

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL- UFMS
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS, ALIMENTOS E NUTRIÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

DENISE CAROLINE LUIZ SOARES BASILIO

**Efeito antitrombótico e hepatoprotetor do óleo essencial de *Levisticum
officinale***

CAMPO GRANDE-MS

2025

DENISE CAROLINE LUIZ SOARES BASILIO

Efeito antitrombótico e hepatoprotetor do óleo essencial de *Levisticum officinale*

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Alimentos e Nutrição (FACFAN) da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, como requisito para obtenção do título de Doutor

Área de concentração: Ciências Farmacêuticas

Linha de Pesquisa: Investigação de alvos terapêuticos, estudos epidemiológicos e pré-clínicos

Orientador: Prof. Dr. Eduardo Benedetti Parisotto

Coorientador: Prof. Dr. Éverton do Nascimento Alencar

CAMPO GRANDE – MS

2025

AGRADECIMENTOS

À Deus expresso minha eterna gratidão, por me dar forças e sabedoria ao longo dessa jornada.

Ao meu esposo, Kaleb Basilio, agradeço por todo apoio, sem você esse sonho não teria se tornado realidade.

Aos meus pais, Anizio e Rosângela, pelo amor incondicional e por todo esforço para que me dedicasse exclusivamente aos estudos.

Aos meus familiares e amigos, meu agradecimento pelo encorajamento e palavras de conforto.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Eduardo Benedetti Parisotto, demonstro minha sincera gratidão, pois sua orientação e dedicação foram fundamentais em todos os processos. Agradeço por sua paciência e por sempre estar disponível para discutir e esclarecer as dúvidas mais simples. Obrigada!

Ao meu coorientador, Prof. Dr. Éverton do Nascimento Alencar, pela colaboração no desenvolvimento e aperfeiçoamento desse trabalho.

Ao Laboratório de Hematologia e Biologia Redox (HematoRedoxLab), meu muito obrigada pelo auxílio em todos os processos. Aos alunos de Iniciação Científica (ICs) do laboratório, Rafael Seiji Nakano Ota e Olivia Lopes Lucier agradeço por sua dedicação e comprometimento. Em especial, agradeço Isabelly Teixeira Espinoça e Paola Mayara Valente Coronel por tornarem esses anos muito mais fáceis e divertidos, muito obrigada!

À Dra. Nadla Soares Cassemiro, Prof. Dra. Denise Brentan Silva, Prof. Dra. Janaina de Cássia Orlandi Sardi, Dra. Kamylla Fernanda Souza de Souza, Prof. Dr. Edgar Julian Paredes Gamero, Prof. Dra. Naira Ferreira Anchieta, Prof. Dra. Renata Trentin Perdomo e Prof. Dra. Luciane Candeloro Portugal agradeço pelo apoio

essencial para o desenvolvimento desta pesquisa.

Agradeço ao Laboratório de Biofisiologia e seus colaboradores: Paloma Kênia de Moraes Berenguel Lossavaro, Joyce dos Santos Lencina, Prof. Dr. Saulo Euclides Silva Filho e Prof. Dr. Davi Campos La Gatta. Sua colaboração, suporte técnico e contribuições foram fundamentais para a realização deste trabalho.

Agradeço ao Laboratório de Purificação de Proteínas e suas Funções Biológicas (LPPFB) e ao Laboratório de Análises Clínicas (LAC), em especial as técnicas Débora, Regina e Liliane.

À Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS) pela oportunidade de realização deste trabalho de pesquisa.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da UFMS.

À CAPES, pelo auxílio financeiro concedido através da minha bolsa de doutorado.

Por fim, agradeço a todos que, de alguma forma, contribuíram para a realização desse trabalho. Muito obrigado a todos!

RESUMO

As doenças cardiovasculares e hepáticas representam um grande desafio para a saúde pública, tornando a busca por novos agentes terapêuticos crucial. Além disso, a identificação de novos tratamentos para essas condições deve ser acompanhada por ensaios de toxicidade garantindo a segurança e eficácia. O objetivo desse estudo foi avaliar a ação antitrombótica e hepatoprotetora do óleo essencial de *Levisticum officinale* (OELO) em modelos experimentais *in vitro* e *in vivo*. O OELO obtido de folhas oriundas da Hungria pela técnica de arraste a vapor foi submetido a caracterização química através da cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM). O protocolo desse estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética da UFMS (CAAE 57842022.2.0000.0021, parecer n.º 5.445.802). Para avaliação da toxicidade *in vitro* e *in vivo*, foi realizado o ensaio de exclusão de azul de trypan em plaquetas (*in vitro*) e a toxicidade sistêmica foi estudada por meio do modelo *in vivo* de larvas de *Galleria mellonella*. A avaliação da atividade antitrombótica foi determinada pelo ensaio de agregação plaquetária realizado por turbidimetria, usando os agonistas dos receptores de adenosina (ADP) e epinefrina (EPI). A coagulação foi determinada pelo tempo de atividade da protrombina (TP) e tempo de tromboplastina parcialmente ativada (TTPa). A ativação plaquetária foi avaliada pela expressão de P-selectina e conteúdo de espécies reativas de oxigênio (EROs) por citometria de fluxo e fluorescência, respectivamente. Para avaliação da atividade hepatoprotetora, os experimentos foram realizados em camundongos Balb/c machos (6 semanas, 25 ± 2 g). Quatro animais foram reservados para obtenção de neutrófilos utilizados no ensaio de quimiotaxia. O protocolo desse estudo foi aprovado pelo CEUA/UFMS (1.243/2022). Os demais animais foram alocados em seis grupos experimentais (n = 8/grupo). Grupo I (controle negativo - CN) e grupo II (paracetamol - PCT) receberam solução salina, veículo de dissolução de PCT e OELO. Grupo III foi pré-tratado com silimarina (SLM-200 mg/kg). Grupos IV-VI receberam OELO em diferentes doses (50, 200 e 400 mg/kg). Após 7 dias de tratamento, os grupos II-VI receberam PCT (300 mg/kg). Doze horas após a administração de PCT, os animais foram eutanasiados e o sangue foi coletado para análises bioquímicas de função hepática (AST, ALT e γ -GT). Os fígados dos camundongos foram extraídos para avaliações histológicas bem como de biomarcadores de inflamação e estresse oxidativo hepático (óxido nítrico - \bullet NO, mieloperoxidase - MPO, substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico – TBARS e glutatona reduzida - GSH). O ensaio de quimiotaxia de neutrófilos foi realizado usando uma placa de microquimiotaxia nas concentrações de 1 - 60 mg/mL de OELO. A caracterização química do OELO mostrou a presença de monoterpenos, incluindo α -terpinil acetato, β -felandreno, β -mirreno, α -terpineol e (Z)- β -ocimeno. O OELO não mostrou toxicidade *in vitro* e *in vivo*. O OELO diminuiu a agregação plaquetária induzida por ADP e EPI. O tratamento de plaquetas com OELO mostrou diminuição na expressão de P-selectina, bem como na produção de EROs. Por outro lado, OELO não interferiu no TP e TTPa. Em relação a avaliação hepatoprotetora, o pré-tratamento com OELO reverteu as alterações enzimáticas hepáticas induzidas por PCT. Além disso, diminuiu a atividade de MPO e a produção hepática de \bullet NO. Os cortes histológicos mostram fígados normais (sem alterações morfológicas) no grupo I. O Grupo II exibiu necrose severa. Grupos III-VI apresentaram vacuolização difusa, com menor necrose nos grupos OELO. O OELO diminuiu os valores de TBARS e restaurou as concentrações de GSH. O OELO preveniu a migração de neutrófilos. Os resultados demonstraram que o OELO apresenta ação antiplaquetária e hepatoprotetora. Ademais, os achados sugerem que tais efeitos farmacológicos possivelmente decorram da ação antioxidante do OELO, uma vez que o mesmo foi capaz de diminuir a produção de EROs em plaquetas humanas bem como proteger contra o estresse oxidativo tecidual induzido pelo PCT, inibindo o processo inflamatório hepático.

Palavras-chave: antioxidantes, espécies reativas de oxigênio, estresse oxidativo hepatoproteção, inflamação, trombose, *Levisticum officinale*

ABSTRACT

Cardiovascular and liver diseases represent a major challenge for public health, making the search for new therapeutic agents crucial. Furthermore, the identification of new treatments for these conditions must be accompanied by toxicity tests to ensure safety and efficacy. The aim of this study was to evaluate the antithrombotic and hepatoprotective action of *Levisticum officinale* essential oil (EOLO) in *in vitro* and *in vivo* experimental models. EOLO obtained from leaves from Hungary to capture the vapor was subjected to chemical characterization by gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS). The study protocol was approved by the UFMS Ethics Committee (CAAE 57842022.2.0000.0021, approval no. 5.445.802). To evaluate the *in vitro* and *in vivo* toxicity activity, the trypan blue exclusion test was performed on platelets (*in vitro*) and systemic toxicity was developed by an *in vivo* model of *Galleria mellonella* larvae. The evaluation of the antithrombotic activity was determined by the platelet aggregation assay performed by turbidimetry, using adenosine (ADP) and epinephrine receptor agonists (EPI). Coagulation was determined by active prothrombin time (PT) and partially activated thromboplastin time (aPTT). Platelet activation was assessed by P-selectin expression and reactive oxygen species (ROS) content by flow cytometry and fluorescence, respectively. To evaluate hepatoprotective activity, experiments were performed with male Balb/c mice (6 weeks, 25 ± 2 g). Four animals were reserved to obtain neutrophils used in the chemotaxis assay. The study protocol was approved by the UFMS Animal Ethics Committee (CEUA/UFMS 1.243/2022). The remaining animals were allocated into six experimental groups (n= 8/group). Group I (NC) and group II (APAP) received saline, paracetamol dissolution vehicle (APAP) and EOLO. Group III was pretreated with silymarin (SLM-200 mg/kg). Groups IV-VI received EOLO at different doses (50, 200 and 400 mg/kg). After 7 days, groups II-VI received APAP (300 mg/kg). Twelve hours after APAP administration, the animals were euthanized and blood was collected for biochemical analysis of liver function (AST, ALT and γ -GT). The livers of the mice were extracted for histological evaluations as well as biomarkers of inflammation and hepatic oxidative stress (nitric oxide - \bullet NO, myeloperoxidase -MPO, thiobarbituric acid reactive substances—TBARS e reduced glutathione-GSH). Neutrophil chemotaxis assay was performed using a microchemotaxis plate at concentrations of 1 - 60 mg/mL of EOLO. Chemical characterization of EOLO showed the presence of monoterpenes, including α -terpinyl acetate, β -phellandrene, β -myrcene, α -terpineol and (Z)- β -ocimene. EOLO demonstrated no toxicity *in vitro* and *in vivo*. EOLO resulted in platelet aggregation caused by ADP and EPI. Treatment of platelets with EOLO demonstrated a decrease in P-selectin expression as well as in ROS production. On the other hand, EOLO did not interfere with PT and aPTT. Regarding the evaluation of hepatoprotective activity, pretreatment with EOLO (50, 200 and 400 mg/kg) reversed the hepatic enzymatic alterations induced by APAP. In addition, MPO activity and hepatic \bullet NO production were increased. Histological sections show normal livers (without morphological alterations) in group I. Group II exhibited severe necrosis. Groups III-VI presented diffuse vacuolization, with less necrosis in the EOLO groups. EOLO included TBARS values and restored GSH concentrations. EOLO prevented neutrophil migration toward fMLP (10^{-6} M). Neutrophil chemotaxis assay was performed using a microchemotaxis plate at concentrations of 1, 3, 10, 30 and 60 mg/mL of EOLO. The results demonstrated that EOLO has antiplatelet and hepatoprotective action. Furthermore, the findings suggest that such pharmacological effects possibly result from the antioxidant action of EOLO, since it was able to reduce the production of ROS in human platelets as well as protect against tissue oxidative stress induced by APAP, inhibiting the hepatic inflammatory process.

Keywords: antioxidants, reactive oxygen species, oxidative stress, hepatoprotection, inflammation, thrombosis, *Levisticum officinale*

SUMÁRIO

| | |
|--|-----|
| RESUMO | 5 |
| ABSTRACT | 6 |
| LISTA DE FIGURAS | 8 |
| LISTA DE TABELAS | 9 |
| LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS | 10 |
| INTRODUÇÃO..... | 12 |
| CAPÍTULO 1: REVISÃO BIBLIOGRÁFICA | 14 |
| 1. Antitrombóticos: agentes antiagregantes e anticoagulantes | 14 |
| 1.1 Hemostasia..... | 14 |
| 1.2 Hemostasia primária | 14 |
| 1.3 Hemostasia secundária..... | 20 |
| 1.3.1 Cascata da coagulação..... | 20 |
| 2 Hepatoproteção | 21 |
| 2.1 Fígado | 21 |
| 2.2.1 Paracetamol (PCT) | 23 |
| 2.3 Estresse oxidativo | 25 |
| 2.4 Inflamação e estresse oxidativo | 27 |
| 3 Óleos essenciais | 27 |
| 4 <i>Levisticum officinale</i> | 31 |
| 5 Ação antitrombótica e hepatoprotetora do OELO | 33 |
| 6 Referências bibliográficas | 35 |
| 7 OBJETIVOS..... | 56 |
| CAPITULO 2: Perfil químico e atividade antitrombótica do óleo essencial de <i>Levisticum officinale</i> WDJ Koch (Apiaceae)..... | 57 |
| CAPITULO 3: <i>Levisticum officinale</i> previne a hepatotoxicidade induzida por paracetamol ao diminuir o estresse oxidativo..... | 82 |
| 10. CONSIDERAÇÕES FINAIS..... | 111 |
| 11. PERSPECTIVAS..... | 112 |
| ANEXO 1:Aprovação Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos..... | 113 |
| ANEXO 2:Aprovação Comissão de Ética no Uso de Animais..... | 122 |

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1. Adesão, ativação, secreção e agregação plaquetária..... | 15 |
| Figura 2. Ação de agentes agregantes (ADP e epinefrina) na agregação plaquetária..... | 17 |
| Figura 3. Exemplo das três vias da coagulação..... | 20 |
| Figura 4. Biotransformação hepática de xenobióticos..... | 22 |
| Figura 5. Reações de metabolização do medicamento paracetamol..... | 24 |
| Figura 6. A importância da mitocôndria no metabólito reativo do paracetamol..... | 25 |
| Figura 7. Equilíbrio entre agentes antioxidantes e pró-oxidantes (radicalares e não radicalares)..... | 26 |
| Figura 8. Formação de monoterpenos presentes em óleos essenciais através de isoprenos..... | 29 |
| Figura 9. Partes aéreas da planta aromática conhecida como <i>Levisticum officinale</i> | 32 |
| Figura 10. Folha de rosto do artigo publicado no periódico Chemical Papers (JCR/2024 2.5 – Qualis A4 - https://doi.org/10.1007/s11696-024-03573-5)..... | 57 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|--|----|
| Tabela 1. Agonistas da Ativação Plaquetária: Receptores, Potência Biológica e Relevância Terapêutica..... | 19 |
| Tabela 2. Compostos bioativos presentes em óleos essenciais..... | 30 |
| Tabela 3. Diferentes propriedades biológicas da planta <i>Levisticum officinale</i> | 33 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

| | |
|-------|--|
| AVC | Acidente vascular cerebral |
| DNA | Ácido desoxirribonucleico |
| COX-1 | Ciclooxigenase 1 |
| COX-2 | Ciclooxigenase 2 |
| CG-EM | Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas |
| DNA | Ácido desoxirribonucleico |
| EROs | Espécies reativas de oxigênio |
| fvW | Fator de von Willebrand |
| γ-GT | Gama gt |
| GSH | Glutathiona reduzida |
| MDA | Malonaldeído |
| MPO | Mieloperoxidase |
| •NO | Óxido nítrico |
| NAPQI | N-acetil- <i>p</i> -benzoquinona imina-NAPQI |
| OE | Óleo essencial |
| OELO | Óleo essencial de <i>Levisticum officinale</i> |
| OEs | Óleos essenciais |
| PPP | Plasma Pobre em Plaquetas |
| PRP | Plasma Rico em Plaquetas |
| RNI | Razão normalizada internacional |
| SLM | Silimarina |
| SNC | Sistema nervoso central |
| TBARS | Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico |
| TP | Tempo de protrombina |

| | |
|------|--|
| TTPa | Tempo de tromboplastina parcial ativada |
| TCLE | Termo de Consentimento Livre e Esclarecido |
| AST | Transaminase Oxalacética |
| ALT | Transaminase Pirúvica |

INTRODUÇÃO

As doenças cardiovasculares são reconhecidas devido aos elevados custos para o sistema de saúde pública, sendo que os eventos trombóticos podem ser prevenidos e tratados por meio da administração de medicamentos antiagregantes ou anticoagulantes (Vaduganathan *et al.*, 2022). Estima-se que o Sistema Único de Saúde (SUS) some gastos de R\$ 1 bilhão em tratamentos cardiovasculares anualmente (De Oliveira *et al.*, 2024). Foram registradas 2.917.900 hospitalizações por doenças cardiovasculares no Brasil, tendo variações geográficas na taxa de mortalidade por acidente vascular cerebral (AVC), por exemplo, em 2021, o Maranhão registrou a maior taxa, com 31,7 óbitos por 100 mil habitantes (Dóris *et al.*, 2025).

Apesar dos esforços das indústrias farmacêuticas em desenvolverem medicamentos antitrombóticos seguros, os que estão disponíveis no mercado, muitas vezes não cumprem esse quesito em sua totalidade, devido a janela terapêutica estreita e inúmeras interações medicamentosas (Medlinskiene *et al.* 2023). Diante do exposto, faz-se necessário o desenvolvimento de novos agentes antitrombóticos com intuito de garantir o controle seguro da hemostasia e custo acessível para população com baixo poder aquisitivo (Gimbel *et al.*, 2018; Mcfadyen *et al.*, 2018).

Os produtos naturais são fontes de novos agentes ativos e com potencial uso terapêutico em diversas doenças humanas (Newman, Cragg, 2020). Pesquisas que incluem a avaliação de produtos naturais como candidatos a uma nova terapêutica têm como alvo os medicamentos hepatoprotetores (Cardia *et al.*, 2018). A utilização de produtos naturais para prevenção e tratamento de doenças hepáticas tornou-se popular, tendo como exemplo, a silimarina (SLM), reconhecida por seu efeito hepatoprotetor (Zhong *et al.*, 2017; Wang *et al.*, 2020). Os produtos naturais exercem efeitos hepatoprotetores devido as suas múltiplas propriedades farmacológicas, incluindo atividade anti-inflamatória, antioxidante e antiapoptótica (Papackova *et al.*, 2018; Cardia *et al.*, 2018).

Levisticum officinale (*L. officinale*) é uma planta perene, pertencente à família Apiaceae, cultivada na Europa e América do Norte, a qual é conhecida por sabor semelhante ao aipo (Szparaga *et al.*, 2023). O óleo essencial das folhas de *L. officinale* são usados na produção de alimentos e bebidas, além da atividade contra

bactérias gram-positivas (Miran *et al.*, 2018; Spréa *et al.* 2020).

A escassez de estudos científicos que comprovem as propriedades antitrombótica e hepatoprotetora do óleo essencial extraído das folhas de *L. officinale* (OELO) ressalta a importância do desenvolvimento de pesquisas abordando esse tema. As investigações das atividades biológicas propostas nesse estudo buscam avaliar a eficácia do OELO e elucidar os mecanismos com intuito de explicar suas ações farmacológicas. Desta forma, é possível ampliar o conhecimento das possibilidades terapêuticas do OELO, promovendo o desenvolvimento da farmacologia de produtos naturais e a sugestão de novas estratégias terapêuticas no tratamento de doenças relacionadas à trombose e disfunções hepáticas.

CAPÍTULO 1: REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1. Antitrombóticos: agentes antiagregantes e anticoagulantes

1.1 Hemostasia

Em estado fisiológico o corpo humano apresenta o sangue em seu estado fluido, tendo esta função, o transporte de células e demais substâncias (Bittencourt, 2016). O sistema hemostático é responsável por manter o sangue fluído e a integridade do vaso sanguíneo, tendo as plaquetas, os vasos sanguíneos, as proteínas da coagulação e as da fibrinólise como seus componentes (Bittencourt, 2016).

A hemostasia é um processo complexo que garante a manutenção do fluxo sanguíneo em condições fisiológicas e interrompe a ocorrência de hemorragias após alguma lesão vascular (Pourshahrestani *et al.*, 2020). Esse processo é responsável pelo equilíbrio entre a trombose e a hemorragia através de eventos pró-trombóticos e antitrombóticos (Del Carmen *et al.*, 2019; Vayne *et al.*, 2021; Zaidi, Green, 2022). Por razões didáticas, os processos hemostáticos são divididos em hemostasia primária e hemostasia secundária.

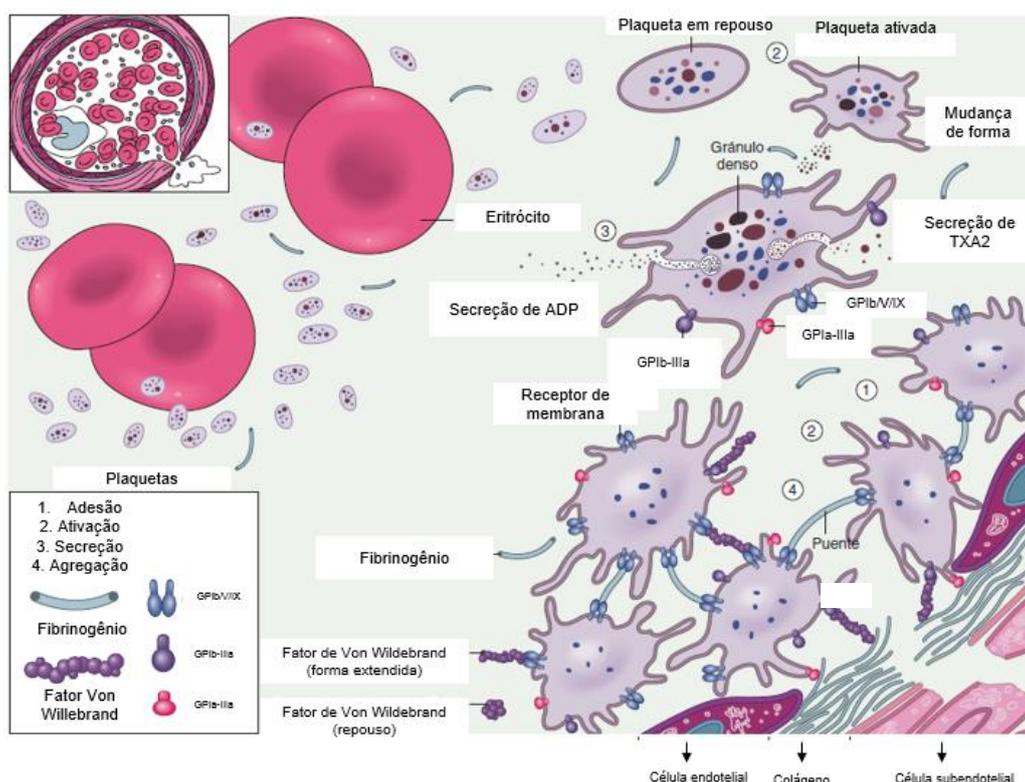
1.2 Hemostasia primária

As plaquetas são fragmentos celulares anucleados com formato discóide e tamanho variável entre 2-3 μm que desempenham um papel fundamental na hemostasia (Vandermeijden, Heemskerk, 2019). A trombopoietina é o hormônio que regula a produção das plaquetas, as quais são produzidas pelos fragmentos citoplasmáticos de megacariócitos na medula óssea, tendo sobrevivência de 7-10 dias (Vandermeijden, Heemskerk, 2019). A partir de uma lesão vascular é desencadeada a adesão e ativação das plaquetas induzindo ao rearranjo da estrutura plaquetária (Figura 1), secreção dos grânulos plaquetários e agregação plaquetária (Vilahur *et al.*, 2018). Como resultado forma-se um tampão hemostático para obstruir o local lesionado, cessando a perda sanguínea e auxiliando na regeneração tecidual (Matus *et al.*, 2018). Quando ativadas, as plaquetas são capazes de recrutar outras plaquetas circulantes pela secreção de mediadores da

ativação plaquetária, como a adenosina difosfato (ADP), aumentando o tamanho do tampão plaquetário (Koupenova- Zamor *et al.*, 2017).

O tecido subendotelial é conhecido por ser trombogênico, pois nele encontra-se o fator de von Willebrand (fvW) e colágeno (Tsyu, Belyaev, 2023). Quando ocorre a exposição do subendotélio, o fvW é responsável pelo recrutamento das plaquetas ao local onde está a lesão vascular (Shahidi, 2016). Esse processo se dá a partir da interação do domínio A1 do fvW com a porção Ib do complexo GPIb/V/IX das plaquetas (Figura 1). Um fator facilitador é o colágeno que imobiliza o fvW para que ocorra a ligação a vários receptores de GPIb. A GPVI assim como GPIb facilita a interação do colágeno com as plaquetas (Kaplan, Jackson, 2011; Cimmino, Golino, 2013; Vilahur *et al.*, 2018).

Figura 1. Adesão, ativação, secreção e agregação plaquetária.



Fonte: Adaptado de Vayne *et al.*, 2021.

Conhecidos como substâncias que promovem a ativação e agregação das plaquetas os agentes agregantes plaquetários (ADP, epinefrina, trombina, ácido araquidônico, colágeno, serotonina e ristocitina) são responsáveis por desempenhar papel fundamental na hemostasia e na formação de trombos (Zhou

et al., 2019). Nesse processo, as plaquetas são capazes de recrutar outras plaquetas circulantes pela secreção de mediadores da ativação plaquetária, como a adenosina difosfato (ADP), aumentando o tamanho do tampão plaquetário (Koupenova- Zamor *et al.*, 2017).

1.2.1 ADP

Os receptores purinérgicos compõem uma classe de receptores de membrana ativados por nucleotídeos e nucleosídeos extracelulares, como ADP (Cardoso *et al.*, 2021). Tais receptores são classificados em duas famílias principais, receptores P1 e P2 (Cardoso *et al.*, 2021). Os receptores P1 são ativados especificamente por adenosina, enquanto os receptores P2, subdivididos em P2X e P2Y. Os receptores P2Y são ativados por canais iônicos sensíveis ao ATP, já os receptores P2Y ativados por receptores acoplados à proteína G, sensíveis a ATP e ADP (Han *et al.*, 2022).

