dilatação do músculo liso vascular também se encontra reduzida nesses pacientes, em paralelo a aumentos significativos da espessura médio-intimal das artérias carótidas (SOUZA et al., 2014).

Portanto, a detecção prévia de doença cardiovascular subclínica, através da avaliação da reatividade microcirculatória, pode representar uma oportunidade

de intervenção precoce e, em consequência, de prevenção de eventos cardiovasculares (ARCÊNCIO; ÉVORA, 2017).

Para avaliação da reatividade microcirculatória, a artéria mesentérica é frequentemente escolhida por ser uma artéria de resistência e, portanto, refletir melhor os possíveis efeitos sobre a reatividade vascular nos leitos menores. O tônus vascular de artérias de resistência é o grande responsável pela manutenção da resistência periférica na circulação e, conseqüentemente, é o principal contribuinte para o controle da pressão arterial (POHL; DE WIT; GLOE, 2000).

Em modo basal, o músculo liso vascular encontra-se parcialmente contraído e o estado contrátil das células vasculares lisas está sob a influência de mecanismos regulados pelo sistema simpático, neuro-humoral e principalmente pelo tônus miogênico. O mecanismo de compreensão do tônus vascular envolve a detecção por meio de mecanorreceptores ao estiramento da parede vascular, hiperpolarização da membrana, alterações na concentração do íon cálcio, ativação na interação actina-miosina e vasoconstrição (KAUFFENSTEIN et al., 2012).

3.4 Fármacos antitrombóticos

Nos últimos anos, os fármacos antitrombóticos podem ser classificados em três categorias principais: anticoagulantes, que impedem o sistema de coagulação e interferem na expansão da placa; agentes antiplaquetários, que diminuem a agregação plaquetária e inibem a formação de trombos; drogas fibrinolíticas, que dissolvem diretamente o trombo formado. Entre essas drogas clínicas usadas, a heparina, a varfarina e seus derivados são aplicados principalmente na inibição dos fatores de coagulação sanguínea, enquanto muitos fármacos antiagregantes plaquetários como aspirina (ASP) e clopidogrel têm sido usados para reduzir o risco de doenças cardiovasculares. Além disso, agentes fibrinolíticos, como a estreptoquinase, são envolvidos para remover e dissolver os coágulos sanguíneos formados (AFONSO et al., 2016; ANDRADE; BORGES, 2017).

No entanto, essas drogas antitrombóticas apesar de reduzirem a mortalidade ainda apresentam resistência na sua utilização, eficácia limitada em alguns pacientes e efeitos colaterais, como maior risco de sangramento e disfunções gastrointestinais. Os efeitos colaterais da ASP incluem sangramento, toxicidade gastrointestinal e trombocitopenia. O cilostazol, tem sérios efeitos

colaterais, como dor de cabeça e taquicardia e inibidores do fator Xa, como o apixabana, podem apresentar sangramento, hipersensibilidade, síncope e náusea com sua utilização. Portanto, há uma crescente necessidade de uma nova abordagem terapêutica para reduzir os efeitos adversos atuais de drogas antitrombóticas sem prejudicar sua eficácia (AFONSO et al., 2016; KOENIG-OBERHUBER; FILIPOVIC, 2016; ANDRADE; BORGES, 2017).

Assim, diante da importância das doenças cardiovasculares no cenário de saúde mundial como geradora de mortalidade e de incapacidade aos indivíduos afetados, assim como, grande destinação de gastos para a saúde pública, muito esforço tem sido focado na descoberta de novos tratamentos mais eficazes e com menos efeitos colaterais. Como alternativa, para descoberta de novos fármacos, existe a possibilidade do uso de produtos naturais como as plantas medicinais. Estas tendem a ter baixa toxicidade em mamíferos, menos efeitos ambientais e ampla aceitação pública (HELAL et. al., 2019).

3.5 Plantas medicinais e óleos essenciais

Desde os primórdios da humanidade, o homem sempre dependeu do uso das plantas, ao utilizá-las como alimento, medicamento, na construção de abrigos, no aquecimento, entre outros. Com o passar dos anos, as plantas medicinais passaram a fazer parte das técnicas de prevenção e tratamento das doenças. Por exemplo, no início do século XIX, a obtenção de morfina pura a partir do extrato de folhas de papoula (*Papaver somniferum*) amplificou significativamente as propriedades analgésicas dessa planta, conhecidas desde o Império Romano. Ao longo daquele século, muitos outros compostos puros extraídos de plantas foram obtidos, sendo utilizados até hoje, como codeína, efedrina e quinina (CUNHA et al., 2007; GIRALDI; HANAZAKI, 2010).

De acordo com a ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) (2018), as plantas medicinais são definidas como espécies vegetais cultivadas ou não, utilizadas com propósitos terapêuticos e/ou profiláticos e contribuem para a promoção da saúde humana devido às diversas atividades biológicas conferidas pelos seus metabólitos, às suas propriedades medicinais.

O uso das plantas medicinais, em sua forma *in natura*, é comum principalmente nos países em desenvolvimento, onde os benefícios de cada

planta são passados de geração em geração. Assim, grande parte de sua utilização ocorre de maneira informal, o que representa um risco à saúde, pois qualquer produto químico pode ser um agente tóxico em potencial (BAKKALI et al., 2008; ROBY et al., 2013; PEREIRA-JÚNIOR et al., 2014; DONG et al., 2015).

Como produtos do metabolismo secundário das plantas medicinais aromáticas, os óleos essenciais apresentam uma vasta utilização, sendo cada vez mais populares e atrativos do ponto de vista científico (SADEGHI et al., 2013). Espécies produtoras de óleos essenciais agregam grande valor econômico para as comunidades da região, abastecendo os mercados nacionais e internacionais de fármacos, cosméticos e perfumes (BAKKALI et al., 2008).

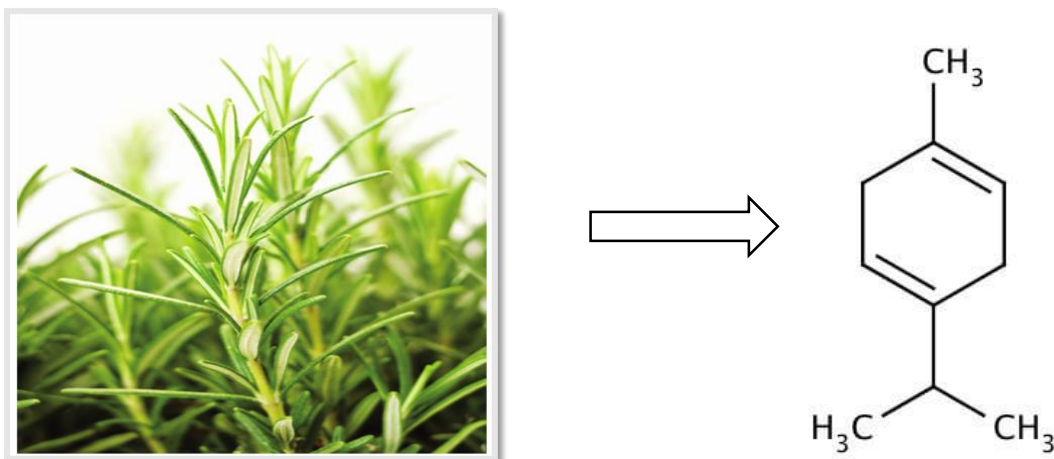
De forma geral, os óleos essenciais são constituídos majoritariamente por terpenos ou seus derivados. Os terpenos representam os constituintes voláteis dos óleos essenciais de ervas e são classificados pelo número de carbonos que eles contêm, sendo a unidade básica, com cinco carbonos, chamada isopreno. Como exemplo de terpenos constituintes de plantas medicinais e óleos essenciais estão os monoterpenos, que possuem duas unidades de isopreno. Alguns monoterpenos, como o 1-8 cineol (SEOL; KIM, 2016), carvacrol (DANTAS et al., 2015), borneol (SILVA-FILHO et al., 2012), linalol (ANJOS et al., 2013), citroneol (BASTOS et al., 2010), limoneno (TEIXEIRA, 2013) e eugenol (PEIXOTO-NEVES et al., 2014) foram avaliados cientificamente quanto às suas atividades biológicas, inclusive sua ação sobre o sistema cardiovascular. Borneol e limoneno, por exemplo, que apresentam efeito vasorrelaxante também são constituintes de uma planta conhecida popularmente como alecrim, cujo efeito antioxidante é bem utilizado pela indústria alimentícia para conservação de alimentos (SILVA-FILHO et al., 2012; ANJOS et al., 2013; NIETO et al., 2017).

3.5.1 *Rosmarinus officinalis* L. (Alecrim)

O alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.) é um arbusto aromático de pequeno porte (0,50 a 1,50 m de altura) originário da região mediterrânea da Europa, mas atualmente cultivado em quase todo o território nacional (Figura 4). Caracteriza-se pelas folhas com 1 a 4 cm de comprimento e 2 a 4 mm de largura, sésseis, coriáceas, lineares a lineares-lanceoladas, com margens recurvadas, face superior verde escura e granulosa e face inferior tomentosa, com nervura mediana

saliente, apresentando cheiro muito característico (ULBRICHT et al., 2010). A sinomínia popular encontrada na literatura para alecrim é alecrim de horta, alecrim de jardim, erva-coada, erva-de-graça, rosmarinho e rosmarino (LORENZI; MATOS, 2008).

Figura 4. *Rosmarinus officinalis* L. (Alecrim) e γ -terpineno.



Fonte: Ulbricht et al. (2010).

O alecrim tem sido usado desde a antiguidade na medicina tradicional. Entre os gregos tinha a reputação de melhorar a memória, enquanto os italianos e espanhóis o consideravam um protetor contra as forças do mal (BRENDER; GRUENWALD; JAENICKE, 1997). O alecrim é usado como estimulante digestivo, para a falta de apetite (inapetência); contra azia; em problemas respiratórios e debilidade cardíaca (cardiotônico) e como antisséptico para ferimentos. Ainda há relatos de seu uso como diurético, antiespasmódico, cicatrizante, protetor hepático, anti-tumoral, antidepressivo natural e vasodilatador (SIMÕES; SPITZER, 2003; BABAR, et al., 2015; RAFIE; SOHEILA, GRANT, 2017).

A família Lamiaceae (Labiatae), à qual pertence o alecrim é bem conhecida por seus óleos essenciais biologicamente ativos, comuns a muitos membros da família, como manjerição, lavanda, hortelã e tomilho (ULBRICHT et al., 2010).

Várias formulações de alecrim são cada vez mais exploradas pela medicina alternativa para curar ou prevenir diferentes distúrbios de saúde. As biopropriedades do alecrim o levaram a ser objeto de investigação científica, e estudos comprovaram suas atividades antioxidante, citostática, citotóxica,

antifúngica, antimutagênica, antiviral e hipolipemiante (HUSSAIN et al., 2010; CAVALCANTI; ALMEIDA; PADILHA, 2011; PESHEV et al., 2011; AMARAL et al., 2018).

Pesquisas ainda indicam o alecrim com propriedades analgésica e anti-inflamatória, principalmente em alterações de circulação sanguínea. A maioria dos seus efeitos advêm das características antioxidantes de vários dos seus constituintes, como carnosol, ácido carnósico, ácido ursólico, ácido rosmarínico e ácido cafeico (RAŠKOVIĆ et al., 2014; CATTANEO et al., 2015; SATYAL et al., 2017; VILLAREAL et al., 2017; ANDRADE et al., 2018).

O óleo essencial extraído do alecrim é constituído de uma mistura complexa de compostos oriundos do metabolismo secundário, formado por hidrocarbonetos monoterpênicos, ésteres terpênicos, linalol, verbinol, terpineol, 3-octanona e acetato de isobornila e armazenado em pequenas glândulas localizadas nas folhas. A porcentagem de seus constituintes varia consoante o método de cultivo, condições bioclimáticas e métodos de extração e armazenamento (WHO, 2009; BOIX et al., 2010; BEGUM et al., 2013) e os principais responsáveis pelo seu odor típico são o 1,8-cineol (15 - 55%), α -pineno (9 - 26%) e a cânfora (5 - 21%), também considerados os componentes majoritários. Além destes, são constituintes do óleo, o borneol (1,5 – 5,0%), cânfeno (2,5 – 12,0%), β -pineno (2,0 – 9,0%), limoneno (1,5 – 5,0%) e γ -terpineno (0,5 - 20%) (BOIX et al., 2010; STEFFENS, 2010; CLEFF et al., 2012; BEGUM et al., 2013; TADTONG et al., 2015; SPAGNOLETTI et al., 2016).

Ao óleo essencial de *Rosmarinus officinalis* L. (OERO) são atribuídas as seguintes atividades: antifúngica, anticancerígena, anti-infecciosa, antioxidante, protetora do DNA, (OZCAN; CHALCHAT, 2008; SLAMENŇOVÁ et al., 2011; TADTONG et al., 2015; JARDAK et al., 2017) anti-inflamatória, antinociceptiva e antidepressiva (HUSSAIN et al., 2010; QUINTANS-JÚNIOR et al., 2013; RAŠKOVIĆ et al., 2014; DE OLIVEIRA; CAMBORGARGO; DE OLIVEIRA, 2019).

O γ -terpineno (1-metil-4-isopropilciclohexadieno-1,4), de fórmula empírica, $C_{10}H_{16}$ e peso molecular $136,23 \text{ g.mol}^{-1}$, é um composto natural presente no OERO, com comprovada ação antioxidante, anti-inflamatória, antifúngica e antinociceptiva (REBELO et al. 2009; MARZEC et al., 2011; PASSOS et al., 2015; RAMALHO et al., 2015). Em testes de toxicidade aguda, o γ -terpineno mostrou

uma DL₅₀ em ratos de 3,65 g/kg e a DL₅₀ dérmica aguda em coelhos excedeu 5g/kg (MORENO, 1973; SIANI et al., 2004; MOYNA; PEDRUZZI; SERAFINI, 2004; SANTOS; KAISER; FERZOU, 2008; ECONOMOU et al., 2011).

Apesar das características acima citadas, o OERO apresenta restrições de utilização devido à sua natureza volátil, a fraca estabilidade e reduzida solubilidade. O surgimento de novas estratégias de encapsulamento desempenha um papel vital para a administração dessas frações pouco solúveis e instáveis, alcançando melhor eficácia terapêutica e reduzindo seus efeitos colaterais. Diante deste fato, o encapsulamento do OERO torna-se uma alternativa para ampliar a sua biodisponibilidade oral e promover o uso sustentável da espécie vegetal.

3.6 Ciclodextrinas

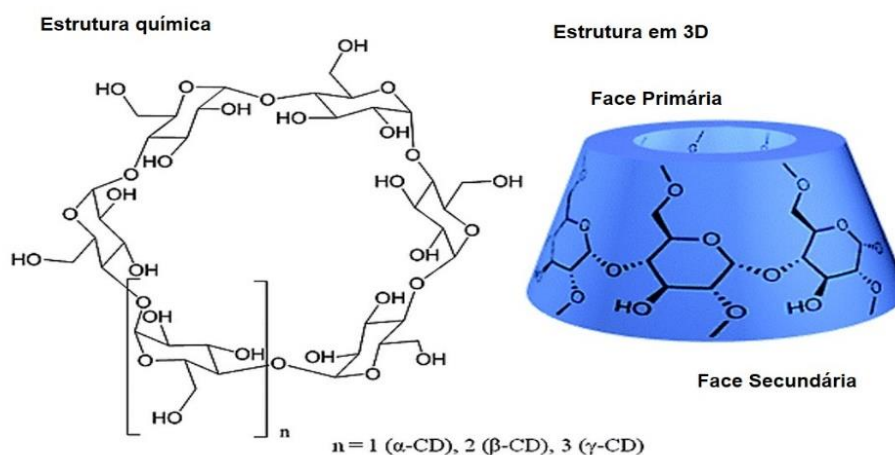
Um complexo de inclusão é formado quando uma molécula é incluída (envolvida) dentro de outra molécula ou agregação de moléculas. Os compostos de inclusão foram primeiramente observados por Villiers, em 1891, como complexações incomuns ocorrendo entre a hidroquinona e vários compostos voláteis. Ele propôs que os dois componentes estavam interagindo na ausência de ligações químicas comuns e sugeriu que uma molécula estava envolvendo a outra (MARQUES, 2010; CARNEIRO et al., 2019).

As ciclodextrinas (CDs) são oligossacarídeos cíclicos, solúveis em água, que são produzidos a partir da conversão enzimática, degradação e ciclização do amido e outros α -1,4-glucanos, por CD glicosiltransferase e em parte por α -amilases. As várias unidades de D-glicose ligadas por ligações α -D- (1 \rightarrow 4), exibem uma estrutura tridimensional, que é considerada como um cone truncado (ZHOU; RITTER, 2010).

Os grupamentos –CH ligados aos H-1, H-2 e H-4 encontram-se no exterior da molécula e as hidroxilas orientam-se para o exterior do cone, tornando a superfície externa das CDs, hidrofílica. Por sua vez, o revestimento da cavidade interna da CD é delineado por dois anéis de grupos –CH, aos quais estão ligados aos H-4 e H-5, e por pontes de éteres glicosídicos. Os pares de elétrons livres dos átomos de oxigênio envolvidos nas pontes glicosídicas estão dirigidos para o interior da cavidade, produzindo um ambiente de elevada densidade eletrônica,

que consequentemente confere à superfície interna da molécula de CD um caráter extremamente hidrofóbico (VEIGA; PECORELLI, 2006; ZHOU; RITTER, 2010; LOFTSSON; BREWSTER, 2012; CHEIRSILP; RAKMAI, 2016) (Figura 5).

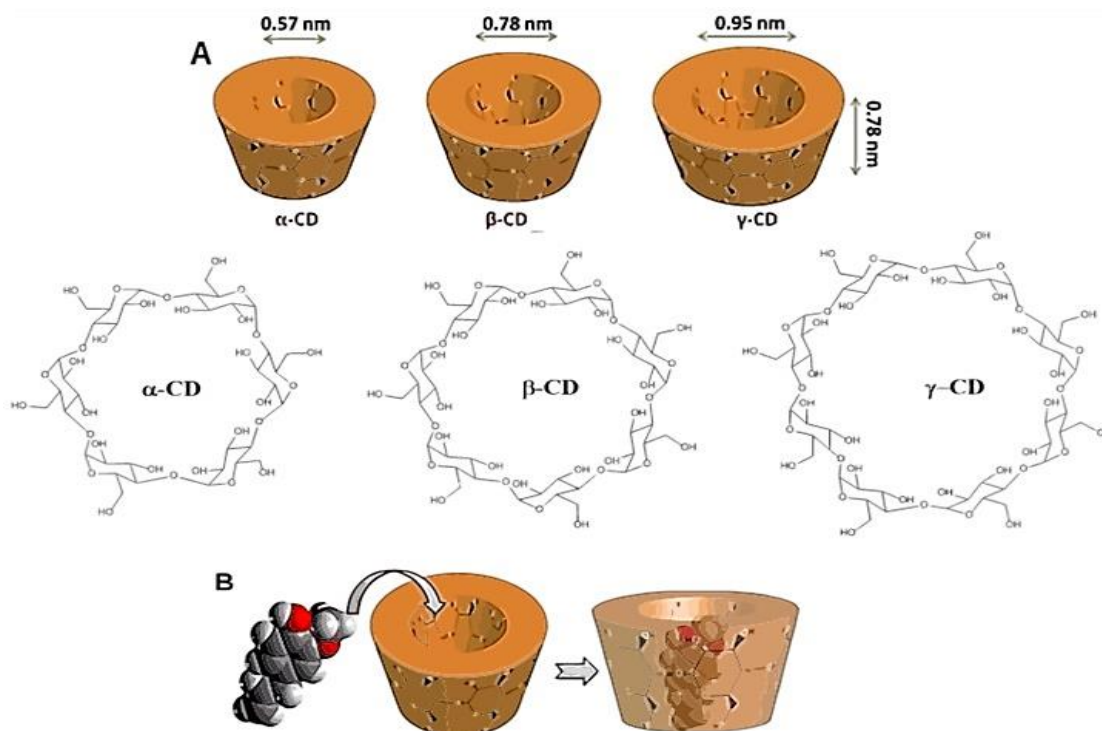
Figura 5. Estrutura tronco-cônica característica das ciclodextrinas.



Fonte: Adaptado de Zhou e Ritter (2010).

A presença da estrutura espacial cônica e a orientação dos grupos hidroxílicos para o exterior atribuem as ciclodextrinas propriedades físico-químicas únicas, sendo capazes de solubilizar-se em meio aquoso e ao mesmo tempo encapsular, no interior da sua cavidade, moléculas hidrofóbicas. Essas características conferem as CDs uma consolidação em sistemas farmacêuticos, melhorando a biodisponibilidade, estabilidade e segurança através da formação de complexos de inclusão reversíveis em água (TIWARI; TIWARI; RAI, 2010; JAMBHEKAR; BREEN, 2016). Cada CD apresenta habilidades particulares para formar complexos de inclusão com moléculas específicas. Esta formação é determinada por características das moléculas hóspedes (polaridade, tamanho e geometria) e das ciclodextrinas (tamanho da cavidade e grau de polaridade). As mais comuns dessas moléculas em forma de anel são α -CD, β -CD e γ -CD, que consistem em seis, sete e oito unidades de D-glicose, respectivamente. Sua profundidade é a mesma, independentemente do número da unidade de glicose, enquanto seu diâmetro, que é determinado pelo número de unidades de glicose, é diferente (GIDWANI; VYAS, 2015; CARNEIRO et al., 2019) (Figura 6).

Figura 6. Estrutura e propriedades de α , β e γ ciclodextrinas.



Fonte: Carneiro et al. (2019).

Vários derivados químicos das CDs como o Hidroxipropil- β -ciclodextrina (HP- β -CD), sulfobutil-éter- β -ciclodextrina (SBE- β -CD) e metil- β -CD randomizada (RM β CD) são modificados quimicamente e foram criados para ampliar as propriedades físico-químicas e a capacidade de inclusão das ciclodextrinas originais (FRANCO DE LIMA et al., 2012; CHEIRSILP; RAKMAI, 2016). Na indústria farmacêutica as ciclodextrinas são principalmente utilizadas como agentes complexantes para aumentar a solubilidade aquosa de substâncias ativas pouco solúveis em água, de modo a aumentar a sua biodisponibilidade e melhorar a estabilidade. Também podem ser usadas para reduzir ou prevenir a irritação gastrointestinal e ocular, reduzir ou eliminar cheiros ou sabores desagradáveis, prevenir interações medicamentosas ou aditivas de drogas dentro de uma formulação, ou para converter óleos e fármacos líquidos em pós microcristalinos ou amorfos. São utilizados, por exemplo, em comprimidos, soluções parenterais, sprays nasais e colírios (HANUMEGOWDA; WU; ADAMS, 2014; MALANGA et al., 2016).

Estes derivados de amido são ingredientes considerados não tóxicos sendo descritos efeitos adversos (diarréia, alargamento cecal) apenas em altas doses (> 1000 mg/kg) administradas por via oral. Além disso, α , β e γ – CDs gozam do status “geralmente reconhecidas como seguras” (GRAS – Generally Recognized as safe) pela Food and Drug Administration (FDA) para uso como aditivo em produtos alimentícios, como portadores de sabor e protetores (MARQUES, 2010; GIDWANI; VYAS, 2015).

Ainda podem ser administrados por via nasal, pulmonar (instilação traqueal), retal, ocular e parenteral. A forma parenteral, no entanto, não é comumente utilizada devido a seu comprovado poder nefrotóxico (HANUMEGOWDA; WU; ADAMS, 2014). Quando administradas por via oral, não são absorvidos no trato gastrointestinal superior, mas completamente metabolizados pela microflora do cólon (LOFTSSON; BREWSTER, 2012).

Entre as ciclodextrinas referenciadas acima, a β -ciclodextrina é a mais utilizada, pois sua cavidade apolar pode hospedar moléculas de massa molecular entre 100 e 400g.mol⁻¹ que é a faixa de massa molar da maioria das moléculas de interesse da indústria farmacêutica (SHARMA; BALDI, 2016).

3.6.1 β -Ciclodextrina

A beta-ciclodextrina (β -CD) é um polissacarídeo cíclico composto por sete unidades de glicose ligadas por ligações do tipo α - (1,4), que apresenta uma superfície externa hidrofílica e uma cavidade interna hidrofóbica. Sua fórmula empírica é C₄₂H₇₀O₃₅ e seu peso molecular, 1134, 98g.mol⁻¹ (CHEIRSILP; RAKMAI et al. 2016). É facilmente recuperada industrialmente através do processo de cristalização e é a mais economicamente viável, com um custo industrial por quilograma 20 vezes menor do que os outros tipos de ciclodextrinas (SHARMA; BALDI, 2016).