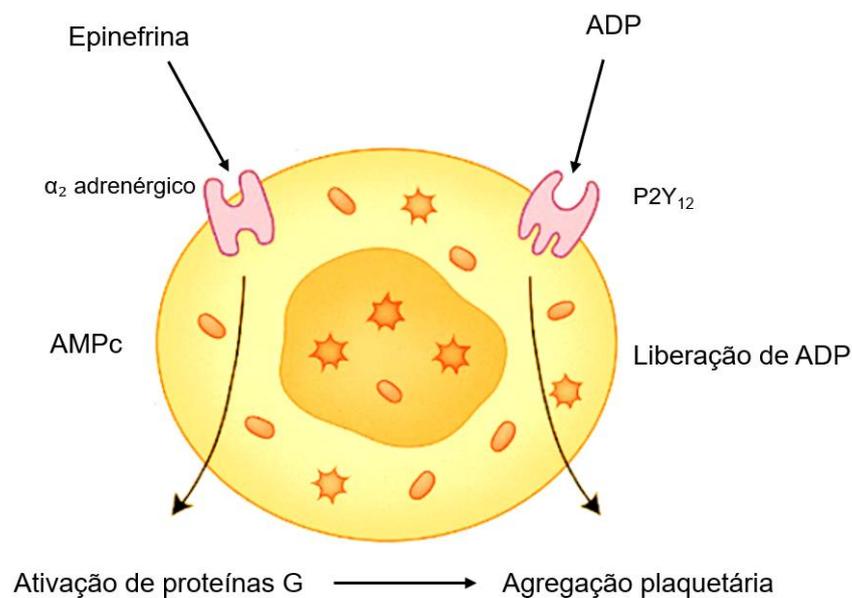
Na hemostasia primária, os receptores purinérgicos P2Y têm papel fundamental na ativação e agregação plaquetária, pois as plaquetas expressam dois subtipos relevantes P2Y₁ e P2Y₁₂ (Boncler, Bartczak, Rozalski, 2024). O P2Y₁ é um receptor acoplado à proteína G_q e quando ativado por ADP, resulta na mobilização de cálcio intracelular e conseqüentemente induz alterações morfológicas nas plaquetas e inicia o processo de agregação plaquetária (Boncler, Bartczak, Rozalski, 2024). Já o P2Y₁₂ é um receptor acoplado à proteína G_i (Figura 2), que ativado por ADP, leva à inibição da adenilato ciclase, à diminuição dos níveis de AMPc e à amplificação e estabilização da agregação plaquetária (Boncler, Bartczak, Rozalski, 2024).

A sinalização entre os receptores P2Y₁ e P2Y₁₂ é fundamental para uma resposta plaquetária eficaz, tornando-se necessários para a formação e manutenção do trombo (Han *et al.*, 2022). Como aplicação clínica, a inibição dos receptores P2Y₁₂ é uma estratégia terapêutica na prevenção de eventos trombóticos, dentre eles o infarto agudo do miocárdio e o acidente vascular cerebral (Han *et al.*, 2022). Como exemplos de medicamentos antiagregantes plaquetários, estão o clopidogrel e ticagrelor que são antagonistas seletivos do P2Y₁₂ (Pitchford, Pan, 2024).

1.2.2 Epinefrina

A epinefrina é um hormônio e neurotransmissor que exerce diversos efeitos fisiológicos ao ativar receptores adrenérgicos α e β , exercendo papel crucial na agregação plaquetária (Golaszewska et al., 2021). Essa ativação ocorre através da interação da epinefrina com os receptores adrenérgicos α_2 (Figura 2) localizados nas plaquetas (Martin et al., 2020). Ao se ligar a esses receptores, a epinefrina ativa vias de sinalização intracelular que resultam na diminuição dos níveis de AMPc (Martin et al., 2020) e favorece a ativação das plaquetas, provocando alterações conformacionais que facilitam a ligação ao fibrinogênio e, assim, promovem a agregação plaquetária (Golaszewska et al., 2021).

Figura 2. Ação de agentes agregantes (ADP e epinefrina) na agregação plaquetária.



ADP: Adenosina Difosfato, AMPc: Adenosina Monofosfato cíclico

Fonte: Autora. Imagem criada utilizando BioRender®.

1.2.3 Trombina

A trombina é reconhecida como um dos principais ativadores da agregação plaquetária, ligando-se aos receptores PAR-1 e PAR-4 nas plaquetas (Ye et al., 2021). Esse processo inicia uma cascata de sinalização intracelular que culmina na ativação do receptor GPIIb/IIIa, promovendo a agregação das plaquetas e,

consequentemente, a formação do coágulo sanguíneo (Badulescu *et al.*, 2025). Além de sua função na agregação, a trombina também converte o fibrinogênio em fibrina (Tabela 1), o que ajuda a estabilizar o coágulo (Theofilis *et al.*, 2022). Dessa forma, ela se destaca como um dos agentes agregantes mais potentes (Theofilis *et al.*, 2022).

1.2.4 Colágeno

O colágeno, ao ser exposto em decorrência de lesões vasculares, constitui um potente agente agregante, exercendo sua ação por intermédio dos receptores GPVI e da integrina $\alpha 2\beta 1$ (Hosseini *et al.*, 2020). Esses receptores desempenham um papel fundamental na adesão e ativação das plaquetas, além de induzirem a liberação de grânulos densos (Tabela 1) com função de amplificar o processo de agregação (Becker, Sexton, Smyth, 2018). O colágeno é reconhecido como o primeiro agente a iniciar o processo de adesão e agregação em resposta a lesões vasculares (Hosseini *et al.*, 2020).

1.2.5 Ácido Araquidônico

O ácido araquidônico é metabolizado em tromboxano A_2 (TXA₂) pelas enzimas ciclooxigenases (Li *et al.*, 2024). O TXA₂ exerce sua ação sobre os receptores TP (receptores de trombospondina) nas plaquetas (Tabela 1), promovendo a ativação e agregação das mesmas (Li *et al.*, 2024). Embora o ácido araquidônico desempenhe um papel fundamental na amplificação do processo de agregação, ele também se configura como um alvo terapêutico. Este ácido é inibido por medicamentos como o ácido acetilsalicílico, que atua como um bloqueador da COX-1, impedindo, dessa forma, a formação de TXA₂ e modulando a resposta agregante (Larsen *et al.*, 2023).

1.2.6 Serotonina (5-HT)

A serotonina (5-HT), liberada por plaquetas e células endoteliais, tem o potencial de promover a agregação plaquetária por meio dos receptores 5-HT_{2A} (Aaron *et al.*, 2019). Embora apresente um efeito agregante modesto quando

utilizada isoladamente, a serotonina exerce um efeito sinérgico (Tabela 1), potencializando a agregação induzida por outros agonistas, como o ADP e a trombina (Lopez-Vilchez *et al.*, 2009).

1.2.7 Ristocetina

A ristocetina é um agente utilizado em laboratórios para o estudo da função plaquetária, com particular ênfase na avaliação da doença de von Willebrand e da síndrome de Bernard-Soulier (Fronthoth, Favalaro, 2017). Este composto promove a ligação entre o fator de von Willebrand e o receptor GPIb presente na plaqueta, facilitando a adesão plaquetária, embora não induza a agregação na ausência de outros estímulos (Fronthoth, Favalaro, 2017). Sua principal aplicação é de natureza diagnóstica (Tabela 1), especialmente em contextos de exames laboratoriais (Kazianka *et al.*, 2017).

Tabela 1. Agonistas da Ativação Plaquetária: Receptores, Potência Biológica e Relevância Terapêutica.

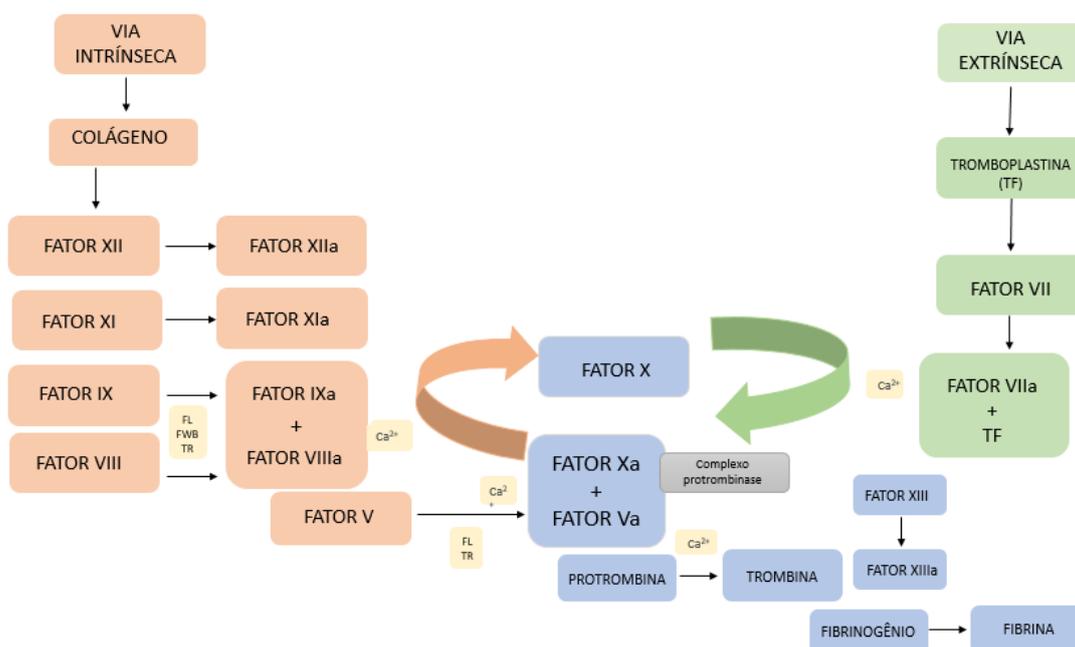
| Agente | Receptor/Mecanismo | Potência Agregante | Observações | Referência |
|---------------------------|---|------------------------------|--|-----------------------------------|
| ADP | Receptores P2Y ₁ e P2Y ₁₂ | Alta | Ativa GPIIb/IIIa; alvo de antiplaquetários como clopidogrel e ticagrelor. | Cardoso <i>et al.</i> , 2021. |
| Epinefrina | Receptores α ₂ -adrenérgicos | Moderada | Potencializa a agregação induzida por ADP; relevante em situações de estresse agudo. | Golaszewska <i>et al.</i> , 2021. |
| Trombina | Receptores PAR-1 e PAR-4 | Muito alta | Potente ativador; converte fibrinogênio em fibrina. | Ye <i>et al.</i> , 2021. |
| Colágeno | GPVI e integrina α2β1 | Alta | Ativação inicial e secreção de grânulos densos. | Hosseini <i>et al.</i> , 2020. |
| Ácido Araquidônico | Conversão em TXA ₂ (receptor TP) | Moderada a alta | TXA ₂ é um potente ativador; inibido por AAS (aspirina). | Li <i>et al.</i> , 2024. |
| Serotonina (5-HT) | Receptor 5-HT _{2A} | Fraca | Efeito sinérgico; reforça agregação induzida por outros agonistas. | Aaron <i>et al.</i> , 2019. |
| Ristocetina | GPIb e fator de von Willebrand | Variável (<i>in vitro</i>) | Usada para diagnóstico laboratorial de doenças como a de von Willebrand. | Fronthoth, Favalaro, 2017. |

1.3 Hemostasia secundária

1.3.1 Cascata da coagulação

A coagulação ocorre através da interação entre enzimas e seus cofatores com intuito de formar um coágulo de fibrina estável (Litvinov *et al.*, 2021). A cascata da coagulação é dividida em três vias denominadas: via intrínseca, via extrínseca e via comum (Figura 3). A ativação da via extrínseca ocorre a partir da lesão da parede vascular, onde ocorre a ativação por tromboplastina, seguida da ativação do fator VII, havendo formação do complexo do fator tecidual com VIIa. Esse complexo, quando influenciado por cálcio, ativa o fator X. O fator X inicia a via comum e em seguida, forma o complexo protrombinase, ativando o fator II (protrombina) que se transforma em IIa (trombina) (Silva, Melo, 2016; Van Der Meijden, Heemskerk, 2019).

Figura 3. Exemplo das três vias da coagulação.



FL: fosfolípidos de membrana das plaquetas ; FvW: fator de Wildebrand ; TR: trombina

Fonte: Adaptado de SILVA; MELO, 2016.

A via intrínseca da coagulação é ativada através do colágeno a partir do momento em que ocorre uma lesão vascular (Silva, Melo, 2016). Quando ativado pelo colágeno o fator XII transforma-se em XIIa e o fator XI transforma-se em XIa (Silva, Melo, 2016). Sendo que o fator IX transforma-se em IXa e o fator VIII é

ativado por fosfolipídios das plaquetas, fator de Willdebrand e trombina (Silva, Melo, 2016). Os fatores IXa e VIIIa formam um complexo cálcio dependente ativado pelo fator X, tornando-o Xa(Silva, Melo, 2016). O fator V é ativado em Va através da influência de fosfolipídios e trombina, dando origem ao complexo protrombinase dependente de cálcio (Xa e Va) (Silva, Melo, 2016). A trombina ativa fibrinogênio, que conseqüentemente ativa fibrina (Silva, Melo, 2016). A trombina ativa o fator XIII, originando o fator XIIIa, responsável pela polimerização das fibrinas (ligações cruzadas) (Silva, Melo, 2016). A fibrina é uma proteína insolúvel responsável pela formação de uma rede de fibras elásticas que consolida o tampão plaquetário e o transforma em um tampão hemostático (Van Der Meijden, Heemskerk, 2019).

2 Hepatoproteção

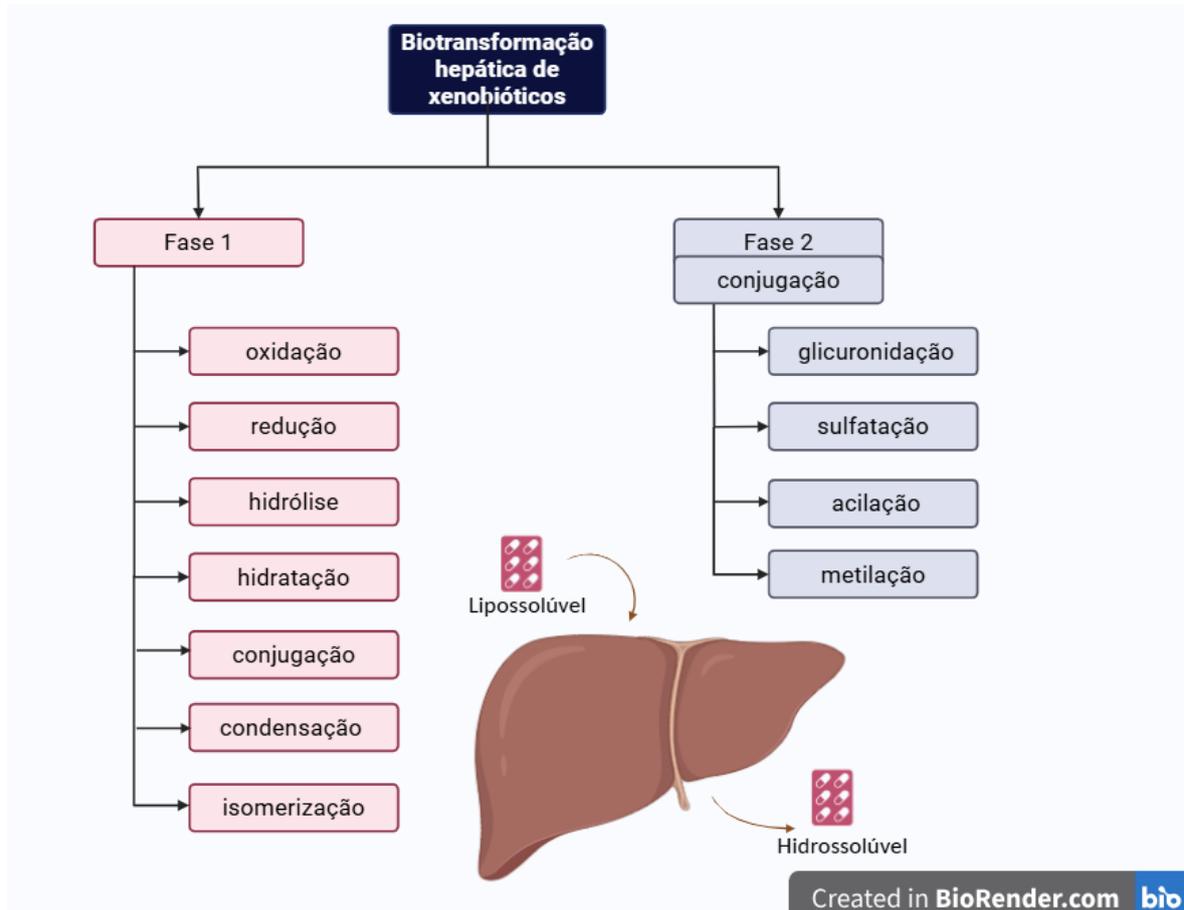
2.1 Fígado

O fígado é considerado a maior glândula encontrada no corpo humano, estando localizado no quadrante superior da cavidade abdominal e sendo classificado como o maior órgão interno do organismo (Yang *et al.*, 2022). Esse órgão é de extrema relevância para o corpo humano, devido as diversas funções que desempenha, como o metabolismo (alimentos e medicamentos) e o armazenamento de nutrientes, a síntese de proteínas e de hormônios (Ayenew, Wasihun, 2023). Além disso, os hepatócitos tem a função de produzir a bile e de converter substâncias tóxicas a não tóxicas, tornando-as hidrossolúveis para serem excretadas (Gartner, 2007; Brunton *et al.*, 2018). No fígado, os medicamentos administrados por via oral sofrem o efeito de primeira passagem tendo sua concentração reduzida antes de chegarem a circulação sistêmica (Kammerer *et al.*, 2024).

Para serem eliminados do organismo, os fármacos são biotransformados em compostos hidrossolúveis, sendo essas reações catalisadas por enzimas do citocromo P450 (CYP) (Kammerer *et al.*, 2024). As reações de fase 1 (Figura 4) ocorrem através de reações de oxidação, redução, hidrólise, hidratação, conjugação, condensação ou isomerização, pois nesse fase são incorporados grupos funcionais ao fármaco (Dibetso, 2020). Já as reações da fase 2 consistem na conjugação com substâncias endógenas, como ácido glucurônico, sulfato ou

glicina e ocorrendo ocorrem por catálise da uridina 5'-difosfo-glucuronosiltransferases e sulfotransferases (Järvinen *et al.*, 2022).

Figura 4. Biotransformação hepática de xenobióticos.



Fonte: Autora. Imagens criadas utilizando BioRender®.

2.2 Modelo de hepatoproteção

Modelos de hepatoproteção *in vivo* consistem em métodos químicos para induzir lesão hepática por meio de substâncias químicas como tetracloreto de carbono (CCl₄), tioacetamida e dimetilnitrosamina, amplamente utilizadas devido à sua capacidade de mimetizar diferentes padrões de dano hepático (Mao *et al.*, 2024). Alguns modelos unem substâncias químicas com etanol para induzir toxicidade, assim como, há modelos de lesão induzida por fármacos, pois atuam de forma dose-dependente e são altamente reprodutíveis (Mao *et al.*, 2024). Um desses fármacos é o paracetamol (PCT) que possui extrema relevância clínica, pois é conhecido como uma das principais causas de insuficiência hepática aguda em

casos de intoxicação (Mossanen, Tacke, 2015), Por meio de parâmetros bioquímicos, histológicos, e moleculares, esse modelo ajuda a avaliar com precisão os impactos de medicamentos hepatoprotetores, avançando em terapias contra danos hepáticos agudos (Mossanen, Tacke, 2015).

2.2.1 Paracetamol (PCT)

O PCT é um fármaco com ação analgésica e antipirética, com indicação terapêutica para eliminação ou prevenção da dor e da febre com indicação para adultos e crianças (Mirrasekhian *et al.*, 2018). É considerado um medicamento seguro se administrado em doses entre 500 mg a 1 g , sendo considerado tóxico, administrado em dose superior a 4 g por dia (Chowdhury *et al.*, 2020). A aquisição do paracetamol em drogarias e farmácias sem retenção de receita médica faz com que a automedicação seja realizada, podendo acarretar em sobredosagem e no desencadeamento de insuficiência hepática aguda (Da Silva *et al.*, 2014; Marzuillo, Guarino, Barbi, 2014; Dos Santos *et al.*, 2018).

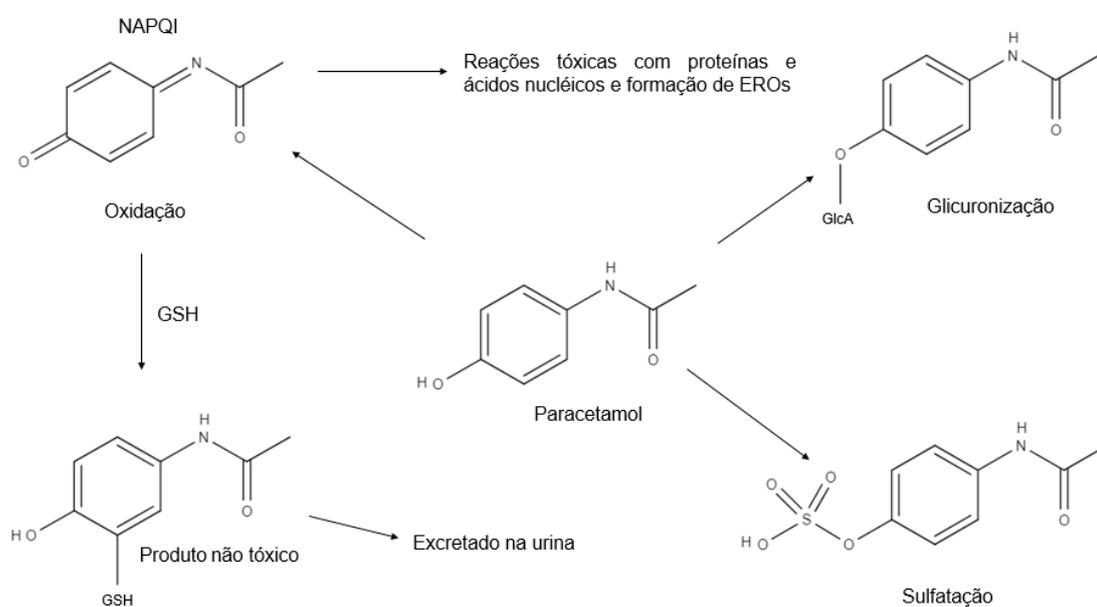
Em casos de febre, o paracetamol bloqueia a formação e a liberação de prostaglandinas no sistema nervoso central (SNC), além de inibir a ação de pirogênios endógenos presentes no hipotálamo, ocorrendo vasodilatação periférica, sudorese e dissipação de calor (Mirrasekhian *et al.*, 2018). Já o efeito analgésico do fármaco ocorre por meio da inibição da ciclooxigenase 2 (COX-2), ressalta-se que 10 a 25% do paracetamol está ligado as proteínas plasmáticas, em casos de intoxicação aguda, 20 a 50% do fármaco pode estar ligado a estas (Marzuillo, Guarino, Barbi, 2014; Brunton *et al.*, 2018; De Farias *et al.*, 2021).

Durante a metabolização hepática do paracetamol são produzidos metabólitos tóxicos em pequenas quantidades, N-acetil-*p*-benzoquinona imina-NAPQI e N-acetil-*p*-benzosemiquinona imina-NAPSQI (intermediário eletrolítico reativo e espécie radicalar de oxigênio, respectivamente) (Borges *et al.*, 2022). Tais metabólitos tóxicos são neutralizados pelo sistema defensivo do próprio órgão, porém quando em condições de sobredoses (intoxicação) de paracetamol, a neutralização hepática não é efetiva, ocorrendo dano hepático centrolobular dependente do sistema CP450 (Batlouni, 2010; Brayner *et al.*, 2018).

O PCT é metabolizado por três mecanismos metabólicos: conjugação hepática com ácido glicurônico (glicuronização), sulfatação e oxidação (Figura 5) (Borges *et*

al., 2022). A via oxidativa produz NAPQI que rapidamente é metabolizada a produto não tóxico por conjugação com a glutathiona reduzida (GSH) e posteriormente metabolizada em ácido mercaptúrico e excretada na urina (Borges *et al.*, 2022). Em casos de intoxicação pelo paracetamol, ocorre acúmulo de NAPQI e com depleção do conteúdo de GSH, promovendo ocorre um processo irreversível de lesão hepatocelular (Sebben, 2010; Lopes, Matheus, 2012; Kheradpezhouha *et al.*, 2014; Brayner *et al.*, 2018).

Figura 5. Reações de metabolização do medicamento paracetamol.



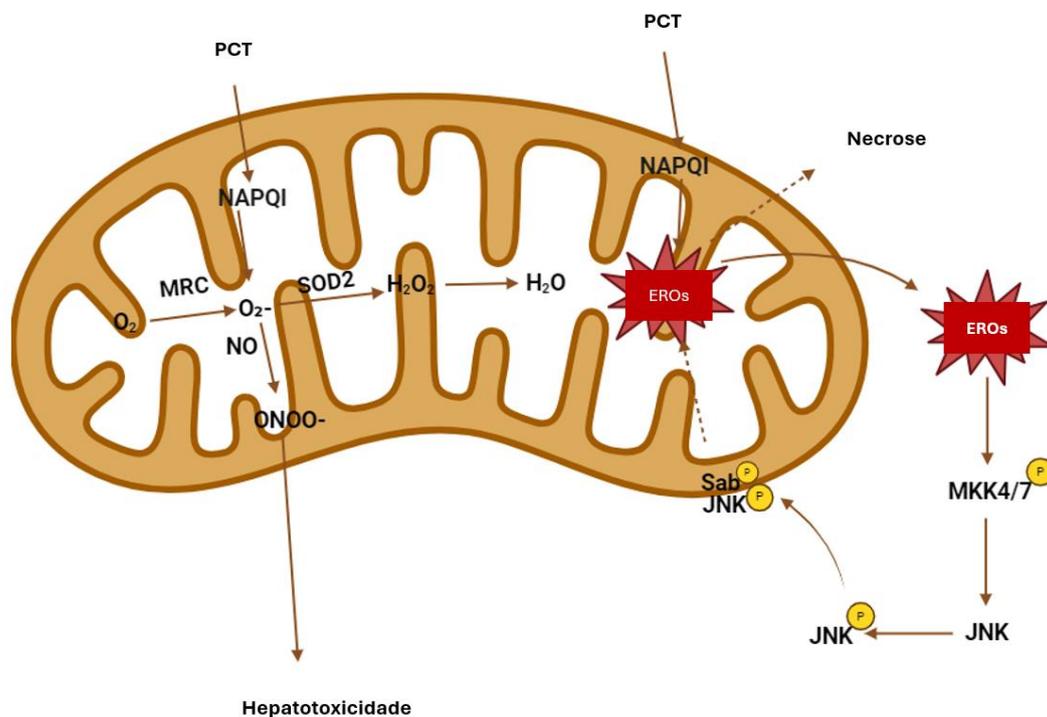
NAPQI: N-acetil-*p*-benzoquinona; EROs: Espécies reativas de oxigênio

Fonte: Adaptado de Casarett *et al.*, 2008.

O NAPQI se liga covalentemente a proteínas celulares, principalmente as proteínas mitocondriais, levando a uma disfunção dessa organela, e induzindo a formação de espécies reativas de oxigênio (EROs) (Kennon, Heard, 2008). A geração de EROs mitocondrial é exacerbada por uma infinidade de eventos de sinalização intracelular, provocando danos ao ácido desoxirribonucleico (DNA) mitocondrial, causando a fragmentação do DNA nuclear e culminando na abertura dos poros de transição mitocondriais (Kennon, Heard, 2008). Todos esses eventos resultam em necrose hepatocelular em meio à ativação das cascatas de sinalização celular e o estabelecimento do estresse oxidativo (Kennon, Heard, 2008; Halliwell, Gutteridge, 2015).

A partir do momento que a fase II do metabolismo do paracetamol torna-se saturada, o seu excesso é metabolizado pela fase I, acumulando NAPQI (Win *et al.*,2018). Conseqüentemente, a depleção de GSH leva à formação de conjugados de proteína paracetamol, desencadeando estresse oxidativo e aumento de EROs (Win *et al.*,2018). Nas mitocôndrias dos hepatócitos, esses conjugados ativam a MAPK (MKK4/7) a qual ativa a JNK. A JNK fosforilada transloca-se para as mitocôndrias, ligando-se à proteína Sab (Win *et al.*,2018). Isso induz estresse oxidativo, causando disfunção mitocondrial, necrose dos hepatócitos e insuficiência hepática (Figura 6).

Figura 6. A importância da mitocôndria no metabólito reativo do paracetamol.



EROs: Espécies reativas de oxigênio; NAPQI: N-acetil-*p*-benzoquinona imina; PCT: Paracetamol.

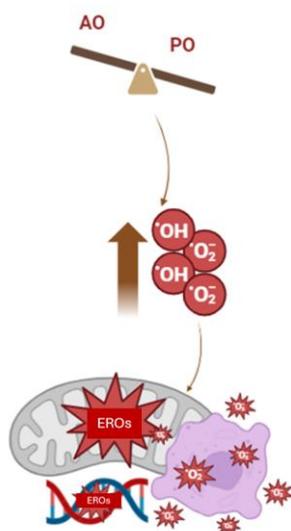
Fonte: adaptado de Win *et al.*, 2018. Imagem criada utilizando BioRender®.

2.3 Estresse oxidativo

O estresse oxidativo é definido pelo desequilíbrio entre as moléculas pró-oxidantes e antioxidantes (Figura 7) o qual induz a ocorrência de danos oxidativos que podem atingir DNA, lipídeos, proteínas e carboidratos (Halliwell, Gutteridge,

2015). As EROs são moléculas altamente reativas que podem ser radicalares ou não radicalares (Barreiros *et al.*, 2006), sendo os elétrons não emparelhados os responsáveis pela alta reatividade das mesmas. Como exemplo de EROs pode-se citar o radical superóxido (O_2^\bullet), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), radical hidroxila ($\bullet OH$), dentre outros (El Hadri *et al.*, 2021). As EROs possuem instabilidade e tempo de meia vida curto, além de uma elevada reatividade, pois ligam-se com outras estruturas semelhantes próximas de sua formação. Tais moléculas também são conhecidas por sua capacidade de serem aceptores (oxidantes) ou doadores (redutores) de elétrons (Barbosa *et al.*, 2010; Halliwell, Gutteridge, 2015).

Figura 7. Equilíbrio entre agentes antioxidantes e pró-oxidantes (radicalares e não radicalares).



PO: Pró-oxidantes; AO: Antioxidantes; EROs: Espécies reativas de oxigênio

Fonte: adaptado de Halliwell; Gutteridge, 2015. Imagem criada utilizando BioRender®.

As reações envolvendo EROs podem causar danos oxidativos a biomoléculas, como o DNA e o RNA, e induzindo mutações que desencadeiam o câncer (Barreiros *et al.*, 2006). Além disso, a oxidação de lipídeos prejudica o transporte (ativo e passivo) de substâncias através da membrana e causa dano a essa estrutura e morte celular, assim como atinge também as membranas das artérias e veias (Zhu *et al.*, 2025). Ainda o acúmulo de lipídeos pode resultar em aterosclerose e eventos como trombose, infarto ou acidente vascular cerebral (AVC) (Barbosa *et al.*, 2010; Halliwell, Gutteridge, 2015).

2.4 Inflamação e estresse oxidativo

A inflamação é uma defesa do organismo que ocorre após algum dano celular causado por microorganismos, agentes físicos ou químicos e reações imunológicas (Filep, 2022). Nesse processo, ocorre recrutamento de células do sistema imune para identificar o agente causador e ativando os processos de defesa (El Hadri *et al.*, 2021), e desencadeando a inflamação local ou sistêmica, bem como o estresse oxidativo (Galdiero, Marone, Mantovani, 2018).

Durante a fase fagocitária do processo inflamatório ocorre a liberação de substâncias microbidas, com conseqüente ocorre a ativação da enzima NADPH oxidase e influxo de íons que ativam a mieloperoxidase (MPO) (Hawkins, Davies, 2021). A MPO favorece a produção de ácido hipocloroso (HOCl), seguido da produção de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e íons cloreto, causando dano oxidativo (Mortimer, Mc Intyre, Thomas, 2021).

3 Óleos essenciais

Os óleos essenciais (OEs) são definidos como substâncias voláteis de plantas aromáticas, tendo suas matérias-primas empregadas industrialmente nas áreas cosméticas, farmacêuticas e alimentícias (Bolouri *et al.*, 2022). Os OEs são utilizados como fragâncias e aromas por diferentes segmentos industriais (Al-khayri *et al.*, 2023, Sharma *et al.*, 2023).

Os OEs podem conter mais de 200 compostos voláteis, sendo atribuídas aos mesmos diversas atividades biológicas como ação antimicrobiana, anticancerígena, antioxidantes, antiinflamatória e antiviral (Aziz *et al.*, 2018). Devido a sua composição complexa, os OEs são capazes de exercer maior atividade biológica, quando comparados com componentes isolados, como por exemplo atividade antimicrobiana (Contrucci *et al.*, 2019).

Os OEs são conhecidos por sua rica composição de monoterpenos, sesquiterpenos, fenilpropanoides, ésteres e outras substâncias de baixo peso molecular (Craveiro *et al.*, 1993; Neta *et al.*, 2021). Alguns exemplos de monoterpenos encontrado em OEs são o limoneno, o β-mirceno e o γ-terpineno (Sharma, Thulasingam, Nagarajan, 2017; Yang *et al.*, 2020).

3.1 Extração e caracterização química de óleos essenciais

A principal técnica para obtenção dos OEs ocorre por meio da técnica de destilação por arraste a vapor, além da prensagem dos pericarpos de frutos cítricos (Machado *et al.*, 2022, Salvatore *et al.*, 2022). A destilação por arraste a vapor é um processo que utiliza vapor de água com o intuito de volatilizar os compostos aromáticos presentes nas plantas, os quais são posteriormente condensados e separados (Ayub *et al.*, 2024). Por sua vez, a prensagem a frio constitui uma técnica mecânica aplicada na extração de OEs de frutas cítricas, rompendo as glândulas localizadas na casca de frutas cítricas para liberar o óleo (Siano, Cautela, 2021). Este processo preserva a composição natural do óleo, sem a utilização de calor ou solventes (Siano, Cautela, 2021).

A cromatografia gasosa (CG) é reconhecida por realizar a separação dos componentes presentes em um óleo essencial por meio da volatilidade e interações com a fase estacionária em uma coluna, enquanto, a espectrometria de massas (EM) identifica estes componentes através de seus padrões de fragmentação (Aziz *et al.*, 2018). Através da cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-EM) obtém-se a capacidade de separação da cromatografia com a capacidade de identificação da espectrometria de massas (Aziz *et al.*, 2018). A submissão da amostra, no estado gasoso a um bombardeamento de elétrons, e conseqüentemente, quebra em íons positivos (Lai *et al.*, 2024). A diferença entre a massa e a carga dos íons gerados os separa, sendo assim, ao detectar e registrar os fragmentos gerados pelo impacto dos elétrons, é possível identificar o composto químico (Wesdemiotis *et al.*, 2024). Esse método garante respostas rápidas e eficazes (Lai *et al.*, 2024).

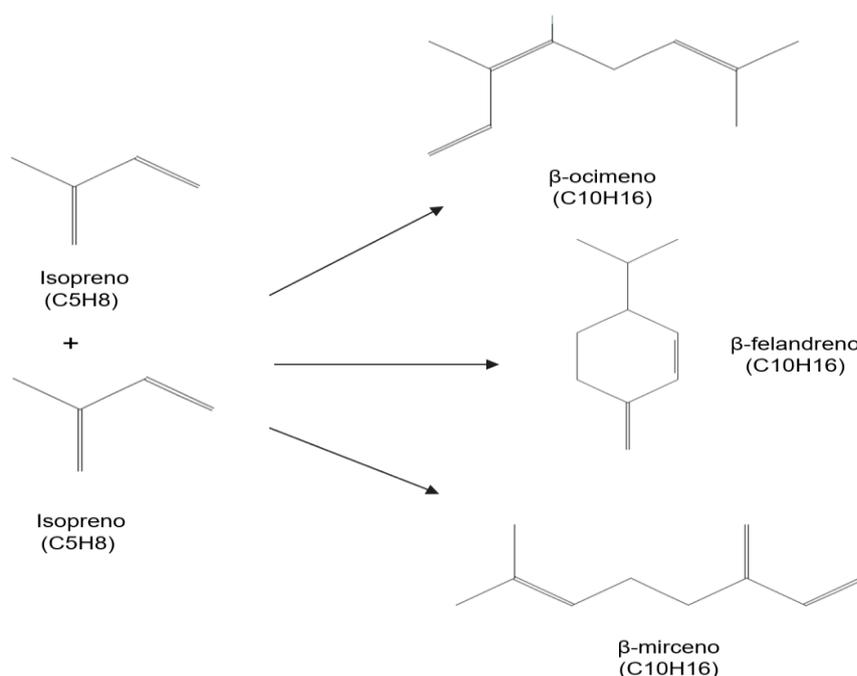
3.2 Terpenos encontrados em OEs

Os terpenos são compostos orgânicos encontrados em plantas, podendo ser classificados como monoterpenos ou sesquiterpenos, dependendo do número de unidades de isopreno que os compõem (Felipe, Bicas, 2016). Os monoterpenos são formados por duas unidades de isopreno e representam cerca de 90% dos

óleos essenciais das plantas (Figura 8), sendo assim, apresentam uma grande diversidade estrutural, com aproximadamente 1000 metabólitos diferentes (Forezi *et al.*, 2022). A formação dos sesquiterpenos ocorre pela união de três unidades de isopreno, conhecidos por sua complexidade estrutural (Forezi *et al.*, 2022).

Os terpenos são conhecidos por desempenharem papéis importantes na ecologia das plantas, pois são defensores contra herbívoros e patógenos, além de atraírem polinizadores (Forezi *et al.*, 2022). É possível observar que a diversidade estrutural dos terpenos é resultado de rearranjos e modificações bioquímicas, o que permite que esses compostos apresentem diversas atividades biológicas (Felipe, Bicas, 2017).

Figura 8. Formação de monoterpênos presentes em óleos essenciais através de isoprenos.



Fonte: a autora. Imagens obtidas utilizando o Pubchem.

3.3 Fenilpropanoides

Os fenilpropanoides são uma classe de compostos orgânicos sintetizados pelas plantas, possuem uma estrutura central contendo um anel aromático de benzeno ligado a uma cadeia lateral de três carbonos (Dong, Lin, 2021). Essa classe de compostos possuem uma variedade de compostos aromáticos, como

aldeídos e álcoois, desempenhando funções de defesa das plantas e na interação com o ambiente (Dong, Lin, 2021).

3.4 Propriedades biológicas dos óleos essenciais

Os OEs são ricos em compostos derivados do metabolismo secundário de plantas, dentre esses compostos são encontradas estruturas químicas capazes de desempenhar ações antimicrobianas, antiinflamatórias, antiparasitárias e antipruriginosas (Balkrishna *et al.*, 2024). Os OEs e suas atividades biológicas são destacadas através da influência de sua composição química, pois sua ação normalmente é gerada a partir dos compostos majoritários (De Sousa *et al.*, 2023). Essas propriedades estão diretamente ligadas à presença de compostos bioativos, incluindo monoterpenos, sesquiterpenos, fenóis e aldeídos, que interagem com estruturas celulares e processos fisiológicos de microrganismos e células humanas (De Sousa *et al.*, 2023). Contudo, compostos minoritários podem desempenhar um papel relevante na bioatividade, podendo potencializar a ação dos compostos majoritários (Bruno, Almeida, 2021). Exemplos de OEs e suas propriedades biológicas descritas a seguir (Tabela 2).

Tabela 2. Compostos bioativos presentes em óleos essenciais.

| Propriedade biológica | Composto | Óleos essenciais | Referência |
|---|---|--|--------------------------------|
| Antimicrobiana/ Antifúngica | Timol e Carvacrol (monoterpenos fenólicos) | <i>Thymus vulgaris</i> (Tomilho) | Perumal <i>et al.</i> , 2021. |
| | Citronelal (aldeído monoterpênico) | <i>Cymbopogon nardus</i> , <i>Eucalyptus spp</i> | Hu <i>et al.</i> , 2022. |
| Antioxidante / Anti-inflamatória | Ácido gálico, rosmarínico, cafeico | <i>Rosmarinus officinalis</i> , <i>Salvia spp.</i> | Perumal <i>et al.</i> , 2021. |
| | Timol, mentol, cinamaldeído, eugenol | <i>Thymus vulgaris</i> , <i>Mentha spp.</i> , <i>Cinnamomum spp.</i> , <i>Syzygium aromaticum</i> | Perumal <i>et al.</i> , 2021. |
| Antitrombótica | Curdiona (sesquiterpeno) | <i>Curcuma aromatica</i> | Fang <i>et al.</i> , 2019. |
| Calmante | α -citral, β -citral, mirceno | <i>Cymbopogon citratus</i> (Capim-limão) | Da Silva, 2022. |
| Hepatoprotetora | α -pineno, β -pineno, mirceno, γ -terpineno | <i>Salvia officinalis</i> | Mohammed <i>et al.</i> , 2021. |

| | | |
|-------------------------------------|-------------------------------|------------------------------|
| (monoterpenos) | | |
| α -tujeno, α -pineno, | <i>Rosmarinus officinalis</i> | El-Demerdash <i>et al.</i> , |
| canfeno, β -mirceno, p- | | 2021. |
| cimeno (monoterpenos) | | |

4 *Levisticum officinale*

A planta *Levisticum officinale* é conhecida como levistico ou lovage, uma planta herbácea (Figura 9), perene, glabra, com sabor e cheiro característicos de aipo e pertence à família *Apiaceae* (Chaudhari *et al.*, 2021). A família *Apiaceae* é composta por cerca de 3.780 espécies e 434 gêneros distribuídos em várias regiões do mundo e que apresentam diversas propriedades terapêuticas, devido a presença de metabólitos secundários como OEs, polifenóis, cumarinas, saponinas e alcalóides (Sertel *et al.*, 2011; Miran *et al.*, 2018; Thiviya *et al.*, 2022).

A família *Apiaceae* inclui alguns vegetais e ervas aromáticas conhecidas, como a cenoura (*Daucus carota*), o aipo (*Apium graveolens*), a gotu kola (*Centella asiatica*), a salsa (*Petroselinum crispum*), o coentro (*Coriandrum sativum*) e o cominho (*Cuminum cyminum*) (Wang *et al.*, 2022). As plantas dessa família são frequentemente cultivadas como fonte nutricional, mas também como fonte de fragrâncias e desenvolvimento de medicamentos, além de conterem glândulas secretoras essenciais no armazenamento de OEs, resultando no sabor característico de cada espécie (Thiviya *et al.*, 2022).

A planta *L. officinale* é originária do Irã e do Afeganistão, tornando-se difundido mundialmente, sendo seu crescimento já foi identificado em várias áreas da Europa e no sudoeste da região do Mediterrâneo Oriental (Afarnehan *et al.*, 2017). A planta *L. officinale* é muito utilizada devido aos seus benefícios terapêuticos apresentando propriedades antiespasmódicas, antiasmáticas e diuréticas (Hogg *et al.*, 2001), popularmente é empregada no tratamento de infecção do trato urinário e de cálculos renais, além de ser utilizada como agente anticancerígeno, anti-inflamatório, antitumoral, nefroprotetor e neuroprotetor (Abd El-Hamid *et al.*, 2009; Miran *et al.*, 2018; Chaudhari *et al.*, 2021). O levistico possui também efeito antidislipidêmico significativo e efeito anti-hiperglicêmico, o que nos mostra que a planta pode ser eficaz no tratamento de diabetes e de dislipidemias (Ghaedi *et al.*, 2020).

Figura 9. Partes aéreas da planta aromática conhecida como *Levisticum officinale*.



Fonte: Istock, 2016.

Suas folhas são utilizadas para a preparação de sopas, saladas, preparo de carnes e em enxaguatórios bucais, bem como no tratamento de dor de garganta e febre (Olennikov, 2022). O extrato das partes aéreas de *L. officinale* tem sido usado como antisséptico para feridas (El-Din, Hendary, 2010; Miran *et al.*, 2018, Spréa *et al.*, 2020). Já o seu OE pode ser utilizado na preparação de medicamentos, aromatizantes de alimentos e perfumes (Miran *et al.*, 2018; Sprea *et al.*, 2020; Chaudhari *et al.*, 2021).

A composição do óleo essencial de *L. officinale* (OELO) depende de vários fatores, como as partes da planta, colheita e localização geográfica (Moradalizadeh *et al.*, 2012). Alguns estudos destacam que o óleo essencial derivado da planta contém Z-ligustilida, pentilciclohexano, derivados de ftalida e terpenóides incluindo α - e β -pinenos, α - e β -felandrenos, γ -terpineno, carvacrol, eugenol, l- α -terpineol, p-cimeno e α -terpinila (Miran *et al.*, 2018). Devido às suas diversas características biológicas, a planta *Levisticum officinale* é amplamente submetida a estudos. Na tabela 3, são descritos exemplos de origem dos extratos e seus respectivos efeitos biológicos.

Tabela 3. Diferentes propriedades biológicas da planta *Levisticum officinale*.

| Origem da extração | Propriedade biológica | Referência |
|---|---|---|
| Óleo essencial das partes aéreas <i>L. officinale</i> | Antimicrobiano (<i>M. tuberculosis</i>) | Miran <i>et al.</i> , 2018. |
| Óleo essencial das folhas <i>L. officinale</i> | Inibe o crescimento de células tumorais | Sertel <i>et al.</i> , 2011. |
| Extrato aquosa de raízes de <i>L. officinale</i> | Potencial alelopático | Szparaga <i>et al.</i> , 2021. |
| Extrato etanólico de folhas de <i>L. officinale</i> | Aumenta viabilidade celular e capacidade reprodutiva (células Leydig TM3) | Jambor <i>et al.</i> , 2021. |
| Partes aéreas de <i>L. officinale</i> | Potencial fertilizante | Matlok <i>et al.</i> , 2021. |
| Óleo essencial das folhas de <i>L. officinale</i> | Atividade antitrombótica (Z-ligustilida) | Moradalizadeh <i>et al.</i> , 2012, Zhang <i>et al.</i> , 2009. |
| Extrato aquoso de <i>L. officinale</i> | Atividade hepatoprotetora (paraquat) | Afarnegan <i>et al.</i> , 2017. |

5 Ação antitrombótica e hepatoprotetora do OELO

A medicina complementar e alternativa é definida como todo tipo de terapia, seja medicamentosa ou não, que não esteja inserida no cuidado de saúde convencional (Makarem *et al.*, 2023). A aromaterapia encontra-se inserida na medicina integrativa, no entanto combinada com terapias convencionais (Liao *et al.*, 2022). Essa associação tem como objetivo complementar o tratamento tradicional, garantindo a promoção da saúde e bem estar (Liao *et al.*, 2022).

Os OEs são conhecidos por sua ampla aplicação à saúde, como antisséptica, calmante e antiinflamatória, no entanto não devem ser empregadas como substituição aos tratamentos tradicionais ou convencionais (Sharifi-rad *et al.*, 2023). A eficácia dos OEs é variável, além de terem apenas evidências científicas de curto prazo e ausência de estudos clínicos prolongados (Sharifi-rad *et al.*, 2023).

A utilização dos OEs com propriedades antitrombóticas e hepatoprotetoras podem trazer benefícios através da redução da inflamação, atuando como

antioxidante e protetor hepático (Daoudi, Bnouham, 2020). Os OEs possuem propriedades antiinflamatórias consequentemente reduzindo a inflamação evitando a formação de coágulos e, junto à atividade antioxidante auxiliam na prevenção de danos aos vasos sanguíneos e reduzindo o risco de trombose (Memariani *et al.*, 2018). Os OEs podem ser conhecidos por suas propriedades hepatoprotetoras, através da desintoxicação e redução da inflamação, relacionada a sua composição rica em antioxidantes (Daoudi, Bnouham, 2020). No entanto, a identificação de novos tratamentos com OEs para essas condições deve ser acompanhada por ensaios de toxicidade garantindo a segurança e eficácia (Leigh-de Rapper, Viljoen, Van Vuuren, 2021).

A intenção desse trabalho foi destacar que a utilização do óleo essencial de *L. officinale* traz inúmeros benefícios para saúde humana. Dessa maneira, o presente estudo que tem como objetivo avaliar a atividade antitrombótica e o efeito hepatoprotetor de *L. officinale* em diferentes concentrações em modelos experimentais *in vitro* e *in vivo*.

6 Referências bibliográficas

AARON, E., MONTGOMERY, A., REN, X., GUTER, S., ANDERSON, G., CARNEIRO, A. M., VEENSTRA-VANDERWEELE, J. Whole blood serotonin levels and platelet 5-HT 2A binding in autism spectrum disorder. **Journal of autism and developmental disorders**, v. 49, p. 2417-2425, 2019.

ABD EL-HAMID, S. R., ABEER, Y. I., HENDAWY, S. F. Anti-inflammatory, antioxidant, anti-tumor and physiological studies on *Levisticum officinale*-Koch plant. **Planta medica**, v. 75, n. 09, p. PE62, 2009.

AFARNEGAN, H., SHAHRAKI, A., SHAHRAKI, J. The hepatoprotective effects of aquatic extract of *Levisticum officinale* against paraquat hepatocyte toxicity. **Pakistan journal of pharmaceutical sciences**, v. 30, 2017.

AL-KHAYRI, J. M., BANADKA, A., NANDHINI, M., NAGELLA, P., AL-MSSALLEM, M. Q., ALESSA, F. M. Essential oil from *Coriandrum sativum*: A review on its phytochemistry and biological activity. **Molecules**, v. 28, n. 2, p. 696, 2023.

AZIZ, Z. A., AHMAD, A., SETAPAR, S. H. M., KARAKUCUK, A., AZIM, M. M., LOKHAT, D., ASHRAF, G. M. Essential oils: extraction techniques, pharmaceutical and therapeutic potential-a review. **Current drug metabolism**, v. 19, n. 13, p. 1100-1110, 2018.

AYENEW, K. D., WASIHUN, Y. Hepatoprotective effect of methanol extract of *Agave americana* leaves on paracetamol induced hepatotoxicity in Wistar albino rats. **BMC Complementary Medicine and Therapies**, v.23, n. 1, p. 99, 2023.

AYUB, M. A., IRAM, I., WASEEM, R., AYUB, I., HUSSAIN, A., ABID, M. A., IQBAL, S. Z. Optimizing the extraction of essential oil yield from *Pistacia lentiscus* oleo-gum resin by superheated steam extraction using response surface methodology. **Scientific Reports**, v. 14, n. 1, p. 25791, 2024.

BADULESCU, O. V., CIOCOIU, M., VLADANU, M. C., HUZUM, B., PLESOIANU, C. E., ILIESCU-HALITCHI, D., BOJAN, I. B. THE Role of Platelet Dysfunctions in the Pathogenesis of the Hemostatic-Coagulant System Imbalances. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 26, n. 6, p. 2756, 2025.

BALKRISHNA, A., BISHT, S., JOSHI, B., SRIVASTAVA, A., MISHRA, R. Study of essential oil bearing plants, their composition and Ayurvedic herbalism. **Journal of Essential Oil & Plant Composition. Health**, v. 5, n. 6, p. 23.

BARBOSA, K. B. F., COSTA, N. M. B., ALFENAS, R. D. C. G., DE PAULA, S. O., MINIM, V. P. R., BRESSAN, J. Oxidative stress: concept, implications and modulating factors. **Rev Nutr**, v. 23, n. 4, p. 629-43, 2010.

BARREIROS, ANDRÉ LBS; DAVID, JORGE M.; DAVID, JUCENI P. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Química nova**, v. 29, p. 113-123, 2006.

BATLOUNI, M. Anti-Inflamatórios Não Esteroides: **Efeitos Cardiovasculares**. 2010.

BECKER, R. C., SEXTON, T., SMYTH, S.S. Translational implications of platelets as vascular first responders. **Circulation research**, v. 122, n. 3, p. 506-522, 2018.

BITTENCOURT, N. C., SANTOS, P. N. P. Avaliação das provas da hemostasia primária em indivíduos atendidos nas clínicas odontológicas da Universidade Estadual de Feira de Santana. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v. 48, n. 2, p. 144-8, 2016.

BOLOURI, P., SALAMI, R., KOUHI, S., KORDI, M., ASGARI LAJAYER, B., HADIAN, J., ASTATKIE, T. Applications of essential oils and plant extracts in different industries. **Molecules**, v. 27, n.24, p.8999, 2022.

BONCLER, M., BARTCZAK, K., ROZALSKI, M. Potential for modulation of platelet function via adenosine receptors during inflammation. **British Journal of**

Pharmacology, v. 181, n. 4, p. 547-563, 2024.

BORGES, R. S., COSTA, W. S., GURRÃO, E. P., HOLANDA, L. H., SOUSA, A. C., VALE, J. K., DA SILVA, A. B. Estudo teórico e experimental de estrutura e reatividade relacionado ao metabolismo e toxicidade do paracetamol. **Química Nova**, v. 45, p.1160-1166, 2022.