Diversos autores têm demonstrado que a β -CD forma complexos de inclusão com os óleos essenciais e seus derivados isolados, melhorando a biodisponibilidade, efeito e estabilidade (QUINTANS-JÚNIOR et al., 2013; SANTOS et al., 2015; SILVA, 2017; SIQUEIRA-LIMA et al., 2017; LIS et al., 2018). Trabalho realizado por Papajani et al. (2015) conseguiu encapsular de forma

eficaz o óleo essencial de *Rosmarinus officinalis* L. em β -ciclodextrina para avaliação de atividade antifúngica.

Deste modo, de acordo com as características acima citadas do OERO e sabendo-se que não existe relato na literatura científica sobre os possíveis efeitos deste sobre o sistema hemostático, utilizou-se a β -ciclodextrina para encapsular o OERO e verificar sua ação sobre a formação de trombos patológicos. A encapsulação em sistema de transporte como as ciclodextrinas mostra-se importante tanto pela possibilidade de aumentar a ação benéfica do OERO, como pela probabilidade de reduzir o surgimento de efeitos colaterais, fato que limita e restringe a utilização de fármacos antitrombóticos atuais e contribui para a ocorrência de eventos adversos durante o tratamento de doenças cardiovasculares.

REFERÊNCIAS

AFONSO, A. et al. A terapêutica antitrombótica: atual e em desenvolvimento. **Angiologia e Cirurgia Vascular**, v.12, n.3, p.170-79, 2016.

ALLFORD, S. L., MACHIN, S. J. Haemostasis. **Medicine**, v. 32, n. 5, p.11-4, 2004.

AMARAL, G. P. et al. Antibacterial and antioxidant effects of *Rosmarinus officinalis* L. extract and its fractions. **Journal of Traditional and Complementary Medicine**, v. 2018, p. 1-10, 2018.

ANDRADE, J. M. et al. *Rosmarinus officinalis* L.: an update review of its phytochemistry and biological activity. **Future Science AO**, v. 4, n. 4, FSO283, 2018.

ANDRADE, P. B., BORGES, L. S. R. Antiplatelet Agents in Acute Coronary Syndromes. **International Journal of Cardiovascular Sciences**, v. 30, n. 5, p. 442-51, 2017.

ANJOS, P. J. et al. Cardiovascular effects induced by linalool in normotensive and hypertensive rats. **Zeitschrift für Naturforschung C**, v. 68, n. 5-6, p. 181-90, 2013.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Primeiro Suplemento do Formulário de Fitoterápicos da Farmacopeia Brasileira, 1ª edição. 2018.

ARCÊNCIO, L., ÉVORA, P. R. B. The Lack of clinical applications would be the cause of low interest in an endothelial dysfunction classification. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 108, n. 2, p. 97-9, 2017.

BABAR, A. et al. Essential oils used in aromatherapy: A systemic review. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v.5, n. 8, p. 601-11, 2015.

BAKKALI, F. et al. A Biological effects of essential oils – A review. **Food and Chemical Toxicology**, v 46, n. 2, p. 446-75, 2008.

BASTOS, J. F. et al. Hypotensive and Vasorelaxant Effects of Citronellol, a Monoterpene Alcohol, in Rats. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, v. 106, n. 4, p. 331-7, 2010

BEGUM, A. et al. An in-depth review on the medicinal flora *Rosmarinus officinalis* (Lamiaceae). **Acta Scientiarum Polonorum Technologia Alimentaria**, v.12, n. 1, p. 61-73, 2013.

BENJAMIM, E. J. et al. Heart Disease and Stroke Statistics—2018 Update. A Report From the American Heart Association. **Circulation**, v. 137, e67–492, 2018.

BENJAMIN, E. J. et al. Heart Disease and Stroke Statistics-2019 Update: A Report From the American Heart Association. **Circulation**, v. 139, n.10, e56-e528, 2019.

BOIX, Y. F. et al. Volatile compounds from *Rosmarinus officinalis* L. and *Baccharis dracunculifolia* DC. Growing in southeast coast of Brazil. **Química Nova**, v. 33, n. 2, p. 255-57, 2010.

BONOTTO, G. M., MENDOZA-SASSI, R. A., SUSIN, L. R. O. Conhecimento dos fatores de risco modificáveis para doença cardiovascular entre mulheres e seus fatores associados: um estudo de base populacional. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 21, n. 1, p. 293-302, 2016.

BRENDER, T., GRUENWALD, J., JAENICKE, C. Herbal Remedies, Phytopharm Consulting Institute for Phytopharmaceuticals, 2nd Ed., Schaper & Brümmer GmbH & Co. Salzgitter, Berlin, Germany, CD-Rom, 1997.

BREWER, M. et al. Future approaches of nanomedicine in clinical. **Medical Clinics of North America**, v. 91, n. 5, p. 963-1016, 2007.

CAHILL, P. A., REDMOND, E. M. Vascular endothelium - Gatekeeper of vessel health. **Atherosclerosis**, v. 248, p. 97-109, 2016.

CARNEIRO, S. B. et al. Cyclodextrin Drug Inclusion Complexes: In Vivo and In Vitro Approaches. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 3, 2019.

CARVAJAL, C. El endotelio: estructura, función e disfunción endotelial. **Medicina legal de Costa Rica**, v. 34, n. 2, p. 90-100. 2017.

CATTANEO, L. et al. Anti-Proliferative Effect of *Rosmarinus officinalis* L. Extract on Human Melanoma A375 Cells. **PLoS One**, v. 15, n. 7, p.1-18, 2015.

CAVALCANTI, Y. W., ALMEIDA, L. F., PADILHA, W. W. N. Anti-adherent activity of *Rosmarinus officinalis* essential oil on *Candida albicans*: an SEM analysis. **Revista Odonto Ciência**, v. 26, n. 2, p. 139-144, 2011.

CHEIRSILP, B., RAKMAI, J. Inclusion complex formation of cyclodextrin with its guest and their applications. **Biology, Engineering and Medicine**, v. 2, n. 1, p. 1-6, 2016.

CHEN, C. et al. Natural Products for Antithrombosis. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2015, p.1-17, 2015.

CHRISTENSEN, K., MULVANY, M. J. Location of Resistance arteries. **Journal of Vascular Research**, v. 38, n. 1, p. 1-12, 2011.

CLEFF, M. B. et al. Perfil de suscetibilidade de leveduras do gênero *Candida* isoladas de animais ao óleo essencial de *Rosmarinus officinalis* L. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 14, n. 1, p. 43-9, 2012.

CRACOWSKI, J. L., ROUSTIT, M. Current methods to assess human cutaneous blood flow: an updated focus on laser-based-techniques. **Microcirculation**, v. 23, n. 5, p. 337-44, 2016.

CUNHA, P. A., RIBEIRO, J., ROQUE, O. Plantas aromáticas em Portugal: Caracterização e Utilizações. Fundação Calouste Gulbenkian. **Farmacognosia e Fitoquímica**, 2007. p. 328.

DANTAS, B. P. et al. Participation of the TRP channel in the cardiovascular effects induced by carvacrol in normotensive rat. **Vascular Pharmacology**, v. 67-69, p. 48-58, 2015.

DEEPA, B., ANURADHA, C. V. Linalool, a plant derived monoterpene alcohol, Rescues kidney from diabetes-induced Nephropathic changes *via* blood glucose Reduction. **Diabetologia Croatica**, v.40, n.4, p.121-137, 2011.

DE OLIVEIRA, J. R., CAMBORGARGO, S. E. A., DE OLIVEIRA, L. D. *Rosmarinus officinalis* L. (rosemary) as therapeutic and prophylactic agent. **Journal of Biomedical Science**, v. 26, n. 5, p. 1-22, 2019.

DONG, H. et al. Antioxidant activity and Chemical composition of essential oil and ethanol extract of *Chuanminshen violaceum*. **Industrial Crops and Products**, v. 76, p. 290-297, 2015.

ECONOMOU, G. et al. Variability in essential oil content and composition of *Origanum hirtum* L., *Origanum onites* L., *Coridothymus capitatus* (L.) and *Satureja thymbra* L., populations from the Greek island Ikaria. **Industrial Crops and Products**, v. 33, p. 236-41, 2011.

FAVERO, G. et al. Endothelium and its alterations in cardiovascular diseases: life style intervention. **BioMed Research International**, v. 2014, 2014.

FERNANDES, R. V. D. B. et al. Effect of solids content and oil load on the microencapsulation process of rosemary essential oil. **Industrial Crops and Products**, v. 58, p. 173–81, 2014.

FOGELSON, A. L., HUSSAIN, Y. H., LEIDERMAN, K. Blood clot formation under flow: the importance of factor XI depends strongly on platelet count. **Biophysical Journal**, v.102, n. 1, p. 10-8, 2012.

FRANCO DE LIMA, R. A. et al. Improvement of tetracaine antinociceptive effect by inclusion in cyclodextrins. **Journal of Drug Targeting**, v. 20, n. 1, p. 85-96, 2012.

GALVEZ, K., CORTES, C. Tromboelastografía: nuevos conceptos en la fisiología de la hemostasia y su correlación con la coagulopatía asociada al trauma. **Revista Colombiana de Anestesiología**, v. 40, n. 3, p. 224–30, 2012.

GBD 2017 Disease and Injury Incidence and Prevalence Collaborators. “Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 354 diseases and injuries for 195 countries and territories, 1990-2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017.” **Lancet (London, England)**, v. 392, n.10159, p.1789-1858, 2018.

GIDWANI, B., VYAS, A. A Comprehensive Review on Cyclodextrin-Based Carriers for Delivery of Chemotherapeutic Cytotoxic Anticancer Drugs. **Biomed Research International**, v. 2015, 2015.

GILES, G. E. et al. Differential cognitive effects of energy drink ingredients: Caffeine, taurine, and glucose. **Pharmacology Biochemistry & Behavior**, v. 102, n. 4, p. 569-77, 2012.

GIRALDI, M., HANAZAKI, N. Uso e conhecimento tradicional de plantas medicinais no Sertão do Ribeirão, Florianópolis, SC, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, v. 24, n. 2, p. 395-406, 2010.

GUREWICH, V. Therapeutic Fibrinolysis. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 68, n. 19, p. 2099-106, 2016.

GURBEL, P. A. et al. Platelet activation in myocardial ischemic syndromes. **Expert Review of Cardiovascular Therapy**, v. 2, n. 4, p. 535-45, 2004.

GUTTERMAN, D. D. et al. The human microcirculation: regulation of flow and beyond. **Circulation Research**, v. 118, n. 1, p.157-72, 2016.

HANUMEGOWDA, U. M., WU, Y., ADAMS, S. P. Potential Impact of Cyclodextrin-Containing Formulations in Toxicity Evaluation of Novel Compounds in Early Drug Discovery. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 2, n. 1, p. 1-5, 2014.

HELAL, I. M. et al. Antimicrobial Efficiency of Essential Oils from Traditional Medicinal Plants of Asir Region, Saudi Arabia, over Drug Resistant Isolates. **BioMed Research International**, v. 2019, 2019.

HERNÁNDEZ-SÁNCHEZ, P. et al. Optimization of a method for preparing solid complexes of essential clove oil with β -cyclodextrins. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 97, p. 420–26, 2017.

HIEN, T. T. et al. Potent vasodilation effect of amurensin G is mediated through the phosphorylation of endothelial nitric oxide synthase. **Biochemical Pharmacology**, v. 84, n. 11, p. 1437-50, 2012.

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

HOFFMAN, M., MONROE, D. M. Coagulation 2006: A Modern View of Hemostasis. **Hematology/Oncology Clinics of North America**, v. 21, n. 1, p. 1-11, 2007.

HOFFMAN, M. Remodeling the blood coagulation cascade. **Journal of Thrombosis and Thrombolysis**, v. 16, p.17-20, 2003.

HSIEH, H. J. et al. Shear-induced endothelial mechanotransduction: the interplay between reactive oxygen species (ROS) and nitric oxide (NO) and the pathophysiological implications. **Journal of Biomedical Science**, v. 21, n. 1, 2014.

HUSSAIN, A. I. et al. *Rosmarinus officinalis* essential oil: antiproliferative, antioxidant and antibacterial activities. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 41, n. 4, p.1070-8, 2010.

JAAFARI, A. et al. I. Chemical composition and antitumor activity of different wild varieties of *Moroccan thyme*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, n. 4, p. 477-491, 2007.

JAMBHEKAR, S. S., BREEN, P. Cyclodextrins in pharmaceutical formulations I: structure and physicochemical properties, formation of complexes, and types of complex. **Drug Discovery Today**, v. 21, n. 2, p. 356-62, 2016.

JARDAK, M. et al. Chemical composition, anti-biofilm activity and potential cytotoxic effect on cancer cells of *Rosmarinus officinalis* L. essential oil from Tunisia. **Lipids in Health and Disease**, v.16, n. 1, p.190, 2017.

KATRANCHA, E. D., GONZALEZ, L. S. I. I. I, PHARMD, B. C. P. S. Trauma-Induced Coagulopathy. **Critical Care Nurse**, v. 34, n. 4, p. 54-63, 2014.

KAUFFENSTEIN, G. et al. Emerging role of G protein-coupled receptors in microvascular myogenic tone. **Cardiovascular Research**, v. 95, n. 2, p. 223-32, 2012.

KOENIG-OBERHUBER, V., FILIPOVIC, M. New antiplatelet drugs and new oral anticoagulants. **British Journal of Anaesthesia**, v.117, n.2, p. ii74 - ii84, 2016.

LIMA, A. A. N. et al. Alternative technologies to improve solubility of poorly water soluble drugs. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 27, n. 5, p. 789-97, 2008.

LIS, M. J. et al. Inclusion Complexes of Citronella Oil with β -Cyclodextrin for Controlled Release in Biofunctional Textiles. **Polymers**, v. 10, n. 12, p.1324, 2018.

LOFTSSON, T., BREWSTER, M. E. Cyclodextrins as Functional Excipients: Methods to Enhance Complexation Efficiency. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 101, n. 9, p. 3019-32, 2012.

LORENZI, H., MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas**. 2. ed. Nova Odessa, São Paulo: Instituto Platarum, 2008.

LORGA FILHO, A. M. et al. Diretrizes brasileiras de antiagregantes plaquetários e anticoagulantes em cardiologia. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 101, n. 3, p. 01-95, 2013.

MACHADO, D. G. et al. Antidepressant-like effects of fractions, essential oil, carnosol and betulinic acid isolated from *Rosmarinus officinalis* L. **Food Chemistry**, v. 136, n. 2, p. 999-1005, 2013.

MALANGA, M. et al. "Back to the Future": A New Look at Hydroxypropyl Beta-Cyclodextrins. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 105, n. 9, p. 2921-2931, 2016.

MARQUES, H. M. C. A review on cyclodextrin encapsulation of essential oils and volatiles. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 25, n. 5, p. 313-26, 2010.

MARZEC, K. M. et al. Comparative matrix isolation infrared spectroscopy study of 1,3- and 1,4-diene monoterpenes (α -phellandrene and γ -terpinene). **The Journal of Physical Chemistry A**. v. 115, n. 17, p. 4342-53, 2011

MORENO, O. M. Report to Research Institute for Fragrance Materials, 1973.

MOYNA, P., PEDRUZZI, L., SERAFINI, L. A. Influence of Rootstock on essential oil composition of Mandarins. **Acta Farmacéutica Bonaerense**, v. 23, p. 498-502, 2004.

NIETO, G. Biological Activities of Three Essential Oils of the Lamiaceae Family. **Medicines (Basel, Switzerland)**, v. 4,3 63. 23, 2017.

OZCAN, M. M, CHALCHAT, J. C. Chemical composition and antifungal activity of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) oil from Turkey. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, v. 59, n. 7-8, p. 691-8, 2008.

PAIVA, T. B., FARIAS, N. C. Mecanismos de contração do músculo liso vascular. **Revista Brasileira de Hipertensão**, v. 12, n. 2, p. 89-92, 2005.

PALOMO, I. F. et al. Antiagregantes plaquetarios: mecanismos de acción y riesgos asociados al uso. **Vitae**, v. 16, n. 1, p. 233-43, 2009.

PAPAJANI, V. et al. Evaluation of antifungal activity of origanum vulgare and *Rosmarinus officinalis* essential oil before and after inclusion in β -cyclodextrine. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 7, n. 5, p. 270-273, 2015.

PASSOS, F. F. et al. Involvement of Cholinergic and Opioid System in γ -Terpinene-Mediated Antinociception. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2015, 2015.

PEIXOTO-NEVES, D., LEAL-CARDOSO J. H., JAGGAR J. H. Eugenol dilates rat cerebral arteries by inhibiting smooth muscle cell voltage-dependent calcium channels. **Journal of Cardiovascular Pharmacology**, v. 64, n. 5, p. 401-6, 2014.

PEREIRA, C., BARROS, L., FERREIRA., I. C. F. R. Plantas aromáticas usadas como condimentos: prevalência de ácidos gordos polinsaturados. **Revista de Ciências Agrárias**, v. 40, p. 201-10, 2017.

PEREIRA-JÚNIOR, L. R. et al. Espécies da caatinga como alternativa para o desenvolvimento de novos fitofármacos. **Floresta e Ambiente**, v. 21, p. 509-20, 2014.

PESHEV, D. et al. Application of organic solvent nanofiltration for concentration of antioxidante extracts of Rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.). **Chemical Engineering Research and Design**, v. 89, p. 318-27, 2011.

POHL, U., DE WIT, C., GLOE, T. Large arterioles in the control of blood flow: role of endothelium-dependent dilation. **Acta Physiologica Scandinavica**, v.168, n. 4, p. 505-10, 2000.

QUINTANS-JÚNIOR, L. J. et al. β -Cyclodextrin-complexed (-)-linalool produces antinociceptive effect superior to that of (-)-linalool in experimental pain protocols. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, v. 113, p.167–72, 2013.

RAFIE, H., SOHEILA, H., GRANT, E. *Rosmarinus officinalis* (Rosemary): A Novel Therapeutic Agent for Antioxidant, Antimicrobial, Anticancer, Antidiabetic, Antidepressant, Neuroprotective, Anti-Inflammatory and Anti-Obesity Treatment. **Herbal Medicine**, v.3, n. 2, p.1-5, 2017.

RAJENDRAN, P. et al. The vascular endothelium and human diseases. **International Journal of Biological Sciences**, v. 9, n. 10, p. 1057- 69, 2013.

RAMALHO, T. R. et al. Gamma-Terpinene Modulates Acute Inflammatory Response in Mice. **Planta Medica**, v. 81, n. 14, p. 1248-54, 2015.

RAMOS, E. T. A., BORGES, K. C. A. S., TEBALDI, V. M. R. Atividade bactericida dos extratos hidroalcoólicos de hera-roxa e capim-limão e dos óleos essenciais de orégano, tomilho e melaleuca sobre *Xanthomonas albilineans*. **Cadernos Unifoa**, v. 19, p. 65-71, 2012.

RAŠKOVIĆ, A. et al. Antioxidant Activity of Rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) Essential Oil and its Hepatoprotective Potential. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 14, n. 225, 2014.

REBELO, M. M. et al. Antioxidant capacity and biological activity of essential oil and methanol extract of *Hyptis crenata* Pohl ex Benth. **Revista Brasileira Farmacognosia**, v. 19, n. 1b, p. 230-235, 2009.

ROBY, M. H. H. et al. Antioxidant and antimicrobial activities of essential oil and extracts of fennel (*Foeniculum vulgare* L.) and chamomile (*Matricaria chamomilla* L.). **Industrial Crops and Products**, v. 44, p. 437-45, 2013.

RODRIGUES, B. et al. Exercise training on cardiovascular diseases: Role of animal models in the elucidation of the mechanisms. **Motriz: Revista de Educação Física**, v. 23, 2017.

RODRIGUES, E. S. et al. Novos conceitos sobre a fisiologia da hemostasia. **Revista da Universidade Vale do Rio Verde, Três Corações**, v. 10, n. 1, p. 218-233, 2012.

SÁ, R. C. S. et al. Analgesic-Like Activity of Essential Oil Constituents: An Update. **International Journal of Molecular Sciences**, v.18, n. 12, 2017.

SADEGHI, I. et al. *In vitro* Cytotoxic and Antimicrobial Activity of Essential Oil From *Satureja intermedia*. **Iranian Red Crescent Medical Journal**, v. 15, n. 1, p. 70-4, 2013.

SANTOS, A. R., KAISER, C. R. FERZOU, J. P. Ring-closing olefin metathesis: A powerful tool for the synthesis of natural macrocycles. **Química Nova**, v. 31, p. 655-68, 2008.

SANTOS, P. L. et al. Preparation, Characterization, and Pharmacological Activity of *Cymbopogon winterianus* Jowitt ex Bor (Poaceae) Leaf Essential Oil of β -Cyclodextrin Inclusion Complexes. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2115, p. 1-15, 2015.

SATYAL, P. et al. Chemotypic Characterization and Biological Activity of *Rosmarinus officinalis*. **Foods**, v. 6, n. 3, p. 20, 2017.

SAYORWAN, W. et al. Effects of inhaled rosemary oil on subjective feelings and activities of the nervous system. **Scientia Pharmaceutica**, v. 81, n. 2, p. 531-42, 2013.

SEGADE, M. et al. Involvement of endothelium in the vasorelaxant effects of 3, 4- DHPEA-EA and 3, 4-DHPEA-EDA, two major functional bioactives in olive oil. **Journal of Functional Foods**, v. 23, p. 637-646, 2016.

SELMİ, S. et al. Rosemary (*Rosmarinus officinalis*) essential oil components exhibit anti-hyperglycemic, anti-hyperlipidemic and antioxidant effects in experimental diabetes. **Pathophysiology**, v. 24, n. 4, p. 297-303, 2017.

SEOL, G. H., KIM, K. Y. Eucalyptol and Its Role in Chronic Diseases. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 929, p. 389-398, 2016.

SHARMA, N., BALDI, A. Exploring versatile applications of cyclodextrins: an overview. **Drug Delivery**, v. 23, n. 3, p. 729-47, 2016.

SHUAIB, A., ROHIT, A., PIYUSH, M. A review article on essential oils **Journal of Medicinal Plants Studies**, v.4, n.3, p.237-240, 2016.

SI, L. Y-N. et al. Roselle supplementation prevents nicotine-induced vascular endothelial dysfunction and remodelling in rats. **Applied Physiology Nutrition and metabolism**, v. 42, p. 765-72, 2017.

SIANI, A. C. et al. *Protium icicariba* as a source of volatile essences. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 32, p. 477-489, 2004.

SIENKIEWICZ, M. et al. The potential of use basil and rosemary essential oils as effective antibacterial agents. **Molecules**, v.18, n. 8, p. 9334-51, 2013.

SILVA-FILHO, J. C. et al. Investigation of mechanisms involved in (-)-borneol-induced vasorelaxant response on rat thoracic aorta. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, v. 110, n. 2, p. 171-7, 2012.

SILVA, J. P. L. et al. Óleo essencial de orégano: interferência da composição química na atividade frente a *Salmonella* Enteritidis. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 30, n. 1, p.136-41, 2010.

SILVA, F. V. Investigação do potencial farmacológico dos monoterpenos carvacrol e (-)-linalol livres ou complexados e o desenvolvimento de formulação tópica para aplicações farmacêuticas. 2017. Tese (doutorado em Biotecnologia). Universidade Federal do Piauí, Rede Nordeste de Biotecnologia – RENORBIO, Teresina, 2017.

SIMMONS, J. W., POWELL, M. F. Acute traumatic coagulopathy: pathophysiology and resuscitation. **British Journal of Anaesthesia**, v. 117, n. 3, p. iii31-iii43, 2016.

SIMÕES, C. M. O., SPITZER, V. Óleos voláteis. In: SIMÕES, C.M.O. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRGS/Editora da UFSC, p.468-95, 2003.

SIQUEIRA, A. E. S., SIQUEIRA-FILHO, A. G., GERARDIN, M. Impacto econômico das doenças cardiovasculares. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 109, n. 1, p. 39-46, 2017.

SIQUEIRA-LIMA, P. S. et al. Natural products assessed in animal models for orofacial pain – a systematic review. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 27, n. 1, p.124-134, 2017.

SLAMEŇOVÁ, D. et al. Essential rosemary oil protects testicular cells against DNA-damaging effects of H₂O₂ and DMNQ. **Food Chemistry**, v. 129, p. 64–70, 2011.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA. Cardiômetro: mortes por doenças cardiovasculares no Brasil [Internet]. 2018. Disponível em: <http://www.cardiometro.com.br/anteriores.asp>

SOUZA, E. G. et al. Impairment of systemic microvascular endothelial and smooth muscle function in individuals with early-onset coronary artery disease: studies with laser speckle contrast imaging. **Coronary Artery Disease**, v. 25, n. 1, p. 23-8, 2014.