BRANCO, A. C. C. C., YOSHIKAWA, F. S. Y., PIETROBON, A. J., SATO, M. N. Role of histamine in modulating the immune response and inflammation. **Mediators of inflammation**, v. 2018, 2018.

BRAYNER, A.A.S., ALMEIDA, F.R. O risco do uso irracional do paracetamol na população brasileira e seus efeitos na hemostasia. **Revista Científica FASETE**, v. 1, p. 138-53, 2018.

BRUNO, C., ALMEIDA, M. R. Óleos essenciais e vegetais: matérias-primas para fabricação de bioprodutos nas aulas de química orgânica experimental. **Química Nova**, v. 44, p. 899-907, 2021.

BRUNTON, L. L., HILAL-DANDAN, R., KNOLLMANN, B. C. As Bases Farmacológicas da Terapêutica de Goodman e Gilman-13. **Artmed Editora**, 2018.

CAVALCANTE, H. T. M., DOS SANTOS, N. S., DE OLIVEIRA, A. P., DOS SANTOS, J. P., DOS SANTOS, J. N., DA SILVA RODRIGUES, V. T., DA SILVA VIEIRA, L. C. A. Óleos essenciais no tratamento de dermatozoonoses—uma revisão de literatura. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 17, p. e144101724180-e144101724180, 2021.

CARDIA, G.F.E., SILVA-FILHO, S.E., SILVA, E.L., UCHIDA, N.S., CAVALCANTE, H.A.O., CASSAROTTI, L.L., CUMAN, R.K.N. Effect of lavender (*Lavandula angustifolia*) essential oil on acute inflammatory response. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**. 2018.

CARDOSO, A. M., MANFREDI, L. H., MACIEL, S. F. V. D. O. **Sinalização**

purinérgica: implicações fisiopatológicas. Editora UFFS, 2021.

CARDOSO-UGARTE, G. A., SOSA-MORALES, M. E. Essential oils from herbs and spices as natural antioxidants: Diversity of promising food applications in the past decade. **Food Reviews International**, v. 38, n. sup1, p. 403-433, 2022.

CASARETT, L. Casarett and Doull's toxicology: the basic science of poisons. **New York: McGraw-Hill**, v. 71470514, 2008.

CHAUDHARI, A. K., DAS, S., SINGH, V. K., PRASAD, J., DUBEY, N. K. Assessing the *Levisticum officinale* Koch. essential oil as a novel preservative for stored chia seeds (*Salvia hispanica* L.) with emphasis on probable mechanism of action. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 28, n. 48, p. 68690-68705, 2021.

CHIN, Y. W., BALUNAS, M. J., CHAI, H. B., KINGHORN, A. D. Drug discovery from natural sources. *The AAPS Drug discovery from natural sources.* **The AAPS Journal**, v. 8, n. 2, p. E239-E253, 2006.

CHOWDHURY, A., NABILA, J., TEMITOPE, I. A., WANG, S. Current etiological comprehension and therapeutic targets of acetaminophen-induced hepatotoxicity. **Pharmacological research**, v.161, p.105102, 2020.

CIMMINO, G.; GOLINO, P. Platelet biology and receptor pathways. **Journal of cardiovascular translational research**, v. 6, n. 3, p. 299-309, 2013.

CONSELHO FEDERAL DE ENFERMAGEM (BRASIL). Parecer 34/2020 da CTLN sobre prescrição de óleos essenciais. Coren-SE; 2020. Disponível em: <https://coren-se.gov.br/cofen-divulga-parecer-34-2020-da-ctlN-sobre-prescricao-de-oleos-essenciais/>. Acessado em 20 de abril de 2025.

CONTRUCCI, B. A., SILVA, R., JUNIOR, R. A., KOZUSNY-ANDREANI, D. I. Efeito de óleos essenciais sobre bactérias gram-negativas isoladas de alimentos. **Ensaio e Ciência C Biológicas Agrárias e da Saúde**, v. 23, n. 3, p.

180-184, 2019.

CRAVEIRO, A. A., QUEIROZ, D. C. Óleos essenciais e química fina. **Química nova**, v. 16, n. 3, p. 224-228, 1993.

CRISTANI, M., SPECIALE, A., MANCARI, F., ARCORACI, T., FERRARI, D., FRATANTONIO, D., TROMBETTA, D. Protective activity of an anthocyanin-rich extract from bilberries and blackcurrants on acute acetaminophen-induced hepatotoxicity in rats. **Natural Product Research**, v. 30, n. 24, p. 2845-2849, 2016.

DA CUNHA, I. P., DE CASTRO, M.M., DE CHECCHI, M. H. R. Política nacional de práticas integrativas e complementares no sistema único de saúde. **Revista Faipe**, v. 10, n. 1, p. 21-39, 2020.

DAOUDI, N. E.; BNOUHAM, M. Hepatoprotective essential oils: A review. **Journal of pharmacopuncture**, v. 23, n. 3, p. 124, 2020.

DA SILVA, S. C., CARDOSO, D. T., DOS SANTOS, J. V., DA SILVA SABOIA, C., BARBOSA, R. T. P., TELES, A. M., MOUCHREK, A.N. Caracterização química e atividade antimicrobiana do óleo essencial e do extrato bruto do capim limão (*Cymbopogon citratus*). **Research, Society and Development**, v. 11, n. 7, p. e37611730064-e37611730064, 2022.

DE FARIAS, M. T., CAVALCANTI, C. H. M., ALBUQUERQUE, J. R. A., FALCÃO FILHO, Á. S. S., ARAÚJO, P. X., MELO, A. B. M., DE JESUS, R. Aspectos moleculares e citotóxicos do paracetamol: uma revisão narrativa. **Revista Eletrônica Acervo Saúde**, v. 13, n. 8, p. e8511-e8511, 2021.

DEL CARMEN, R. D. S., SANDRA, G. S., GUADALUPE, B. R. S., BENJAMÍN, R. J., HERNÁN, N. Z. A. Hemostasia y factores asociados a tendencia trombótica. **Contenido/Contents**, v. 66, n. 4, p. 227-233, 2019.

DEMIRCI-ÇEKIÇ, S., ÖZKAN, G., AVAN, A. N., UZUNBOY, S., ÇAPANOĞLU, E., APAK, R. Biomarkers of oxidative stress and antioxidant defense. **Journal of**

pharmaceutical and biomedical analysis, v. 209, p. 114477, 2022.

DE OLIVEIRA, G. M. M., BRANT, L. C. C., POLANCZYK, C. A., MALTA, D. C., BIOLO, A., NASCIMENTO, B. R., RIBEIRO, A. L. P. **Cardiovascular Statistics–Brazil 2023**, 2024.

DE SOUSA, D. P., DAMASCENO, R. O. S., AMORATI, R., ELSHABRAWY, H. A., DE CASTRO, R. D., BEZERRA, D. P., LIMA, T. C. Essential oils: Chemistry and pharmacological activities. **Biomolecules**, v. 13, n. 7, p. 1144, 2023.

DIBETSO, T. J. Phase I reactions. **Southern African Journal of Anaesthesia and Analgesia**, v. 26, n. 6, p.S30-31, 2020.

DONG, N., LIN, H. Contribution of phenylpropanoid metabolism to plant development and plant–environment interactions. **Journal of integrative plant biology**, v. 63, n. 1, p. 180-209, 2021.

DÓRIS, B., SAVOGIN ANDRAUS, G., DA SILVA SEUNARAINÉ, R., NABOR DE CÁSSIA SILVA, D., DA SILVA TEIXEIRA, N., SIEGEL GUERRA, B., LENCI MARQUES, G. Association between Climatic Variables and Cardiovascular Hospitalizations in Brazil: An Ecological Study. **Available at SSRN 5242623**, 2025.

DOS SANTOS, T. S., ALMEIDA, M. M., PESSOA, E. V. M., PESSOA, N. M., SIQUEIRA, H. D. S., SILVA, J. M. N., SOUSA, F. D. C. A. Prática da automedicação entre acadêmicos do curso de enfermagem de uma instituição de ensino superior. **Scientia Plena**, v. 14, n. 7, 2018.

DOS SANTOS, B. A. B., MOMBELLI, M. A., VIEIRA, R. G., LOPES, A. R. Práticas Integrativas e Complementares na Atenção Primária à Saúde em Município de Médio Porte. **Revista Pleiade**, v. 17, n. 39, p. 37-47, 2023.

EDWARDS, S. E., DA COSTA ROCHA, I., WILLIAMSON, E. M., HEINRICH, M. **Phytopharmacy: An evidence-based guide to herbal medicinal products**. **John Wiley & Sons**, 2015.

EL-DEMERDASH, F. M., EL-SAYED, RAGHDA A., ABDEL-DAIM, MOHAMED M. Hepatoprotective potential of *Rosmarinus officinalis* essential oil against hexavalent chromium-induced hematotoxicity, biochemical, histological, and immunohistochemical changes in male rats. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 28, n. 14, p. 17445-17456, 2021.

EL-DIN, A. A. E., HENDARY, S. F. Comparative efficiency of organic and chemical fertilizers on herb production and essential oil of lovage plants grown in Egypt. **American-Eurasian J. Agricultural and Environmental Sciences**, v. 8, p. 60-66, 2010.

EL HADRI, K., SMITH, R., DUPLUS, E., EL AMRI, C. Inflammation, oxidative stress, senescence in atherosclerosis: Thioredoxine-1 as an emerging therapeutic target. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 1, p. 77, 2021.

FANG, H., GAO, B., ZHAO, Y., FANG, X., BIAN, M., XIA, Q. Curdione inhibits thrombin-induced platelet aggregation via regulating the AMP-activated protein kinase-vinculin/talin-integrin $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ sign pathway. **Phytomedicine**, v. 61, p. 152859, 2019.

DA FARMACOPEIA, Coordenação et al. Formulário de fitoterápicos da farmacopeia brasileira 2ª Edição. 2021.

FAVALORO, E. J., PASALIC, L., LIPPI, G. Autoimmune diseases affecting hemostasis: a narrative review. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 23, p. 14715, 2022.

FELIPE, L.O., BICAS, J. Terpenos: compostos majoritários de óleos essenciais. **Química e Sociedade**, v. 39, p. 120-130, 2016.

FELIPE, L.O., BICAS, J. Terpenos, aromas e a química dos compostos naturais. **Química Nova na Escola**, v. 39, n. 2, p. 120-130, 2017.

FERREIRA, A. L. A., MATSUBARA, L. S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista da associação médica brasileira**, v. 43, p. 61-68, 1997.

FILEP, J. G. Targeting neutrophils for promoting the resolution of inflammation. **Frontiers in immunology**, v. 13, p. 866747, 2022.

Folhas molhadas da planta Lovage (*Levisticum officinale*) crescendo no jardim. IStok, 2016. Disponível em < <https://www.istockphoto.com/br/foto/folhas-molhadas-da-planta-lovage-crescendo-no-jardim-gm585303768-100359925>>. Acesso em 24 de março de 2022.

FOREZI, L. S., FERREIRA, P. G., HÜTHER, C. M., DA SILVA, F. D. C., FERREIRA, V. F. Aqui Tem Química: parte IV. Terpenos na Perfumaria. **Revista Virtual de Química**, v. 14, p. 1005-1024, 2022.

Franklin, D. S., Oliveira, L. J., Machado, A. C. S., Rodrigues, G. S., Lascalla, K. R., Sandoval, E. G. B. Uso do Ácido Tranexâmico no contexto do trauma com hemorragia: Use of Tranexamic Acid in the context of trauma with hemorrhage. **Brazilian Journal of Development**, v. 8, n. 10, p. 65142-65156, 2022.

FRONTROTH, J.P., FAVALORO, E. J. Ristocetin-induced platelet aggregation (RIPA) and RIPA mixing studies. **Hemostasis and Thrombosis: Methods and Protocols**, p. 473-494, 2017.

GALDIERO, M. R.; MARONE, G.; MANTOVANI, A. Cancer inflammation and cytokines. **Cold Spring Harbor perspectives in biology**, v. 10, n. 8, p. a028662, 2018.

GARTNER, L.P. Tratado de histologia em cores. **Elsevier Brasil**, 2007.

GEORGIEVA, A. Potential health benefits of the plant (lovage) in relation to its

polyphenolic content. **Acta Scientifica Naturalis**, v. 10, n.1, pp.16-36, 2023.

GHAEDI, N.; POURABOLI, I.; ASKARI, N. Antidiabetic properties of hydroalcoholic leaf and stem extract of *Levisticum officinale*: an implication for α -amylase inhibitory activity of extract ingredients through molecular docking. **Iranian Journal of Pharmaceutical Research: IJPR**, v. 19, n. 1, p. 231, 2020.

GIMBEL, M. E., MINDERHOUD, S. C. S., & TEN BERG, J. M. A practical guide on how to handle patients with bleeding events while on oral antithrombotic treatment. **Netherlands Heart Journal**, v. 26, n. 6, p. 341-351, 2018.

GOLASZEWSKA, A., MISZTAL, T., MARCINCZYK, N., CHABIELSKA, E., RUSAK, T. Adrenaline may contribute to prothrombotic condition via augmentation of platelet procoagulant response, enhancement of fibrin formation, and attenuation of fibrinolysis. **Frontiers in Physiology**, v. 12, p. 657881, 2021.

GYAWALI, R., IBRAHIM, S. A. Natural products as antimicrobial agents. **Food control**, v. 46, p. 412-429, 2014.

HALLIWELL, B., GUTTERIDGE, J.M.C. *Free Radicals in Biology and Medicine*. ed. 5. Oxford: Clarendon Press, 2015.

HAN, S., SUZUKI-KERR, H., VLAJKOVIC, S. M., THORNE, P. R. The developmental journey of therapies targeting purine receptors: from basic science to clinical trials. **Purinergic Signalling**, v. 18, n. 4, p. 435-450, 2022.

HAWKINS, C. L., DAVIES, M. J. Role of myeloperoxidase and oxidant formation in the extracellular environment in inflammation-induced tissue damage. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 172, p. 633-651, 2021.

HEARD, K. J. Acetylcysteine for acetaminophen poisoning. **New England Journal of Medicine**, v. 359, n. 3, p. 285-292, 2008.

HOGG, C. L., SVOBODA, K. P., HAMPSON, J. B., BROCKLEHURST,

S. Investigation into the composition and bioactivity of essential oil from lovage (*Levisticum officinale* WDJ Koch). **International journal of aromatherapy**, v. 11, n. 3, p. 144-151, 2001.

HOSSEINI, E., HOJJATI, S., AFZALNIAYE GASHTI, S., GHASEMZADEH, M. Collagen-dependent platelet dysfunction and its relevance to either mitochondrial ROS or cytosolic superoxide generation: a question about the quality and functional competence of long-stored platelets. *Thrombosis Journal*, v. 18, p. 1-12, 2020.

HU, H., DAN, Z., JIAN-WEN, W., CHAO, WU., HONG-JIAO, LI., JUAN, Z., ZHUN X., CHAO, S. Chemical composition of citronella (*Cymbopogon winterianus*) leaves essential oil and gastric toxicity of its major components to drosophila melanogaster larvae. **Journal of Essential Oil Bearing Plants**, v. 25, n. 2, p. 315-325, 2022.

HU, W. J., YU, A. Q., BI, H. Z., ZHANG, Z. J., WANG, Z. B., WANG, M., KUANG, H. X. Carbon dots derived from *Zingiber officinale* Rosc (ginger) with hemostatic effects. **Frontiers in Molecular Biosciences**, v. 12, p. 1530469, 2025.

JAMBOR, T., ARVAY, J., TVRDA, E., KOVACIK, A., GREIFOVA, H., LUKAC, N. The effect of *Apium graveolens* L., *Levisticum officinale* and *Calendula officinalis* L. on cell viability, membrane integrity, steroidogenesis, and intercellular communication in mice Leydig cells *in vitro*. **Physiological Research**, v. 70, n. 4, p. 615, 2021.

JÄRVINEN, E., DENG, F., KIANDER, W., SINOKKI, A., KIDRON, H., SJÖSTEDT, N. The role of uptake and efflux transporters in the disposition of glucuronide and sulfate conjugates. **Frontiers in Pharmacology**, v.12, p.802539, 2022.

JAYASENA, D. D., JO, C. Potential application of essential oils as natural antioxidants in meat and meat products: A review. **Food reviews international**, v. 30, n. 1, p. 71-90, 2014.

JHALEGAR, M. D., SHARMA, R. R., SINGH, D. *In vitro* and *in vivo* activity of essential oils against major postharvest pathogens of Kinnow (*Citrus nobilis*× C.

deliciosa) mandarin. **Journal of food science and technology**, v. 52, n. 4, p. 2229-2237, 2015.

KAMMERER, S., NOWAK, E., MANTKE, R., JUNG, F., KÜPPER, J. H. *In vitro* simulation of the liver first-pass effect with biotransformation-competent HepG2 cells to study effects of MG-132 on liver and cancer cells. **Clinical Hemorheology and Microcirculation**, n. Preprint, p. 1-10, 2024.

KAPLAN, Z. S., JACKSON, S. P. The role of platelets in atherothrombosis. **Hematology 2010, the American Society of Hematology Education Program Book**, v. 2011, n. 1, p. 51-61, 2011.

KAZIANKA, L., DRUCKER, C., SKRABS, C., THOMAS, W., MELCHARDT, T., STRUVE, S., JAEGER, U. Ristocetin-induced platelet aggregation for monitoring of bleeding tendency in CLL treated with ibrutinib. **Leukemia**, v. 31, n. 5, p. 1117-1122, 2017.

KHERADPEZHOUHA, E., MA, L., MORPHETT, A., BARRITT, G. J., RYCHKOV, G. Y. TRPM2 channels mediate acetaminophen-induced liver damage. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 111, n. 8, p. 3176-3181, 2014.

KOUPENOVA, M., KEHREL, B. E., CORKREY, H. A., FREEDMAN, J. E. Thrombosis and platelets: an update. **European heart journal**, v. 38, n. 11, p. 785-791, 2017.

LAI, Y., KOELMEL, J. P., WALKER, D. I., PRICE, E. J., PAPAZIAN, S., MANZ, K. E., MILLER, G. W. High-resolution mass spectrometry for human exposomics: Expanding chemical space coverage. **Environmental Science & Technology**, v. 58, n. 29, p. 12784-12822, 2024.

LANGER, B., WOLOSKER, M. Coagulação e fibrinólise: ideias atuais e suas aplicações clínicas. **Revista de Medicina**, v. 85, n. 4, p. 157-164, 2006.

LARSEN, H. J., BYRNE, D., ÖZPOLAT, T., CHAUHAN, A., BAILEY, S. L.,

RHOADS, N., STOLLA, M. Loss of 12-Lipoxygenase improves the post-transfusion function of stored platelets. **Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology**, v. 43, n. 10, p. 1990-2007, 2023.

LEE, W., KU, S. K., KIM, M. A., BAE, J. S. Anti-factor Xa activities of zingerone with anti-platelet aggregation activity. **Food and Chemical Toxicology**, v. 105, p. 186-193, 2017.

LEIGH-DE RAPPER, S., VILJOEN, A., VAN VUUREN, S. Essential oil blends: The potential of combined use for respiratory tract infections. **Antibiotics**, v. 10, n. 12, p. 1517, 2021.

LI, X. J., SUO, P., WANG, Y. N., ZOU, L., NIE, X. L., ZHAO, Y. Y., MIAO, H. Arachidonic acid metabolism as a therapeutic target in AKI-to-CKD transition. **Frontiers in Pharmacology**, v. 15, p. 1365802, 2024.

LIAO, Y., LIU, X., ZHANG, M., HUA, H. Application Progress of Aromatherapy in Perioperative Patients. **Journal of Intelligent Medicine and Healthcare**, v. 1, n. 1, p. 1-10, 2022.

LITVINOV, R. I., PIETERS, M., DE LANGE-LOOTS, Z., WEISEL, J. W. Fibrinogen and fibrin. **Macromolecular Protein Complexes III: Structure and Function**, p. 471-501, 2021.

LOPES, J., MATHEUS, M.E. Risco de hepatotoxicidade do Paracetamol (Acetaminofem). **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 93, n. 4, p. 411-414, 2012.

LOPEZ-VILCHEZ, I., DIAZ-RICART, M., WHITE, J. G., ESCOLAR, G., GALAN, A. M. Serotonin enhances platelet procoagulant properties and their activation induced during platelet tissue factor uptake. **Cardiovascular research**, v. 84, n. 2, p. 309-316, 2009.

MACHADO, C. A., OLIVEIRA, F. O., DE ANDRADE, M. A., HODEL, K. V. S., LEPIKSON, H., MACHADO, B. A. S. Steam distillation for essential oil extraction: An evaluation of technological advances based on an analysis of patent

documents. **Sustainability**, v. 14, n.12, p. 7119, 2022.

MAKAREM, N. N., BROME, D., SAWAF, S. S., SAYYID, A., ROMANI, M. Knowledge, Attitude, and Practices of Complementary and Alternative Medicine: A Patients' Perspective. **Research Square**. 2023.

MAO, J., TAN, L., TIAN, C., WANG, W., ZHANG, H., ZHU, Z., LI, Y. Research progress on rodent models and its mechanisms of liver injury. **Life Sciences**, v. 337, p. 122343, 2024.

MARTIN, A. C., ZLOTNIK, D., BONETE, G. P., BARON, E., DECOUTURE, B., BELLEVILLE-ROLLAND, T., BACHELOT-LOZA, C. Epinephrine restores platelet functions inhibited by ticagrelor: A mechanistic approach. **European Journal of Pharmacology**, v. 866, p. 172798, 2020.

MARZUILLO, P., GUARINO, S.; BARBI, E. Paracetamol: a focus for the general pediatrician. **European journal of pediatrics**, v. 173, n. 4, p. 415-425, 2014.

MATŁOK, N., GORZELANY, J., FIGIEL, A., BALAJEJDER, M. Effect of fertilisation on the quality of dried coriander (*Coriandrum sativum L.*) and lovage (*Levisticum officinale*). **Agriculture**, v. 11, n. 5, p. 386, 2021.

MATUS, M. F., VILOS, C., CISTERNA, B. A., FUENTES, E., PALOMO, I. Nanotechnology and primary hemostasis: Differential effects of nanoparticles on platelet responses. **Vascular pharmacology**, v. 101, p. 1-8, 2018.

MCFADYEN, J. D., SCHAFF, M., PETER, K. Current and future antiplatelet therapies: emphasis on preserving haemostasis. **Nature Reviews Cardiology**, v. 15, n. 3, p. 181-191, 2018.

MEDLINSKIENE, K., RICHARDSON, S., PETTY, D., STIRLING, K., FYLAN, B. Barriers and enablers to healthcare system uptake of direct oral anticoagulants for stroke prevention in atrial fibrillation: a qualitative interview study with healthcare professionals and policy makers in England. **BMJ open**, v. 13, n. 4, p. e069575, 2023.

MEMARIANI, Z., MOEINI, R., HAMED, S. S., GORJI, N., MOZAFFARPUR, S. A. Medicinal plants with antithrombotic property in Persian medicine: a mechanistic review. **Journal of thrombosis and thrombolysis**, v. 45, p. 158-179, 2018.

MIRAN, M., FEIZABADI, M. M., KAZEMIAN, H., KARDAN-YAMCHI, J., MONSEF-ESFAHANI, H. R., EBRAHIMI, S. N. The activity of *Levisticum officinale* WDJ Koch essential oil against multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. **Iranian journal of microbiology**, v. 10, n. 6, p. 394, 2018.

MIRAN, M., MONSEF ESFAHANI, H., MORIDI FARIMANI, M., AHMADI, A. A., EBRAHIMI, S. N. Essential oil composition and antibacterial activity of *Levisticum officinale* Koch at different developmental stages. **Journal of Essential Oil Bearing Plants**, v. 21, n. 4, p. 1051-1055, 2018.

MIRRASEKHIAN, E., NILSSON, J. L., SHIONOYA, K., BLOMGREN, A., ZYGMUNT, P. M., ENGBLOM, D., BLOMQVIST, A. The antipyretic effect of paracetamol occurs independent of transient receptor potential ankyrin 1-mediated hypothermia and is associated with prostaglandin inhibition in the brain. **The FASEB Journal**, 2018.

MOHAMMED, H. A., ELDEEB, H. M., KHAN, R. A., AL-OMAR, M. S., MOHAMMED, S. A., SAJID, M. S., EL-READI, M. Z. Sage, *Salvia officinalis* L., Constituents, hepatoprotective activity, and cytotoxicity evaluations of the essential oils obtained from fresh and differently timed dried herbs: a comparative analysis. **Molecules**, v. 26, n. 19, p. 5757, 2021.

MORADALIZADEH, M., AKHGAR, M. R., RAJAEI, P., FAGHIHI-ZARANDI, A. CHEMICAL composition of the essential oils of *Levisticum officinale* growing wild in Iran. **Chemistry of natural compounds**, v. 47, n. 6, p. 1007-1009, 2012.

MORTIMER, P. M., MC INTYRE, S. A., THOMAS, D. C. Beyond the extra respiration of phagocytosis: NADPH oxidase 2 in adaptive immunity and inflammation. **Frontiers in immunology**, v. 12, p. 733918, 2021.

MOSSANEN, J. C., TACKE, F. Acetaminophen-induced acute liver injury in mice. **Laboratory animals**, v. 49, n. 1, p. 30-36, 2015.

NETA, R. N. F. C., SOUSA, D. B. P., DE SOUSA BARROS, M. F., NUNES, K. B., TORRES, H. S., ASSIS, E. B. V., TURRI, R. D. J. G. Usos potenciais de óleos essenciais em remediação ambiental: Uma revisão. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 7, p. e3210716146-e3210716146, 2021.

NEWMAN, D. J., CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs over the nearly four decades from 01/1981 to 09/2019. **Journal of Natural Products**, v. 83, n. 3, p. 770-803, 2020.

NIE, Y. J., WU, S. H., XUAN, Y. H., YAN, G. Role of IL-17 family cytokines in the progression of IPF from inflammation to fibrosis. **Military Medical Research**, v. 9, n. 1, p. 1-10, 2022.

OLENNIKOV, D. N. Coumarins of lovage roots (*Levisticum officinale* WDJ Koch): LC-MS profile, quantification, and stability during postharvest storage. **Metabolites**, v.13, n.1, p. 3, 2022.

PAN, G. Roles of hepatic drug transporters in drug disposition and liver toxicity. **Drug Transporters in Drug Disposition, Effects and Toxicity**, p. 293-340, 2019.

PAPACKOVA, Z., HECZKOVA, M., DANKOVA, H., STICOVA, E., LODEREROVA, A., BARTONOVA, L., CAHOVA, M. Silymarin prevents acetaminophen-induced hepatotoxicity in mice. **PloS one**, v. 13, n. 1, p. e0191353, 2018.