SPAGNOLETTI, A. et al. Chemical Composition and Bio-efficacy of Essential Oils from Italian Aromatic Plants: *Mentha suaveolens*, *Coridothymus capitatus*, *Origanum hirtum* and *Rosmarinus officinalis*. **Natural Product Communications**, v. 11, n.10, p.1517 – 1520, 2016.

STEFFENS, A. H. **Estudo da composição química dos Óleos Essenciais obtidos por destilação arraste a vapor em escala laboratorial e industrial**. 2010. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Tecnologia de Materiais) - Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2010.

STORCH, A. S. et al. Methods of Endothelial Function Assessment: Description and Applications. **International Journal of Cardiovascular Sciences**, v. 30, n. 3, p. 262-273, 2017.

TADTONG, S. et al. Chemical componentes of four essential oils in aromatheray recipe. **Natural Product Communications**, v. 10, n. 6, p.1091-2, 2015.

TAFNER, P. F. D. A. et al. Recent advances in bedside microcirculation assesment in critically ill patients. Recentes avanços na avaliação da microcirculação à beira do leito em pacientes graves. **Revista Brasileira de Terapia Intensiva**, v. 29, n. 2, p. 238–47, 2017.

TAKAHASHI, A. I., FERRAZ, H. G., VEIGA, F. J. B. A literature review of cyclodextrins inclusion complexes characterization–part II: X-Ray diffraction, infrared spectroscopy and nuclear magnetic resonance. **International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research**, v. 2, n. 1, p. 8-15, 2012.

TEIXEIRA, A. C. C. **Efeitos dos monoterpenoides limoneno, carveol e álcool perílico no músculo liso vascular**. 2013. Dissertação (mestrado Acadêmico em Ciências Fisiológicas) – Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, 2013.

TIWARI, G., TIWARI, R., RAI, A. K. Cyclodextrins in delivery systems: Applications. **Journal of Pharmacy Bioallied Sciences**, v. 2, n. 2, p. 72–9, 2010.

TOMAIUOLO, M., BRASS, L. F., STALKER, T. J. Regulation of Platelet Activation and Coagulation and Its Role in Vascular Injury and Arterial Thrombosis. **Interventional Cardiology Clinics**, v. 6, n. 1, p. 1-12, 2017.

TSUI, F. et al. Spices and Atherosclerosis. **Nutrients**, v. 10, n. 11, p. 1724, 2018.

ULBRICHT, C. et al. An evidence-based systematic review of rosemary (*Rosmarinus officinalis*) by the Natural Standard Research Collaboration. **Journal of Dietary Supplements**, v. 7, n. 4, p. 351-413, 2010.

VEIGA, F., PECORELLI, C. **As ciclodextrinas em tecnologia farmacêutica**. Minerva Coimbra: Coimbra, 2006.

VILLAREAL, M. O. et al. Anti-stress and neuronal cell differentiation induction effects of *Rosmarinus officinalis* L. essential oil. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 17, n. 1, p. 549, 2017.

WHO. World Health Organization. Monographs on selected medicinal plants. World Health Organization, Genebra. 2009.

WHO - World Health Organization. Hearts: technical package for cardiovascular disease management in primary health care. WHO Library Cataloguing. 2016.

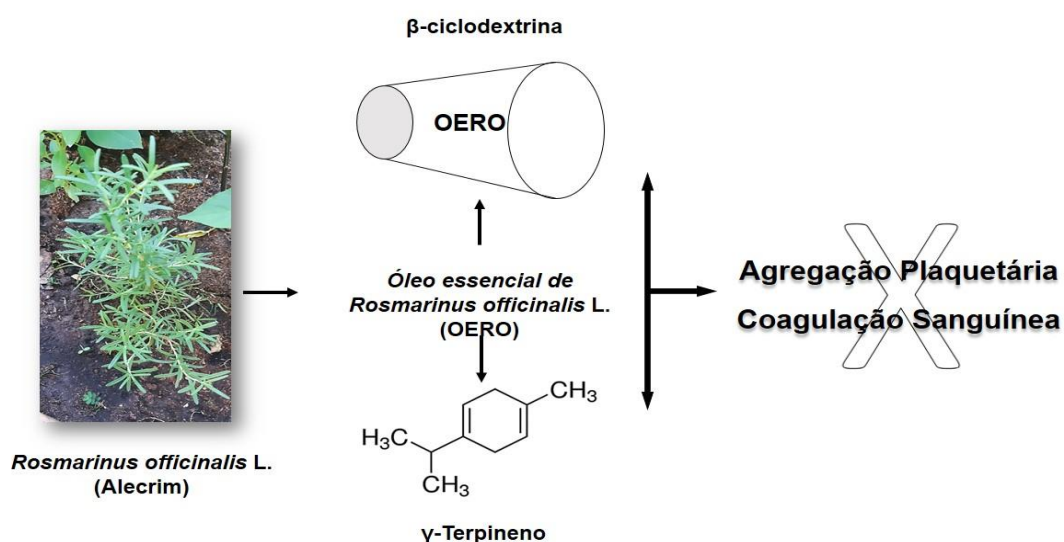
WHO - World Health Organization. World Health Statistics 2018: Monitoring health for the SDGs. 2018.

ZHOU, J., RITTER, H. Cyclodextrin functionalized polymers as drug delivery systems. **Polymer Chemistry**, v. 1, p.1552-59, 2010.

CAPÍTULO 1

ATIVIDADE ANTICOAGULANTE E ANTIAGREGANTE DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Rosmarinus officinalis* L. LIVRE E COMPLEXADO EM β -CICLODEXTRINA E DO SEU CONSTITUINTE γ -TERPINENO

RESUMO GRÁFICO



RESUMO

A ocorrência de doenças cardiovasculares está diretamente relacionada ao surgimento de trombos no coração, cérebro e membros inferiores. Tratamentos existentes, apesar de eficazes, apresentam graves efeitos colaterais, evidenciando a necessidade da pesquisa de novos fármacos antitrombóticos. Alternativa pode ser encontrada na utilização de plantas medicinais, como a *Rosmarinus officinalis* L. (alecrim) e seu óleo essencial, que exibem poder anti-inflamatório e antioxidante. O objetivo deste trabalho foi avaliar a ação antitrombótica do óleo essencial de *Rosmarinus officinalis* L. (Alecrim) (OERO) e de seu constituinte γ -terpineno. Para isso, OERO livre e complexado em β -ciclodextrina (OERO+ β CD), assim como, um de seus constituintes, o γ -terpineno

(100 mg/kg), foram utilizados para tratamento oral de ratos fêmeas, seguido da avaliação da atividade anticoagulante, pela realização de testes coagulométricos, e avaliação do efeito antiagregante, realizada pelo método de agregação plaquetária por turbidimetria. Tratamento por via oral com OERO, OERO+ β CD e γ -terpineno, apresentou efeito anticoagulante quando comparado ao grupo controle. Não houve alteração da agregação plaquetária *in vitro* induzida por ADP após tratamento por via oral com OERO, OERO+ β CD e γ -terpineno (100 mg/kg) em ratos fêmeas. No entanto, houve uma redução significativa da agregação plaquetária após adição de OERO na concentração de 100 μ M diretamente à cubeta do agregômetro. Assim, estes resultados sugerem que o OERO, OERO+ β CD e γ -terpineno apresentam efeito anticoagulante e que o OERO apresenta também efeito antiagregante, oferecendo evidências para uma potencial nova terapia antitrombótica.

Palavras-chave: anticoagulante, antiagregante, *Rosmarinus officinalis* L., β -ciclodextrina, γ -terpineno.

1. INTRODUÇÃO

É essencial à vida humana, a manutenção do fluxo sanguíneo, de forma que, após uma lesão vascular não haja perda excessiva de sangue. Para isso, o próprio sangue fornece substâncias que participam de um complexo mecanismo fisiológico, denominado hemostasia, que interrompe o sangramento no local da lesão, através da formação de um tampão e mantém o fluxo sanguíneo normal em outras partes da circulação (REHMAN et al., 2017). Uma eficaz hemostasia ocorre pela ação coordenada e simultânea das etapas de agregação plaquetária, coagulação sanguínea e fibrinólise (JIN et al., 2013; SON et al., 2017).

As plaquetas são pequenos fragmentos de células anucleares que se originam do citoplasma dos megacariócitos da medula óssea e circulam dentro do sistema vascular sem interação significativa com a parede do vaso. Após lesão vascular, elas acionam o sistema hemostático através dos processos de adesão, ativação e agregação plaquetária. O agregado de plaquetas formado no local da lesão é, então, estabilizado pela fibrina, um polímero insolúvel formado através de

reações de proteases plasmáticas inativas durante a cascata de coagulação (FERNANDES et al., 2016; CIMMINO; FISCHETTI; GOLINO, 2017).

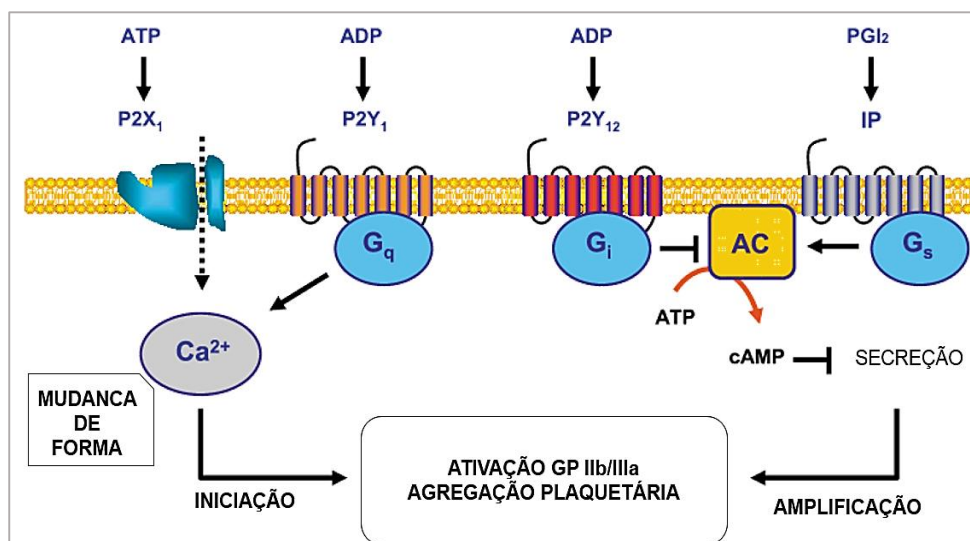
Considera-se que a coagulação sanguínea é disparada pela via do fator tecidual (FT), uma lipoproteína presente na superfície de células que não estão diretamente em contato com o sangue, como fibroblastos e macrófagos. Assim, logo em seguida à lesão e exposição do sangue às células produtoras de FT, inicia-se o processo de coagulação (TOMAIUOLO; BRASS; STALKER, 2017). Após a restauração da parede do vaso pela formação de tecido novo, o trombo formado é, então, dissolvido gradualmente pelo sistema fibrinolítico, normalizando a passagem de sangue para áreas distais à lesão (FERREIRA et al., 2010).

A formação do trombo fisiológico é rigidamente regulada, de tal forma, que é iniciada dentro de segundos após a lesão, mas deve ser temporária e situada no local lesionado. Falhas no controle desse processo estão diretamente relacionadas à ocorrência de doenças cardiovasculares (DCVs) (IRFAN, et al., 2018). Estas são a principal causa de morte no Brasil e no mundo, gerando gastos de aproximadamente 329,7 bilhões de dólares, incluindo despesas com tratamento e perda de produtividade (BENJAMIN et al., 2018).

Para a prevenção e/ou tratamento da trombose, os fármacos utilizados são divididos em três categorias: antiplaquetários, anticoagulantes e fibrinolíticos. Entre os antiplaquetários estão a aspirina e o clopidogrel. Como anticoagulantes, encontram-se a heparina e o warfarin. E como fibrinolítico, pode ser citado a estreptoquinase. No entanto, esses fármacos apresentam diversos efeitos colaterais, como ocorrência de hemorragias e elevação dos níveis de lipoproteínas plasmáticas, além de resistência à sua atuação, em alguns indivíduos (CIMMINO; FISCHETTI; GOLINO, 2017).

O clopidrogrel é um fármaco antiagregante já utilizado no mercado que tem como alvo os receptores de ADP. Este agonista atua através de receptores purinérgicos P2Y, acoplados a proteína G (IMAM et al., 2019). O receptor P2Y₁, quando ativado, promove a ativação da proteína fosfolipase C, com consequente mudança na forma da plaqueta e mobilização de cálcio. Adicionalmente, a ativação do receptor P2Y₁₂ atua estabilizando agregados plaquetários por inibição da adenilil ciclase (Figura 1) (LOPEZ FARRE; MACAYA, 2013).

Figura 01. Receptores P2 plaquetários e seu sinal de transdução



Fonte: Siller-Matula et al. (2007).

Diante da importância das doenças cardiovasculares no cenário de saúde mundial como geradora de mortalidade e incapacidade aos indivíduos afetados, muito esforço tem sido focado na descoberta de produtos naturais utilizados como medicamentos, que provoquem menos efeitos colaterais e apresentem maior eficácia.

Dentre os produtos naturais, promissores para a indústria farmacêutica derivados de plantas medicinais, estão os óleos essenciais utilizados na medicina popular. Seu papel físico é proteger as plantas contra bactérias, fungos, vírus, insetos e alguns herbívoros. Estes óleos são líquidos aromáticos obtidos de material vegetal (flor, sementes, folhas, casca, frutas e/ou raízes) que apresentam diversas propriedades biológicas, incluindo, atividades antioxidante, anti-inflamatória e antibacteriana (FITSIOU et al., 2016; SHUAIB; ROHIT; PIYUSH, 2016; DE CÁSSIA et al., 2017; ANDRADE et al., 2018).

O óleo essencial de *Rosmarinus officinalis* L. (Alecrim) é um líquido incolor ou amarelo pálido, extraído das folhas do alecrim, com odor característico da planta, constituído principalmente por 1,8-cineol, α -pineno, cânfora, canfeno, limoneno, borneol, mirceno, cimeno e γ -terpineno (JARDAK et al., 2017; ANDRADE et al., 2018). Este último é um monoterpeno, presente no OERO, em variadas concentrações e que exibe poder antioxidante, anti-inflamatório e

antibacteriano (RAMALHO et al., 2015; TADTONG et al., 2015; JARDAK et al., 2017).

A utilização do óleo essencial de *Rosmarinus officinalis* L. (OERO) vem despertando grande interesse clínico por apresentar importante atividade antioxidante, antibacteriana, antitumoral, anti-inflamatória, antiproliferativa e antinociceptiva. No entanto, apesar desses efeitos benéficos, o OERO exibe fraca solubilidade em água, alta volatilidade, sensibilidade a luz e meia-vida curta (HUSSAIN et al., 2010; SIENKIEWICZ et al., 2013; RAŠKOVIĆ et al., 2014; VILLAREAL et al., 2017; DE OLIVEIRA; CAMARGO; DE OLIVEIRA, 2019). Como forma de contornar essas características, sistemas de transporte de fármacos, como as ciclodextrinas (CDs), podem ser utilizados como técnica para proteger o OERO contra oxidação, degradação por calor e luz, evaporação e umidade, além de aumentar o tempo de ação, e reduzir possível toxicidade celular (HERNÁNDEZ-SÁNCHEZ et al., 2017).

Com base nos fatos citados, o objetivo do presente estudo foi avaliar a ação anticoagulante e antiagregante plaquetária do óleo essencial de *Rosmarinus officinalis* L. (OERO) livre e complexado em β -ciclodextrina (OERO+ β CD) e de seu constituinte, γ -terpineno e assim contribuir para a descoberta de novas terapias inibidoras dos eventos trombóticos que estão intimamente relacionados com a ocorrência de doenças cardiovasculares.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Substâncias e reagentes

β -ciclodextrina ($\geq 97\%$ de pureza), Tween 80, óleo essencial de *Rosmarinus officinalis* L. (OERO), γ -terpineno, adenosina difosfato (ADP) e calmidazolium (CMZ) foram comprados da empresa Sigma-Aldrich (EUA). Cetamina e Xilazina foram comprados de Cristália (Itabira-SP, Brasil).

Na preparação das soluções de tratamento, OERO, OERO+ β CD e γ -terpineno foram solubilizados em 0,1 μ L de monolato de polioxietileno-sorbitano (Tween 80) (0,5% v/v) e dissolvido em água destilada, no volume total de 1mL. Soluções de OERO, OERO+ β CD e γ -terpineno foram armazenados em recipiente de vidro selados, cobertos com folha de alumínio e mantidos sob refri

geração a -10° até serem utilizados. Calmidazolium foi dissolvido em dimetilsulfóxido (DMSO) (1% v/v) e mantido sob refrigeração a -10° até ser utilizado.

2.2 Complexo de inclusão de β -Ciclodextrina com o óleo essencial de *Rosmarinus officinalis* L.

O complexo de inclusão foi preparado no Departamento de Fisiologia da Universidade Federal de Sergipe utilizando a técnica descrita por SIQUEIRA-LIMA et.al. (2014).

2.3 Animais e protocolo experimental

Foram utilizados *Rattus norvegicus*, linhagem Wistar, fêmeas, pesando entre 200-250 g, obtidos no biotério setorial da Universidade Federal do Piauí. Os animais foram mantidos em condições controladas de temperatura ($22 \pm 2^{\circ}\text{C}$), com ciclo claro/escuro de 12 horas e livre acesso à água filtrada e ração padrão.

O uso dos animais seguiu os princípios e normas para utilização de animais em projetos de pesquisa e todos os procedimentos experimentais do projeto foram submetidos ao Comitê de Ética em Experimentação Animal da UFPI (CEUA/UFPI) e aprovados sob o número 275/16. Os procedimentos referentes à eutanásia dos animais foram realizados em consonância com a Lei nº 11.794 de 8 de outubro de 2008 do Decreto nº 6.899 de julho de 2009, regulamentada pela Resolução normativa vigente nº 37 de 15 de fevereiro de 2018.

2.4 Avaliação da atividade anticoagulante

Para o estudo do efeito anticoagulante do OERO, na forma livre e complexado com β -ciclodextrina, e de seu constituinte γ -terpineno, os animais foram distribuídos aleatoriamente em quatro grupos constituídos por 5-9 animais e divididos pelo tratamento recebido em: (CONTROLE) - tratado com o veículo empregado na dissolução do OERO (Tween 80 – 1 μL) + água destilada; (OERO): tratado com Tween 80 + água destilada + OERO (100 mg/kg); (OERO+ β CD): tratado com Tween 80 + água destilada + OERO+ β CD (100 mg/kg); (γ -TERPINENO): tratado com Tween 80 + água destilada + γ -terpineno (100 mg/kg).

O tratamento ocorreu por via oral (gavagem) (volume total de 1 mL), uma vez ao dia, por 7 dias. No oitavo dia, os animais foram anestesiados com cloridrato de cetamina (90 mg/kg) associado a cloridrato de xilazina (10 mg/kg) via intraperitoneal (i.p.). O sangue foi coletado da veia cava inferior e acondicionado em tubos de coleta à vácuo, marca Becton Dickinson®, contendo citrato de sódio 3,2% como anticoagulante, para dosagem de Tempo de Protrombina (TAP) e Tempo de Tromboplastina Parcial Ativada (TTPA).

2.4.1 Tempo de Protrombina (TAP)

O teste consiste na medida do tempo de coagulação do plasma após a adição de uma fonte de fator tissular (tromboplastina) e cálcio. Este processo ativa o fator X, resultando na formação do coágulo de fibrina.

Para a realização do exame, o sangue coletado da veia cava inferior dos animais previamente anestesiados, foi acondicionado em tubos de coleta à vácuo, marca Becton Dickinson®, contendo citrato de sódio 3,2% como anticoagulante. Estes foram centrifugados a 3000 rpm por 15 minutos para obtenção de plasma, o qual foi separado em tubos, tipo *ependorf*. A avaliação do TAP foi realizada por meio de técnica manual utilizando o kit TP CLOT (BIOS Diagnostica) de acordo com as orientações do fabricante. Os testes e controles foram realizados em duplicata. Inicialmente as amostras/controles foram pré-aquecidos a 37°C, de 2 a 3 minutos em banho maria. Em um tubo limpo colocou-se 200 uL do reagente TP CLOT e incubou-se à 37°C, de 4 a 5 minutos. Em seguida foi pipetado 100 uL da amostra/controle ao tubo contendo o reagente, disparando simultaneamente o cronômetro, e observou-se o tempo da formação do coágulo. Foi realizada a média dos resultados obtidos por duplicata (CLSI, 2003).

2.4.2 Tempo de Tromboplastina Parcial Ativada (TTPA)

O teste foi realizado incubando o plasma citratado, coletado como descrito no item anterior, com o reagente contendo ativador plasmático (ácido elágico) e fosfolípides plaquetários. Essa junção proporciona condições ótimas para a ativação por contato de fatores de coagulação. O procedimento foi realizado por técnica manual utilizando o kit APTT HEMOSTASIS (Labtest) seguindo as orientações do fabricante. Inicialmente o Reagente 2 (cloreto de cálcio contendo

20 mmol/L e azida sódica < 0,095%) foi pré-aquecido a 37°C, assim como 0,1 mL do plasma a ser medido (controle/amostra) por 3 min. Em seguida adicionou-se, ao plasma, 0,1 mL do Reagente 1 (ácido elágico > 99 μ mol/L, fosfolípide de cérebro de coelho > 0,007%, fenol 320 mmol/L, albumina bovina 0,005%, estabilizadores e preservativos), homogeneizou e incubou-se a 37°C por 4 min (tempo de ativação). Adicionou-se 0,1 mL do Reagente 2 (previamente aquecido a 37°C) e o cronômetro foi disparado simultaneamente para observação do tempo de formação do coágulo (CLSI, 2003).

2.5 Avaliação da atividade antiagregante

A avaliação ocorreu por dois diferentes protocolos. O primeiro consistiu na administração direta do OERO livre na cubeta do agregômetro contendo Plasma Rico em Plaquetas (PRP), obtido de ratos fêmeas não tratados.

O segundo protocolo consistiu no tratamento dos animais, distribuídos nos seguintes grupos: (CONTROLE) - tratado com o veículo empregado na dissolução do OERO (Tween 80 - 1 μ L) + água destilada; (OERO): tratado com Tween 80 + água destilada + OERO (100 mg/kg); (OERO+ β CD): tratado com Tween 80 + água destilada + complexo OERO+ β CD (100 mg/kg). O tratamento ocorreu por via oral (gavagem) durante 7 dias.

Nos dois protocolos o sangue foi coletado da aorta abdominal dos animais, previamente anestesiados, e acondicionado em tubos de coleta à vácuo, marca Becton Dickinson®, contendo citrato de sódio 3,2% como anticoagulante. Estes foram centrifugados a 180 x g por 10 minutos, em temperatura ambiente, para obtenção de plasma rico em plaquetas (PRP), o qual foi separado em tubos, tipo *ependorf*. Após a retirada do PRP, obteve-se o Plasma Pobre em Plaquetas (PPP) pela centrifugação a 2100 x g por 10 minutos (LEE et al., 2013).

Os ensaios de agregação foram realizados em agregômetro de quatro canais (modelo Easy Agreg - Qualitem), segundo método descrito por LEE et al., (2013). O agregômetro foi calibrado com o PPP para obter 100% de transmitância. Para cada canal foi utilizado 300 μ L de PRP (ajustado para 2×10^8 plaquetas/mL) incubados a 37°C por 1 minuto com agitação contínua à 1000 rpm. Para a realização do primeiro protocolo o PRP foi pré incubado por 5 min com OERO (100 μ M) (Grupo OERO) e sem seguida, a ativação da agregação foi realizada

com ADP (20 μ M). Simultaneamente, foram realizados controles com incubação sem OERO (Grupo Controle - ADP) e com incubação somente com OERO, sem ADP. Para avaliar provável mecanismo de ação da agregação, um grupo foi pré incubado com Calmidazolium (CMZ) (10 μ M), antes da adição de ADP e outro grupo foi pré incubado com CMZ e OERO antes da adição de ADP. A % máxima de agregação foi registrada para os grupos controle e grupo OERO e a inibição da agregação (IA) foi calculada como: $IA = (\text{Controle} - \text{OERO} / \text{Controle}) \times 100$ (JIN et al., 2013).