PARISOTTO, E. B., VIDAL, V., GARCÍA-CERRO, S., LANTIGUA, S., WILHELM FILHO, D., SANCHEZ-BARCELÓ, E. J., RUEDA, N. Chronic melatonin administration reduced oxidative damage and cellular senescence in the hippocampus of a mouse model of down syndrome. **Neurochemical research**, v. 41, n. 11, p. 2904-2913, 2016.

PERUMAL, A. B., HUANG, L., NAMBIAR, R. B., HE, Y., LI, X., SELLAMUTHU, P. S. Application of essential oils in packaging films for the preservation of fruits and vegetables: A review. **Food Chemistry**, p. 131810, 2021.

PITCHFORD, S.C., PAN, D. Platelet purinergic receptors and non-thrombotic diseases. **British journal of pharmacology**, v. 181, n. 4, p. 513-514, 2024.

POURSHAHRESTANI, S., ZEIMARAN, E., KADRI, N. A., MUTLU, N., BOCCACCINI, A. R. Polymeric hydrogel systems as emerging biomaterial platforms to enable hemostasis and wound healing. **Advanced healthcare materials**, v. 9, n. 20, p. 2000905, 2020.

RODRIGUES, E. S., CASTILHO-FERNANDES, A., FONTES, A. M. Novos conceitos sobre a fisiologia da hemostasia. **Revista da Universidade Vale do Rio Verde**, v. 10, n. 1, p. 218-233, 2012.

SALVATORE, M. M., NICOLETTI, R., ANDOLFI, A. Essential oils in citrus fruit ripening and postharvest quality. **Horticulturae**, v. 8, n. 5, p. 396, 2022.

SEBBEN, V.C. Validação de metodologia analítica e estudo de estabilidade para quantificação sérica de paracetamol. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 46, p. 143-148, 2010.

SELLAMUTHU, P. S., SIVAKUMAR, D., SOUNDY, P., KORSTEN, L. Essential oil vapours suppress the development of anthracnose and enhance defence related and antioxidant enzyme activities in avocado fruit. **Postharvest Biology and Technology**, v. 81, p. 66-72, 2013.

SERTEL, S., EICHHORN, T., PLINKERT, P. K., EFFERTH, T. Chemical Composition and antiproliferative activity of essential oil from the leaves of a medicinal herb, *Levisticum officinale*, against UMSCC1 head and neck squamous carcinoma cells. **Anticancer research**, v. 31, n. 1, p. 185-191, 2011.

SHAHIDI, Minoo. Thrombosis and von Willebrand factor. **Thrombosis and embolism: from research to clinical practice**, p. 285-306, 2016.

SHARIFI-RAD, J., SUREDA, A., TENORE, G. C., DAGLIA, M., SHARIFI-RAD, M., VALUSSI, M., IRITI, M. Biological activities of essential oils: From plant chemoecology to traditional healing systems. **Molecules**, v. 22, n. 1, p. 70, 2017.

SHARMA, S. H., THULASINGAM, S., NAGARAJAN, S. Terpenoids as anti-colon cancer agents—A comprehensive review on its mechanistic perspectives. **European journal of pharmacology**, v. 795, p. 169-178, 2017.

SHARIFI-RAD, J., SUREDA, A., TENORE, G. C., DAGLIA, M., SHARIFI-RAD, M., VALUSSI, M., IRITI, M. Role of Essential Oil Used Pharmaceutical Cosmetic Product. **Journal for Research in Applied Sciences and Biotechnology**, v. 2, n. 3, p. 147-157, 2023.

SIANO, F., CAUTELA, D. Assessment of free plant sterols in cold pressed Citrus essential oils. **Natural Product Research**, v. 35, n. 21, p. 4078-4083, 2021.

SILVA, R. D., MELO, E. M. A atual teoria da coagulação baseada em superfícies celulares. **Saúde & ciência em ação**, v. 2, n. 1, p. 79-92, 2016.

SIMÕES, C. M. O., SCHENKEL, E. P., GOSMANN, G., MELLO, J. C. P., MENTZ, L. A., PETROVICK, P. R. Farmacognosia, da planta ao medicamento. Porto Alegre/Florianópolis: Ed. **Universidade/UFRGS, Ed. da UFSC**, 2001.

SPENCE, C. Lovage: a neglected culinary herb. **International Journal of Gastronomy and Food Science**, v.33, p.100764, 2023.

SPRÉA, R. M., FERNANDES, Â., CALHELHA, R. C., PEREIRA, C., PIRES, T. C., ALVES, M. J., FERREIRA, I. C. Chemical and bioactive characterization of the aromatic plant *Levisticum officinale* WDJ Koch: A comprehensive study. **Food & Function**, v. 11, n. 2, p. 1292-1303, 2020.

STOLL, S. N. Óleos essenciais e aromaterapia aplicada à estética e bem-estar. **Studies in Health Sciences**, v. 5, n. 1, p. 92-108, 2024.

SZPARAGA, A., KOCIRA, S., FINDURA, P., KAPUSTA, I., ZAGUŁA, G., ŚWIECA, M. Uncovering the multi-level response of *Glycine max* L. to the application of allelopathic biostimulant from *Levisticum officinale* Koch. **Scientific Reports**, v. 11, n. 1, p. 1-15, 2021.

SZPARAGA, A., KOCIRA, S., KAPUSTA, I., ZAGUŁA, G. Exploring the agropotential of extract from *Levisticum officinale* WDJ Koch in soybean cultivation. **Industrial Crops and Products**, v.203, p.117235, 2023.

TAJNER-CZOPEK, A., GERTCHEN, M., RYTEL, E., KITA, A., KUCHARSKA, A. Z., SOKÓŁ-ŁĘTOWSKA, A. Study of antioxidant activity of some medicinal plants having high content of caffeic acid derivatives. **Antioxidants**, v. 9, n. 5, p. 412, 2020.

THANGALEELA, S., SIVAMARUTHI, B. S., KESIKA, P., BHARATHI, M., KUNAVIKTIKUL, W., KLUNKLIN, A., CHAIYASUT, C. Essential oils, phytoncides, aromachology, and aromatherapy—a review. **Applied Sciences**, 12(9), 4495, 2022.

THEOFILIS, P., SAGRIS, M., OIKONOMOU, E., ANTONOPOULOS, A. S., TSIIOUFIS, K., TOUSOULIS, D. Factors associated with platelet activation-recent pharmaceutical approaches. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 6, p. 3301, 2022.

THIVIYA, P., GUNAWARDENA, N., GAMAGE, A., MADHUJITH, T., MERAH, O. Apiaceae Family as a Valuable Source of Biocidal Components and their Potential Uses in Agriculture. **Horticulturae**, v. 8, n. 7, p. 614, 2022.

TONET, A. C., NÓBREGA, O. T. Imunossenescência: a relação entre leucócitos, citocinas e doenças crônicas. **Revista Brasileira de Geriatria e Gerontologia**, v. 11, p. 259-273, 2008.

TSYU, N. G., BELYAEV, A. V. Coarse-grained simulations of von Willebrand factor adsorption to collagen with consequent platelet recruitment. **International Journal for Numerical Methods in Biomedical Engineering**, v.39, n.11, p. e3747, 2023.

ULANOWSKA, M., OLAS, B. Biological properties and prospects for the application of eugenol—a review. **International journal of molecular sciences**. v.22, n.7, p. 3671, 2021.

VADUGANATHAN, M., MENSAH, G. A., TURCO, J. V., FUSTER, V., ROTH, G. A. The global burden of cardiovascular diseases and risk: a compass for future health. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 80, n. 25, p. 2361-2371, 2022.

VAN DER MEIJDEN, P.E.J., HEEMSKERK, J.W.M. Platelet biology and functions: new concepts and clinical perspectives. **Nature Reviews Cardiology**, v. 16, n. 3, p. 166-179, 2019.

VAYNE, C., GRUEL, Y., POUPLARD, C. Hemostasia: fisiología y principales pruebas de exploración. **EMC-Tratado de Medicina**, v. 25, n. 1, p. 1-10, 2021.

VILAHUR, G., GUTIERREZ, M., ARZANAUSKAITE, M., MENDIETA, G., BEN-AICHA, S., BADIMON, L. Intracellular platelet signalling as a target for drug development. **Vascular pharmacology**, v.111, p. 22-25,2018.

VORA, L. K., GHOLAP, A. D., HATVATE, N. T., NAREN, P., KHAN, S., CHAVDA, V. P., KHATRI, D. K. Essential oils for clinical aromatherapy: A comprehensive review. **Journal of ethnopharmacology**, p. 118180, 2024.

WANG, X. ZHANG, Z., WU, S. Health benefits of *Silybum marianum*: Phytochemistry, pharmacology, and applications. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 68, n. 42, p. 11644-11664, 2020.

WANG, X. J., LUO, Q., LI, T., MENG, P. H., PU, Y. T., LIU, J. X., XIONG, A. S. Origin, evolution, breeding, and omics of Apiaceae: a family of vegetables and

medicinal plants. **Horticulture Research**, v. 9, p. uhac076, 2022.

WESDEMIOTIS, C., WILLIAMS-PAVLANTOS, K. N., KEATING, A. R., MCGEE, A. S., BOCHENEK, C. Mass spectrometry of polymers: A tutorial review. **Mass spectrometry reviews**, v. 43, n. 3, p. 427-476, 2024.

WIN, S., THAN, T. A., KAPLOWITZ, N. The regulation of JNK signaling pathways in cell death through the interplay with mitochondrial SAB and upstream post-translational effects. **International journal of molecular sciences**, v. 19, n. 11, p. 3657, 2018.

YANG, W., CHEN, X., LI, Y., GUO, S., WANG, Z., YU, X. Advances in pharmacological activities of terpenoids. **Natural Product Communications**, v. 15, n. 3, p. 1934578X20903555, 2020.

YANG, Z., LIU, X., CRIBBIN, E. M., KIM, A. M., LI, J. J., YONG, K. T. Liver-on-a-chip: Considerations, advances, and beyond. **Biomicrofluidics**, v. 16, n.6, 2022.

YE, F., GARTON, H. J., HUA, Y., KEEP, R. F., XI, G. The role of thrombin in brain injury after hemorrhagic and ischemic stroke. **Translational Stroke Research**, v. 12, p. 496-511, 2021.

ZAIDI, A., GREEN, L. Physiology of haemostasis. *Anaesthesia & Intensive Care Medicine*, 2022.

ZHANG, L., DU, J. R., WANG, J., YU, D. K., CHEN, Y. S., HE, Y., WANG, C. Y. Z-ligustilide extracted from *Radix Angelica Sinensis* decreased platelet aggregation induced by ADP ex vivo and arterio-venous shunt thrombosis in vivo in rats. **Yakugaku Zasshi**, v. 129, n. 7, p. 855-859, 2009.

ZHANG, X., LIU, C. J. "Multifaceted regulations of gateway enzyme phenylalanine ammonia-lyase in the biosynthesis of phenylpropanoids." **Molecular plant**, v. 8, n. 1, p. 17-27, 2015.

ZHONG, S., FAN, Y., YAN, Q., FAN, X., WU, B., HAN, Y., NIU, J. The therapeutic effect of silymarin in the treatment of nonalcoholic fatty disease. **Medicine**, v. 96, n. 49, p. e9061, 2017.

ZHOU, J., ZHAI, J., ZHENG, W., HAN, N., LIU, Z., LV, G., YIN, J. The antithrombotic activity of the active fractions from the fruits of *Celastrus orbiculatus* Thunb through the anti-coagulation, anti-platelet activation and anti-fibrinolysis pathways. **Journal of ethnopharmacology**, v. 241, p. 111974, 2019.

ZHU, D., PHAM, Q. M., WANG, C., COLONNELLO, E., YANNAS, D., NGUYEN, B. H., SANSONE, A. Erectile Dysfunction and Oxidative Stress: A Narrative Review. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 26, n. 7, p. 3073, 2025.

7 OBJETIVOS

7.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito antitrombótico e hepatoprotetor do óleo essencial de *Levisticum officinale* (OELO).

7.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar a caracterização química do OELO;
- Avaliar o efeito do OELO sobre:
 - A toxicidade *in vitro* com Azul de Trypan e *in vivo* em *Galleria mellonella*;
 - Agregação plaquetária induzida por ADP e epinefrina (EPI);
 - A coagulação sanguínea
- Avaliar como possível mecanismo de ação do OELO sobre a ativação plaquetária.
- Avaliar o efeito do OELO em camundongos Balb/c com hepatotoxicidade induzida por paracetamol sobre:
 - As alterações funcionais hepáticas por meio de marcadores bioquímicos plasmáticos (AST, ALT e γ -GT);
 - Os aspectos inflamatórios no tecido hepático (MPO e \bullet NO);
 - O estado oxidativo hepático utilizando biomarcadores de estresse oxidativo (conteúdo de TBARS e GSH);
 - As características histológicas do tecido hepático.

CAPITULO 2: Perfil químico e atividade antitrombótica do óleo essencial de *Levisticum officinale* WDJ Koch (Apiaceae)

Figura 10. Folha de rosto do artigo publicado no periódico Chemical Papers (JCR/2024 2.5 – Qualis A4 - <https://doi.org/10.1007/s11696-024-03573-5>).

Chemical Papers
<https://doi.org/10.1007/s11696-024-03573-5>

ORIGINAL PAPER



Chemical profile and antithrombotic activity of the essential oil of *Levisticum officinale* W.D.J.Koch (Apiaceae)

Denise Caroline Luiz Soares Basilio¹ · Isabelly Teixeira Espinoça¹ · Paola Mayara Valente Coronel¹ · Rafael Seiji Nakano Ota¹ · Anna Júlia Papa de Araujo¹ · Nadla Soares Cassemiro^{1,2} · Denise Brentan Silva^{1,2} · Janaina de Cássia Orlandi Sardi³ · Kamylla Fernanda Souza de Souza⁴ · Davi Campos La Gatta¹ · Edgar Julian Paredes-Gamero¹ · Everton do Nascimento Alencar¹ · Eduardo Benedetti Parisotto¹

Received: 22 February 2024 / Accepted: 15 June 2024
© The Author(s), under exclusive licence to the Institute of Chemistry, Slovak Academy of Sciences 2024

Abstract

Cardiovascular diseases generate high costs for public health systems, making it necessary to develop/discover anticoagulant or antiplatelet agents. In this context, the present study investigated the antithrombotic action of the essential oil of *Levisticum officinale* W.D.J. Koch in an in vitro experimental model. The oil chemical composition was characterized using gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC–MS). The trypan blue exclusion assay in platelets (in vitro) was carried out. Systemic toxicity was studied by an in vivo model of *Galleria mellonella* larvae. Platelet aggregation assay was performed by turbidimetry in an aggregometer device, using the adenosine receptor agonist, ADP, and epinephrine (EPI). Coagulation was determined by prothrombin activity time (PT) and partially activated thromboplastin time (aPTT) in the coagulation system. Platelet activation was assessed by P-selectin expression and reactive oxygen species (ROS) content by flow cytometry and fluorescence, respectively. The oil is composed of monoterpenes, including α -terpinyl acetate, β -phellandrene, β -myrcene, α -terpineol, and (Z)- β -ocimene. The oil did not show toxicity in vitro and in vivo. The oil significantly reduced platelet aggregation against ADP and EPI. EPI-induced aggregation was most potently inhibited. Treatment of platelets with oil showed a decrease in P-selectin expression and ROS production when compared to vehicle. On the other hand, the oil did not interfere in PT and aPTT. The results demonstrated that the essential oil of *Levisticum officinale* has antiplatelet action but without anticoagulant effects.

Eduardo Benedetti Parisotto
eduardo.parisotto@ufms.br; parisotto.edu@gmail.com

¹ Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Alimentos e Nutrição (FACFAN), Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS), Bairro Universitário, Av. Costa e Silva, Campo Grande, MS 79070-900, Brazil

² Laboratório de Produtos Naturais e Espectrometria de Massas (LAPNEM), Faculdade de Ciências Farmacêuticas Alimentos e Nutrição (FACFAN), Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS), Campo Grande, MS, Brazil

³ Divisão de Pesquisa Odontológica, Universidade de Guarulhos, Guarulhos, SP 07023-070, Brazil

⁴ Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, Brazil

Published online: 21 June 2024

Springer

Perfil químico e atividade antitrombótica do óleo essencial de *Levisticum officinale* WDJ Koch (Apiaceae)

Resumo

As doenças cardiovasculares estão associadas a altos custos para os sistemas de saúde pública, tornando necessário o desenvolvimento de agentes anticoagulantes ou antiplaquetários. Portanto, o presente estudo investigou a ação antitrombótica do óleo essencial de *Levisticum officinale* WDJ Koch em um modelo experimental *in vitro*. A composição química do óleo essencial foi caracterizada por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM). Foi realizado o ensaio de exclusão do azul de Trypan em plaquetas (*in vitro*). A toxicidade sistêmica foi realizada através do modelo *in vivo* de larvas de *Galleria mellonella*. O ensaio de agregação plaquetária foi realizado por turbidimetria utilizando um agregômetro semiautomático, e foram empregados dois agentes agregantes: agonista do receptor de adenosina (ADP) e epinefrina (EPI). A coagulação foi determinada pelo tempo de atividade da protrombina (TP) e tempo de tromboplastina parcialmente ativada (TTPa) em coagulômetro semiautomatizado. A ativação plaquetária foi avaliada pela expressão de P-selectina e conteúdo de espécies reativas de oxigênio (EROs) por citometria de fluxo e fluorescência, respectivamente. Em nosso estudo, identificamos que o óleo essencial é constituído predominantemente por monoterpenos, incluindo α -terpinil acetato, β -felandreno, β -mirceno, α -terpineol e (Z)- β -ocimeno. O óleo essencial não apresentou toxicidade *in vitro* e *in vivo*. O óleo essencial reduziu significativamente a agregação plaquetária frente ADP e EPI. A agregação induzida por EPI foi mais potentemente inibida. O tratamento de plaquetas com óleo essencial mostrou uma diminuição na expressão de P-selectina e produção de EROs quando comparado ao veículo. Por outro lado, o óleo essencial não interferiu no TP e TTPa. Os resultados demonstraram que o óleo essencial de *L. officinale* tem ação antiplaquetária, mas não possui efeitos anticoagulantes.

Palavras-chave: Lovage · Antiagregante · Plaquetas · P-selectina · Espécies reativas de oxigênio

Introdução

Muitos indivíduos vivem com doenças crônicas e o aumento da expectativa de vida pode agravar essa situação (Bickmann *et al.*, 2017). Eventos tromboembólicos, por exemplo, representam um sério problema de saúde pública (Bickmann *et al.*, 2017). Diversos estudos investigaram o desenvolvimento de medicamentos para tratar e prevenir eventos tromboembólicos (Andrews *et al.* 2014). No entanto, a farmacoterapia disponível atualmente para tratamento antitrombótico possui desvantagens consideráveis, como um risco aumentado de sangramento (Bickmann *et al.*, 2017) e altos custos de tratamento. Tais problemas ressaltam a necessidade de novos agentes antitrombóticos (Gimbel *et al.*, 2018; Mcfadyen *et al.*, 2018).

Os produtos naturais são empregados por muitas décadas na medicina tradicional (Wang *et al.*, 2023). Atualmente são estudados por seus possíveis efeitos protetores contra riscos sérios à saúde de doenças tromboembólicas (Santana *et al.*, 2023). Os óleos essenciais, por exemplo, são produtos naturais extraídos de plantas aromáticas e caracterizados por uma composição complexa de substâncias voláteis (Santana *et al.*, 2023). São conhecidas por suas atividades biológicas, como anticâncer, antimicrobiana, anti-inflamatória e antitrombótica (Santana *et al.*, 2023).

A família Apiaceae compreende vegetais e plantas aromáticas bem conhecidos, como aipo (*Apium graveolens*), salsa (*Petroselinum crispum*), coentro (*Coriandrum sativum*) e cominho (*Cuminum cyminum*). Além de serem valorizadas como ingredientes culinários, são usadas em formulações de fragrâncias e no desenvolvimento de medicamentos (Thiviya *et al.*, 2022). A família compreende cerca de 434 gêneros e 3780 espécies, distribuídas em várias regiões do mundo com diferentes propriedades terapêuticas (Wang *et al.*, 2022). As plantas e vegetais da família produzem metabólitos secundários, como óleos essenciais, polifenóis, cumarinas, saponinas e alcaloides (Thiviya *et al.*, 2022). Muitas plantas são conhecidas por serem empregadas na medicina tradicional ou como remédios caseiros para prevenir ou tratar doenças como hipertensão e doenças cardiovasculares (Kamyab *et al.*, 2020). Estudos mostraram que as plantas da família Apiaceae são uma boa fonte de compostos

bioativos com efeitos antimicrobianos, anti-inflamatórios, anticancerígenos, cardioprotetores, anti-hiperglicêmicos e hipolipidêmicos (Sal-eem *et al.*, 2017).

Levisticum officinale WDJKoch (Apiaceae), conhecido como levístico ou lovage, é uma erva perene classificada como glabra e eudicotiledônea, com sabor e cheiro característicos de aipo (Miran *et al.*, 2018a,b). A planta é oriunda do Irã e do Afeganistão e difundiu-se pelo mundo todo. Atualmente, encontra-se em várias áreas da Europa e no sudoeste da região do Mediterrâneo Oriental (Afarnehan *et al.*, 2017). Todas as partes de *L. officinale* têm o sabor característico do aipo, sendo que os extratos de raiz são descritos como picantes (Deepika *et al.*, 2021; Moradalizadeh *et al.*, 2012). No sul da Europa, as folhas de *L. officinale* são usadas em saladas e sopas, assim como suas sementes que são adicionadas a doces, bolos e queijos; e os talos geralmente são comidos frescos (Spréa *et al.*, 2020). As folhas secas de levístico são usadas para preparar infusões para aliviar dor de garganta e febre devido às suas propriedades anti-inflamatórias (Miran *et al.*, 2018a,b).

O óleo essencial de *L. officinale* (OELO) contém monoterpenos, incluindo acetato de α -terpinila e β -felandreno (Spréa *et al.*, 2020; Miran *et al.*, 2018a,b), que possui propriedades anti-inflamatórias e antioxidantes, respectivamente, sendo benéficas em condições como inflamação, dor e infecções (Deep-ika *et al.*, 2021). Diferentes partes constituintes do lovage são usadas na preparação de medicamentos e usadas como temperos alimentares (Miran *et al.*, 2018a,b). Além disso, raízes e folhas de *L. officinale* têm alto teor de compostos fenólicos que estimulam o sistema imunológico e protegem contra inflamação, sendo usadas na prevenção de inúmeras doenças cardiovasculares e distúrbios neurodegenerativos (Violeta *et al.*, 2017). Apesar de ser tradicionalmente usada para proteção cardiovascular, os possíveis efeitos antitrombóticos da planta nunca foram avaliados.

Dada a importância biológica do óleo essencial das folhas de *L. officinale*, este estudo teve como objetivo investigar sua toxicidade, bem como suas propriedades antiagregantes e anticoagulantes *in vitro*.

Material e métodos

Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (CG-EM)

O OELO foi adquirido através da empresa Laszlo[®], por destilação por arraste a vapor das folhas importadas da Hungria e analisado por CG-EM (Sharma et al. 2021). A amostra foi diluída em hexano a uma concentração de 5 mg/mL, e 1 µL foi injetado em um cromatógrafo Shimadzu QP2010 equipado com um autoinjeter COA-20i e uma coluna capilar Rtx-5MS (30 m×0,25 mm×0,25 µm). A temperatura de injeção foi de 250 °C, e a razão de divisão foi de 1:20. O programa de temperatura foi aumentado de 60 para 240°C com uma rampa de 3 °C/min, e o tempo total de análise foi de 60 min.

O hélio foi usado como gás de arraste a 79,7 kPa, e o fluxo da coluna foi de 1,30 mL/min. Os espectros de massa foram obtidos por ionização de elétrons a 70 eV. A temperatura da interface foi de 280 °C, e a faixa de m/z aplicada foi de 40–500. Os constituintes do óleo essencial foram identificados em comparação de seus espectros de massa com aqueles depositados nas bibliotecas do Instituto Nacional de Padrões e Tecnologia (*National Institute of Standards and Technology* - NIST), Wiley, e Espectros de massa de sabor e fragrância de compostos naturais e sintéticos (*Mass Spectra of Flavour and Fragrance of Natural and Synthetic Compounds* - FFNSC) e seus índices de retenção (calculados pela injeção de um padrão de alceno C8–C28) com dados da literatura (Adams, 2007).

Coleta de sangue

As plaquetas humanas foram obtidas através da coleta de sangue de 20 doadores saudáveis, homens e mulheres, na mesma proporção, com idades entre 18 e 40 anos, sem histórico de sangramento ou trombose. As amostras foram fornecidas voluntariamente. Todos os voluntários assinaram um termo de

consentimento antes de participar do estudo. O protocolo do estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul e atende às diretrizes nacionais e internacionais sobre pesquisas envolvendo seres humanos (protocolo CAAE n.º 57842022.2.0000.0021, parecer de aprovação n.º 5.445.802).

A coleta de sangue foi realizada usando citrato trissódico (nove partes de sangue e uma parte de 3,8% de citrato trissódico) como anticoagulante. Para os ensaios da determinação da agregação plaquetária, um *pool* de plasma rico em plaquetas (PRP) foi obtido por centrifugação de sangue total por 10 min a 123×g em temperatura ambiente. O PRP foi ajustado para $2,5 \times 10^8$ células/mL em solução salina tamponada com fosfato. Para ensaios de coagulação, um *pool* de plasma pobre em plaquetas (PPP) foi usado. O *pool* de PPP foi obtido por centrifugação de amostras de sangue por 15 min a 1107×g e 8 °C. Em todos os experimentos, foram usados PRP e PPP, os quais foram obtidos dentro de 3 h após a coleta da amostra.

Avaliação de toxicidade

Toxicidade *in vitro* com azul de Trypan

A viabilidade plaquetária foi determinada usando o ensaio de exclusão de azul de trypan. Para isso, 400 µL de PRP foram incubados com 5 µL de OELO em diferentes concentrações (50, 100, 200, 400, 800 e 1000 µg/ mL), DMSO 0,6% (v/v) (controle negativo/veículo) ou 1% de Triton X-100 (controle positivo) por 5 min. Posteriormente, 50 µL de PRP tratado (OELO ou controles) foram misturados individualmente com um volume igual de azul de Trypan 0,04% e 20 µL desta solução foram transferidos para uma câmara de Neubauer para determinar as contagens de plaquetas totais e não viáveis. A viabilidade plaquetária foi determinada pela Eq. (1). Os resultados foram apresentados como a média.

Eq. 1. Viabilidade plaquetária (%) = $\frac{\text{Número total de células viáveis}}{\text{Número total de células}} \times 100$

Toxicidade aguda *in vivo* em *Galleria mellonella*

Este ensaio foi realizado para avaliar efeitos tóxicos sistêmicos, conforme descrito por Megaw *et al.* 2015. Dez larvas pesando entre 0,2 e 0,3 g e sem sinais de melanização foram usadas por grupo. Inicialmente, 10 µL de OELO foram injetados no hemocele de cada larva através da última proleg esquerda usando uma seringa Hamilton (Hamilton Inc[®], Nevada, EUA). Posteriormente, as larvas foram incubadas no escuro a 37 °C, e sua sobrevivência foi registrada em intervalos selecionados por 72 h. Larvas que não se moviam quando tocadas e com altos níveis de melanização eram contadas como mortas.

Determinação da agregação plaquetária

A agregação plaquetária foi avaliada por turbidimetria (Weber *et al.* 2022), utilizando um agregômetro semiautomático (EasyA-greg, Qualitem[®], São Paulo, Brasil). Alíquotas de 400 µL de PRP foram transferidas para uma curveta e homogeneizadas sob agitação a 180×g e 37 °C. As plaquetas foram pré incubadas com 5 µL de diferentes concentrações de OELO (50, 100, 200, 400, 800 e 1000 µg/mL), e posteriormente, foram adicionadas adenosina difosfato (ADP, 30 µM, Sigma–Aldrich[®] St. Louis, EUA) ou epinefrina (EPI, 5 µg/mL; Hipolabor[®], Minas Gerais, Brasil). A agregação foi medida como porcentagem (%) e registrada continuamente por 5 min após a adição do agonista. A turbidez basal das amostras foi corrigida usando PPP obtido por centrifugação. O veículo (DMSO 0,6% (v/v)) foi usado como controle negativo e 10 µM de ticlopidina, como controle positivo. ADP, epinefrina e ticlopidina foram diluídos em água destilada purificada. Todos os testes foram realizados em triplicata e em três dias independentes.

Avaliação da coagulação sanguínea

Os ensaios de coagulação foram realizados usando um coagulômetro semiautomático (CLOTimer®, Quick Timer, São Paulo, Brasil). Inicialmente, 100 µL do *pool* de PRP foram incubados a 37 °C por 5 min com diferentes concentrações de OELO (50, 100, 200, 400, 800 e 1000 µg/mL). Em seguida, o tempo de protrombina (TP) e o tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPa) foram determinados de acordo com as diretrizes do fabricante (BIOS Diagnostics®, São Paulo, Brasil). O veículo (DMSO 0,6% v/v) foi usado como controle negativo e a heparina (17 UI/mL de sangue) como controle positivo. Todos os testes foram realizados em triplicata, em três dias independentes, sem exceder três horas após a coleta.

Ativação plaquetária

Expressão de P-selectina

A expressão da P-selectina nas plaquetas foi determinada após incubação de 400 µL de pool de PRP com 5 µL de OELO (50, 100, 200, 400, 800 e 1000 µg/mL) ou veículo (DMSO 0,6% v/v) por 5 min em temperatura ambiente. A solução foi estimulada com ADP (30 µM) e incubada por 5 min. As plaquetas ativadas foram marcadas com isotiocianato de fluoresceína (FITC) anti-CD42b humano de camundongo (5 µL) e P-selectina com ficoeritrina (PE) anti-CD62P humano de camundongo (5 µL). As amostras foram mantidas no escuro por 15 min. PRP não marcado, PRP marcado apenas com CD42b-FITC e PRP marcado apenas com CD62P-PE foram usados como controles. Um total de 10.000 eventos foram avaliados usando citômetro de fluxo CytoFLEX (Beckman Coulter®, Califórnia, EUA). Os dados foram analisados usando o software FlowJo® versão 10.8 (BD Life Sciences®) (Merten, Thiagarajan 2000; Park, 2009).

Geração de espécies reativas de oxigênio

A ativação plaquetária também foi avaliada pela determinação do conteúdo intraplaquetário de espécies reativas de oxigênio (EROs), conforme Reiniers *et al.*, 2017. Em uma placa de 96 poços, foram adicionados 200 µg de PRP ($2,5 \times 10^8$ células/mL), 2,5 µg dos respectivos controles (DMSO 0,5% e H₂O₂ 30%) e 2,5 µg de OELO (0–1000 µg/mL). A placa foi incubada por 5 min, em seguida 10 µL de 2',7'-diclorodihidrofluoresceína diacetato (DCFH-DA-10 µM) foram adicionados em cada poço, e a placa foi incubada por mais 30 min. Todos os experimentos foram realizados em triplicata em três dias independentes. A intensidade da fluorescência foi medida na emissão de 485/530 nm usando um espectrofotômetro multimodo (Varioskan™ LUX, Thermo Fisher Scientific®, Vantaa, Finlândia).

Análise estatística

Para o modelo de *G. mellonella*, as diferenças na sobrevivência foram comparadas usando o teste log-rank. Análise de variância unidirecional (ANOVA) foi realizada para investigar diferenças entre concentrações de OELO e os controles. A significância foi definida em $p < 0,05$. Todas as imagens dos resultados foram geradas usando GraphPad Prism 8.0.

Resultados

Composição química do OELO

A análise da CG-EM de OELO revelou a presença de 32 constituintes voláteis. Dezenove compostos foram anotados usando as bibliotecas de equipamentos (NIST, FFNSC e Wiley) bem como os índices de retenção (Tabela 1). As principais classes de compostos foram monoterpenos oxigenados e não

oxigenados, enquanto os principais compostos foram acetato de α -terpinila (36,67%), β -felandreno (36,21%), β -mirceno (10,66%), α -terpineol (4,61%) e (Z)- β -ocimeno (3,22%) (Tabela 1).

Tabela 1. Constituintes identificados a partir do óleo essencial de *L. officinale* (OELO) por CG-EM.

| Pico | RT (min) | Composto | Área (%) | RI |
|------|----------|-----------------------|----------|------|
| 1 | 4.31 | NI | 0.01 | - |
| 2 | 4.50 | NI | 0.06 | 909 |
| 3 | 4.87 | NI | 0.13 | 928 |
| 4 | 4.95 | α -tujeno | 0.07 | 931 |
| 5 | 5.13 | α -pineno | 2.18 | 939 |
| 6 | 5.40 | NI | 0.03 | 951 |
| 7 | 5.50 | Canfeno | 0.15 | 955 |
| 8 | 5.65 | NI | 0.02 | 961 |
| 9 | 5.96 | NI | 0.37 | 972 |
| 10 | 6.12 | Sabineno | 1.05 | 978 |
| 11 | 6.23 | β -pineno | 0.30 | 982 |
| 12 | 6.39 | NI | 0.01 | 987 |
| 13 | 6.57 | β -mirceno | 10.66 | 993 |
| 14 | 6.72 | NI | 0.00 | 998 |
| 15 | 6.98 | α -felandreno | 1.12 | 1007 |
| 16 | 7.37 | α -terpineno | 0.03 | 1020 |
| 17 | 7.62 | P-Cimeno | 1.29 | 1029 |
| 18 | 7.80 | β -felandreno | 36.21 | 1035 |
| 19 | 8.02 | (Z)- β -ocimeno | 3.22 | 1042 |
| 20 | 8.38 | (E)- β -ocimeno | 0.50 | 1053 |
| 21 | 8.65 | NI | 0.01 | 1060 |
| 22 | 8.76 | Y-terpineno | 0.57 | 1064 |
| 23 | 9.07 | NI | 0.01 | 1072 |
| 24 | 9.83 | α -terpinoleno | 0.18 | 1091 |

| | | | | |
|----|-------|--------------------------------|-------|------|
| 25 | 10.27 | Linalol | 0.06 | 1102 |
| 26 | 11.38 | NI | 0.04 | 1134 |
| 27 | 12.49 | NI | 0.25 | 1162 |
| 28 | 13.31 | Terpinen-4-ol | 0.07 | 1181 |
| 29 | 13.71 | NI | 0.08 | 1190 |
| 30 | 13.85 | α -terpineol | 4.61 | 1193 |
| 31 | 19.12 | NI | 0.03 | 1320 |
| 32 | 20.50 | acetato de α -terpinila | 36.67 | 1355 |

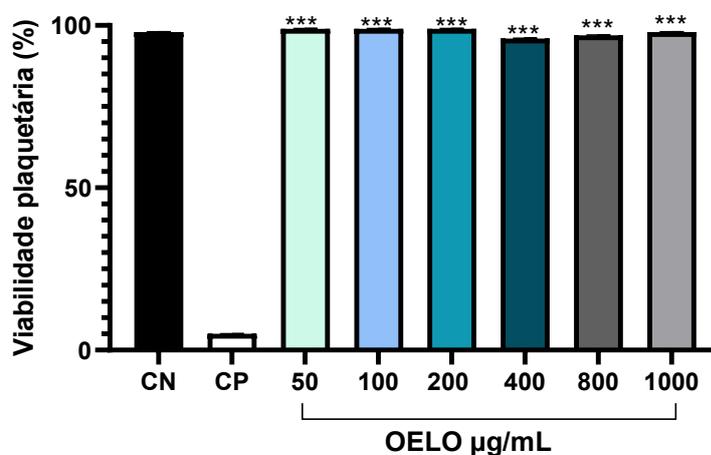
NI: não identificado; TR: tempo de retenção; IR: índices de retenção no colo capilar RTx-5MS.

Testes de toxicidade

Avaliação da toxicidade *in vitro* com azul de Trypan

O OELO em diferentes concentrações não promoveu reduções significativas no número de plaquetas viáveis em comparação ao controle. Este achado sugere que o óleo essencial não é tóxico para as plaquetas humanas (Figura 1).

Figura 1. Porcentagem (%) de viabilidade plaquetária humana obtida em PRP tratado com óleo essencial de *L. officinale* (OELO) em diferentes concentrações.

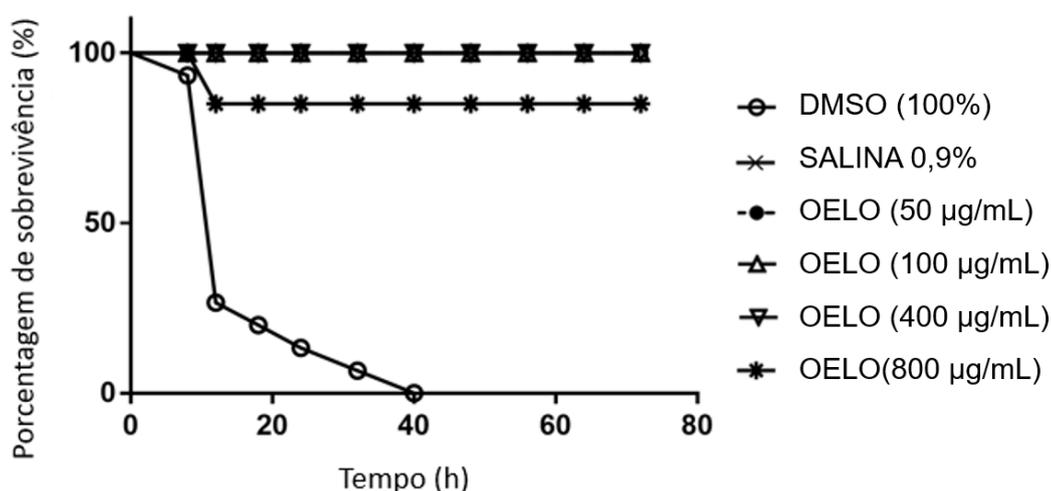


Nota: Controle negativo (CN): 0,6% DMSO; Controle positivo (CP): Triton 1% X-100; óleo essencial de *L. officinale* (OELO). *** $p < 0,001$ em comparação com o CN.

Toxicidade aguda *in vivo* em *G. mellonella*

A taxa de sobrevivência das larvas de *G. mellonella* não foi significativamente influenciada pela incubação com diferentes concentrações de OELO (50–1000 µg/mL). Portanto, os resultados sugerem que o óleo essencial não causou toxicidade sistêmica aguda (Figura 2).

Figura 2. Taxa de sobrevivência de larvas de *G. mellonella* ao longo de 72 h após a administração de diferentes concentrações de OELO.

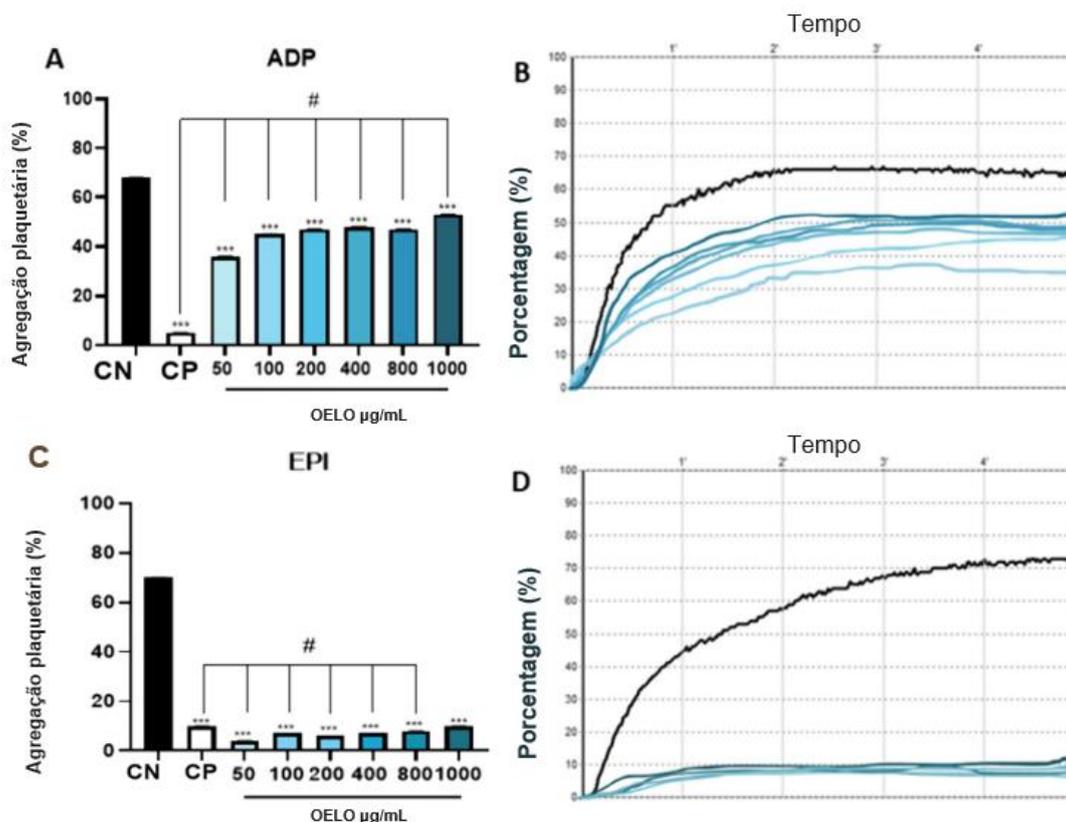


Nota: A curva de controle refere-se a larvas tratadas com solução salina estéril com fosfato (PBS). As diferenças nas estimativas de sobrevivência foram comparadas pelo teste de log-rank ($p < 0,05$).

Efeito do OELO na agregação plaquetária humana

A agregação plaquetária foi determinada usando dois agentes agregadores (ADP e EPI). OELO mostrou atividade antiplaquetária significativa *in vitro* ao inibir a agregação plaquetária induzida por ADP (Figura 2A, B). O OELO também mostrou um efeito inibitório significativo na agregação plaquetária induzida por EPI (Figura 2C, D).

Figura 3. Efeito do óleo essencial de *L. officinale* (OELO) na agregação plaquetária humana.



Nota: Porcentagem de agregação plaquetária após tratamento com diferentes concentrações de OELO (50–1000 $\mu\text{g/mL}$) e indução com 30 μM de ADP (**A e B**) ou 5 $\mu\text{g/mL}$ de epinefrina – EPI (**C e D**) por 5 min.

Efeito do OELO na coagulação sanguínea

O tratamento do plasma humano com OELO nas concentrações testadas não resultou em aumentos significativos no TP ou TTPa (Tabela 2). Além disso, o OELO não alterou a Razão Normalizada Internacional (RNI) e o TTPa.

Tabela 2. Parâmetros de coagulação medidos em plasma humano tratado óleo essencial de *L. officinale* (OELO).

| Amostras ¹ | Ensaio de coagulação sanguínea ² | | | |
|--------------------------------------|---|------------------|-------------|--------------------|
| | TP | | TTPa | |
| | Tempo (sec) | RNI ³ | Tempo (sec) | Razão ⁴ |
| Padrão | 14 ± 0,0 | - | 28 ± 2,20 | - |
| Controle negativo | 15 ± 0,22 | 1.1 | 33 ± 1,74 | 1.2 |
| OELO (50 µg/mL) | 16 ± 0,0 | 1.1 | 24 ± 3,01 | 0.9 |
| OELO (100 µg/mL) | 15 ± 0,69 | 1.1 | 26 ± 0,96 | 0.9 |
| OELO (200 µg/mL) | 15 ± 0,31 | 1.1 | 32 ± 4,55 | 1.1 |
| OELO (400 µg/mL) | 16 ± 0,50 | 1.2 | 32 ± 4,92 | 1.1 |
| OELO (800 µg/mL) | 15 ± 0,88 | 1.1 | 31 ± 3,01 | 1.1 |
| OELO (1000 µg/mL) | 16 ± 0,61 | 1.2 | 33 ± 3,18 | 1.2 |
| Heparina (17 IU/mL de sangue) | > 100 | - | > 100 | - |

Nota: Óleo essencial de *L. officinale* (OELO); controle negativo (veículo, DMSO 0,6%) e heparina (controle positivo). Tempo de protrombina (TP) e tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPa) em segundos (seg) medido em plasma humano tratado com OELO e expresso em média ± DP. Razão normalizada internacional (RNI) calculada com base nos resultados do TP e usada para monitorar a eficácia do anticoagulante. Relação entre os valores de tempo entre o (s) tempo (s) das concentrações e o (s) tempo (s) do controle (Razão).

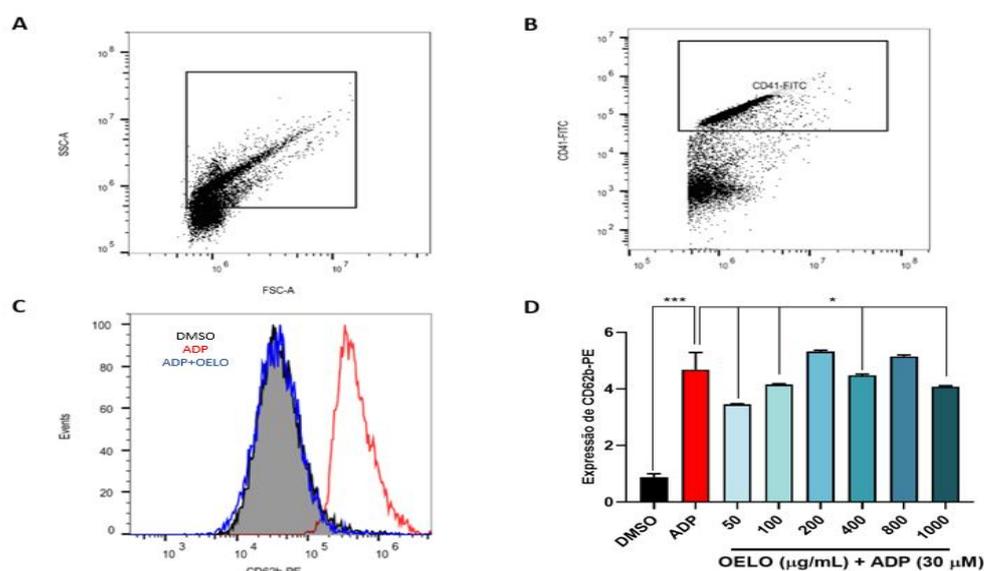
Expressão da P-selectina nas plaquetas

A ativação plaquetária é desencadeada pela exposição das plaquetas ao ADP, colágeno, trombina ou derivado do ácido araquidônico. Logo após a ativação plaquetária, a P-selectina, que é armazenada em alfa grânulos plaquetários, move-se para a superfície celular e facilita a adesão aos leucócitos

e/ou endotélio, levando à geração de biomoléculas como citocinas, fatores e procoagulantes (Merten, Thiagarajan 2000).

Os produtos naturais e compostos sintéticos que suprimem a expressão de P-selectina são alvos de pesquisa interessantes para o tratamento de doenças cardiovasculares (Park, 2009). A expressão de P-selectina foi medida por citometria de fluxo. Os resultados mostraram que a concentração de 50, 100, 400 e 1000 $\mu\text{g/mL}$ OELO suprimiu a expressão de P-selectina em comparação com o controle negativo. No entanto, não houve diminuição nas concentrações 200 e 800 $\mu\text{g/mL}$ quando comparado ao controle negativo.

Figura 4. Expressão de superfície da P-selectina em plaquetas após exposição ao óleo essencial de *L. officinale* (OELO).

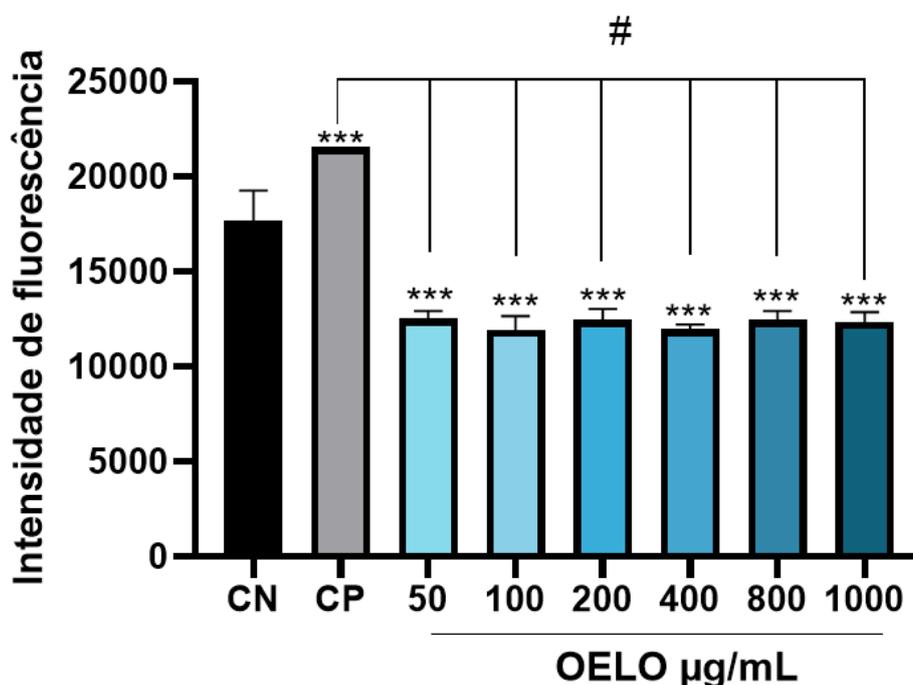


Nota: (A) Gráficos de pontos representativos gerados usando o software FlowJo. A zona bloqueada mostra a população de plaquetas. (B) Gráfico de pontos representativo mostrando uma população CD42b FITC-positiva (plaquetas). (C) Histogramas representativos mostrando ativação plaquetária após incubação com OELO e indução com ADP (30 μM) por 5 min. As plaquetas ativadas foram marcadas com CD42b (5 μL) e CD62P (5 μL) e mantidas no escuro por 15 min. (D) Intensidade média de fluorescência (IMF) de CD62P-PE expressa na membrana de plaquetas ativadas tratadas com diferentes concentrações de OELO (50–1000 $\mu\text{g/mL}$). CN, controle negativo (DMSO 0,6%). Os resultados são a média de três experimentos independentes. * $p < 0,05$ e *** $p < 0,001$ em comparação com plaquetas induzidas por ADP.

Geração de espécies reativas de oxigênio (EROs)

O composto 2',7'-diclorodihidrofluoresceína diacetato (DCFH-DA) é oxidado por moléculas pró-oxidantes, como o peróxido de hidrogênio (H₂O₂). A diclorofluoresceína reage com EROs e libera altas quantidades de 2',7' diclorofluoresceína (DCFH), que é impermeável à membrana plasmática (Reiniers *et al.* 2017). Como resultado, o conteúdo de EROs pode ser medido e estimado por meio da intensidade de fluorescência. Os resultados demonstraram que todas as concentrações testadas (0–1000 µg/mL) de OELO diminuíram a produção de EROs em comparação com os controles positivos e negativos.

Figura 5. Conteúdo intracelular de espécies reativas de oxigênio (EROs).



Nota: Intensidade de fluorescência de plaquetas tratadas com DMSO 0,5% (controle negativo, CN), peróxido de hidrogênio (H₂O₂) 30% (controle positivo, CP) ou óleo essencial de *L. offinale* (OELO) (50–1000 µg/mL). p<0,001 em comparação com CN e # p<0,001 em comparação com CP.

Discussão

A composição química do OELO determinada no presente trabalho corrobora outros achados com a mesma espécie. Em um estudo recente, a caracterização química de vários extratos de *L. officinale* revelou mais de 190 compostos voláteis, variando de acordo com diferentes partes da planta e tipos de extração química, sendo a principal classe os monoterpenos (Atteya *et al.*, 2022). Os monoterpenos α -acetato de terpinila (36,67%), β -felandreno (36,21%), β -mirceno (10,66%) e (Z)- β -ocimeno (4,61%) são os principais compostos do OELO. Suas concentrações diferem de acordo com a parte da planta usado para extração (Spréa *et al.*, 2020). Os óleos essenciais extraídos da raiz e folhas de *L. officinale* possuem composições químicas diferentes, mas seus principais constituintes são o β -felandreno e o acetato de α -terpinila, corroborando a composição química encontrada em nosso estudo (Heidarpour *et al.*, 2013).

O acetato de α -terpinila é conhecido por sua fragrância adocicada e odor floral herbáceo, sendo utilizado na fabricação de sabonetes, produtos para o cabelo, antitranspirantes, loções e produtos de limpeza, além de aromatizante em bebidas e doces (VAIČIULYTĖ *et al.*, 2021). O monoterpeno β -felandreno foi identificado no óleo essencial de *Angelica purpurascens* (Apiaceae), sendo reconhecido por sua ação antioxidante e citotoxicidade contra linhagens celulares de câncer de mama humano (Boiangiu *et al.*, 2022). O β -mirceno possui atividades antiulcerosas, antioxidantes e antimicrobianas. O β -ocimeno possui propriedades anticonvulsivantes, antifúngicas e antitumorais (Badalamenti *et al.*, 2022). Portanto, os principais compostos do OELO apresentam uma ampla gama de atividades biológicas e potencial para uso na indústria alimentícia. Tais características tornam o OELO uma fonte natural promissora desses compostos (Spréa *et al.*, 2020).