Para realização do segundo protocolo, o PRP teve a ativação da agregação estimulada pelo ADP (20 μ M) no plasma dos ratos tratados, por via oral, divididos nos grupos controle, OERO e OERO+ β CD. O grau de agregação foi expresso como uma porcentagem da transmissão máxima de luz na amostra de PPP.

Figura 2. Agregômetro



Fonte: Laboratório de Farmacologia Cardiovascular – LAFAC/UFPI.

2.6 Análise estatística

As medições estatísticas foram realizadas usando o software GraphPad Prism versão 6.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, EUA). Os resultados foram relatados como média \pm Erro Padrão da Média (E.P.M). Os dados foram analisados estatisticamente por análise de variância (ANOVA) e o teste de Tukey

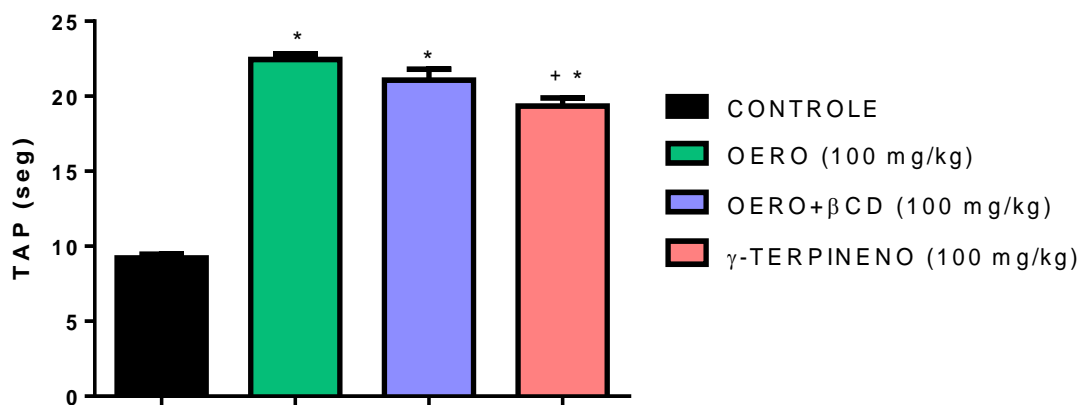
(comparação múltipla das médias) foi utilizado como pós-teste para determinação da significância ($p < 0,05$).

3. RESULTADOS

3.1 Efeito do tratamento, por via oral, com óleo essencial de *Rosmarinus Officinalis* L. livre e complexado em β -ciclodextrina, e do seu constituinte γ -terpineno sobre a coagulação sanguínea

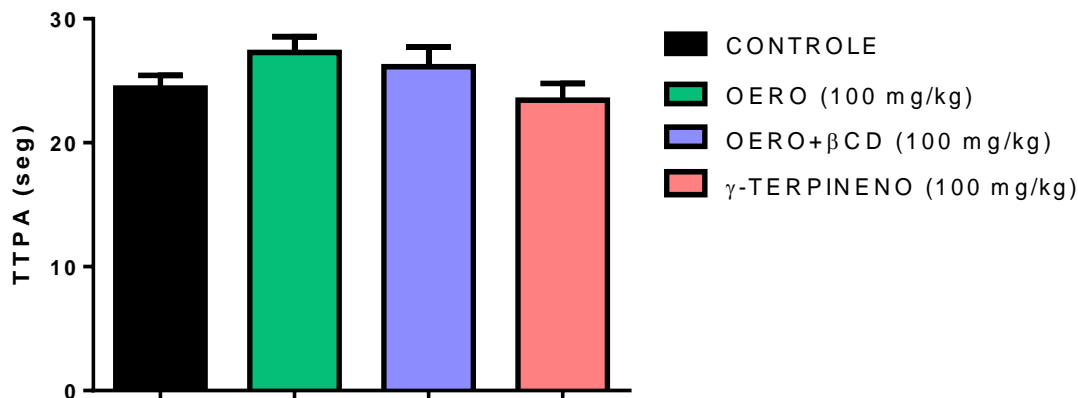
Como apresentado na Figura 3, o TAP (medido em segundos) está aumentado nos grupos OERO ($21,96 \pm 0,45$), OERO+ β CD ($20,46 \pm 1,66$) e γ -terpineno ($19,34 \pm 0,55$) quando comparados ao grupo controle ($9,22 \pm 0,23$). A mesma alteração não ocorreu com o TTPA (medido em segundos) (Figura 4) cujo resultado para o grupo controle ($24,4 \pm 1,0$) não diferiu significativamente do grupo OERO ($25,8 \pm 1,5$), grupo OERO+ β CD ($19,5 \pm 4,4$) e grupo γ -terpineno ($23,44 \pm 1,35$).

Figura 3. Efeito do OERO, OERO+ β CD e γ -terpineno sobre o Tempo de Protrombina (TAP)



Valores apresentados em média \pm E.P.M. * $p < 0,05$ comparado ao grupo Controle. + $p < 0,05$ comparado ao grupo OERO.

Figura 4. Efeito do OERO, OERO+ β CD e γ -terpineno sobre o Tempo de Tromboplastina Parcialmente Ativada (TTAP)



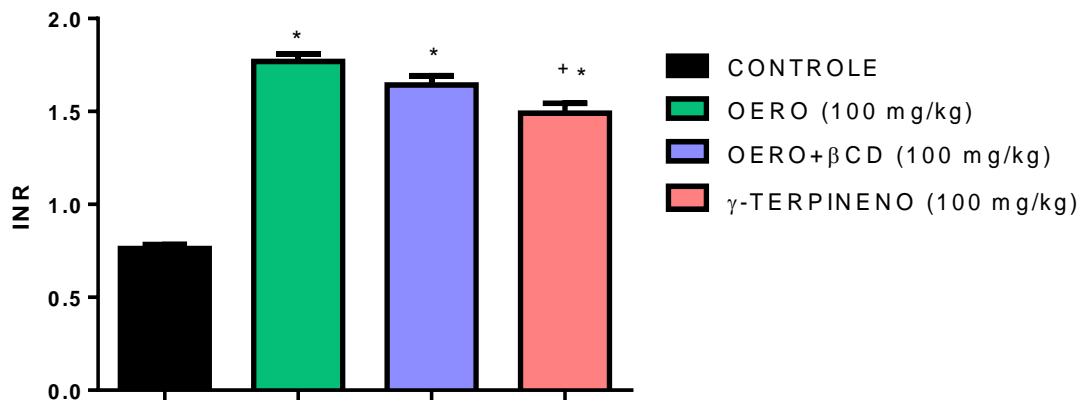
Valores apresentados em média \pm E.P.M.

O Índice Internacional Normalizado (*International Normalized Ratio* - INR) é baseado no tempo de protrombina (TAP) do paciente em relação ao tempo de protrombina normal (valor médio), corrigido pela sensibilidade da tromboplastina usada. Essa correção é feita por meio do uso de reagente de calibração ou Índice de Sensibilidade Internacional” (ISI) (CAMPOS et al., 2018). Como demonstrado na Figura 5, o INR está maior nos grupos OERO ($1,75 \pm 0,04$), OERO+ β CD ($1,60 \pm 0,16$) e γ -terpineno ($1,49 \pm 0,05$) em relação ao controle ($0,76 \pm 0,02$), o que reitera os achados na dosagem de TAP.

De acordo com a figura 6, a atividade de protrombina (AP) está reduzida significativamente nos grupos OERO ($39,46 \pm 1,02$), OERO+ β CD ($46,71 \pm 1,54$) e γ -terpineno ($51,15 \pm 2,60$) quando comparado ao controle ($172,25 \pm 8,58$) demonstrando uma redução do tempo de atividade desta enzima e certificando o efeito anticoagulante dos testes anteriores.

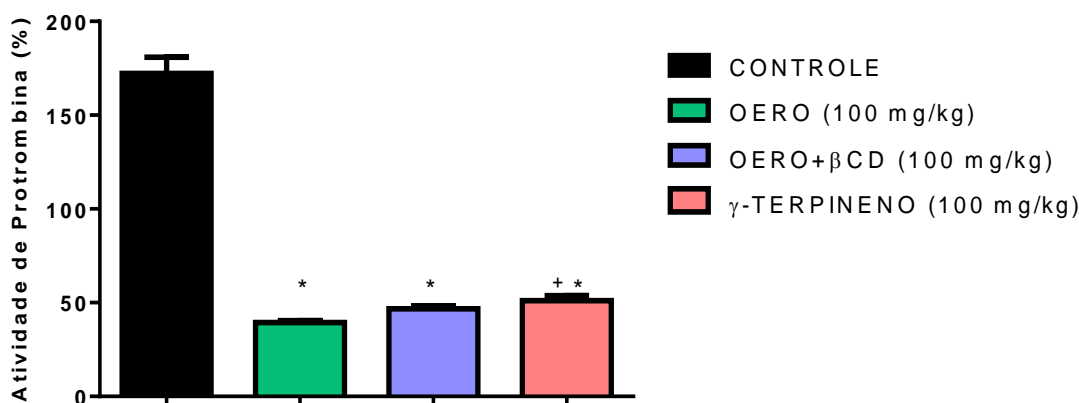
A utilização do complexo OERO+ β CD não apresentou valores diferentes significativamente para TAP e TTPA quando comparado ao grupo OERO livre. OERO apresentou diferença estatística significativa nas dosagens de TAP ($25,8 \pm 1,5$), INR ($1,75 \pm 0,04$) e AP ($39,46 \pm 1,02$) quando comparado ao γ -terpineno: TAP ($19,34 \pm 0,55$), INR ($1,49 \pm 0,05$) e AP ($51,15 \pm 2,60$), demonstrando um maior efeito anticoagulante do óleo.

Figura 5. Efeito do OERO, OERO+ β CD e γ -terpineno sobre o Índice Internacional Normalizado (INR).



Valores apresentados em média \pm E.P.M. * $p < 0,05$ comparado ao grupo Controle. + $p < 0,05$ comparado ao grupo OERO.

Figura 6. Efeito do OERO, OERO+ β CD e γ -terpineno sobre a Atividade de Protrombina (%).



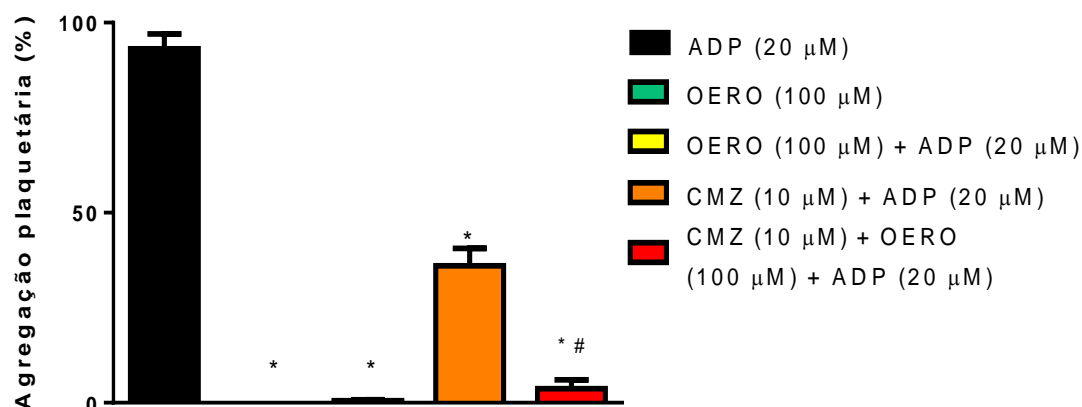
Valores apresentados em média \pm E.P.M. * $p < 0,05$ comparado ao grupo Controle. + $p < 0,05$ comparado ao grupo OERO.

3.2 Efeito do óleo essencial de *Rosmarinus Officinalis* L. livre sobre a agregação plaquetária induzida por ADP

Na concentração de 100 μ M, a pré-incubação com OERO adicionado diretamente na cubeta do agregômetro, inibiu a agregação plaquetária induzida

por ADP (20 μ M) em aproximadamente 98%. Calmidazolium (CMZ) (10 μ M) (um inibidor da calmodulina) (GIETZEN; WIITHRICH; BADER, 1981) provocou uma redução estatisticamente significativa da agregação induzida por ADP (20 μ M) e incubação com OERO associada ao calmidazolium potencializou o efeito antiagregante apresentado pelo calmidazolium (figura 7).

FIGURA 7. Efeito do OERO sobre a agregação plaquetária induzida por ADP.

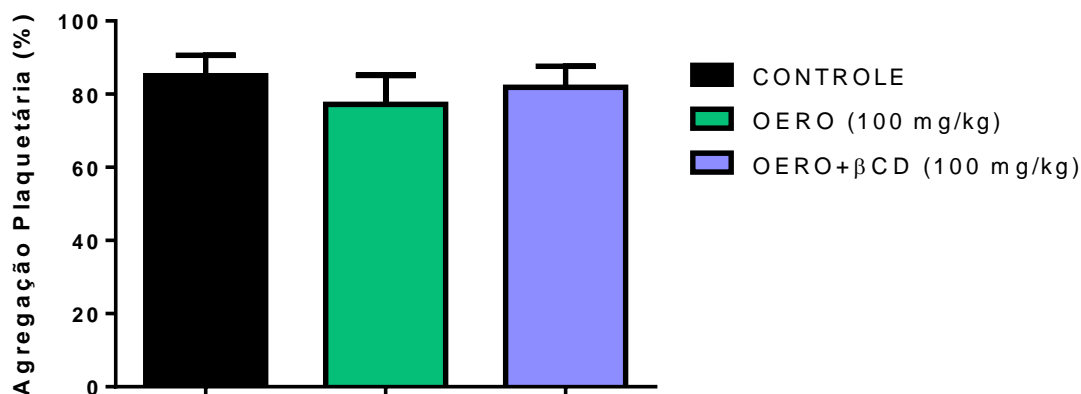


Valores apresentados em média \pm E.P.M. * $p < 0,05$ comparado ao grupo Controle (ADP). # $p < 0,05$ comparado ao grupo CMZ+ADP. Inibição da agregação (IA) foi calculada como: $IA = (ADP - OERO + ADP / ADP) \times 100$.

3.3. Efeito do tratamento, por via oral, com óleo essencial de *Rosmarinus Officinalis* L. livre e complexado em β -ciclodextrina sobre a agregação plaquetária induzida por ADP

Os resultados, apresentados na Figura 8, mostram que o tratamento por via oral (100 mg/kg) com OERO (77,20 \pm 7,89) e OERO+ β CD (81,90 \pm 5,7), não alteram a percentagem de agregação plaquetária quando comparados aos animais do grupo controle (ADP) (85 \pm 5,59).

Figura 8. Agregação plaquetária induzida por ADP após tratamento por via oral com OERO e OERO+ β CD



Valores apresentados em média \pm E.P.M.

4. DISCUSSÃO

Desequilíbrio do processo hemostático, com formação de trombos patológicos é uma das principais causas subjacentes de doenças cardiovasculares. A prevenção e/ou tratamento dessa disfunção inclui a administração de fármacos antiagregantes e anticoagulantes, que apesar da comprovada eficácia, apresentam graves efeitos colaterais, como hemorragias, doenças gastrointestinais e osteoporose (CIMMINO; FISCHETTI; GOLINO, 2017). Assim, a descoberta de novos agentes antitrombóticos baseados em plantas medicinais surge como uma importante alternativa à utilização dos fármacos já existentes.

O alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.) é uma erva aromática que tem sido amplamente utilizada não só como condimento alimentar, mas também como planta medicinal com comprovada atividade antioxidante e anti-inflamatória (LABBAN, et al., 2014). Seu poder antioxidante pode estar relacionado ao efeito antitrombótico, avaliado por técnica de trombose induzida, encontrado por Naemura et al. (2008), após administração prolongada (12 semanas) de alecrim na dieta. Especial atenção vem sendo dada ao estudo de seus principais constituintes, como carnosol e ácido carnósico (LOUSSOUARN et al., 2017; ANDRADE et al., 2018). Estes estão entre os diterpenos fenólicos mais

abundantes do alecrim e estudos anteriores atestaram sua ação antitrombótica através da inibição da agregação plaquetária (LEE, et al., 2007; HAOUARI; ROSADO, 2016).

O óleo essencial do alecrim é também usado para fins medicinais por apresentar efeito antioxidante, anti-inflamatório, antitumoral e analgésico. Entre seus constituintes está o 1-8 cineol, linalol, γ -terpineno e borneol. Este último, um monoterpeno com comprovado poder anticoagulante (Li et al., 2008).

No presente trabalho utilizamos o OERO e um de seus constituintes, o γ -terpineno para avaliar um potencial efeito anticoagulante. E, ainda, como possível forma de melhorar a biodisponibilidade, reduzindo a degradação e volatilização do OERO, este foi complexado em β -ciclodextrina.

Para conveniência de estudo, *in vitro*, da fisiologia da coagulação sanguínea, a cascata de coagulação é dividida em vias extrínseca, intrínseca e via comum. O novo modelo de coagulação baseado em observações experimentais e clínicas, demonstra que a via extrínseca opera na superfície das células que expressam Fator Tecidual (FT) para iniciar o processo de coagulação (HOFFMAN, 2003; FERREIRA et al., 2010), enquanto os componentes da via intrínseca operam na superfície das plaquetas ativadas para produzir grande quantidade de trombina que resultará na formação e estabilização do coágulo de fibrina. Assim, o TAP avalia os níveis de pró-coagulantes envolvidos na fase de iniciação da coagulação, enquanto o TTPA avalia os níveis de pró-coagulantes envolvidos na produção de grande quantidade de trombina, na superfície das plaquetas ativadas, gerada durante a fase de propagação (FERREIRA et al., 2010).

Portanto, anormalidades na via extrínseca e comum da cascata de coagulação (fatores VII, V, X, protrombina ou fibrinogênio) são responsáveis por alterações no TAP. O teste pode estar prolongado nas deficiências de um ou mais dos fatores acima, bem como na presença de um inibidor de algum desses fatores. Dos cinco fatores que alteram o TAP, três são dependentes de vitamina K (protrombina, fator VII e fator X) e tornam-se diminuídos com o uso dos anticoagulantes cumarínicos, por diminuição de vitamina K na dieta ou má absorção gastrointestinal. Nessas situações, o TAP irá prolongar antes que o TTPA o faça, denotando assim que o TAP é mais sensível que o TTPA para

detectar os estados de deficiência de vitamina K (MAKRIS; WATSON, 2001). Assim, a inibição de fatores pró-coagulantes da cascata de coagulação, representam uma abordagem promissora para a prevenção do distúrbio trombotico que está intimamente relacionado com a ocorrência de Doenças Cardiovasculares (DCVs).

O risco de eventos tromboembólicos está aumentado quando o INR se encontra abaixo do nível terapêutico (0,8 a 1,05); quando acima do mesmo, o risco de hemorragias aumenta drasticamente (LIU et al., 2013). Duric et. al. (2015) ao estudaram a atividade anticoagulante *in vitro* do extrato de *Artemisia dracuncululus* L., pertencente à família Asteraceae, verificaram aumento do INR e TAP e associaram este efeito à presença de compostos cumarínicos nesta espécie de planta. Khouya et al. (2015) obtiveram um prolongamento do TAP e TTPA após a administração do extrato aquoso de *Thymus atlanticus* e *Thymus zygis* e atribuíram os resultados à ação aos compostos fenólicos e flavonoides encontrados nestas plantas. Estes compostos são constituintes majoritários de muitas plantas e óleos essenciais e têm sido, cada vez mais, utilizados por seus efeitos, promotores de saúde, como antioxidantes (MESHKINI; TAHMASBI, 2017).

O tratamento por via oral (100 mg/kg), com OERO, OERO+ β CD e γ -terpineno, prolongaram o TAP, aumentaram o INR e reduziram a atividade de protrombina, sugerindo um importante efeito anticoagulante, causado provavelmente por inativação de fatores VII, V, X, protrombina ou fibrinogênio que compõem a via extrínseca e comum da cascata de coagulação. O tratamento com OERO apresentou maior poder anticoagulante quando comparado ao tratamento com γ -terpineno isolado, podendo este fato ser explicado pela ação anticoagulante do óleo ocorrer pela ação sinérgica de seus constituintes.

As plaquetas desempenham um papel vital tanto na formação, como no crescimento dos trombos vasculares. Após lesão vascular, as plaquetas que circulam na corrente sanguínea são expostas ao colágeno das proteínas da matriz extracelular (MEC) e ao fator de von Willebrand (FvW) o que leva à ativação e disseminação da adesão plaquetária. A ativação plaquetária é um processo altamente orquestrado que requer a reorganização do citoesqueleto celular e mudanças morfológicas que são sustentadas por uma resposta coordenada entre

moléculas sinalizadoras e uma rede de proteínas de ligação à actina (ABURIMA et al., 2017).

No presente estudo, o OERO foi avaliado *in vitro*, quanto à atividade antiagregante plaquetária induzida por ADP.

No primeiro protocolo, OERO adicionado diretamente à cubeta do agregômetro (100 μ M), inibiu aproximadamente 98% da agregação plaquetária em relação ao grupo ADP, evidenciando um efeito antiagregante do OERO provavelmente por interagir com o local de ação do ADP, interrompendo a sinalização celular e antagonizando o processo de agregação (DIB et al., 2017).

Outros óleos essenciais como os de *Curcuma wenyujin*, *Goniothalamus velutinus*, *Allium atrovioleaceum* e *Lavandula hybrida* demonstraram efeito antiagregante, causados provavelmente pelo alto teor de sesquiterpenos presentes nestes óleos essenciais. Ademais, estes estudos fornecem evidências que o efeito antiagregante mais efetivo ocorreu pela ação sinérgico de seus componentes (BALLABENI et al., 2004; MOHARAM et al., 2010; LORIGOOINI; KOBARFARD; AYATOLLHAHI, et al., 2014).

A utilização do calmidazolium (um inibidor da calmodulina) reduz a agregação plaquetária induzida por ADP provavelmente pela inibição da interação da calmodulina com o receptor P2Y, como demonstrado anteriormente em trabalho realizado por Arthur et al. (2006). Intensificação do efeito antiagregante do calmidazolium ocorreu com a pré-incubação com OERO reforçando a ação deste como antiagregante. Estes efeitos associados aos descritos anteriormente reforçam os estudos do OERO como uma importante substância terapêutica sobre o sistema cardiovascular.

No segundo protocolo, os animais foram tratados por via oral com OERO e OERO+ β CD seguido da avaliação da agregação máxima induzida por ADP. Contudo, não houve porcentagem de inibição significativa quando comparado ao grupo controle. Este resultado durante avaliação, *in vitro*, após tratamento por via oral, pode ter sofrido interferência pela forma de administração das substâncias analisadas (OERO e OERO+ β CD) pela própria cinética de seus diversos constituintes no organismo, ou seja, metabolismo de primeira passagem, ou devido ao tempo e concentração que o OERO e OERO+ β CD permaneceram no

plasma em contato com as plaquetas, possibilitando inibir sua ativação e agregação (XIA, et al., 2012).

5. CONCLUSÃO

- OERO, OERO+ β CD e seu constituinte γ -terpineno apresentam efetiva ação anticoagulante;
- Não foi observada ação antiagregante nos grupos OERO e OERO+ β CD após tratamento por via oral;
- A ação antriagregante ocorreu pela pré-incubação com OERO (100 μ M) direto na cubeta, antes da adição do agonista ADP.

REFERÊNCIAS

ABURIMA, A. et al. cGMP signaling inhibits platelet shape change through regulation of the RhoA-Rho Kinase-MLC phosphatase signaling pathway. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, v.15, n. 8, p.1668–78, 2017.

ANDRADE, J. M. et al. *Rosmarinus officinalis* L.: an update review of its phytochemistry and biological activity. **Future Science OA**, v. 4, n. 4, p. FSO283, 2018.

ARTHUR, J. F. “Calmodulin interacts with the platelet ADP receptor P2Y1.” **The Biochemical journal**, v. 398, n.3, p.339-43, 2006.

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

BENJAMIM, E. J. et al. Heart Disease and Stroke Statistics -2018 Update.A Report From the American Heart Association. **Circulation**, v. 137, p. e67–492, 2018.

CAMPOS, F. H. O. et al. Immediate laser-induced hemostasis in anticoagulated rats subjected to oral soft tissue surgery: a double-blind study. **Brazilian Oral Research**, v. 32, e56, 2018.

CIMMINO, G., FISCHETTI, S., GOLINO, P. The Two Faces of Thrombosis: Coagulation Cascade and Platelet Aggregation. Are Platelets the Main Therapeutic Target? **Journal of Thrombosis and Circulation**, v. 3, n. 1, p. 117, 2017.

CLSI. Clinical Laboratory Standards Institute: Collection, Transport and Processing of Blood Specimens for Testing Plasma-based Coagulation Assays; Approved Guideline – Fourth Edition. v. 18, n. 20, p. 4, 2003.

DE CÁSSIA, S. S. R. et al. Analgesic-Like Activity of Essential Oil Constituents: An Update. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 12, p. 2392, 2017.

DE OLIVEIRA, J. R., CAMARGO, S. E. A., DE OLIVEIRA, L. D. *Rosmarinus officinalis* L. (rosemary) as therapeutic and prophylactic agent. **Journal of Biomedical Science**, v. 26, n. 5, p. 1-22, 2019.

DIB, I. et al. Chemical composition, vasorelaxant, antioxidant and antiplatelet effects of essential oil of *Artemisia campestris* L. from Oriental Morocco. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v.17, n.1, p. 1-15, 2017.

DURIĆ, K. et al. Anticoagulant activity of some *Artemisia dracunculus* leaf extracts. **Bosnian Journal of Basic Medical Sciences**, v. 15, v. 2, p. 9-14, 2015.

FITSIOU, E. et al. Antioxidant and Antiproliferative Properties of the Essential Oils of *Satureja thymbra* and *Satureja parnassica* and their Major Constituents. **Anticancer Research**, v.36, p. 5757-64, 2016.

FERNANDES, C. J. C. S. et al. New anticoagulants for the treatment of venous thromboembolism. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 42, n. 2, p. 146-154, 2016.

FERREIRA, C. N. et al. O novo modelo da cascata de coagulação baseado nas superfícies celulares e suas implicações. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 32, n. 5, p. 416-421, 2010.

HAOUARI, M. E., ROSADO, J. A. Medicinal plants with antiplatelet activity. **Phytotherapy Research**, v. 30, n. 7, p. 1059-71, 2016.

HERNÁNDEZ-SÁNCHEZ, P. et al. Optimization of a method for preparing solid complexes of essential clove oil with β -cyclodextrins. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 97, p. 420–26, 2017.

HOFFMAN, M. Remodeling the blood coagulation cascade. **Journal of Thrombosis and Thrombolysis**, v. 16, p.17-20, 2003.

GIETZEN, K., WÜTHRICH, A., BADER, H. R 24571: A new powerful inhibitor of red blood cell Ca^{2+} -transport ATPase and of calmodulin-regulated functions.

Biochemical and Biophysical Research Communications, v. 101, p. 418–25, 1981.

HUSSAIN, A. I. et al. *Rosmarinus officinalis* essential oil: antiproliferative, antioxidant and antibacterial activities. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 41, n. 4, p.1070-1078, 2010.

IMAM, H. et al. Impaired adenylate cyclase signaling in acute myocardial ischemia: Impact on effectiveness of P2Y₁₂ receptor antagonists. **Thrombosis Research**, v. 181 p. 92–98, 2019.

IRFAN, M. et al. *Eisenia bicyclis* (brown alga) modulates platelet function and inhibits thrombus formation via impaired P2Y₁₂ receptor signaling pathway. **Phytomedicine**, v. 40, p. 79-87, 2018.

JARDAK, M. et al. Chemical composition, anti-biofilm activity and potential cytotoxic effect on cancer cells of *Rosmarinus officinalis* L. essential oil from Tunisia. **Lipids in Health and Diseases**, v. 16, n. 1, p. 190, 2017.

JIN, W. Y. et al. Antiplatelet and antithrombotic effect of *Phyllostachys pubescens* leaves and Mume Fructus combination. **Integrative Medicine Research**, v. 2, p. 70-75, 2013.

KHOUYA, T. et al. Anti-inflammatory, anticoagulant and antioxidant effects of aqueous extracts from Moroccan thyme varieties. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 5, n. 8, p. 636-44, 2015.

LABBAN, L., et al. The Effects of Rosemary (*Rosmarinus officinalis*) Leaves Powder on Glucose Level, Lipid Profile and Lipid Peroxidation. **International Journal of Clinical Medicine**, v. 5, p. 297-304, 2014.

LEE, J. J. et al. Antiplatelet activity of carnosic acid, a phenolic diterpene from *Rosmarinus officinalis*. **Planta Medica**, v. 73, n. 2, p. 121-7, 2007.

LEE, J. J. et al. Antithrombotic and antiplatelet activities of Soshiho-tang extract. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v.13, n.137, p.1-8, 2013.

LI, et al. The antithrombotic effect of borneol related to its anticoagulant property. **The American Journal of Chinese Medicine**, v. 36, n.4 p.719-27, 2008.

LIU, SQ et al. “Anticoagulant effect of Huisheng Oral Solution in a rat model of thrombosis.” **Indian journal of pharmacology**, v. 45, n.4, p. 359-64, 2013.

LOPEZ FARRÉ, A.; MACAYA, C. Palqueta:fisiologia de la activación y la inhibición. **Revista Española Cardiología Suplementos**, v.13, n.3, p. 2-7, 2013.

LORIGOOINI, Z., KOBARFARD, F., AYATOLLHAHI, S. B. Anti-platelet aggregation assay and chemical composition of essential oil from *Allium atroviolaceum* Boiss growing in Iran. **International Journal of Biosciences**, v. 5, n. 2, p. 151-56, 2014.

LOUSSOUARN, M. et al. Carnosic Acid and Carnosol, Two Major Antioxidants of Rosemary, Act through Different Mechanisms. **Plant physiology**, v. 175, n. 3, p. 1381-94, 2017.

MAKRIS, M., WATSON, H. G. The management of coumarin-induced over-anticoagulation. **British Journal of Hematology**, v. 114, n.2, p. 271-80, 2001.

MESHKINI, A., TAHMASBI, M. Antiplatelet Aggregation Activity of Walnut Hull Extract via Suppression of Reactive Oxygen Species Generation and Caspase Activation. **Journal of Acupuncture e Meridian Studies**, v. 10, n. 3, p. 193-203, 2017.

MOHARAM, B. A. et al. "Inhibitory effects of phylligenin and quebrachitol isolated from *Mitrephora vulpina* on platelet activating factor receptor binding and platelet aggregation." **Molecules**, v. 15, n.11, p. 7840-8, 2010.

NAEMURA, A. et al. Long-term intake of rosemary and common thyme herbs inhibits experimental thrombosis without prolongation of bleeding time. **Thrombosis Research**, v.122, n. 4, p. 517-22, 2008.

RAŠKOVIĆ, A. et al. Antioxidant Activity of Rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) Essential Oil and its Hepatoprotective Potential. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 14, n. 225, 2014.

REHMAN, A-UR. et al. A preliminary investigation of *in vitro* anti-thrombotic and anti-platelet activity of *Pinus Gerardiana*. **Biomedical Research and Therapy**, v. 4, n. 1, p. 1098-1109, 2017.

SIENKIEWICZ, M. et al. The potential of use basil and rosemary essential oils as effective antibacterial agents. **Molecules**, v. 18, n. 8, p. 9334-51, 2013.

SILLER-MATULA, J. et al. Thienopyridines in cardiovascular disease: focus on clopidogrel resistance. **Thrombosis and Haemostasis**. v.97, n. 3, p. 385-93, 2007.

SIQUEIRA-LIMA, P. S. et al. β -Cyclodextrin Complex Containing *Lippia grata* Leaf Essential Oil Reduces Orofacial Nociception in Mice – Evidence of Possible Involvement of Descending Inhibitory Pain Modulation Pathway. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, v. 9, p. 1739–747, 2014.

SON, E. et al. Antiplatelet mechanism of an herbal mixture prepared from the extracts of *Phyllostachys pubescens* leaves and *Prunus mume* fruits. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 17, n. 1, p. 541, 2017.

TADTONG, S. et al. Chemical components of four essential oils in aromatherapy recipe. **Natural Product Communications**, v. 10, n. 6, p. 1091-2, 2015.

TOMAIUOLO, M., BRASS, L. F., STALKER, T. J. Regulation of Platelet Activation and Coagulation and Its Role in Vascular Injury and Arterial Thrombosis. **Interventional Cardiology Clinics**, v. 6, n. 1, p. 1-12, 2017.

VILLAREAL, M. O. et al. Anti-stress and neuronal cell differentiation induction effects of *Rosmarinus officinalis* L. essential oil. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 17, n. 1, n. 549, 2017.

XIA, Q. et al. Inhibition of platelet aggregation by curdione from *Curcuma wenyujin* essential Oil. **Thrombosis Research**, v.130, p: 409–414.

CAPÍTULO 2

AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Rosmarinus officinalis* L. LIVRE E COMPLEXADO EM β -CICLODEXTRINA

RESUMO

Rosmarinus officinalis L., conhecido popularmente como alecrim, é bastante utilizado como condimento alimentar e na preservação de produtos alimentícios, principalmente devido seu sabor e propriedade antioxidante. Esta espécie, pertencente à família Lamiaceae, tem aroma forte e de suas folhas pode ser extraído um óleo com diversas atividades biológicas, tais como: antibacteriana, anticancerígena, anti-inflamatória e antioxidante. No entanto, o conhecimento de possíveis efeitos tóxicos do óleo essencial de *Rosmarinus officinalis* L. (OERO) ainda é limitado e precisa ser melhor investigado. O objetivo deste trabalho foi avaliar a segurança de administração do OERO livre e complexado em β -ciclodextrina (OERO+ β CD), através da realização de teste de citotoxicidade (*in vitro*) em macrófagos murinos (*Balb/c*) e testes toxicidade (*Rattus norvegicus*), com análises de parâmetros bioquímicos e análise histológica. Para isso, ratas foram tratadas com OERO ou OERO+ β CD (100 mg/kg), uma vez ao dia, via oral, durante 7 dias. No grupo controle, animais receberam somente água e veículo (Tween 80). O teste de citotoxicidade em macrófagos apresentou pequena redução da viabilidade celular nas concentrações de 200, 400 e 800 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de OERO e OERO+ β CD, com CC_{50} do OERO (13.291 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) e OERO+ β CD (7.555 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) caracterizando as substâncias como atóxicas. Na avaliação dos parâmetros bioquímicos, ocorreu redução nos valores de glicose, colesterol e alanina aminotransferase (ALT), no grupo OERO+ β CD. A análise histológica do fígado e rim apresentou padrões de normalidade, sem indicação de toxicidade, em ambos os grupos. Conclui-se que o OERO e OERO+ β CD não apresentaram citotoxicidade e o tratamento com OERO e OERO+ β CD, na dose testada, não apresentou toxicidade, fato importante para o desenvolvimento de fármacos seguros.

Palavras-chave: *Rosmarinus officinalis* L.. β -ciclodextrina. Citotoxicidade. Bioquímica. Histologia.

1. INTRODUÇÃO

O óleo essencial de *Rosmarinus officinalis* L. (OERO) é um metabólico secundário do alecrim que apresenta substâncias biologicamente ativas com efeito antioxidante, anti-inflamatório e antimicrobiano (HUSSAIN, et al., 2010; SELMI, et al., 2017). Seus constituintes majoritários incluem monoterpenos e diterpenos fenólicos e suas ações medicinais podem derivar da atuação isolada dos compostos majoritários, como 1-8 cineol ou da ação sinérgica de seus constituintes. No entanto, apesar dos benefícios, o OERO, bem como o uso de outras plantas medicinais e seus derivados como matéria-prima para a síntese de compostos químicos com atividade biológica, pode causar efeitos tóxicos dependendo da dose, via e tempo de administração. Assim, apesar do uso de plantas medicinais ser largamente descrito, ainda se faz necessário, pesquisas que disponibilizam informações referentes ao efeito tóxico que essas substâncias podem desencadear. Neste sentido, os estudos toxicológicos são necessários para que ocorra a pesquisa da relação entre dose, risco e benefício da utilização destas plantas e seus derivados (BOZIN et al., 2007; YU et al., 2013; LIMA et. al., 2014; ANDRADE et al., 2018).

A toxicidade corresponde à capacidade de determinadas substâncias causarem danos aos seres vivos. Essas são classificadas quanto ao tempo de resposta, como aguda, subcrônica e crônica; ou conforme a severidade em leve, moderada e severa. A avaliação de toxicidade pode ocorrer a nível físico, bioquímico, hematológico e histológico, através de testes efetuados *in vitro* e *in vivo* (DOMINGUES, et. al., 2010). Com relação aos ensaios *in vitro*, avaliação em sistemas de cultura celular, como a citotoxicidade assumem importância por serem sensíveis, reprodutíveis e de baixo custo (PINTO; KANECO; PINTO, 2010). Em relação aos testes *in vivo* os ensaios pré-clínicos de eficácia são os mais utilizados e envolvem a avaliação dos efeitos obtidos após o tratamento dos animais (ANVISA, 2018).

Os ensaios de citotoxicidade objetivam determinar a resposta biológica de células de mamíferos *in vitro* com o uso de parâmetros biológicos adequados (NBR ISO 10993-5), através da avaliação de dano celular por meios morfológicos e medições desses danos, do crescimento celular e de aspectos específicos do

metabolismo celular (OECD, 2010; ABNT, 2013). Essa avaliação está relacionada com a toxicidade aguda *in vivo* e sua análise é importante para conhecer os aspectos de morbi mortalidade de agentes químicos sobre o organismo. Nos testes ela é expressa como CC₅₀ (concentração que inibe 50% das células quando comparada as células controle não-tratadas), e pode ser matematicamente calculada a partir da curva de concentração-efeito (PINTO; KANECO; PINTO, 2010; ANVISA, 2018).

Um dos métodos mais utilizados para avaliação é o teste de redução dos sais de brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-zil)2,5-difeniltetrazolio (MTT). Este teste analisa a viabilidade celular e o estado metabólico da célula, baseado na conversão do sal brometo de MTT em azul de formazan, a partir de enzimas mitocondriais presentes somente nas células metabolicamente ativas. Ou seja, a solução amarela do MTT é reduzida, pela atividade mitocondrial nas células metabolicamente ativas, em um cristal roxo (ÉVORA, 2015).

Outra etapa para avaliação de toxicidade é a realização de estudo bioquímico e histológico, durante a avaliação pré-clínica. O estudo sanguíneo químico fornece indicação da adaptação do organismo, no metabolismo energético, proteico e mineral, além de oferecer evidências do funcionamento de órgãos vitais como o fígado e rim. A associação de avaliação histológica e histopatológica contribui para atestar a segurança na utilização da substância analisada e garantir a possibilidade do desenvolvimento de ensaios clínicos e novos fármacos (DOMINGUES et. al., 2010).

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Substâncias e reagentes

β -ciclodextrina ($\geq 97\%$ de pureza), Tween 80, óleo essencial de *Rosmarinus officinalis* L. (OERO), foram comprados da empresa Sigma-Aldrich (EUA). Cetamina e Xilazina foram comprados de Cristália (Itabira-SP, Brasil). Na preparação das soluções de tratamento, OERO (100 mg/kg) e OERO+ β CD (100 mg/kg) foram solubilizados em 1 μ L de monolato de polioxietileno-sorbitano (Tween 80) (0,5% v/v) e dissolvido em água destilada, em volume total de 1 mL. Soluções de OERO e OERO+ β CD foram armazenados em recipiente de vidro

selados, cobertos com folha de alumínio e mantidos sob refrigeração a -10° até serem utilizados.

2.2 Complexo de inclusão de β -ciclodextrina com o óleo essencial de *Rosmarinus officinalis* L.

O complexo de inclusão foi preparado no Departamento de Fisiologia da Universidade Federal de Sergipe utilizando a técnica descrita por Siqueira-Lima et al. (2014).

2.3 Animais e protocolo experimental

Foram utilizados *Rattus norvegicus*, linhagem Wistar, fêmeas, pesando entre 200-250g, obtidos no biotério setorial do Núcleo de Pesquisas em Plantas Medicinais (NPPM) da Universidade Federal do Piauí. Os animais foram mantidos em condições controladas de temperatura ($22 \pm 2^{\circ}\text{C}$), com ciclo claro/escuro de 12 horas e livre acesso à água filtrada e ração padrão.

O uso dos animais seguiu os princípios e normas para utilização de animais em projetos de pesquisa e todos os procedimentos experimentais do projeto foram submetidos ao Comitê de Ética em Experimentação Animal da UFPI (CEUA/UFPI) e aprovados sob o número 275/16. Os procedimentos referentes à eutanásia dos animais foram realizados em consonância com a Lei nº 11.794 de 8 de outubro de 2008 do Decreto nº 6.899 de julho de 2009, regulamentada pela Resolução normativa vigente nº 37 de 15 de fevereiro de 2018.

Para o estudo do efeito do óleo essencial de *Rosmarinus officinalis* L., na forma livre e complexado com β -ciclodextrina, sobre os parâmetros bioquímicos e análise histológica, os animais foram distribuídos aleatoriamente em três grupos constituídos por 7-11 animais e divididos pelo tratamento recebido em:

- **Grupo 1** (CONTROLE) - tratado com o veículo empregado na dissolução do óleo essencial de *Rosmarinus officinalis* L. (OERO) (Tween 80 – 1 μL) + água destilada.
- **Grupo 2** (OERO): tratado com óleo essencial de *Rosmarinus officinalis* L. (100 mg/kg) dissolvido em Tween 80 (1 μL) + água destilada;
- **GRUPO 3** (OERO+ β CD): tratado com complexo de inclusão contendo β -ciclodextrina e óleo essencial de *Rosmarinus officinalis* L. (100 mg/kg) dissolvido em Tween 80 (1 μL) + água destilada;

O tratamento foi realizado no laboratório de Farmacologia Cardiovascular (LAFAC-UFPI), sendo administrado por via oral (volume total de 1 mL) (gavagem), uma vez ao dia, por 7 dias, de acordo com modelo descrito por Holanda (2015). No oitavo dia, após 10 horas de jejum, os animais foram anestesiados com cloridrato de cetamina (90 mg/kg) associado a cloridrato de xilazina (10 mg/kg) via intraperitoneal (i. p.). O sangue foi coletado da aorta abdominal e acondicionado em tubos específicos para posterior avaliação bioquímica. Em seguida, os tecidos utilizados para subsequente avaliação histopatológica (rim e fígado) foram retirados e armazenados em frascos contendo formaldeído 10%.

2.4 Teste de citotoxicidade em macrófagos

Para assegurar a viabilidade do tratamento com diferentes concentrações do OERO e OERO+ β CD, foi executado o protocolo de viabilidade celular utilizando-se o teste do brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-zil)2,5-difeniltetrazolio (MTT) em macrófagos murinos Balb/c seguindo o modelo descrito por Nogueira et al. (2007).

Foram adicionados 100 μ L de meio RPMI 1640 suplementado com 10% de soro fetal bovino, 10.000U de penicilina e 10 mg de estreptomicina, em placas de 96 poços, com cerca de 2×10^5 macrófagos por poço. Essas células foram incubadas em estufa a 37°C com atmosfera de 5% de CO₂ e 95% de umidade por 4 h para adesão celular. Após este tempo, foram realizadas duas lavagens com meio RPMI suplementado, para a retirada das células que não aderiram. Posteriormente, foram adicionados 100 μ L do meio RPMI suplementado juntamente com as amostras diluídas, de forma seriada, nas concentrações de 800 a 6,25 μ g/mL. Em seguida, as amostras foram incubadas por 48 h e, ao final da incubação, foi adicionado 10 μ L de MTT diluído em meio RPMI a 5 mg/mL. Em seguida, as amostras foram incubadas por mais 4 h em estufa a 37°C com 5% de CO₂, e logo após o sobrenadante foi descartado e adicionado 100 μ L de em todos os poços.

A placa foi colocada sob agitação por cerca de 30 min em agitador de Kline (modelo AK 0506), à temperatura ambiente, para dissolução completa do formazan. Por último, foi realizada a leitura a 550 nm em leitora de placa.

Os resultados foram expressos em porcentagem (calculados a partir de absorbâncias lidas pelo espectrofotômetro) e em concentração citotóxica média (CC₅₀) sendo o grupo controle considerado como 100% de viabilidade. Foram consideradas não tóxicas aquelas concentrações cuja viabilidade celular foi acima de 90%, quando comparadas aos controles celulares não tratados (NOGUEIRA et. al., 2007).

2.5 Avaliação de parâmetros bioquímicos

Amostras de sangue provenientes dos ratos Wistar fêmeas foram obtidas nos animais previamente anestesiados com cloridrato de cetamina (90 mg/kg) associado a cloridrato de xilazina (10 mg/kg) via intraperitoneal (i. p.). Foram coletados 4 mL de sangue, a partir da aorta abdominal e acondicionados em tubos sem anticoagulante. Estes foram centrifugados a 3500 rpm por 10 minutos para obtenção de soro, o qual foi separado em tubos, tipo *ependorf*, para posterior análise bioquímica.

O material foi analisado no Núcleo de Pesquisas em Plantas Medicinais – NPPM utilizando o Analisador Bioquímico Automático Labmax pleno modelo Standard, nº de série 1208.06 (Labtest, Brasil) (Figura 1). Os exames foram realizados, pelo Prof. Benedito Pereira Neto, seguindo os protocolos do fabricante do equipamento e dos kits reagentes (marca LABTEST) para cada parâmetro avaliado. Foram dosados colesterol total, HDL (*High-density lipoprotein*), triglicerídeos, glicose, aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT), ureia, creatinina, proteínas totais e albumina.

Figura 1. Analisador Bioquímico Automático Labmax.



Fonte: Núcleo de Pesquisas em Plantas Mediciniais – NPPM. UFPI.

2.6 Análise histológica

Para esta avaliação, amostras de tecido renal e hepático foram coletadas e fixadas em solução de formaldeído tamponado com fosfatos a 10% (pH 7). Em seguida foram lavadas e submetidas a desidratação gradual crescente com soluções alcólicas ascendentes de 30%, 50%, 70%, 90% em intervalos de uma hora cada e em álcool absoluto por uma hora e meia. O processo de diafanização foi feito em xilol I por 45 minutos e em xilol II por mais 45 minutos. A inclusão foi feita em parafina líquida para banho I por 15 – 20 minutos a 80°C e parafina líquida para inclusão II a 80°C. Após o derretimento, resfriamento e endurecimento da parafina, a mesma foi aparada em um bloco com tamanho apropriado. O bloco foi então colocado em um micrótomo (LUPETEC®, MRP 09) e cortado com uma lâmina de aço. A desparafinização foi feita com xilol I por 7 minutos e mais 3 minutos com xilol II. Seguiu a hidratação com álcool absoluto por 7 minutos, álcool 90% por 2 minutos, álcool 75% por 2 minutos, álcool 50% por 2 minutos, álcool 30% por 2 minutos, água destilada I por 2 minutos e água destilada II por 2 minutos. A coloração foi feita com hematoxilina por 2 minutos, banhada em água corrente por 3,5 minutos, corada com eosina por 5 minutos e banhada em água corrente por mais 3 minutos, seguida pela secagem por 4 horas em temperatura ambiente. Depois iniciou-se a montagem das lâminas de vidro em secções

sagitais delgadas de 6 μ m para visualização em microscópio óptico (NOVA®) (PINTO, 2015).

A análise histopatológica duplo cega foi realizada pelo Prof. Dr. Daniel F. Pereira Vasconcelos (UFDpar-Parnaíba). As alterações histopatológicas do material avaliado foram pontuadas em uma escala de zero a três pontos. Os resultados de todas as lâminas de cada grupo foram calculados para dar uma nota final para os grupos.

2.7 Análise estatística

As medições estatísticas foram realizadas usando o software GraphPad Prism versão 6.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, EUA). Para cálculo de viabilidade celular, análise de variância (ANOVA) foi seguida do pós-teste de Bonferroni e os resultados foram apresentados como média e desvio padrão. Parâmetros bioquímicos foram analisados estatisticamente por ANOVA e o teste de Tukey (comparação múltipla das médias) foi utilizado como pós-teste para determinação da significância ($p < 0,05$), sendo os resultados expressos em tabelas e apresentados como média \pm Erro Padrão da Média (E.P.M). Para a análise histopatológica foi utilizado o teste de Kruskal Wallis, seguido pelo teste de Dunn.

3. RESULTADOS

3.1 Efeito do óleo essencial de *Rosmarinus Officinalis* L. livre e complexado em β -ciclodextrina sobre a citotoxicidade em macrófagos

Nos testes realizados com macrófagos murinos *Balb/c*, foram utilizadas as concentrações de OERO e OERO+ β CD de (6,25; 12,5; 25; 50; 100; 200; 400 e 800 μ g.mL⁻¹), sendo a classificação de citotoxicidade baseada na percentagem de viabilidade celular, proposta por Oliveira (2009) (Tabela 1).

Tabela 1. Classificação de citotoxicidade consoante a percentagem de viabilidade celular.