Um extrato de *L. officinale* com composição semelhante ao OELO não demonstrou toxicidade em até 5.000 mg/kg em ratos Wistar após 72 h de administração, sendo considerado seguro (Ghaedi *et al.*, 2020). Neste estudo, avaliamos o efeito do OELO na viabilidade plaquetária (Fig. 1A). Foi demonstrado que o OELO nas concentrações de 50–1000 μ g/mL não causou uma diminuição significativa no número de plaquetas viáveis, evidenciando sua

atoxicidade para esses elementos. O modelo experimental de *G. mellonella* é barato e rápido para avaliação *in vivo* de novos compostos terapêuticos (Megaw *et al.*, 2015; Singkum *et al.*, 2019). O ensaio de toxicidade *in vivo* utilizando larvas de *G. mellonella* confirmou a ausência de toxicidade nas concentrações testadas (Fig. 1B). Esses resultados *in vivo* corroboram os do ensaio de viabilidade plaquetária *in vitro*. Em um teste de toxicidade oral aguda em camundongos, o OELO apresentou uma dose letal média (DL50 = 19.786,59 µL/kg) maior do que o *Illicium verum* (11.257,14 µL/kg) e o *Mentha cardiaca* (7.133,70 µL/kg), sugerindo que o OELO possui um melhor perfil de segurança (Deepika *et al.*, 2021). O óleo essencial de *Foeniculum vulgare* (Apiaceae) demonstrou ser atóxico em um teste de viabilidade plaquetária em comparação com o controle negativo (Tognolini *et al.*, 2007). Os resultados do presente estudo confirmam esses dados anteriores, mostrando que o OELO não induziu toxicidade *in vitro* ou *in vivo* em modelos experimentais.

O OELO causou uma diminuição significativa na agregação plaquetária induzida por ADP ou EPI. Na agregação plaquetária induzida por ADP, houve redução de 32% em comparação com o controle negativo. Além disso, quando induzida por EPI, a agregação plaquetária diminuiu 66% em comparação com o controle negativo (Figura 3). O óleo essencial de *F. vulgare* exibiu atividade antiplaquetária, atribuída à presença de anetol (Tognolini *et al.*, 2007). Esses dados corroboram os resultados do nosso estudo, mostrando o potencial uso do OELO como agente antiplaquetário. *A. visnaga*, *A. majus* e *P. anisum*, todos pertencentes à família Apiaceae, contêm cumarinas, conhecidas por seu potencial anticoagulante. *P. anisum* demonstrou ter atividade anticoagulante, pois prolonga o TTPa (Mahrous *et al.*, 2022). O OELO, por outro lado, não influenciou significativamente o TP, o TTPa ou o INR (Tabela 2), demonstrando que não atua na cascata de coagulação.

Estudos anteriores investigaram a atividade antiplaquetária dos óleos essenciais. Por exemplo, o óleo essencial de *Curcuma wenyujin* contém curdiona, conhecida por sua ação antiplaquetária. O mecanismo de ação da curdiona foi elucidado: o composto inibe o aumento dos níveis de Ca²⁺ e diminui a expressão de P-selectina em plaquetas induzida pelo fator ativador de plaquetas. Semelhante à curdiona, o OELO (50–1000 µg/mL) reduziu a

expressão da P-selectina (Xia *et al.*, 2012). Em nosso estudo, a expressão de P-selectina foi reduzida nas concentrações de 50 µg/mL (26%), 100 µg/mL (11%), 400 µg/mL (4%) e 1000 µg/mL (12%). Contudo, as concentrações de 200 µg/mL (13%) e 800 µg/mL (10%) estimularam a expressão de P-selectina quando comparadas com plaquetas induzidas por ADP. Além disso, o OELO mostrou-se mais eficaz na concentração de 50 µg/mL, comparativamente às demais concentrações testadas (Figura 4).

As EROs são produzidas em plaquetas ativadas, desempenhando um papel importante na formação de trombos (Qiao *et al.*, 2018). O pré-tratamento com OELO resultou em uma diminuição na geração de EROs nas plaquetas em todas as concentrações testadas [50 µg/mL (29%), 100 µg/mL (33%), 200 µg/mL (30%), 400 µg/mL (32%), 800 µg/mL (30%) e 1000 µg/mL (30%)], em comparação ao controle negativo (Figura 5). A liberação e ativação de plaquetas por EROs são responsáveis por alterar a função mitocondrial e aumentar a ativação plaquetária (Ajanel *et al.*, 2023). Conseqüentemente, a hiperativação plaquetária desencadeia a formação excessiva de coágulos e complicações tromboembólicas (Masselli *et al.*, 2020). A ação antiplaquetária do OELO foi evidenciada pela diminuição das EROs.

O presente estudo identificou os efeitos farmacológicos do OELO voltado para o uso antitrombótico, tendo como próximo passo desta pesquisa o desenvolvimento de um produto para administração oral contendo OELO. Os estudos se concentrarão no desenvolvimento de uma formulação oral nanoestruturada à base de lipídios para administração oral estável e homogênea de OELO.

Conclusão

O OELO promoveu uma diminuição significativa na agregação plaquetária em diferentes concentrações, independentemente do agente agregante utilizado. Além disso, o OELO diminuiu a ativação plaquetária, pois foi capaz de impedir a produção de EROs e a expressão de P-selectina. Esses achados demonstram o potencial do OELO no tratamento e/ou prevenção da trombose

arterial. Nenhuma das concentrações de OELO testadas influenciou significativamente os parâmetros de coagulação (TP, INR e TTPa), e o óleo essencial não apresentou toxicidade nas concentrações testadas.

Referências

ADAMS, R.P., SPARKMAN, O.D. Review of identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry. **Journal of the American Society for Mass Spectrometry**. v.18, p. 803-806, 2007.

AFARNEGAN, H., SHAHRAKI, A., SHAHRAKI, J. The hepatoprotective effects of aquatic extract of *Levisticum officinale* against paraquat hepatocyte toxicity. **Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences**. v.30, n. 6, p. 2363-2368, 2017.

AJANEL, A., CAMPBELL, R. A., DENORME, F. Platelet mitochondria: the mighty few. **Current opinion in hematology**, v. 30, n. 5, p. 167-174, 2023.

ANDREWS, R.K., ARTHUR, J.F., GARDINER, E.E. Targeting GPVI as a novel antithrombotic strategy. **Journal of Blood Medicine**. v.5, p.59-68, 2014.

ATTEYA, A.K., ALBALAWI, A.N., BAYOMY, H.M., EL MOATAZ, A.B., GHOZLAN M.H., GENAIDY, E. Impact of planting density and soaking seeds in melatonin solution on yield, secondary products content and antimicrobial activity of lovage plant. **Saudi Journal of Biological Sciences**. v.29, p. 2656-2673, 2022.

BADALAMENTI, N., MARESCA, V., DI NAPOLI, M., BRUNO, M., BASILE, A., ZANFARDINO, A. Chemical composition and biological activities of *Prangos ferulacea* essential oils. **Molecules**. v.27, n. 21, p. 7430,2022.

BICKMANN, J.K., BAGLIN, T., MEIJERS, J.C., RENNÉ, T. Novel targets for anticoagulants lacking bleeding risk. **Current Opinion in Hematology**. v. 24, n. 5, p.419-426, 2017.

BOIANGIU, R.S., BAGCI, E., DUMITRU, G., HRITCU, L., TODIRASCU-CIORNEA, E. *Angelica purpurascens* (Ave-Lall.) Gilli. essential oil improved brain function via cholinergic modulation and antioxidant effects in the scopolamine-induced zebrafish (*Danio rerio*) model. **Plants**. v.11, p.1096, 2022.

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

DEEPIKA, CHAUDHARI, A.K., DAS, S., SINGH, V.K., PRASAD, J., DUBEY, N.K. Assessing the *Levisticum officinale* Koch. essential oil as a novel preservative for stored chia seeds (*Salvia hispanica* L.) with emphasis on probable mechanism of action. **Environmental Science and Pollution Research**. v. 28, p. 68690-68705, 2021.

GHAEDI, N., POURABOLI, I., ASKARI, N. Antidiabetic properties of hydroalcoholic leaf and stem extract of *Levisticum officinale*: an implication for α -amylase inhibitory activity of extract ingredients through molecular docking. **Iranian Journal of Pharmaceutical Research**. v.9, p.231, 2020.

GIMBEL, M.E., MINDERHOUD, S.C., TEN BERG, J.M. A practical guide on how to handle patients with bleeding events while on oral antithrombotic treatment. **Netherlands Heart Journal**. v. 26, p.341-351, 2018.

HEIDARPOUR, O., SOURI, M.K., OMIDBAIGI, R. Changes in content and constituents of essential oil in different plant parts of lovage (*Levisticum officinale* Koch. Cv. Budakalaszi) cultivated in Iran. **Journal of Essential Oil Bearing Plants** v.16, n. 3, p. 318-322, 2013.

KAMYAB, R., NAMDAR, H., TORBATI, M., GHOJAZADEH, M., ARAJ-KHODAEI, M., FAZLJOU, S. M. B. Medicinal plants in the treatment of hypertension: A review. **Advanced Pharmaceutical Bulletin**, v. 11, n. 4, p. 601, 2020.

MAHROUS, R., EL-KHAIR, R.A., OMAR, A., IBRAHIM, R. Investigation of the effect of selected edible and medicinal plants on in-vitro blood coagulation profile. **Kuwait Journal of Science**. v.49, n.4, 2022.

MASSELLI, E., POZZI, G., VACCAREZZA, M., MIRANDOLA, P., GALLI, D., VITALE, M., GOBBI, G. ROS in platelet biology: functional aspects and methodological insights. **International Journal of Molecular Sciences**. v. 21, n. 14, p. 4866, 2020.

MAURYA, A.K., VASHISATH, S., AGGARWAL, G., YADAV, V., AGNIHOTRI, V.K. Chemical diversity and α -glucosidase inhibitory activity in needles essential oils

of four *Pinus* species from Northwestern Himalaya, India. **Chemistry & Biodiversity**. v.19, n.12, p. e202200428. 2022.

MCFADYEN, J.D., SCHAFF, M., PETER, K. Current and future antiplatelet therapies: emphasis on preserving haemostasis. *Nature Reviews Cardiology* v. 15, p. 181-191, 2018.

MEGAW, J., THOMPSON, T.P., LAFFERTY, R.A., GILMORE, B.F. *Galleria mellonella* as a novel *in vivo* model for assessment of the toxicity of 1-alkyl-3-methylimidazolium chloride ionic liquids. **Chemosphere**. v.139, p.197-201, 2015.

MERTEN, M., THIAGARAJAN, P. P-selectin expression on platelets determines size and stability of platelet aggregates. **Circulation**. v.102, p.1931-1936, 2000.

MIRAN, M., MONSEF, H.E., MORIDI, M.F., AHMADI, A.A., EBRAHIMI, S.N. Essential oil composition and antibacterial activity of *Levisticum officinale* Koch at different developmental stages. **Journal of Essential Oil Bearing Plants**. v. 21, p.1051-1055, 2018.

MORADALIZADEH, M., AKHGAR, M.R., RAJAEI, P., FAGHIHI-ZARANDI, A. Chemical composition of the essential oils of *Levisticum officinale* growing wild in Iran. **Chemistry of Natural Compounds**. v. 47, p.1007-1009, 2012.

PARK, J.B. Isolation and characterization of N-feruloyltyramine as the P-selectin expression suppressor from garlic (*Allium sativum*). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v.57, n.19, p.8868-8872, 2009.

QIAO, J., ARTHUR, J.F., GARDINER, E.E., ANDREWS, R.K., ZENG, L., XU, K. Regulation of platelet activation and thrombus formation by reactive oxygen species. **Redox Biology**. v.14, p.126-130, 2018.

REINIERS, M.J., VAN GOLEN, R.F., BONNET, S., BROEKGAARDEN, M., VAN GULIK, T.M., EGMOND, M.R., HEGER, M. Preparation and practical applications of 2',7'-dichlorodihydrofluorescein in redox assays. **Analytical Chemistry**. v. 89, p.3853-3857, 2017.

SALEEM, F., SARKAR, D., ANKOLEKAR, C., SHETTY, K. Phenolic bioactives and associated antioxidant and anti-hyperglycemic functions of select species of Apiaceae family targeting for type 2 diabetes relevant nutraceuticals. **Industrial Crops and Products**. v. 107, p.518-525 ,2017.

SANTANA, M.O., VOSTINARU, O., RIGANO, D., AGUIAR, E.H.A. Bioactive compounds present in essential oils: Advances and pharmacological applications. **Frontiers in Pharmacology**. v.14, p.1130097, 2023.

SINGKUM, P., SUWANMANEE, S., PUMESAT, P., LUPLERTLOP, N. A powerful in vivo alternative model in scientific research: *Galleria mellonella*. **Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica**. v.66, p.31-55, 2019.

SPRÉA, R.M., FERNANDES, A., FINIMUNDY, T.C., PEREIRA, C., ALVES, M.J., CALHELHA, R.C., FERREIRA, I.C. Lovage (*Levisticum officinale* WDJ Koch) roots: A source of bioactive compounds towards a circular economy. **Resources**. v.9, n. 7, p.81, 2020.

THIVIYA, P., GUNAWARDEN, N., GAMAGE, A., MADHUJITH, T., MERAH, O. Apiaceae family as a valuable source of biocidal components and their potential uses in agriculture. **Horticulturae**. v.8, n. 7, p. 614, 2022.

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

VIOLETA, N.O.U.R., TRANDAFIR, I., COSMULESCU, S. Bioactive compounds, antioxidant activity and nutritional quality of different culinary aromatic herbs. **Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca**. v.45, p.179-184. 2017.

XIA Q, WANG X, XU DJ, CHEN XH, CHEN FH. Inhibition of platelet aggregation by curdione from *Curcuma wenyujin* essential oil. **Thrombosis Research**. v.130, p. 409-414, 2012.

WANG, X. J., LUO, Q., LI, T., MENG, P. H., PU, Y. T., LIU, J. X., XIONG, A. S. Origin, evolution, breeding, and omics of Apiaceae: a family of vegetables and medicinal plants. **Horticulture Research**, v. 9, p. uhac076, 2022.

WANG, H., CHEN, Y., WANG, L., LIU, Q., YANG, S., WANG, C. Advancing herbal medicine: enhancing product quality and safety through robust quality control practices. **Frontiers in pharmacology**, v. 14, p. 1265178, 2023.

CAPITULO 3: O óleo essencial de *Levisticum officinale* previne a hepatotoxicidade induzida por paracetamol ao diminuir o estresse oxidativo

O óleo essencial de *Levisticum officinale* previne a hepatotoxicidade induzida por paracetamol ao diminuir o estresse oxidativo

Resumo

Levisticum officinale (Apiaceae) é uma erva perene, conhecida como levístico ou lovage, sendo utilizada em preparações culinárias, como por exemplo saladas e sobremesas. Neste estudo, os efeitos hepatoprotetores e os mecanismos subjacentes do óleo essencial das folhas de *Levisticum officinale* (OELO) foram investigados em um modelo experimental de hepatotoxicidade induzida por paracetamol utilizando camundongos Balb/c. Os experimentos foram realizados com camundongos machos (6 semanas, 25±2 g). Antes dos experimentos, quatro animais foram reservados como fontes de neutrófilos para o ensaio de quimiotaxia. Os camundongos restantes foram alocados em seis grupos experimentais ($n=8$ por grupo): o grupo I (controle negativo) foi pré-tratado com solução salina (veículo de dissolução de paracetamol); o grupo II não foi pré-tratado (administrado apenas 300 mg/kg de paracetamol - PCT); o grupo III foi pré-tratado com silimarina (SLM, 200 mg/kg) e os grupos IV–VI foram pré-tratados com OELO em diferentes doses (50, 200, 400 mg/kg). Após 7 dias de tratamento, os grupos II–VI receberam PCT (300 mg/kg). Doze horas após a administração de PCT, os animais foram eutanasiados e o sangue foi coletado para análises bioquímicas de função hepática (AST, ALT e γ -GT). Os fígados dos camundongos foram extraídos para avaliações histológicas bem como de biomarcadores de inflamação e estresse oxidativo hepático (óxido nítrico - \bullet NO, mieloperoxidase - MPO, substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico – TBARS e glutathiona reduzida - GSH). A quimiotaxia de neutrófilos foi avaliada usando uma placa de microquimiotaxia nas concentrações de OELO (1 - 60 μ g/mL). O pré-tratamento com OELO (50- 400 mg/kg) preveniu alterações nos valores plasmáticos de AST, ALT e γ -GT induzidas por paracetamol. O pré-tratamento com OELO diminuiu a atividade da MPO e a produção de \bullet NO. O OELO em diferentes concentrações preveniu a migração de neutrófilos. Os cortes histológicos mostraram fígados normais (sem alterações morfológicas) no grupo I, com vacuolização ocasional devido ao jejum. O grupo II apresentou necrose grave, e os grupos III-VI apresentaram vacuolização difusa e necrose diminuída. O pré-tratamento com OELO diminuiu a peroxidação lipídica e restaurou as concentrações de GSH. De maneira geral, o OELO preveniu a lesão hepática induzida por paracetamol, protegendo contra o estresse oxidativo e inibindo a inflamação.

Palavras-chave: antioxidante, hepatotoxicidade, inflamação, *Levisticum officinale*, paracetamol.

Introdução

O uso irracional de medicamentos pode levar à dependência e a doenças graves, principalmente quando consumidos em sobredoses ou combinados com álcool e outras substâncias (Mhadi *et al.*, 2023). Esse fenômeno é atribuído à falta de conhecimento por parte de pacientes e prescritores, ao fácil acesso aos medicamentos e à comercialização inadequada (Rahman *et al.*, 2021). Um dos órgãos frequentemente analisados em pacientes que fazem uso indevido de medicamentos é o fígado (Zhang *et al.*, 2019). O fígado é o segundo maior órgão do corpo humano, representando aproximadamente 2% do peso corporal de um adulto saudável (Mohajan, 2025). Ele exerce funções secretoras e excretoras e é responsável pela regulação das funções metabólicas e vasculares (Alamri, 2018). Aproximadamente 30% do débito cardíaco é direcionado ao fígado por meio do sangue da artéria hepática e do sangue da veia porta (Alamri, 2018). Além disso, o fígado desempenha um papel fundamental na desintoxicação e excreção de inúmeras substâncias endógenas e exógenas (Barouki *et al.*, 2023).

As doenças hepáticas podem estar associadas a comportamentos aditivos (por exemplo, consumo de álcool e tabagismo), desequilíbrio alimentar e obesidade, infecções virais e parasitárias, exposição a toxinas e intoxicação medicamentosa (Barouki *et al.*, 2023). A lesão hepática é um efeito adverso comum de medicamentos e um grave problema de saúde, com evolução clínica que varia de assintomática a icterícia hepatocelular ou colestática, insuficiência hepática e hepatite crônica (Ke *et al.*, 2020). Em casos de lesão hepática por intoxicação medicamentosa, os pacientes geralmente recebem o antídoto *N*-acetilcisteína, que restaura as concentrações de glutatona reduzida (GSH) hepática e é eficaz na maioria dos casos (Zhou *et al.*, 2021; Sanabria-Cabrera *et al.*, 2022).

O paracetamol ou acetaminofeno (N-acetil-p-aminofenol, PCT) é um medicamento de venda livre usado terapêuticamente nos Estados Unidos desde meados de 1950 para tratar dores leves e febre em crianças, gestantes e idosos (Cooper *et al.*, 2017). O PCT apresenta um bom perfil de segurança na dosagem recomendada de 4 g por dia em adultos (Ndetan *et al.*, 2020). No entanto, uma sobredose de PCT pode desencadear dano oxidativo, morte de células hepáticas, inflamação, formação de vacúolos nos hepatócitos e disfunção mitocondrial (Ahmed *et al.*, 2023). Esses efeitos aumentam os níveis sanguíneos de várias enzimas, como

a alanina aminotransferase (ALT), a aspartato aminotransferase (AST) e a gama-glutamil transferase (γ -GT), além de aumentar os biomarcadores de lesão hepática e biliar em casos de hepatotoxicidade e insuficiência hepática aguda (Fu *et al.*, 2020; Guo *et al.*, 2019).

O PCT é biotransformado por três mecanismos metabólicos: conjugação hepática com ácido glicurônico (glicuronidação), sulfatação e oxidação (Brayner *et al.*, 2018). A via oxidativa produz *N*-acetil-*para*-benzoquinona imina (NAPQI), que é rapidamente metabolizada em um produto não tóxico por conjugação com GSH, o que é metabolizado em ácido mercaptúrico e excretado na urina (Brayner *et al.*, 2018). Em casos de intoxicação por PCT, a depleção do conteúdo de GSH leva ao acúmulo de NAPQI, desencadeando um processo irreversível de dano hepatocelular (Guo *et al.*, 2019). O NAPQI liga-se covalentemente a proteínas celulares, principalmente proteínas mitocondriais, causando disfunção mitocondrial e aumento da formação de espécies reativas de oxigênio (EROs) (Guo *et al.*, 2019). O excesso de NAPQI danifica as proteínas hepáticas, induz a peroxidação lipídica e causa danos oxidativos no fígado (Li *et al.*, 2023). Assim, os danos hepáticos por sobredose de PCT ocorrem devido ao acúmulo do composto tóxico NAPQI, que sobrecarrega o processo de eliminação e induz danos oxidativos nas células hepáticas (Chilvery *et al.*, 2023).

Um exemplo de planta com propriedades bioativas é *Levisticum officinale*. Comumente conhecido como lovage, trata-se de uma planta perene pertencente à família Apiaceae, nativa do Irã e Afeganistão, e sendo encontrada em toda a Europa e no Mediterrâneo Oriental (Spréa *et al.*, 2020). Possui sabor e aroma semelhantes ao aipo, sendo usada em saladas e sobremesas (Basilio *et al.*, 2024). O óleo essencial obtido desta planta é rico em compostos fenólicos, possuindo propriedade antioxidante, imunomoduladora e anti-inflamatória, além disso, pode proteger contra o desenvolvimento de doenças cardiovasculares e neurodegenerativas (Basilio *et al.*, 2024, Avola *et al.*, 2024). No entanto, mais pesquisas são necessárias para elucidar esse efeito específico em modelos experimentais envolvendo danos induzidos por PCT.

Diante do exposto, este estudo teve como objetivo avaliar o efeito hepatoprotetor do óleo essencial das folhas de *L. officinale* (OELO) em um modelo experimental *in vivo* de lesão hepática induzida por PCT.

Material e métodos

Óleo essencial e reagentes

OELO foi adquirido da Laszlo® Brasil. O OELO foi extraído por destilação por arraste a vapor de folhas importadas da Hungria (Sharma *et al.*, 2021). A caracterização química foi realizada por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM), e os resultados podem ser encontrados em um estudo publicado recentemente por nosso grupo de pesquisa (Basilio *et al.*, 2024). Os kits diagnósticos para quantificação de ALT, AST e γ -GT foram adquiridos da Gold Analisa® Brasil. Fosfato monossódico, ácido 2-ditionitrobenzóico (DTNB) e ácido tiobarbitúrico (TBA) foram adquiridos da Sigma–Aldrich® Estados Unidos. Tris(hidroxi)aminometano e ácido tricloroacético foram obtidos da Cromoline Química Fina® e Dinâmica Química Contemporânea®, ambas localizadas no Brasil. Todos os outros reagentes foram de grau analítico.

Animais

Foram utilizados camundongos Balb/c machos de 6 semanas de idade, pesando 25 ± 2 g. Os animais foram obtidos do Biotério Central da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS), Brasil. Os animais foram alojados em condições laboratoriais padrão com temperatura (24 ± 1 °C) e umidade (60%–65%) controladas e um ciclo claro/escuro de 12 h. Ração peletizada padrão e água foram fornecidas *ad libitum*. O protocolo de uso de animais foi revisado e aprovado pelo Comitê de Cuidados com Animais da UFMS (CEUA/UFMS 1.243/2022, 9 de setembro de 2022).

Desenho experimental

Os camundongos foram aclimatados por 1 semana antes dos experimentos. Em seguida, foram alocados aleatoriamente em seis grupos experimentais ($n=8$ por grupo), conforme descrito a seguir: grupo I, o controle negativo (CN), foi pré-tratado com solução salina (veículo de dissolução do PCT); grupo II não foi pré-tratado (PCT);

grupo III, recebeu o tratamento de referência, foi pré-tratado com silimarina (SLM, 200 mg/kg), reconhecida por suas propriedades hepatoprotetoras; e os grupos IV-VI foram pré-tratados com OELO nas doses de 50, 200 e 400 mg/kg, respectivamente.

Os pré-tratamentos de CN, SLM e OELO foram administrados por via oral uma vez ao dia durante 7 dias. As doses de OELO e PCT foram definidas com base em estudos anteriores (Rocha et al., 2017; Uchida et al., 2017). No dia 7, após 8 horas da administração dos pré-tratamentos, os grupos II-VI receberam 300 mg/kg de PCT para induzir lesão hepática aguda. Doze horas após a administração de PCT, os animais foram anestesiados com uma dose única de cetamina (100 mg/kg ip) + xilazina (10 mg/kg ip) e eutanasiados. O sangue foi obtido por punção cardíaca, coletado em tubos com anticoagulante EDTA e centrifugado a $1500 \times g$ por 10 min para separar o plasma, que foi utilizado para avaliação bioquímica da função hepática (AST, ALT e γ -GT).

Os fígados foram cuidadosamente retirados e separados em duas partes. A primeira foi utilizada para avaliação histológica e a segunda para análise de biomarcadores de inflamação e estresse oxidativo. Para os ensaios de estado redox, foram preparados homogeneizados de tecido hepático em solução de 20 mM de fosfato de potássio, pH 7,4, contendo 0,1% de Triton X-100 e 150 mM de cloreto de sódio (NaCl). Os homogeneizados de tecido hepático foram armazenados a $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ até a realização dos ensaios. Posteriormente, os homogeneizados de tecido hepático foram descongelados e centrifugados a $1500 \times g$ por 5 min. O sobrenadante foi utilizado nos ensaios redox. Os biomarcadores inflamatórios e de estresse oxidativo foram padronizados para o conteúdo proteico, determinado pelo método de Lowry *et al.* (1951).

Biomarcadores da função hepática

Aproximadamente 1 mL de sangue foi coletado em tubos de EDTA por punção cardíaca. O plasma foi imediatamente separado por centrifugação ($5000 \times g$ por 15 min a $4 \text{ }^\circ\text{C}$) para a avaliação bioquímica. As atividades plasmáticas de ALT, AST e γ -GT foram medidas utilizando kits comerciais, de acordo com as instruções do fabricante, e utilizadas como marcadores da função hepática.