CITOTOXICIDADE	VIABILIDADE CELULAR (%)
Não tóxico	> 90
Levemente tóxico	80 a 90
Moderadamente tóxico	50 a 79
Severamente tóxico	<50

Fonte: Oliveira (2009).

Tanto o grupo OERO como o OERO+ β CD não apresentaram diferença estatística nas concentrações de 6,25 a 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ quando comparadas ao controle. Grupos OERO (92,51% de viabilidade) e o OERO+ β CD (93,03% de viabilidade) na concentração de 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ apresentarem diferença estatística em relação ao controle (100% de viabilidade), mas ainda sendo considerados não citotóxicos (Tabela 2).

Tabela 2. Viabilidade celular de macrófagos murinos da linhagem Balb/c pós incubação com concentrações crescentes (6,25 - 800 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) de OERO e OERO+ β CD pelo ensaio de MTT.

Concentração ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	OERO		OERO+ β CD	
	Viabilidade celular (%)	Citotoxicidade	Viabilidade celular (%)	Citotoxicidade
6,25	99,3	Nula	99,3	Nula
12,5	99,3	Nula	99,3	Nula
25	99,3	Nula	99,3	Nula
50	94,6	Nula	98,3	Nula
100	92,5	Nula	93,03	Nula
200	89,89	Leve	88,85	Leve
400	88,32	Leve	88,32	Leve
800	82,57	Leve	81,01	Leve

No grupo OERO as concentrações de 200 (89,89% de viabilidade); 400 (88,32% de viabilidade) e 800 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (82,57% de viabilidade) apresentaram leve

toxicidade. O mesmo aconteceu com o grupo OERO+ β CD, no qual, as concentrações de 200, 400 e 800 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ foram, respectivamente 88,85%, 88,32% e 81,01% de viabilidade celular (Tabela 2).

A menor concentração do OERO que causa mortalidade de 50% dos macrófagos (CC_{50}) foi de 13.291,160 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Quando conjugado com ciclodextrina foi de 7.555,616 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (Tabela 3).

Tabela 3. Valores de CC_{50} do OERO e OERO+ β CD sobre macrófagos murinos.

SUBSTÂNCIA	CC_{50} ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)
OERO	13.291,160
OERO+ β CD	7.555,616

3.2 Parâmetros bioquímicos de ratas tratadas com óleo essencial de *Rosmarinus Officinalis* L. livre e complexo em β -ciclodextrina.

Modificações no perfil lipídico podem ser detectadas pela interpretação dos níveis de triglicerídeos e colesterol (PENALVA et al. 2008). Quanto ao nível sérico de triglicerídeos, o grupo OERO ($49,83 \pm 7,63$) não apresentou valor estatisticamente diferente quando comparado ao grupo OERO+ β CD ($47,45 \pm 5,01$) e ao grupo controle ($38,71 \pm 4,21$) (Tabela 4). Na dosagem de colesterol os valores do grupo controle ($94,50 \pm 2,67$) não foram diferentes estatisticamente em relação ao grupo OERO ($98 \pm 2,95$), no entanto houve uma redução significativa no grupo OERO+ β CD ($81,63 \pm 1,94$) quando comparado ao OERO e ao grupo controle. Já na dosagem de HDL não houve diferença estatística na comparação entre os grupos tratados com OERO ($36,57 \pm 3,40$) ou OERO+ β CD ($36,63 \pm 1,93$) e nem destes com o grupo controle ($33,3 \pm 2,33$) (Tabela 3).

Os valores de glicose obtidos a partir da análise das amostras mostraram redução significativa no grupo OERO+ β CD ($150,3 \pm 14,85$) quando comparado aos grupos OERO ($244 \pm 21,00$) e controle ($202,05 \pm 22,77$) (Tabela 4).

Os valores de proteínas totais, não apresentaram diferenças em relação ao grupo controle ($7,59 \pm 0,24$) nem entre os grupos experimentais OERO ($7,36 \pm 0,09$) e OERO+ β CD ($7,51 \pm 0,20$). Como apresentado na tabela 4, também não houve diferença estatística nos valores de albumina, quando comparado o grupo

controle ($2,57 \pm 0,12$) com os grupos OERO ($2,38 \pm 0,05$) e OERO+ β CD ($2,50 \pm 0,08$).

Dosagens de ureia e creatinina geralmente são apreciadas conjuntamente para diagnosticar e monitorar alterações renais. Neste trabalho, os resultados não apresentaram diferença estatística significativa quando comparados os grupos experimentais OERO ($31 \pm 2,26$) e OERO+ β CD ($28,09 \pm 2,61$) com o grupo controle ($33,60 \pm 2,97$) na dosagem de ureia, e creatinina, cujos valores foram: OERO ($0,62 \pm 0,04$), OERO+ β CD ($0,64 \pm 0,02$) e controle ($0,52 \pm 0,02$).

De acordo com a tabela 4, o grupo controle ($140 \pm 10,31$) não apresentou diferença estatística em AST na comparação aos grupos OERO ($140 \pm 15,36$) e OERO+ β CD ($141,91 \pm 7,03$). Já para valores de ALT, houve uma redução estatisticamente significativa no grupo OERO+ β CD ($51,72 \pm 2,33$) quando comparado ao grupo controle ($69,66 \pm 8,5$), mas não, quanto ao grupo OERO ($65,33 \pm 8,19$).

Tabela 4. Parâmetros bioquímicos de ratas tratadas, por 7 dias, com OERO e OERO+ β CD.

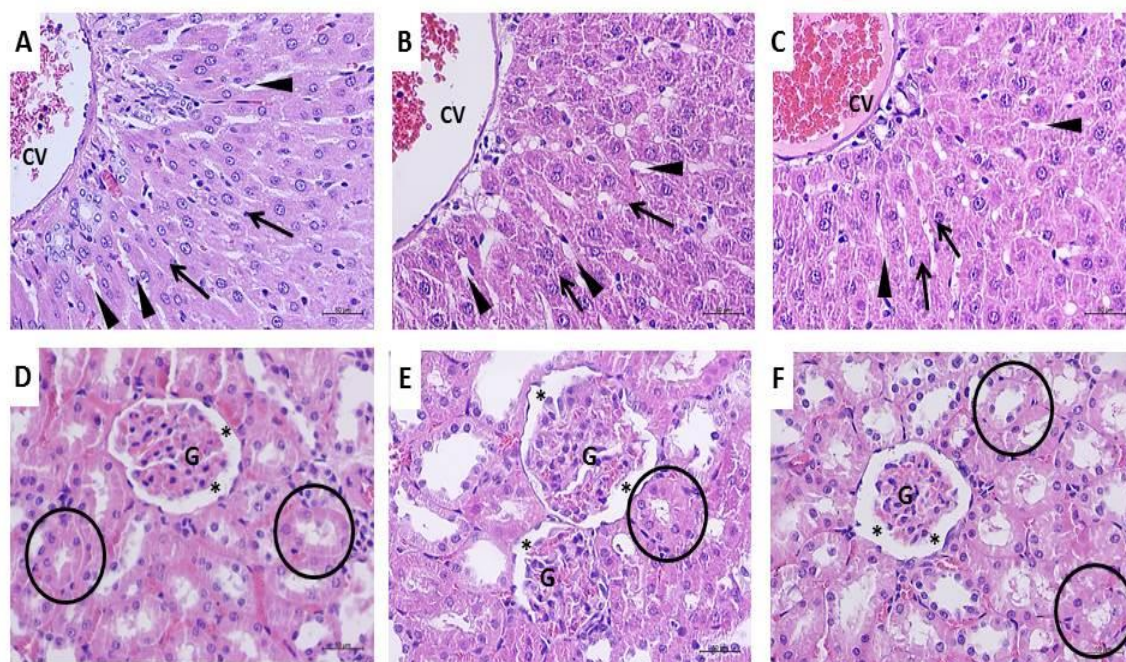
PARÂMETROS BIOQUÍMICOS	GRUPOS		
	CONTROLE	OERO (100 mg/kg)	OERO+ β CD (100 mg/kg)
TRIGLICERÍDEOS (mg/dL)	$38,71 \pm 4,21$	$49,83 \pm 7,63$	$47,45 \pm 5,01$
COLESTEROL (mg/dL)	$94,50 \pm 2,67$	$98 \pm 2,95$	$81,63 \pm 1,94^{**}$
HDL (mg/dL)	$33,3 \pm 2,33$	$36,57 \pm 3,40$	$36,63 \pm 1,93$
GLICOSE (mg/dL)	$202,05 \pm 22,77$	$244 \pm 21,00$	$150,3 \pm 14,85^{**}$
PROTEÍNAS TOTAIS (g/dL)	$7,59 \pm 0,24$	$7,36 \pm 0,09$	$7,51 \pm 0,20$
ALBUMINA (g/dL)	$2,57 \pm 0,12$	$2,38 \pm 0,05$	$2,50 \pm 0,08$
AST (UI)	$140 \pm 10,31$	$140 \pm 15,36$	$141,91 \pm 7,03$
ALT (UI)	$69,66 \pm 8,5$	$65,33 \pm 8,19$	$51,72 \pm 2,33^*$
UREIA (mg/dL)	$33,60 \pm 2,97$	$31 \pm 2,26$	$28,09 \pm 2,61$
CRETININA (mg/dL)	$0,56 \pm 0,02$	$0,62 \pm 0,04$	$0,62 \pm 0,02$

Os valores representam média \pm E.P.M. HDL: *High Density Lipoproteins*. ALT: alanina aminotransferase, AST: aspartato aminotransferas. * $p < 0,05$ comparado ao grupo controle. # $p < 0,05$ comparado ao grupo OERO. ANOVA, teste de Tukey. $n = 7-11$ /grupo.

3.3 Características histológicas dos tecidos hepático e renal após tratamento com o óleo essencial de *Rosmarinus Officinalis* L. livre e complexo em β -ciclodextrina.

Nos tecidos hepático e renal dos animais avaliados constatou-se que os grupos apresentaram padrões de normalidade. No fígado dos três grupos foram facilmente visualizados lóbulos hepáticos, espaços porta e veias hepáticas bem delineados. Os hepatócitos formavam cordões confluentes para a veia centrolobular (Figura 4 - A, B, C). A morfologia dos rins apresentou-se muito semelhante nos três grupos, nos quais se observaram corpúsculos renais e túbulos contorcidos proximais e distais dentro dos padrões de normalidade (Figura 4 - D, E, F).

Figura 2 - Análise histológica do fígado e rim dos animais tratados com OERO (100 mg/kg) e OERO+ β CD (100 mg/kg).



(A) fígado do grupo Controle, (B) fígado do grupo OERO e (C) fígado do grupo OERO + β CD. Hepatócitos (setas), veia central (CV) e capilar sinusoidal (pontas). (D) tecido renal do grupo Controle, (E) tecido renal do grupo OERO e tecido renal do grupo OERO + β CD. Glomérulo (G), espaço capsular (*) e túbulos renais (círculos). Todas as imagens são coradas com hematoxilina e eosina; ampliação original em 600 x.

Para avaliação de toxicidade celular o fígado foi examinado quanto à presença de infiltração, necrose, vacuolização do citoplasma e fragmentação nuclear. A avaliação das alterações teciduais quanto ao grau de dano hepático foi numerada gradualmente, seguindo escores que vão de 0 a 3, em que 0 indica ausência de dano, 1 indica dano baixo, 2 indica dano moderado e 3 dano intenso (VASCONCELOS et al., 2019). Não houve diferença significativa entre os animais que receberam OERO livre e complexado com β -CD e os animais do grupo controle (Tabela 5).

Tabela 5. Avaliação histopatológica do fígado dos animais tratados com OERO (100 mg/kg) e OERO+ β CD (100 mg/kg).

PARÂMETROS	CONTROLE	OERO	OERO+ β CD
Inflamação	0	0	0
Necrose	0	0	0
Vacuolização espumosa do citoplasma	0	0	0
Fragmentação Nuclear	0	0	0

Score: 0-3. Teste de Kruskal Wallis, seguido pelo teste de Dunn.

O tecido renal foi avaliado pelo score renal que inclui os seguintes parâmetros: presença de hiper celularidade glomerular, afecção tubular renal (dilatação do lúmen e/ou células degeneradas), lesões dos vasos corticais renais e infiltração celular. A classificação varia de 0 a 3, sendo 0 = sem anormalidades, 1 = alterações que afetam menos de um terço da amostra, 2 = alterações que afetam um a dois terços da amostra e 3 = alterações que afetam mais de dois terços da amostra (VASCONCELOS et al., 2019). Os resultados sugerem discretas alterações, mas sem evidência significativa de lesão renal causada pela administração, por via oral, do óleo essencial de *Rosmarinus officinalis* L. livre e complexado em β -CD (Tabela 6).

Estes dados corroboram com os testes bioquímicos, citados anteriormente, que avaliaram função renal através da dosagem de ureia e creatinina e não evidenciaram nefrotoxicidade.

Tabela 6. Avaliação histopatológica do rim dos animais tratados com OERO (100 mg/kg) e OERO+ β CD (100 mg/kg).

PARÂMETROS	CONTROLE	OERO	OERO+ β CD
Score renal	0	0	0

Score: 0-3. Teste de Kruskal Wallis, seguido pelo teste de Dunn.

4. DISCUSSÃO

A incorporação de um novo material em aplicações biomédicas exige uma avaliação completa de possíveis danos em organismos vivos. Desta forma, torna-se necessário que sejam realizadas pesquisas *in vitro* e *in vivo* de toxicidade, que contribuam para decifrar a ação de diferentes substâncias durante a sua interação com os tecidos.

Os resultados do teste de MTT evidenciam ausência de citotoxicidade do OERO e OERO+ β CD nas concentrações abaixo de 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Corroborando com nosso experimento, Blank et. al. (2016) atestou que o óleo essencial de alecrim não demonstrou toxicidade celular em concentrações de 0,023 $\mu\text{g/mL}$. Estudo da toxicidade com a utilização do óleo essencial de alecrim puro e dissolvido (10^{-4} e 10^{-5}) em linfócitos humanos também considerou segura sua utilização (MENA-HUERTAS et al., 2016). Nas concentrações de 200 a 800 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, tanto o OERO como o OERO+ β CD apresentaram apenas pequena redução de viabilidade celular.

É descrito na literatura que amostras que apresentaram valor de $CC_{50} < 10 \mu\text{g.mL}^{-1}$ foram consideradas altamente tóxicas, tóxicas quando $10 < CC_{50} < 100 \mu\text{g.mL}^{-1}$, moderadamente tóxicas $100 < CC_{50} > 1000 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e não tóxicas $CC_{50} > 1000 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Isto é, quanto maior o valor da CC_{50} , menos ativa é a substância contra a linhagem de célula analisada (OSÓRIO et al., 2007). O cálculo da CC_{50} também confirma a ausência de citotoxicidade do OERO e OERO+ β CD e os classifica como seguros.

Analisando a toxicidade pré-clínica, a pesquisa de parâmetros bioquímicos ajuda a identificar o estado geral de saúde do animal após o tratamento e ainda sugere os principais órgãos acometidos em caso de toxicidade (LIMA et al., 2014). Neste trabalho, foram encontradas alterações nos valores de colesterol, glicose e alanina aminotransferase (ALT).

Estudos do perfil lipídico através das dosagens de colesterol e triglicerídeos possuem elevado interesse clínico devido a correlação direta com a ocorrência de doenças cardiovasculares, principalmente as causadas pela formação de trombos patológicos (HASSANEN, 2015). Seyedemadi et al. (2016), avaliando o tratamento com extrato hidro-alcoólico de folhas de *Rosmarinus officinalis* L., verificaram que os níveis de colesterol total, LDL e triglicérides foram significativamente reduzidos no soro de ratos suplementados com o extrato hidroalcoólico nas doses de 50, 75 e 100 mg/kg/dia por 30 dias, sendo atribuído esse efeito aos compostos fenólicos do alecrim. O mesmo resultado foi encontrado em camundongos que receberam extratos das folhas de alecrim. Neles a redução dos níveis de colesterol e também de glicose plasmática foram atribuídos à ação do ácido carnósico (IBARRA et al., 2011; WANG et al., 2012). Neste trabalho, os resultados demonstram que, não houve diferença significativa no grupo OERO quando comparado ao grupo controle, mas houve uma redução significativa, nos animais do grupo OERO+ β CD quando comparados aos do grupo OERO e grupo controle, evidenciando um possível efeito da CD na redução do colesterol. O mesmo já documentado em pesquisas anteriores realizadas com ciclodextrinas (KAEWPRASERT, OKADA, AOYAMA, 2001; MISTRY; VERKADE; TIETGE, 2017; SAKURAI et al., 2017).

A concentração plasmática adequada de glicose é essencial para o funcionamento do organismo e para isso são utilizadas diferentes vias de manutenção da glicemia em estados normais ou em situações anormais, como de jejum prolongado (SILVEIRA et al., 2011). Nesta pesquisa, os valores de glicose encontrados foram menores no grupo OERO+ β CD quando comparados ao grupo OERO e grupo controle. A administração de óleo essencial de *Rosmarinus officinalis* L. corrigiu significativamente a hiperglicemia induzida pela intoxicação por aloxana em trabalho apresentado por Selmi et al. (2017). De acordo com Deepa e Anuradha (2011) o efeito anti-hiperglicêmico pode ser devido à presença de componentes voláteis, como 1,8-cineol e α -pinene, que atuam reduzindo o nível de glicose no plasma, aumentando os níveis de insulina e ajudando na utilização da glicose pelas células.

Há evidências crescentes de que os metabólitos secundários das plantas, especialmente os polifenóis, podem modular o aumento pós-prandial dos níveis

de glicose no sangue. Estudos mostraram propriedades anti-hiperglicêmicas de vários alimentos à base de plantas polifenólicas que podem ser associados adicionalmente à atividade inibidora de α -glicosidase e α -amilase a uma inibição da absorção intestinal de glicose (NISTOR et al., 2010; FUJITA et al., 2015).

A redução dos valores de glicose no OERO+ β CD quando comparado ao grupo OERO sugere uma melhor ação dos compostos volatéis do óleo quando complexado em β -CD.

O plasma contém diversas proteínas como a albumina, globulinas, enzimas, proteínas específicas de transporte, hormônios proteicos e fatores de coagulação. A dosagem das proteínas totais e albumina presente no plasma oferece um bom critério para avaliação da presença de doenças sistêmicas e disfunção renal. A albumina participa também do transporte sanguíneo de vários fármacos e sua dosagem contribui para avaliar a intensidade e duração do efeito de medicamentos (ALVARENGA, 2012).

Proveniente do catabolismo proteico, a ureia é um produto metabólico nitrogenado sintetizado no fígado, como produto final da quebra de aminoácidos, transportado pelo plasma e eliminado pelos rins, na urina. A insuficiência renal reduz a excreção de ureia e conseqüentemente eleva a concentração sorológica destes parâmetros. A creatinina é um produto metabólico formado pela descarboxilação da creatina fosfato no músculo. Seu catabolismo é lento, constante e proporcional à massa muscular individual e sua eliminação, ocorre pela urina. Assim como a ureia, alterações na concentração plasmática de creatinina evidenciam disfunção renal (DUSSE et al., 2017).

Neste trabalho não foram evidenciadas alterações nos valores de proteínas totais, albumina, ureia e creatinina, sugerindo que o tratamento com o OERO livre e complexado não induz alterações renais e hepáticas.

Na investigação de parâmetros bioquímicos, alterações das enzimas aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT) são referenciadas na literatura como indicadoras de lesão hepática (KUMAR et al., 2015; SCHMITT et al., 2016). AST está presente nos hepatócitos e nas células cardíacas e musculares, enquanto ALT é encontrada predominantemente nos hepatócitos, sendo, portanto, a mais específica para avaliação hepática. Qualquer injúria tissular ou doença afetando o parênquima hepático liberará maior

quantidade da enzima para a corrente sanguínea, elevando os níveis séricos da ALT (SCHMITT et al. 2016). Níveis reduzidos de ALT nos animais do grupo OERO+ β CD concordam com estudo de Gutiérrez et al. (2010) e Abdel-Wahhab et al. (2011) que mostraram que o extrato metanólico de alecrim restaura a atividade da ALT elevada tanto no dano hepático agudo quanto nos modelos experimentais de cirrose hepática. O mesmo foi apresentado por El-Demerdash et al. (2016) que observaram normalização das transaminases hepáticas, após lesão induzida por creosoto, em ratos tratados com extrato de alecrim. De acordo com Hamza et al (2016) o efeito hepatoprotetor do alecrim ocorre pela ação do ácido rosmarínico e carnazol e em pesquisa realizada por Rašković et al. (2014) o OERO também agiu reduzindo os níveis de ALT e AST.

Os rins e fígado possuem as funções vitais de excreção e metabolização, respectivamente. Os rins, exercem importante papel depurador do sangue, excretando substâncias polares e hidrossolúveis O fígado metaboliza uma enorme variedade de compostos, não só endógenos, mas, também, exógenos sendo mais suscetível à ação de compostos químicos pelo fato de qualquer substância administrada via oral, que sofre absorção no trato gastrointestinal ser transportada primeiramente para o fígado, pela veia porta hepática. Portanto, um agente tóxico vai primeiramente passar pelo fígado para ser distribuído na corrente sanguínea (PEREIRA, 2007; MARTELLI, 2010; SAMPAIO et. al., 2012)

Na análise histopatológica, os resultados obtidos neste estudo confirmam os dados apresentados por Aguilar et. al. (2008), que administrou OERO em ratas durante 90 dias, por via oral, na dose de 2400 mg/kg na dieta (equivalente a aproximadamente 195 mg/kg de massa corporal por dia) e não evidenciou alterações micro e macroscópicas no fígado desses animais. Do mesmo modo, estudo de segurança aguda dos extratos de alecrim foi realizado em ratos Wistar em uma dose oral única (gavagem) de 2.000 mg/kg de peso corporal. Nenhum efeito adverso ou mortalidade foram observados durante o período de observação de 2 semanas (ANADÓN et al., 2008). Wang et al. (2012) ao estudarem um dos compostos majoritários do OERO, ácido carnósico, verificaram que seu uso por trinta dias em ratos, nas doses de 0 (controle), 150, 300 e 600 mg/kg/dia também evidenciaram baixa toxicidade.

Assim, de acordo com o apresentado nos testes acima descritos, não há evidências de toxicidade no tratamento com OERO e OERO+ β CD por via oral em ratos fêmeas.

5. CONCLUSÃO

- OERO livre e o complexo OERO+ β CD pode ser considerado seguro para utilização por via oral, na dose de 100 mg/kg, pois não apresentou citotoxicidade em macrófagos murinos, reduziu os níveis de colesterol, glicose e ALT plasmáticos, e não evidenciou toxicidade renal e hepática após análise histopatológica.

REFERÊNCIAS

ABDEL-WAHHAB, K. et al. Protective effect of a natural herb (*Rosmarinus officinalis*) against hepatotoxicity in male albino rats. **Comunicata Scientiae**, v. 2, n.1, p. 9-17, 2011.

ABNT. Associação Brasileira de Normas Técnicas. SO 10993-1:2009. Avaliação biológica de produtos para a saúde. Parte 1: Avaliação e ensaio dentro de um processo de gerenciamento de risco. 2013.

AGUILAR, F. et al. Scientific opinion of the panel on food additives, flavourings, processing aids and materials in contact with food on a request from the commission on the use of rosemary extracts as a food additive. **The European Food Safety Authority Journal**, v. 721, p.1-29, 2008.

ALVARENGA, L. F. **Avaliação da toxicidade pré-clínica da *Hovenia dulcis***. 2012. Tese (Doutorado em Ciência da Bioquímica Agrícola) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2012.

ANADÓN, A. et al. Acute oral safety study of rosemary extracts in rats. **Journal of Food Protection**, v. 71, n. 4, p. 790-5, 2008.

ANDRADE, J. M. et al. *Rosmarinus officinalis* L.: an update review of its phytochemistry and biological activity. **Future Science OA**, v. 4, n. 4, p. FSO283, 2018.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Primeiro Suplemento do Formulário de Fitoterápicos da Farmacopeia Brasileira, 1ª edição. 2018.

BLANK, D. E. et al. Composição química e citotoxicidade de *Origanum vulgare* L. e *Rosmarinus officinalis* L. **Science and Animal Health**, v. 4, n. 2, p. 117-30, 2016.

BOZIN, B. et al. Antimicrobial and antioxidant properties of rosemary and sage (*Rosmarinus officinalis* L. and *Salvia officinalis* L., Lamiaceae) essential oils. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, n. 19, p. 7879–7885, 2007.

DEEPA, B., ANURADHA, C. V. Linalool, a plant derived monoterpene alcohol, Rescues kidney from diabetes-induced Nephropathic changes *via* blood glucose Reduction. **Diabetologia Croatica**, v.40, n.4, p.121-137, 2011.

DOMINGUES, E. A. et al. Estudo fitoquímico e avaliação da toxicidade frente a *Artemia salina* e da atividade antimicrobiana de *Calycorectes psidiiflorus* (O. Berg) Sobral, Myrtaceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n. 1, p. 23-27, 2010.

DUSSE, L.M.S. et al. Biomarcadores da função renal: do que dispomos atualmente? **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v. 49, n. 1, p. 41-51, 2017.

EL-DEMERDASH, F. M., ABBADY, E. A., BAGHDADI, H. H. Oxidative stress modulation by *Rosmarinus officinalis* in creosote-induced hepatotoxicity. **Environmental Toxicology**, v. 31, n. 1, p. 85-92, 2016.

ÉVORA, L.N.P. **Actividades biológicas e citotoxicidade do óleo essencial de *Rosmarinus officinalis* L.** 2015. Dissertação (mestrado em Segurança Alimentar) -- Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, Coimbra, 2015.

FUJITA, A. et al. Evaluation of phenolic-linked bioactives of camu–camu (*Myrciaria dubia* Mc. Vaugh) for antihyperglycemia antihypertension, antimicrobial properties and cellular rejuvenation. **Food Research International**, v. 77, p. 194–203, 2015.

GUTIÉRREZ, R. et al. Oxidative stress modulation by *Rosmarinus officinalis* in CCl₄-induced liver cirrhosis. **Phytotherapy Research**, v. 24, n. 4), p. 595-601, 2010.

HAMZA, B. et al. Chemical composition and properties of essential oil of *Rosmarinus officinalis* and *Populus alba*. **World Journal Of Pharmacy And Pharmaceutical Sciences**, v. 5, n.9, p. 108-19, 2016.

HASSANEN, N. H. M. Protective Effect of Nutmeg and Rosemary on Oxidative Stress in Hypercholesterolemic Rats. **International Journal of Nutrition and Food Sciences**, v. 4, n. 4, p. 465-476, 2015.

HOLANDA, T. M. **Efeito do óleo essencial da *Alpinia zerumbet* na função cardiovascular e autonômica de ratos com infarto agudo do miocárdio**

induzido por isoproterenol. 2015. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) - Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2015.

HUSSAIN, A. I. et al. *Rosmarinus officinalis* essential oil: antiproliferative, antioxidant and antibacterial activities. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 41, n. 4, p.1070-8, 2010.

IBARRA, A. et al. Carnosic acid-rich rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) leaf extract limits weight gain and improves cholesterol levels and glycaemia in mice on a high-fat diet. **British Journal of Nutrition**, v. 106, n. 8, p. 1182-89, 2011.

KAEWPRASERT, S., OKADA, M., AOYAMA, Y. Nutritional effects of cyclodextrins on liver and serum lipids and cecal organic acids in rats. **Journal of Nutritional Science and Vitaminology**, v.47, n. 5, p. 335-9, 2001.

KUMAR, V. et al. Protective effects of *Centella asiatica* against isoproterenol-induced myocardial infarction in rats: biochemical, mitochondrial and histological findings. **Journal of Phytopharmacology**, v.4, n.2, p. 80-86, 2015.

LIMA, C. M. P. et al. Avaliação da toxicidade aguda do extrato das cascas de *Pithecellobium cochliocarpum* (Gomez) Macbr. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 16, n. 4, p. 832-38, 2014.

LUSTOSA, A. K. M. F. et al. Immunomodulatory and toxicological evaluation of the fruit seeds from *Platonia insignis*, a native species from Brazilian Amazon Rainforest. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 26, v. 1, p. 77-82, 2016.

MARTELLI, A. Metabolismo Hepatocelular dos Lipídeos: uma Abordagem Clínica e Histopatológica do Acúmulo Intracelular de Lipídeos (Esteatose) do Parênquima Hepático Induzida pelo Álcool. **Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 12, n. 1, p. 55-9, 2010.

MENA-HUERTAS, S. J. et al. Cytotoxic and mutagenic innocuousness of essential oils of *Rosmarinus officinalis* L. and *Ruta graveolens* L. as a promising complimentary treatment of *Helicobacter pylori* infection. **Actualidades Biológicas**, v. 38, n. 104, p. 37-44, 2016.

MISTRY, R. H., VERKADE, H. J., TIETGE, U. J. F. Absence of intestinal microbiota increases β -cyclodextrin stimulated reverse cholesterol transport. **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 61, n. 5, p. 1-31, 2017.

MORAIS, I. C. P. S. **Efeito do fitoestrógeno diosgenina sobre a função cardiovascular em modelo de menopausa induzida por ovariectomia.** 2015. Dissertação (mestrado em Farmacologia) – Universidade Federal do Piauí, Teresina, 2015.

NISTOR, L. A. et al. Inhibition of intestinal glucose absorption by anti-diabetic medicinal plants derived from the James Bay Cree traditional pharmacopeia. **Journal of Ethnopharmacology**, v.132, p. 473-482, 2010.

NOGUEIRA, I. A. L. et al. Efeito Citotóxico do *Synadenium umbellatum*. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 4, n. 2, p. 50-3, 2007.

OECD - Organisation For Economic Co-Operation And Development. Guidance document on using cytotoxicity tests to estimate starting doses for acute oral systemic toxicity tests. OECD Environment, Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment, n. 129 – ENV/JM/MONO (2010). 1-54.

OLIVEIRA, M. P. **Análise *in vitro* da citotoxicidade e proliferação celular em equivalentes de pele humana**. 2009. Dissertação (mestrado em Medicina e Ciências da Saúde) – Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2009.

OSÓRIO, E. et al. Antiprotozoal and cytotoxic activities *in vitro* of Colombian Annonaceae. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 111, p. 630–635, 2007.

PEREIRA, D. G. Importância do metabolismo no planejamento de fármacos. **Química Nova**, v.30, n.1, p.171-177, 2007.

PENALVA, R. A. et al. Perfil lipídico e intensidade de doença aterosclerótica na síndrome coronariana aguda. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 90, n. 1, p. 24-30, 2008.

PINTO, M. S. C. **Efeitos dos polissacarídeos sulfatados da alga marinha *Gracilaria caudata* em ratos no modelo de periodontite induzida por ligadura**. 2015. Dissertação (Mestrado em Ciências Biomédicas) - Universidade Federal do Piauí, Parnaíba, 2015.

PINTO, T. J. A., KANECO, T. M., PINTO, A. F. **Controle biológico de qualidade de produtos farmacêuticos, correlatos e cosméticos**. 3. ed. São Paulo: Atheneu, 2010.

RAŠKOVIĆ, A. et al. Antioxidant Activity of Rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) Essential Oil and its Hepatoprotective Potential. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 14, n. 225, 2014.

SAKURAI, T. et al. Dietary α -cyclodextrin reduces atherosclerosis and modifies gut flora in apolipoprotein E-deficient mice. **Molecular nutrition & food research**, v. 61, n. 8, p. 1-22, 2017.

SAMPAIO, J. et al. Estudo da genotoxicidade *in vitro* e *in vivo* após exposição aguda e subcrônica de extratos aquosos de *Ilex paraguariensis* A. St.-Hil. obtidos por infusão. **Revista Brasileira de Biociências**, 2012.

SCHMITT, G.C. et al. Gender differences in biochemical markers and oxidative stress of rats after 28 days oral exposure to a mixture used for weight loss containing *p*-synephrine, ephedrine, salicin, and caffeine. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 52, n. 1, p. 59-68, 2016.

SELMI, S. et al. Rosemary (*Rosmarinus officinalis*) essential oil components exhibit anti-hyperglycemic, anti-hyperlipidemic and antioxidant effects in experimental diabetes. **Pathophysiology**, v. 24, n. 4, p. 297-303, 2017.

SEYEDEMADI, P. et al. The Neuroprotective Effect of Rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) Hydro-alcoholic Extract on Cerebral Ischemic Tolerance in Experimental Stroke. **Iranian Journal of Pharmaceutical Research**, v. 15, n. 4, p. 875-883, 2016.

SILVEIRA, L. R. et al. Regulação do metabolismo de glicose e ácido graxo no músculo esquelético durante exercício físico. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 55, n. 5, p. 303-313, 2011.

SIQUEIRA-LIMA, et al. β -cyclodextrin complex containing Lippia grata leaf essential oil reduces orofacial nociception in mice—evidence of possible involvement of descending inhibitory pain modulation pathway. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, v.114, n. 2, p. 188–96, 2014.

VASCONCELOS, A. C. C. G. et al. Periodontitis causes abnormalities in the liver of rats. **Journal of Periodontology**, v. 90, n. 3, p. 295-305, 2019.

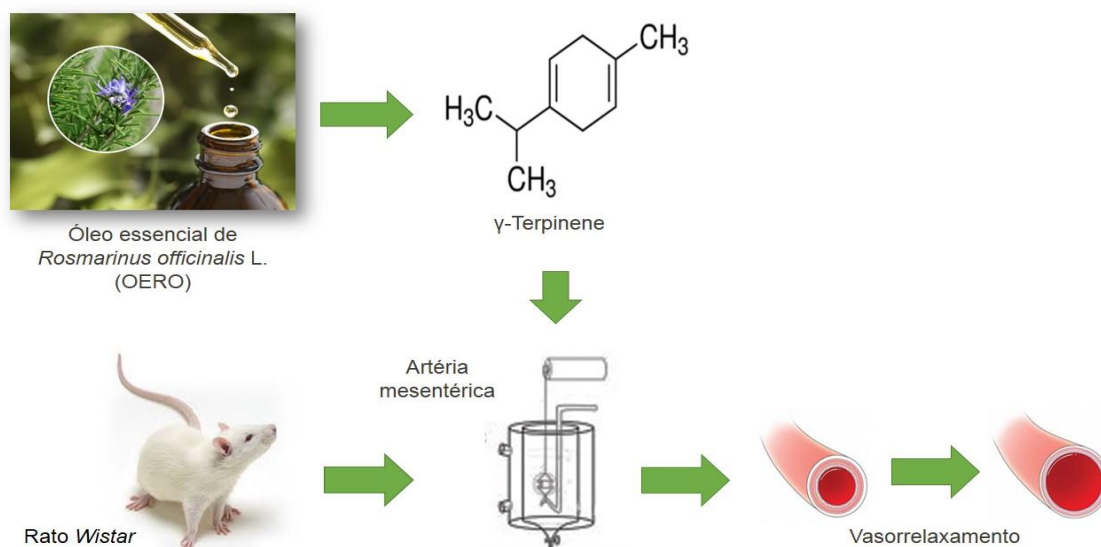
WANG, Q. L. et al. Acute and 30-day oral toxicity studies of administered carnosic acid. **Food and Chemical Toxicology**, v. 50, n. 12, p. 4348-55, 2012.

YU, M. H. et al. Suppression of LPS-induced inflammatory activities by *Rosmarinus officinalis* L. **Food Chemistry**, v. 136, n. 2, p. 1047-1054, 2013.

CAPÍTULO 3

AÇÃO VASORRELAXANTE DO MONOTERPENO γ -TERPINENO EM ARTÉRIA MESENTÉRICA SUPERIOR ISOLADA DE RATO

RESUMO GRÁFICO



RESUMO

O presente estudo teve como objetivo investigar o potencial vasorrelaxante de um dos constituintes do óleo essencial de *Rosmarinus officinalis* (OERO), γ -terpineno, em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos. A referida artéria foi retirada do animal e seccionada em anéis (2-4 mm), que foram mantidos em solução de Tyrode e aerados com carbogênio (95% O₂ e 5% CO₂). Os resultados demonstraram que o γ -terpineno (10^{-9} - 10^{-2} M) promoveu efeito vasorrelaxante na presença ($pD_2=5,58 \pm 0,02$) e na ausência do endotélio vascular ($pD_2=5,34 \pm 0,03$) sobre contrações induzidas por fenilefrina (10^{-5} M). A incubação com diferentes concentrações de γ -terpineno (10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} e 10^{-6} M) não atenuou as contrações induzidas por adição cumulativa de fenilefrina (10^{-9} - 10^{-5} M). No entanto, o pré-tratamento com bloqueador não seletivo de canais de potássio,

tetraetilamonio (TEA) reduziu significativamente o vasorrelaxamento induzido pelo γ -terpineno ($pD_2=3,75\pm 0,09$). Conclui-se que o γ -terpineno exerce efeito vasorrelaxante de maneira dependente de concentração e independente do endotélio vascular por mecanismos que, provavelmente, envolvem a participação dos canais de potássio.

Palavras-chave: γ -terpineno; vasorrelaxamento; artéria mesentérica; canais de potássio.

1. INTRODUÇÃO

Desde a Antiguidade, as plantas medicinais são amplamente empregadas com fins terapêuticos no tratamento e prevenção de diversas patologias, constituindo a forma de medicação mais antiga e mais difundida no mundo (GANESAN, 2008). Tais aplicações perduram ao longo dos anos e a maioria dos fármacos modernos é desenvolvida de compostos de plantas medicinais com bases nos seus usos e aplicações etnofarmacológicas (BHATTARAM et al., 2002; SOUZA-MOREIRA; SALGADO; PIETRO, 2010).

Dessa forma, as plantas medicinais são de grande interesse para a pesquisa farmacológica no desenvolvimento de novos medicamentos, não somente com a aplicação direta da planta como agente terapêutico, mas também as utilizando como matéria-prima para a síntese de novos fármacos ou como modelo estrutural para o desenvolvimento de compostos biologicamente ativos (ANDRADE et al., 2018). Podem assim, ser utilizadas sob a forma de infusão de ervas, preparações farmacêuticas, tais como extratos, comprimidos ou cápsulas, por extração e purificação de compostos ativos (FRANÇA et al. 2008).

Nesse contexto, o Brasil representa uma importante fonte para estudo das propriedades químicas e farmacológicas de produtos de origem natural, uma vez que apresenta grande biodiversidade biológica (BARREIRO; BOLZANI, 2009).

A diversidade de alvos terapêuticos e as limitações de alguns fármacos em controlar algumas patologias, como as doenças cardiovasculares, incentiva a comunidade científica na continuidade dos estudos de identificação de substâncias extraídas da natureza com propriedades biológicas, que possam se

tornar uma fonte alternativa para um tratamento mais eficaz e com menos efeitos colaterais (CHAVES et al., 2010).

A Hipertensão Arterial Sistêmica (HAS) é a doença cardiovascular de maior impacto epidemiológico no mundo, em razão de sua alta prevalência na população e por constituir um fator de risco para o desenvolvimento de diversas patologias associadas ao sistema cardiovascular, como infarto agudo do miocárdio e insuficiência cardíaca congestiva (PELINO e PIZZIMENTI, 2014; MOZAFFARIAN et al., 2016; SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA, 2016).

Anormalidades no controle do tônus vascular, tanto dependente como independente do endotélio, são descritas na HAS e desempenham um importante papel no desenvolvimento de tal enfermidade, visto que o aumento da resistência vascular periférica dos pequenos vasos sanguíneos resulta em aumento da pressão arterial (PA) (MUNÍN et al., 2014; SEGADE et al., 2016; TASHAKORI-SABZEVAR et al., 2016).

Dentre as substâncias de origem natural de interesse farmacológico, os monoterpenos estão entre as mais estudadas e são os que mais apresentam potencial terapêutico sobre o sistema cardiovascular (SANTOS et al., 2015). O γ -terpineno é um monoterpeno encontrado no óleo essencial de *Rosmarinus officinalis* L. (OERO) utilizado na medicina popular como agente anti-inflamatório, antioxidante e antibacteriano (SILVA et al., 2010; RAMOS; BORGES; TEBALDI, 2012). Estudos comprovam a participação do γ -terpineno no OERO em concentrações que variam de 0,5 a 20% (OZCAN E CHALCHAT, 2008; STEFFENS, 2010; TADTONG et al., 2015; JARDAK et al., 2017). Pesquisa realizada por Takahashi et al. (2003) demonstrou que o γ -terpineno promoveu a inibição da oxidação *in vitro* de lipoproteínas de baixa densidade (LDL) e suprimiu o aumento dos níveis séricos de colesterol e triglicerídeos em ratos, processos que desempenham um papel central no desenvolvimento de aterosclerose que, por sua vez, está associada ao desenvolvimento de diversas complicações cardiovasculares (BREWER et al., 2007).

Considerando o efeito anticoagulante encontrado no OERO, o presente trabalho teve como objetivo investigar o potencial vasorrelaxante de um dos seus constituintes, o γ -terpineno, em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos. A artéria mesentérica superior, por ser um vaso de pequeno calibre,

participa da regulação da resistência vascular periférica global e com isso reflete as alterações pressóricas sistêmicas, podendo servir como modelo para a investigação da atividade biológica de substâncias naturais e sintéticas (WATTERSON; RATZ; SPIEGEL, 2005).

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Substâncias e reagentes

Foram utilizadas as seguintes ferramentas farmacológicas: tiopental sódico, cloridrato de L-(-)-fenilefrina, cloridrato de acetilcolina, tetratilamônio (TEA), tween 80 e γ -terpineno. Todos foram comprados da Sigma-Aldrich (EUA). No início de cada experimento, o γ -terpineno foi solubilizado em Tween 80 (0,1% v/v) e dissolvido em água destilada na concentração de 1 M (solução mãe), a partir da qual foram realizadas as diluições para obtenção das demais soluções.

2.2 Animais

Foram utilizados *Rattus norvegicus*, linhagem Wistar, fêmeas, pesando entre 200-250g, obtidos no biotério setorial do Núcleo de Pesquisas em Plantas Medicinais (NPPM) - UFPI. Os animais foram mantidos em condições controladas de temperatura ($22 \pm 2^\circ\text{C}$), com ciclo claro/escuro de 12 horas e livre acesso à água filtrada e ração padrão.

O uso dos animais seguiu os princípios e normas para utilização de animais em projetos de pesquisa e todos os procedimentos experimentais do projeto foram submetidos ao Comitê de Ética em Experimentação Animal da UFPI (CEUA/UFPI) e aprovados sob o número 275/16. Os procedimentos referentes à eutanásia dos animais foram realizados em consonância com a Lei nº 11.794 de 8 de outubro de 2008 do Decreto nº 6.899 de julho de 2009, regulamentada pela Resolução normativa vigente nº 37 de 15 de fevereiro de 2018.

2.3 Preparação de anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato

Para utilização da artéria mesentérica, os animais foram submetidos ao procedimento de eutanásia por uma superdose anestésica (75 mg/kg, tiopental sódico, i.p.) de acordo com o Parágrafo Único da Resolução N° 37, de 15 de fevereiro de 2017.

O sistema de cubas para órgãos isolados (AVS Projetos, SP) foi utilizado para a realização dos ensaios farmacológicos *in vitro* nas dependências do Laboratório de Farmacologia Cardiovascular do Núcleo de Pesquisas em Plantas medicinais (NPPM) – UFPI.

Após o procedimento de eutanásia, realizou-se uma incisão na região abdominal e a artéria mesentérica superior foi cuidadosamente removida e imersa em solução de Tyrode, aerada com uma mistura carbogênica (95% de O₂ e 5% de CO₂). Em seguida, a artéria foi manipulada para retirada dos tecidos conectivo e adiposo e seccionada em anéis (2-4 mm) do primeiro segmento da artéria. Os anéis foram inseridos individualmente em alças de aço inoxidável e suspensos por linhas de algodão fixadas a um transdutor de tensão acoplado a um sistema de aquisição (AECAD 1604, software AQCAD 2.3.6, AVS Projetos, SP) para o registro das tensões isométricas e mantidos em cubas contendo 6 mL de solução de Tyrode (pH 7,4) a 37°C e aeradas com carbogênio durante todo o experimento. Após a montagem do experimento, cada anel foi submetido a uma tensão constante de 0,75 gf por um período de 60 minutos. Durante este período de tempo, a solução nutritiva das cubas foi trocada a cada 15 minutos para evitar a interferência de metabólitos nas etapas posteriores (ALTURA; ALTURA, 1970).

Após o período de estabilização, a viabilidade dos anéis foi verificada com uma pré-contração de fenilefrina (10⁻⁵ M) e a integridade do endotélio vascular foi avaliada a partir da adição de acetilcolina (10⁻⁵ M). Os anéis com relaxamento superior a 70% sobre a pré-contração com fenilefrina foram considerados com endotélio funcional; já os anéis que apresentaram relaxamento inferior a 10% foram considerados desprovidos de endotélio vascular; anéis com relaxamento entre 10% e 70% foram descartados do experimento (FURCHGOTT; ZAWADZKI, 1980). Quando necessário, anéis sem endotélio foram obtidos mecanicamente através do atrito entre as paredes internas do vaso com a haste de metal.

2.4 Atividade vasorrelaxante

Após novo período de estabilização, os anéis com e sem endotélio vascular foram pré-contraídos com fenilefrina (10⁻⁵ M) e na fase tônica da contração foram adicionadas cumulativamente às cubas, concentrações crescentes de γ -terpineno (10⁻⁹ - 10⁻² M) para obtenção de uma curva concentração resposta. O relaxamento

foi medido através da comparação da tensão desenvolvida antes e após a adição de γ -terpineno. Após o experimento realizado para investigar a resposta vasorrelaxante, as preparações foram lavadas por 30 minutos e induziu-se uma contração com fenilefrina para verificar a reversão do relaxamento induzido pelo γ -terpineno.

Para avaliação da resposta contrátil da fenilefrina, na presença de concentrações de γ -terpineno, em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos, os anéis sem endotélio vascular foram pré-contraídos com adição cumulativa de fenilefrina (10^{-9} – 10^{-5} M) para obtenção de uma curva controle. Logo em seguida, as preparações foram lavadas e ao retorno dos valores do tônus basal, os anéis foram pré-incubados isoladamente com diferentes concentrações de γ -terpineno (10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} e 10^{-6} M). Após 30 minutos de incubação, realizou-se uma nova curva cumulativa com a adição de fenilefrina para obtenção de uma segunda curva concentração resposta.

Para verificação da participação dos canais de potássio na resposta vasorrelaxante do γ -terpineno em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos, os anéis sem endotélio vascular foram pré-incubados com tetratilamônio (TEA 3mM), um inibidor não seletivo dos canais de potássio. Após 30 minutos de incubação, foi induzida uma contração com fenilefrina (10^{-5} M) e na fase sustentada desta contração adicionou-se de maneira cumulativa γ -terpineno (10^{-9} - 10^{-2} M). A potência vasorrelaxante do γ -terpineno foi avaliada através de comparação dos valores de pD_2 e $Emax$ na presença e na ausência de TEA 3 mM.

2.5 Análise estatística

Todos os resultados foram relatados como média \pm Erro Padrão da Média (E.P.M). As medições estatísticas foram realizadas usando o software GraphPad Prism versão 6.01 (GraphPad Software, San Diego, CA, EUA). Foram realizados testes *t* de Student, para análise de diferença entre todas as médias e análise de variância (ANOVA) foi seguida do pós-teste Bonferroni. As diferenças entre os grupos foram consideradas significativas para $p < 0.05$.

As curvas concentração resposta do efeito vasorrelaxante foram obtidas através de regressão não linear com variação da inclinação da curva (*slope*

variável). Os valores de pD_2 correspondem ao logaritmo negativo do valor de EC_{50} (concentração capaz de induzir 50% da resposta máxima) e os valores de $Emax$ correspondem à média percentual de relaxamento do γ -terpineno para cada condição estudada.

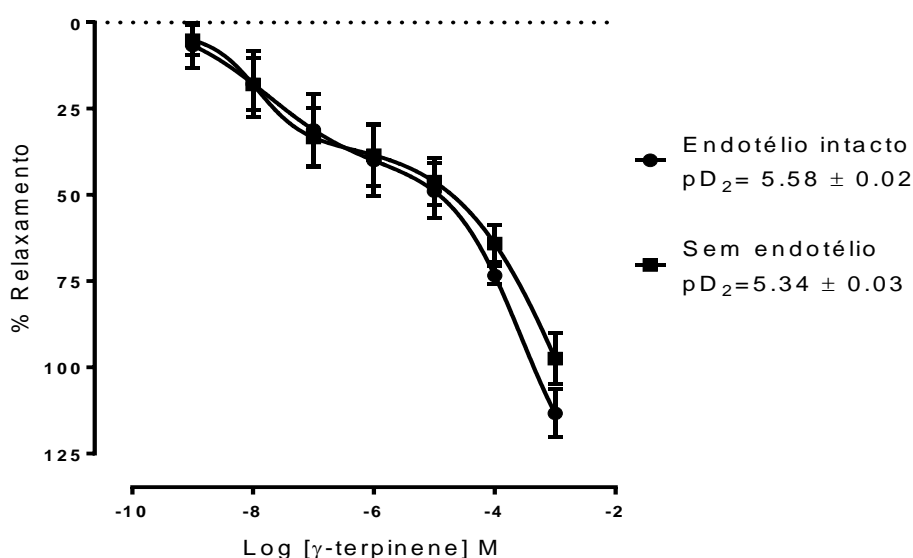
3. RESULTADOS

3.1 Efeito vasorrelaxante do γ -terpineno sobre contrações induzidas por fenilefrina em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato

Para avaliar o efeito vasorrelaxante induzido pelo γ -terpineno, utilizou-se como agente contrátil a fenilefrina, um agonista seletivo para os receptores adrenérgicos do tipo α_1 -adrenérgicos (HUANG et al., 2004; BANKAR et al., 2009).

Os resultados obtidos neste estudo demonstraram que a adição cumulativa de γ -terpineno (10^{-9} - 10^{-2} M) induziu um vasorrelaxamento dependente de concentração, na presença ($pD_2=5,58 \pm 0,02$; $Emax= 124,44 \pm 4,88\%$) e na ausência do endotélio vascular ($pD_2=5,34 \pm 0,03$; $Emax= 128,21 \pm 7,23\%$), em anéis de artéria mesentérica superior pré-contraídos com fenilefrina (10^{-5} M) (Figura 1).

Figura 1. Curvas concentração resposta do efeito vasorrelaxante do γ -terpineno em anéis de artéria mesentérica superior pré-contraídos com fenilefrina na presença (●) e na ausência (■) do endotélio vascular.

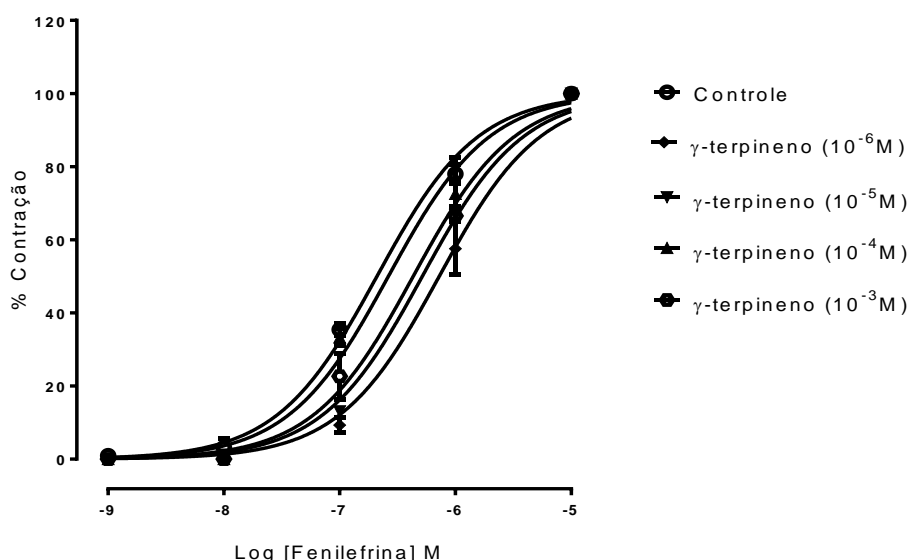


Valores expressos como média \pm E.P.M. (n= 5).

3.2 Efeito do γ -terpineno, em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato, sobre a reatividade vascular à fenilefrina

A incubação prévia com o monoterpeno γ -terpineno (10^{-6} , 10^{-5} , 10^{-4} e 10^{-3} M) não alterou de forma estatisticamente significativa as contrações induzidas pela adição cumulativa de fenilefrina (10^{-9} - 10^{-5} M) uma vez que não houve um deslocamento da curva concentração-resposta para a direita, nem redução do efeito máximo (Figura 2).

Figura 2. Curvas concentração resposta para fenilefrina na presença de concentrações isoladas de γ -terpineno em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato.



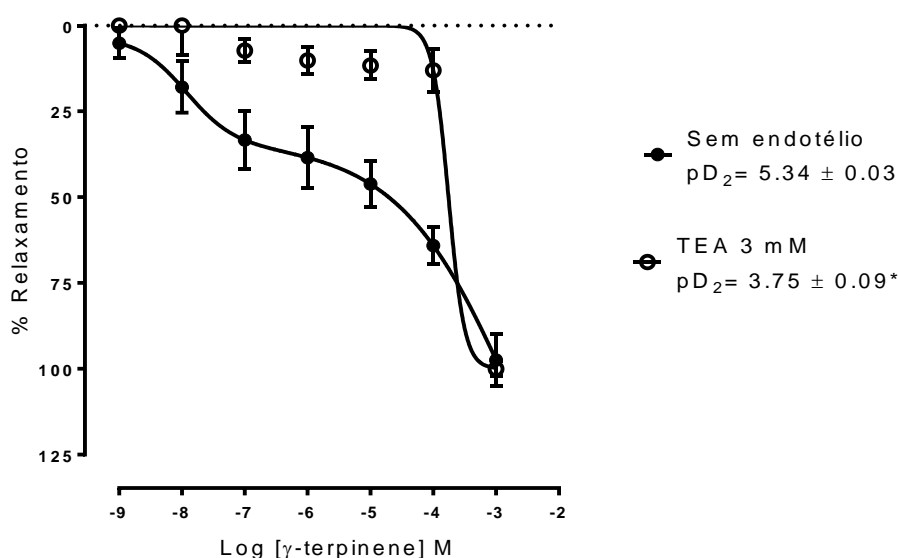
Valores expressos como média \pm E.P.M. (n=5).

3.3 Efeito do γ -terpineno sobre o vasorrelaxamento de anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato, pré-incubados com TEA

Neste estudo em preparações com anéis de artéria mesentérica superior, sem endotélio, pré-contraídos com fenilefrina (10^{-5} M), a incubação por 30 minutos com TEA 3 mM que é um bloqueador não seletivo dos canais de potássio presentes na membrana (QUAYLE; NELSON; STANDEN, 1997), promoveu um deslocamento acentuado para a direita da curva concentração resposta, com atenuação do vasorrelaxamento induzido pela adição cumulativa de γ -terpineno

(10^{-9} - 10^{-2} M) juntamente com alterações significativas no efeito máximo (sem endotélio: $pD_2 = 5,34 \pm 0,03$, $E_{m\acute{a}x} = 128,21 \pm 7,23\%$; TEA 3 mM: $pD_2 = 3,75 \pm 0,09^*$; $E_{m\acute{a}x} = 110,14^*$) (Figura 3).

Figura 3. Curvas concentração resposta do efeito vasorelaxante do γ -terpineno em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato, pré-contraídos com fenilefrina na ausência (●) e na presença (◉) de TEA 3 mM.



Valores expressos como média \pm E.P.M. * $p < 0,05$ versus sem endotélio. (n= 5).

4. DISCUSSÃO

O tônus da musculatura lisa vascular é o principal fator determinante da resistência vascular, cuja regulação é dependente de uma complexa interação entre estímulos vasodilatadores e vasoconstrictores oriundos de hormônios, neurotransmissores e fatores derivados do endotélio (ZAGO; ZANESCO, 2006).

Artérias de resistência, como a mesentérica superior, desempenham um papel preponderante na regulação do fluxo sanguíneo e na modulação da pressão arterial no sistema cardiovascular. Por esta razão, alterações estruturais na vasculatura de resistência, como o estreitamento dos vasos sanguíneos, o espessamento das paredes dos vasos, um aumento e/ou diminuição da rigidez, podem ter um impacto na mecânica da parede arteriolar e no controle e

modulação no sistema cardiovascular, contribuindo para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares tais como a hipertensão arterial, infarto do miocárdio e acidente vascular cerebral (PAIVA; FARIAS, 2005; CHRISTENSEN; MULVANY, 2011).

Lima et al. (2012) demonstraram em seu estudo a importância química natural dos óleos essenciais como bons candidatos para medicamentos anti-hipertensivos, relacionando a sua estrutura química com seu efeito farmacológico. Estes óleos caracterizam-se como metabólitos secundários de várias plantas, apresentando diversas atividades biológicas descritas, dentre elas, efeito vasorrelaxante em mesentérica e aorta de ratos (RIBEIRO et al., 2010).

Os monoterpenos, constituintes de uma variedade desses óleos essenciais, estão entre as moléculas mais estudadas e as que mais apresentam potencial terapêutico sobre o sistema cardiovascular (SANTOS, et al., 2011).

Neste trabalho demonstrou-se que o γ -terpineno, um monoterpeno presente no óleo essencial de *Rosmarinus officinalis* L. exerce efeito vasorrelaxante que se apresenta de forma dependente da concentração e independente do endotélio funcional, evidenciando que o vasorrelaxamento promovido por ele não envolve a participação de fatores relaxantes derivados do endotélio.

Resultados semelhantes foram encontrados em estudos anteriores como o de Peixoto-Neves et al. (2010), no qual, foi demonstrado que os monoterpenos timol e carvacrol induziram um relaxamento independente do endotélio em aorta isolada de ratos. Outros monoterpenos como o (-)-borneol e o α -terpineol também induziram efeito vasorrelaxante independente do endotélio vascular em artéria mesentérica de rato (SILVA-FILHO et al., 2012; SABINO et al., 2013).

Neste estudo, também, avaliou-se o efeito do monoterpeno γ -terpineno sobre a adição cumulativa de agonista adrenérgico em anéis de artéria mesentérica de rato (Figura 2). A fenilefrina é um agonista α_1 -adrenérgico que após ligar-se ao receptor leva o músculo liso a contração. O acoplamento farmacomecânico no músculo liso consiste, de maneira resumida, em: após interação da fenilefrina com o receptor α_1 -adrenérgico que está acoplado a proteína $G_{q/11}$, a subunidade α se dissocia das subunidades $\beta\gamma$ da proteína G, ativando a fosfolipase C que irá hidrolisar os fosfolípidos de membrana

fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato (PIP₂) para formação do inositol - 1,4,5 - trisfosfato (IP₃) e diacilglicerol (DAG). Este IP₃ por ser solúvel difunde-se pelo citosol e liga-se ao seu receptor no retículo sarcoplasmático (RIP₃), que induz liberação de cálcio dessa organela. Esta liberação de cálcio irá ativar os canais de cálcio induzido pelo cálcio (CICR) no retículo sarcoplasmático (riandínico). O DAG por sua vez, irá ativar a proteína cinase C (PKC) que irá fosforilar os canais de cálcio sensíveis à voltagem do tipo-L (Cav-L), que subsequentemente ativa o influxo de cálcio, através dos canais de cálcio, gerando assim um processo de contração do músculo liso vascular (KARAKI; WEISS, 1988; BANKAR et al., 2009, ZHANG et al; 2010).

De acordo com os resultados, a incubação prévia com γ -terpineno não apresentou diferença estatística sobre a contração induzida pela adição cumulativa de fenilefrina sugerindo que o vasorrelaxamento promovido pelo γ -terpineno não decorre de interação com os receptores α_1 -adrenérgicos em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos.

Dados da literatura demonstram que outros monoterpenos como, o borneol, linalol, timol, carvacrol, eugenol e citronelol além de promoverem efeito vasorrelaxante de uma maneira dependente de concentração e independente do endotélio, apresentam capacidade de antagonizar as contrações induzidas por adição cumulativa de CaCl₂ e fenilefrina (LAHLOU et al., 2002; BASTOS et al., 2010; LIMA et al., 2010; PEIXOTO-NEVES et al., 2010; SILVA-FILHO et al., 2012; ANJOS et al., 2013; SABINO et al., 2013). Embora o γ -terpineno não tenha demonstrado efeito sobre a inibição das contrações induzida por fenilefrina, não podemos descartar sua atuação sobre este mecanismo e principalmente sobre outros mecanismos que levam à redução do cálcio intracelular.

Os canais de potássio (K⁺) representam a via de condução iônica majoritária nas células musculares vasculares e, portanto, são essenciais na determinação da polarização da membrana plasmática e regulação do tônus vascular. Uma vez ativados, esses canais permitem o efluxo de K⁺ e determinam a hiperpolarização da membrana celular com posterior fechamento dos CaV, que reduzem a concentração citoplasmática de Ca²⁺ e levam ao relaxamento do músculo liso vascular (JACKSON, 2000; MARTÍN et al., 2014).

Como observado nos resultados, a atividade vasorrelaxante de γ -terpineno foi atenuada na presença do TEA, bloqueador não seletivo dos canais de potássio (Kv - Canais de potássio dependente de voltagem, KATP -Canais de potássio dependentes de ATP, KCa^{2+} - Canais de potássio ativados por Ca^{2+}) indicando que a substância estimula a hiperpolarização das células musculares lisas vasculares, via ativação desses canais. Alguns monoterpenos desencadeiam hiperpolarização da musculatura lisa vascular também por modular a ativação desses canais de modo semelhante ao demonstrado pelo γ -terpineno neste estudo. Um exemplo é o monoterpeno de (-)-borneol que ativa canais de potássio em aorta de rato (SILVA-FILHO et al., 2012), o α -terpineol que apresenta atividade semelhante em mesentérica de ratos normotensos (RIBEIRO et al, 2010) e linalol em artéria mesentérica de ratos normotensos e hipertensos (ANJOS, et al., 2013).

A ativação de canais de potássio na membrana do músculo liso vascular gera o aumento do efluxo de íons potássio causando uma hiperpolarização da membrana celular, levando ao fechamento dos canais de cálcio dependentes de voltagem, diminuindo a entrada de Ca^{2+} na célula, causando uma vasodilatação. Assim, a atividade proveniente dos canais de potássio é de suma importância para a manutenção do tônus vascular (SOBEY, 2001).

Deste modo, os resultados fornecem evidências que o monoterpeno γ -terpineno, um dos constituintes do OERO, regula o tônus vascular e apresenta importante efeito vasorrelaxante, podendo ser uma escolha valiosa para o desenvolvimento biotecnológico de novas alternativas para o tratamento das doenças cardiovasculares.

5. CONCLUSÃO

- O constituinte do OERO, γ -terpineno, exerce efeito vasorrelaxante, independente da presença do endotélio vascular, por mecanismos que, provavelmente, envolvem a participação dos canais de potássio.

REFERÊNCIAS

ALTURA, B. M., ALTURA, B. T. Differential effects of substrate depletion on drug-induced contractions of rabbit aorta. **American Journal of Physiology**, v. 219, n. 6, p.1698-1705, 1970.

ANDRADE, J. M. et al. *Rosmarinus officinalis* L.: an update review of its phytochemistry and biological activity. **Future Science AO**, v.4, n.4, FSO283, 2018.

ANJOS, P. J. et al. Cardiovascular effects induced by linalool in normotensive and hypertensive rats. **Zeitschrift für Naturforschung C**, v. 68, n. 5-6, p. 181-90, 2013.

BANKAR, GR. et al. Vasorelaxant effect in rat aortic rings through calcium channel blockage: a preliminary in vitro assessment of a 1, 3, 4-oxadiazole derivative. **Chemico-Biological Interactions**, v. 181, n. 3, p. 377-82, 2009.

BARREIRO, E. J., BOLZANI, V. S. Biodiversidade: fonte potencial para a descoberta de fármacos. **Química Nova**, v. 32, n.3, p. 679-88, 2009.

BASTOS, J. F. et al. Hypotensive and Vasorelaxant Effects of Citronellol, a Monoterpene Alcohol, in Rats. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, v. 106, n. 4, p. 331-7, 2010

BHATTARAM, V. A. et al. Pharmacokinetics and Bioavailability of Herbal Medicinal Products. **Phytomedicine**, v. 9, n. 3, p. 1-33, 2002.

BREWER, M. et al. Future approaches of nanomedicine in clinical. **Medical Clinics of North America**, v. 91, n. 5, p. 963-1016, 2007.

CHAVES, D. A. S. et al. Metabólitos secundários de origem vegetal: uma fonte potencial de fármacos antitrombóticos. **Química Nova**, v. 33, n. 1, p. 172-180, 2010.

CHRISTENSEN, K., MULVANY, M. J. Location of Resistance arteries. **Journal of Vascular Research**, v. 38, n. 1, p.1-12, 2011.

FRANÇA, I. F. G. et al. Medicina popular: benefícios e malefícios das plantas medicinais. **Revista Brasileira de Enfermagem**, v. 61, n.2, p. 201-8. 2008.

FURCHOGOTT, R. F., ZAWADZKI, J. V. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. **Nature**, v. 288, n. 5789, p. 373-6, 1980.

GANESAN, A. The impact of natural products upon modern drug discovery. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 12, n. 3, p. 306-17, 2008.

HUANG, J. S. et al. Cell signaling through thromboxane A2 receptors. **Cellular Signaling**, v. 16, n. 5, p. 521-33, 2004.

JACKSON, W. F. Íons channels and vascular tone. **Hypertension**, v. 35, n. 2, p. 173-8, 2000.

JARDAK, M. et al. Chemical composition, anti-biofilm activity and potential cytotoxic effect on cancer cells of *Rosmarinus officinalis* L. essential oil from Tunisia. **Lipids in Health and Disease**, v. 16, n.1, p.190, 2017.

KARAKI, H., WEISS, G. B. Calcium release in smooth muscle. **Life Sciences**, v. 42, n. 11, p. 111-22, 1988.

LAHLOU, S et al. Cardiovascular effects of 1,8-cineole, a terpenoid oxide present in many plant essential oils, in normotensive rats. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 80, n. 12, p. 1125-31, 2002.

LIMA, D.F. et al. Antinociceptive activity of the monoterpene – phellandrene in rodents: possible mechanisms of action. **Journal Pharmacy Pharmacology**, v. 64, p. 283–92, 2012.

LIMA, F. J. et al. The essential oil of *Eucalyptus tereticornis*, and its constituents alpha- and beta-pinene, potentiate acetylcholine-induced contractions in isolated rat trachea. **Fitoterapia**, v. 81, n. 6, p. 649-55, 2010.

MARTÍN, P, et al. Diversity of Potassium Channels in Human Umbilical Artery Smooth Muscle Cells: A Review of Their Roles in Human Umbilical Artery Contraction. **Reproduce Sciences**, v. 21, n.4, p. 432-41, 2014.

MOZAFFARIAN, D. et al. Executive Summary: Heart Disease and Stroke Statistics-2016 Update: A Report from the American Heart Association. **Circulation**, v. 133, n.4, p. 447-54, 2016.

MUNÍN, J. et al. Synthesis, biological evaluation and structure–activity relationships of new phthalazinedione derivatives with vasorelaxant activity. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 82, p. 407-17, 2014.

OZCAN, M. M, CHALCHAT, J. C. Chemical composition and antifungal activity of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) oil from Turkey. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, v. 59, n. 7-8, p. 691-8, 2008.

PAIVA, T. B., FARIAS, N. C. Mecanismos da contração do músculo liso vascular. **Revista Brasileira de Hipertensão**, v. 12, n. 2, p. 89-92, 2005.

PEIXOTO-NEVES, D. et al. Vasorelaxant effects of the monoterpenic phenol isomers, carvacrol and thymol, on rat isolated aorta. **Fundamental & Clinical Pharmacology**, v. 24, n. 3, p. 341-50, 2010.

PELINO, C. J., PIZZIMENTI, J. J. Essentials of hypertension: high blood pressure remains a major health issue worldwide, with profound--and often silent--multisystemic effects (effect of hypertension in ocular physiology). **Review of Optometry**, v. 151, n. 9, p. 88, 2014.

QUAYLE, J.M., NELSON, M.T., STANDEN, N.B. ATP-sensitive and inwardly rectifying potassium channels in smooth muscle. **Physiological Reviews**, v. 77, n. 4, p.1165-232, 1997.

RAMOS, E. T. A., BORGES, C. K. S., TEBALDI, V. M. R. Atividade bactericida dos extratos hidroalcoólicos de hera-roxa e capim-limão e dos óleos essenciais de orégano, tomilho e melaleuca sobre *Xanthomonas albilineans*. **Cadernos UniFoa**, v.7, n. 19, p. 65-71, 2012.

Ribeiro, T. P. Unravelling the cardiovascular effects induced by α -terpineol: A role for the nitric oxide-cGMP pathway. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v. 37, n.8, p. 811-16, 2010.

SABINO, C.K.B. et al. Cardiovascular effects induced by α -terpineol in hypertensive rats. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 28, n. 5, p. 333-39, 2013.

SANTOS, M. E. et al. Hypotensive and vasorelaxant effects induced by the ethanolic extract of the *Mimosa caesalpinifolia* Benth. (Mimosaceae) inflorescences in normotensive rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 164, p. 120-8, 2015.

SANTOS, M. R. V. et al. Cardiovascular effects of monoterpenes: a review. **Revista brasileira de farmacognosia**, v. 21, n. 4, p. 764-71, 2011.

SEGADE, M. et al. Involvement of endothelium in the vasorelaxant effects of 3, 4- DHPEA-EA and 3, 4-DHPEA-EDA, two major functional bioactives in olive oil. **Journal of Functional Foods**, v. 23, p. 637-646, 2016.

SILVA, J. P. L. et al. Óleo essencial de orégano: interferência da composição química na atividade frente a *Salmonella* Enteritidis. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 30, n.1, p. 136-141, 2010.

SILVA-FILHO, J. C. et al. Investigation of mechanisms involved in (-)-borneol-induced vasorelaxant response on rat thoracic aorta. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, v. 110, n. 2, p. 171-7, 2012.

SOBEY, C. G. Potassium Channel Function in Vascular Disease. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 21, n. 1, p. 28-38, 2001.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA. VII Diretrizes Brasileiras de Hipertensão. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 107, n. 3, p. 1-103, 2016.

SOUZA-MOREIRA, T. M., SALGADO, H. R. N., PIETRO, R. C. L. R. O Brasil no contexto de controle de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n. 3, p. 435-40, 2010.

STEFFENS, A. H. **Estudo da composição química dos Óleos Essenciais obtidos por destilação arraste a vapor em escala laboratorial e industrial.**

2010. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Tecnologia de Materiais) - Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2010.

TADTONG, S. et al. Chemical componentes of four essential oils in aromatherapy recipe. **Natural Product Communications**, v. 10, n. 6, p.1091-2, 2015.

TAKAHASHI, Y. et al. Effects of γ -Terpinene on Lipid Concentrations in Serum Using Triton WR1339-Treated Rats. **Bioscience Biotechnology and Biochemistry**, v.67, n.11, p. 2448-245, 2003.

TASHAKORI-SABZEVAR, F. et al. Evaluation of mechanism for antihypertensive and vasorelaxant effects of hexanic and hydroalcoholic extracts of celery seed in normotensive and hypertensive rats. **Revista Brasileira Farmacognosia**, v. 26, n. 5, p. 619-626, 2016.

WATTERSON, K. R., RATZ, P. H., SPIEGEL, S. The role of sphingosine-1-phosphate in smooth muscle contraction. **Cellular Signaling**, v. 17, n. 3, p. 289-98, 2005.

ZAGO, A. S., ZANESCO, A. Óxido nítrico, doenças cardiovasculares e exercício físico. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 87, n. 6, p. e264-e270, 2006.

ZHANG, D. Curdione attenuates thrombin-induced human platelet activation: β 1-tubulin as a potential therapeutic target. **Fitoterapia**, v. 116, p. 106-15, 2017.

CONCLUSÃO FINAL

- OERO livre, complexo OERO+ β CD e γ -terpineno causaram um estado de hipocoagulabilidade sanguínea que demonstra o efeito anticoagulante, quando utilizado por via oral;
- OERO livre e complexo OERO+ β CD não apresentou efeito antiagregante, após tratamento por via oral;
- OERO apresentou efeito antiagregante na concentração de 100 μ M;
- OERO livre e complexo OERO+ β CD não apresentou citotoxicidade e pode ser considerado seguro para utilização farmacológica;
- Complexo OERO+ β CD reduziu os níveis plasmáticos de glicose, colesterol e ALT;
- OERO livre e complexo OERO+ β CD não produziram lesões renais e hepáticas;
- γ -terpineno exerceu efeito vasorrelaxante, independente da presença do endotélio vascular, por mecanismos que, provavelmente, envolvem a participação dos canais de potássio.

PERSPECTIVAS

- Investigar o mecanismo específico do efeito anticoagulante do OERO, OERO+ β CD e γ -terpineno através de exames de dosagem de fatores de coagulação;
- Avaliar o efeito da administração prolongada do OERO e OERO+ β CD sobre a cascata de coagulação e agregação plaquetária;
- Determinar os subtipos de canais de potássio envolvidos no efeito vasorrelaxante do γ -terpineno.

AGRADECIMENTOS

- UFPI, RENORBIO, NPPM, CNPq (CHAMADA UNIVERSAL -MCTI/CNPq Nº 14/2014), CAPES E FAPEPI.