Para determinação da atividade de ALT, a solução reagente foi preparada misturando 4 partes de tampão (150 mmol/L de Tris, 750 mmol/L de L-alanina, >2300

U/L de lactato desidrogenase e 14,6 mmol/L de azida sódica) com 1 parte de mistura de coenzimas (75 mmol/L de 2-cetoglutarato, 1,3 mmol/L de NADH e 14,6 mmol/L de azida sódica). Para o ensaio de AST, a solução reagente consistiu em 4 partes de tampão (105 mmol/L de Tris, 330 mmol/L de L-aspartato; 825 U/L de malato desidrogenase, 1200 U/L de lactato desidrogenase, e 0,095% de azida sódica, estabilizantes e surfactantes) e 1 parte de mistura de coenzima (20 mmol/L de Tris, 1320 mol/L de NADH, 66 mmol/L de 2-cetoglutarato e 0,095% de azida sódica, estabilizantes e surfactantes). Para ambos os ensaios de ALT e AST, 200 µL de solução reagente e 20 µL de plasma foram adicionados a uma placa de múltiplos poços. O conteúdo dos poços foi homogeneizado e as placas foram incubadas a 37 °C. A absorção inicial foi lida a 340 nm após 1 min, seguida por leituras adicionais em 2, 3 e 4 min. Os resultados foram calculados com base na diminuição da absorção por minuto e foram expressos em U/L.

Para a determinação quantitativa da atividade de γ -GT, a solução reagente foi preparada misturando 4 partes de tampão (197 mmol/L de glicilglicina e 14,6 mmol/L de azida sódica) e 1 parte de substrato (21 mmol/L de gama-glutamil-3-carboxi-4-nitroanilida e 14,6 mmol/L de azida sódica). Em seguida, 200 µL desta solução reagente e 10 µL de plasma foram adicionados a uma placa multipoços, homogeneizados e incubados a 37 °C por 1 min. A absorbância inicial foi lida a 405 nm. Em seguida, leituras de absorbância subsequentes foram feitas após 1, 2 e 3 min. Os resultados foram calculados usando a absorção média por minuto e são expressos em U/L.

Determinação da atividade da mieloperoxidase (MPO)

A atividade da MPO foi avaliada em homogeneizados de tecido hepático usando o método colorimétrico de Bradley *et al.* (1982). Assim, 20 µL de homogeneizado hepático foram transferidos para poços de microplaca contendo 150 µL de uma solução constituída de dicloridrato de *o*-dianisidina 0,0007 M, H₂O₂ 0,0005%, NaH₂PO₄ 50mM e água destilada. Após a incubação, 30 µL de azida sódica 1% foram adicionados para interromper a reação. As amostras foram incubadas novamente por 10 min à temperatura ambiente, e as leituras de absorção foram obtidas a 450 nm usando um leitor de microplacas multimodo (Varioskan™ LUX, Thermo Fisher Scientific®, Finlândia).

Determinação da produção de óxido nítrico (\bullet NO)

A produção de \bullet NO foi determinada medindo os níveis de nitrito usando a reação de Griess (Green *et al.*, 1982). Os níveis de nitrito foram determinados em amostras de homogeneizado de tecido hepático com solução de lise (tampão fosfato de potássio 20 mM, pH 7,4, Triton X-100 0,1%, NaCl 150 mM). O sobrenadante foi separado (50 μ L) e incubado com um volume igual de reagente de Griess (sulfanilamida 1%, ácido fosfórico 5% e dicloridrato de *N*-1-naftiletilenodiamina 0,1% em água) à temperatura ambiente por 10 min. A densidade óptica foi lida usando um leitor de placas multipoços (HumaReader HS[®], Alemanha) a 540 nm. A quantificação foi obtida usando uma curva padrão de NaNO₂. Os resultados foram expressos em μ M NO₂⁻.

Análise histopatológica

Os fígados foram coletados e fixados em solução de formaldeído 10%. Posteriormente, as amostras foram desidratadas em concentrações crescentes de álcool (80% a 100% v/v), incluídas em parafina e seccionadas a uma espessura de 3 μ m usando um micrótomato rotativo (Ser. Nr. 69190, MICROM GmbH[®], Alemanha). Os cortes foram corados com hematoxilina e eosina e examinados em microscopia óptica para a presença ou ausência de achados histológicos, como degeneração hialina, degeneração hidrópica, necrose e infiltração leucocitária.

Avaliação de biomarcadores de estresse oxidativo

Quantificação da peroxidação lipídica

A peroxidação lipídica foi avaliada pelo ensaio de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) (Bird, Draper, 1984). Resumidamente, 100 μ L de homogeneizado de tecido hepático foram precipitados em 1 mL de ácido tricloroacético (TBA) 12% e tamponados com 1 mL de tampão Tris-HCl 60 mM + ácido

dietilenotriaminopentaacético (DTPA) 0,1 mM, pH 7,4. Em seguida, as amostras foram incubadas em ácido tiobarbitúrico 0,73% por 60 min a 100 °C. Após o resfriamento, as amostras foram centrifugadas (5 min a 10.000 × g), e a densidade óptica foi lida a 535 nm usando um leitor de microplacas (Varioskan™ LUX, Thermo Fisher Scientific®, Finlândia), em triplicata. Os resultados foram expressos em nmol/mg de proteína.

Quantificação de proteína carbonilada(PC)

O conteúdo de PC foi medido de acordo com Levine e colaboradores (1990). Para isso, 100 µL de amostra foram misturados com 600 µL de 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH). Posteriormente, etanol/acetato de etila (1:1 v/v) foi adicionado para remover o DNPH. Em seguida, 600 µL de cloreto de guanidina foram adicionados, e a densidade óptica foi lida a 370 nm usando um leitor de ELISA (Thermo Fisher Scientific Oy®, Vantaa, Finlândia). Os resultados foram expressos como micromoles de PC por miligrama de proteína.

Ensaio de GSH

As concentrações de GSH foram medidas conforme descrito por Beutler e colaboradores (1963). Após centrifugação a 3000 × g por 5 min, 10 µL de homogeneizado de tecido hepático e 10 µL de fosfato de sódio 2 M, pH 8,0, foram adicionados aos poços da microplaca. Em seguida, 20 µL de ácido 2-dityonitrobenzoico (DTNB) 2,525 mM foram adicionados aos poços. A formação do ânion tiolato correspondente foi imediatamente determinada a 412 nm por 90 s usando um leitor de microplacas (Varioskan™ LUX, Thermo Fisher Scientific®, Finlândia). O conteúdo de GSH foi expresso em µmol/mg, calculado usando $\epsilon = 14,1/(\text{mmol}\cdot\text{cm})$.

Quimiotaxia de neutrófilos *in vitro*

Os efeitos do OELO na quimiotaxia foram avaliados usando neutrófilos, que foram obtidos da cavidade peritoneal de camundongos 4 h após a injeção de zimosan (1 mg/cavidade ip). O número de células foi ajustado para 1×10^6 células/mL em meio

RPMI 1640 suplementado com albumina 0,1% de soro bovino. O ensaio de quimiotaxia foi realizado usando uma placa de microquimiotaxia de 48 poços (Neuro Probe®, EUA), na qual as câmaras foram separadas por uma membrana de policarbonato livre de polivinilpirrolidona (tamanho do poro de 5 µm). O quimioatraente, *N*-formil metionil leucil fenilalanina (fMLP 10^{-6} M) e o controle negativo - CN (RPMI 1640) foram adicionados à câmara inferior. Uma suspensão de leucócitos (1×10^6 células/mL) foi pré-tratada por 30 min com OELO (1, 3, 10, 30 ou 60 µg/mL) e, em seguida, adicionada à câmara superior. As câmaras foram incubadas a 37 °C e CO₂ 5% por 1 h. Após a incubação, a membrana foi lavada em solução salina tamponada com fosfato, fixada em metanol e corada solução de ciclohexadienos a 0,1%, solução de azobenzenosulfônicos a 0,1% e solução de fenotiazinas a 0,1% (kit de Instant Prov) . A área da membrana de cada poço foi avaliada por microscopia óptica para a contagem do número de células em cinco campos aleatórios. Os resultados foram expressos como a média do número de neutrófilos por campo e são representativos de medições em triplicata de três experimentos separados.

Análise estatística

Os dados foram expressos como média \pm desvio padrão da média para cada grupo experimental. Os resultados foram analisados estatisticamente por análise de variância (ANOVA) unidirecional, seguida pelo teste de Tukey. As diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$. Diferentes pontos de corte para o valor de p (0,01 e 0,001) foram utilizados para melhor distinguir a força das respostas significativas. As análises estatísticas foram realizadas com o software GraphPad Prism (versão 8.0.2).

Resultados

Função hepática

Os valores plasmáticos de ALT, AST e γ -GT aumentaram significativamente com a administração de PCT, indicando lesão hepática (Tabela 1). O pré-tratamento com OELO, no entanto, atenuou os efeitos do PCT indicado pela redução da atividade enzimática hepática. Nas doses de 50, 200 e 400 mg/kg, o pré-tratamento com OELO levou a reduções nas atividades de AST (36,8%, 27,3% e 32,8%, respectivamente), ALT (36,6%, 44,2% e 45,2%, respectivamente) e γ -GT (0,8%, 12,6% e -1,6%, respectivamente), em comparação com a ausência de pré-tratamento.

Tabela 1. Efeito do óleo essencial das folhas de *L. officinale* (OELO) e da silimarina (SLM) sobre os valores plasmáticos de alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST) e gama-glutamil transferase (γ -GT).

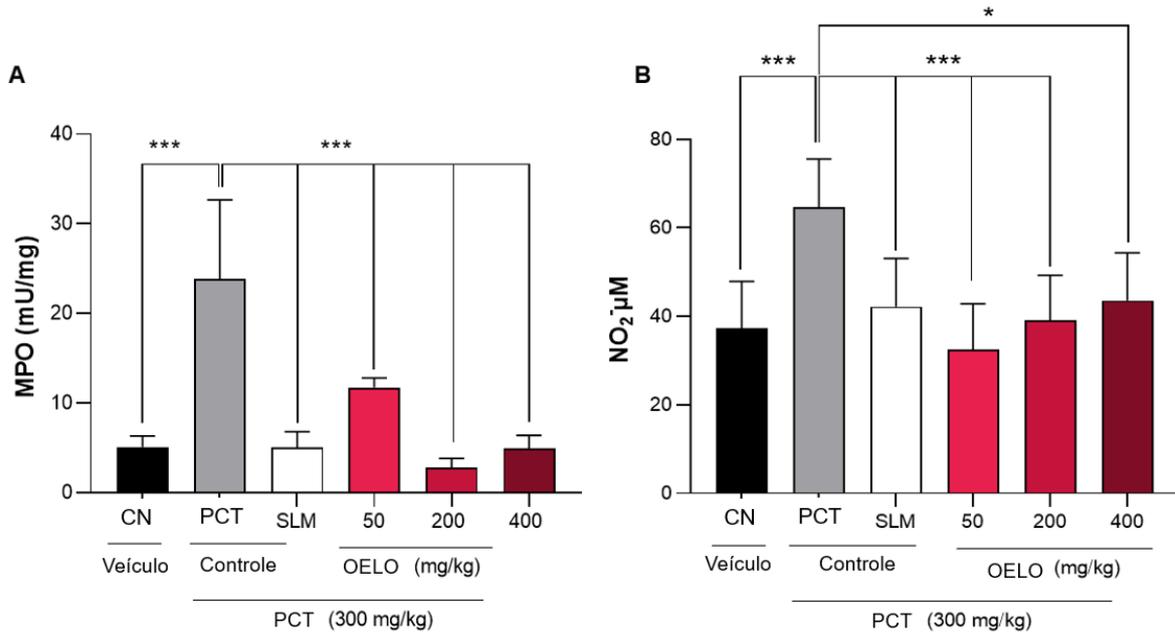
| Pré-tratamento | AST (U/L) | ALT (U/L) | γ -GT (U/L) |
|------------------|------------------------------------|-------------------------------------|------------------------------------|
| CN | 843,58 \pm 68,87 | 803,98 \pm 65,82 | 1181,29 \pm 112,20 |
| PCT | 1606,67 \pm 106,80 ^{##} | 1739,17 \pm 163,30 ^{##} | 1943,10 \pm 278,66 ^{##} |
| SLM (200 mg/kg) | 918,57 \pm 96,23* | 839,61 \pm 102,08* | 1637,31 \pm 335,58 |
| OELO (50 mg/kg) | 1015,03 \pm 86,55* | 1103,58 \pm 85,44 ^{##} * | 1929,39 \pm 240,52 ^{##} |
| OELO (200 mg/kg) | 1169,90 \pm 351,12* | 971,39 \pm 41,96* | 1698,75 \pm 235,26 |
| OELO (400 mg/kg) | 1080,60 \pm 155,53* | 953,15 \pm 74,06* | 1975,61 \pm 173,33 ^{##} |

Nota: Os resultados são expressos como média \pm desvio padrão da média. ^{##} $p < 0,01$ em comparação ao controle negativo. * $p < 0,01$ em comparação ao grupo sem pré-tratamento.

Atividade de MPO e Produção de \bullet NO

O pré-tratamento com OELO nas doses de 50, 200 e 400 mg/kg antes da administração de PCT levou a diminuição na atividade da MPO de cerca de 51%, 88% e 79%, respectivamente, em comparação com a ausência de pré-tratamento (Figura 1A). Além disso, camundongos pré-tratados com OELO nas doses de 50, 200 e 400 mg/kg apresentaram reduções de cerca de 46%, 39% e 32%, respectivamente, nos conteúdos de \bullet NO hepático, em comparação com camundongos não pré-tratados (Fig. 1B).

Figura 1. Efeito do óleo essencial das folhas de *L. officinale* (OELO) e silimarina (SLM, 200 mg/kg).



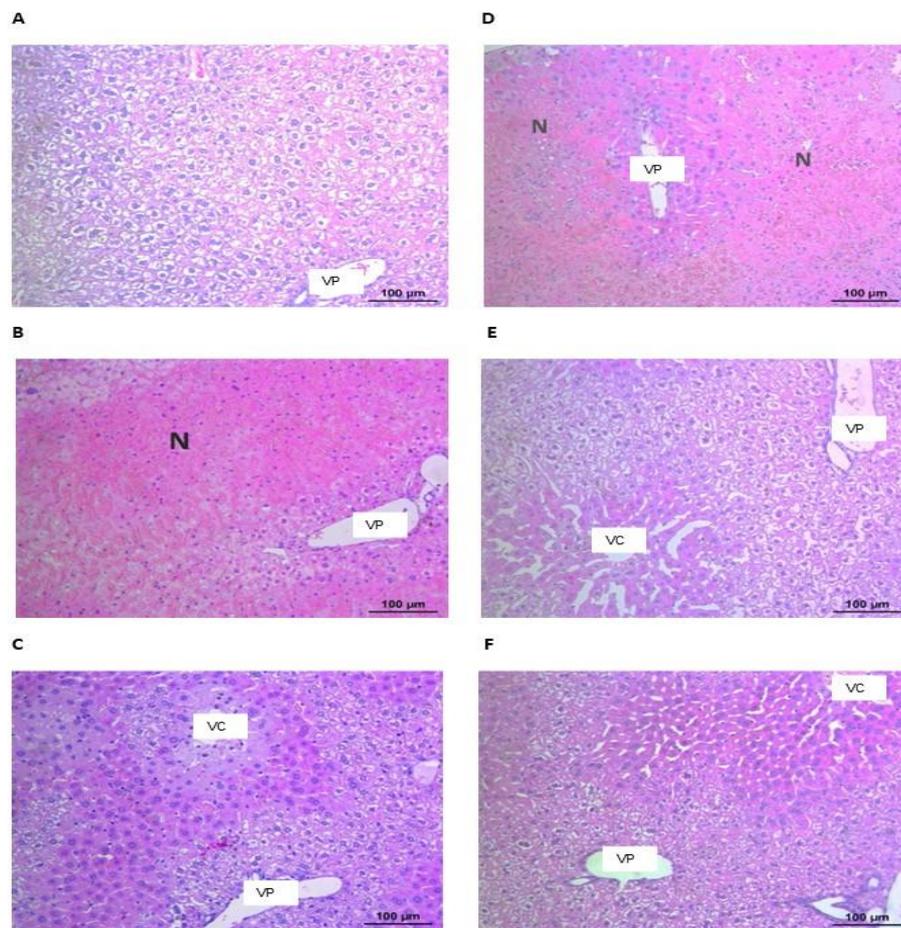
Nota: (A) atividade da mieloperoxidase (MPO); (B) produção de óxido nítrico (\bullet NO). * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$. CN, controle negativo (veículo); PCT, sem pré-tratamento; paracetamol (300 mg/kg).

Histopatologia hepática

Os cortes histológicos de fígados dos camundongos do grupo I (CN) exibiram morfologia normal, mostrando arquitetura lobular e estrutura compatível com o animais saudáveis (Figura 2A). A presença de vacuolização hepatocelular difusa em algumas áreas é justificada pelo jejum prolongado. Em contraste, nos tecidos hepáticos dos camundongos não pré-tratados expostos a PCT, grupo II (Figura 2B), foram visualizadas áreas necróticas graves com manifestações de necrose aguda de coagulação difusa acentuada (intensa). Os achados histológicos dos camundongos pré-tratados com SLM, grupo III, foram semelhantes aos encontrados no CN, exibindo apenas vacuolização hepatocelular significativamente difusa devido ao jejum prolongado (Figura 2C). Os achados histológicos do grupo IV, camundongos pré-tratados com 50 mg/kg de OELO (Figura 2D), mostraram dois tipos de necrose: necrose aguda de coagulação difusa acentuada e necrose aguda de coagulação periacinar multifocal. Os grupos V e VI, referentes aos grupos constituídos por

camundongos pré-tratados com 200 e 400 mg/kg de OELO, respectivamente, apresentaram apenas vacuolização hepatocelular periportal multifocal, justificada pelo jejum prolongado (Figuras 2E e 2F).

Figura 2. Efeito do pré-tratamento com óleo essencial de folhas de *L. officinale* (OELO) na morfologia hepática em camundongos expostos a paracetamol (PCT, 300 mg/kg).

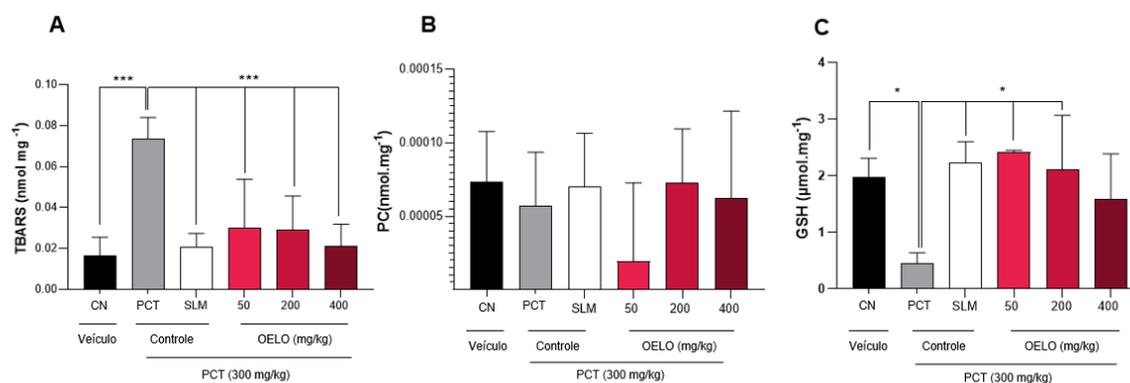


Nota: (A) Grupo I: controle negativo; (B) grupo II: sem pré-tratamento + PCT; (C) pré-tratamento com silimarina (200 mg/kg) + PCT; (D) grupo IV: pré-tratamento com OELO (50 mg/kg) + PCT; (E) grupo V: pré-tratamento com OELO (200 mg/kg) + PCT; (F) grupo VI: pré-tratamento com OELO (400 mg/kg) + PCT. Ampliação 40×. VC, veia centrolobular; VP, veia porta; N, necrose.

Marcadores de estresse oxidativo

Os resultados demonstraram que a administração de PCT aumentou as concentrações de TBARS em comparação com o grupo CN, indicando dano oxidativo no fígado por peroxidação lipídica (Figura 3A). Notavelmente, o pré-tratamento com SLM ou OELO (50, 200 ou 400 mg/kg) diminuiu significativamente os valores de TBARS em 71%, 59%, 60% e 71%, respectivamente. Em relação ao ensaio de PC, não houve diferença estatística entre os grupos (Figura 3B). Além disso, a superdosagem de PCT diminuiu a concentração hepática de GSH em comparação com o controle negativo. No entanto, o pré-tratamento com OELO nas doses de 50, 200 ou 400 mg/kg ou SLM preveniu significativamente essa depleção (Figura 3C).

Figura 3. Efeitos do pré-tratamento com óleo essencial de folhas de *L. officinale* (OELO) em diferentes doses.



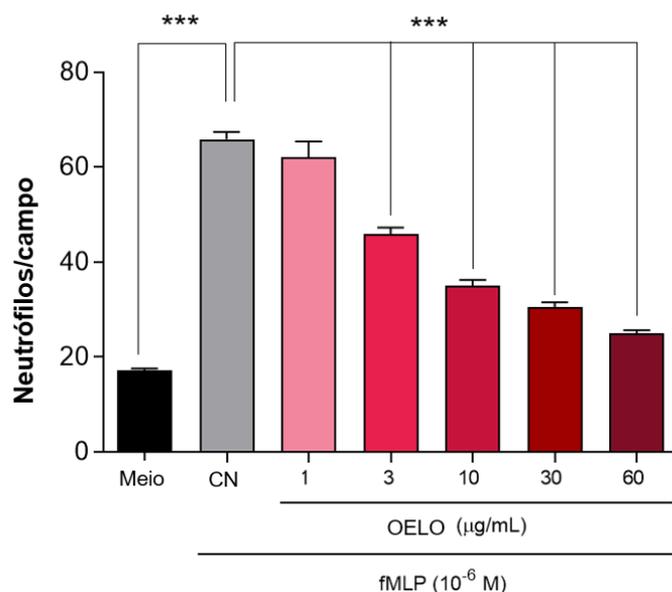
Nota: (A) substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), (B) Proteína carbonilada (PC) e (C) Conteúdo de glutathiona reduzida (GSH) no fígado de camundongos expostos ao paracetamol (PCT, 300 mg/kg). * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$. NC, controle negativo (veículo); PCT, sem pré-tratamento; SLM, silimarina (200 mg/kg).

Quimiotaxia de neutrófilos *in vitro*

A fMLP induziu consideravelmente a migração de neutrófilos ($65,91 \pm 3,44$ células/campo) em comparação com o CN ($17,23 \pm 1,03$ células/campo). O OELO em concentrações de 3, 10, 30 e 60 $\mu\text{g/mL}$ reduziu a migração de neutrófilos em direção

à fMLP (10^{-6} M) (em 30%, 47%, 54% e 62%, respectivamente) em comparação com o controle (Figura 4).

Figura 4. Efeito do óleo essencial das folhas de *L. officinale* (OELO) na quimiotaxia de neutrófilos *in vitro*.



Nota: Os neutrófilos foram estimulados com fMLP (10^{-6} M) 30 min após o tratamento com OELO nas concentrações de 1, 3, 10, 30 ou 60 µg/ mL. Os resultados são representativos de três experimentos independentes. *** $p < 0,001$.

Discussão

Níveis plasmáticos elevados das enzimas hepáticas AST e ALT são indicativos de dano hepatocelular e perda da integridade funcional das membranas celulares dos hepatócitos (Kwo *et al.*, 2017; Ilukho *et al.*, 2022). Todas as doses de pré-tratamento com OELO (50, 200 e 400 mg/kg) preveniram o dano hepático induzido por PCT, visto que a atividade de AST e ALT diminuiu (Tabela 1).

Pesquisas anteriores demonstraram que a atividade da MPO é diretamente proporcional ao grau de infiltração de neutrófilos, devido ao seu papel como mediador da inflamação em danos teciduais (Kargapolova *et al.*, 2021; Rizo-Télez *et al.*, 2022). Além disso, estudos utilizando produtos naturais, incluindo óleos essenciais e monoterpenos, relataram uma diminuição na atividade da MPO, que foi associada a uma menor infiltração de neutrófilos (Cardia *et al.*, 2018; Cardia *et al.*, 2022; Ahmed,

Masoud, 2024). Portanto, sugere-se que o OELO diminuiu a infiltração de leucócitos, reduzindo a resposta inflamatória e protegendo o fígado da toxicidade induzida pela sobredose de PCT. O OELO na dose de 200 mg/mL mostrou-se promissor como um agente hepatoprotetor (Fig. 1A).

A sobredose de PCT pode aumentar a formação de $\bullet\text{NO}$. Este radical óxido interage rapidamente com as EROs, formando peroxinitrito, responsável pela exacerbação da peroxidação lipídica e pela destruição de neutrófilos (Du *et al.*, 2016; Chowdhury *et al.*, 2019). A interação entre $\bullet\text{NO}$ e EROs aumenta a complexidade e gravidade dos danos hepáticos (Du *et al.*, 2016). O estudo atual mostrou a supressão da concentração de $\bullet\text{NO}$ em animais pré-tratados com OELO, indicando que o OELO foi eficaz em todas as doses testadas (Figura 1B). Os resultados do pré-tratamento com OELO foram semelhantes ao do pré-tratamento com SLM.

As avaliações bioquímicas realizadas neste estudo apresentaram resultados semelhantes com os descritos por Uchida *et al.* (2017). No estudo mencionado, a hepatoproteção de *C. citratus* foi confirmada por meio de análises histopatológicas de amostras hepáticas, evidenciando menor grau de lesão nos animais pré-tratados em comparação àqueles que não receberam o tratamento (Uchida *et al.* 2017). Os achados histológicos corroboram os resultados dos grupos submetidos ao pré-tratamento com OELO. Os grupos III, V e VI apresentaram características morfológicas semelhantes às do grupo controle. Apesar de exibirem vacuolização hepatocelular periacinar multifocal, atribuída ao jejum prolongado, esses grupos apresentaram morfologia tecidual fisiológica. Tais achados demonstram que os pré-tratamentos com OELO de 200 e 400 mg/Kg foram eficientes na proteção do fígado contra altas concentrações de PCT. Achados semelhantes foram registrados para o agente antioxidante de referência SLM (200 mg/kg), o que valida o modelo experimental. Por outro lado, o grupo IV (pré-tratado com 50 mg/kg de OELO) apresentou grandes áreas de necrose hepática, fenômeno semelhante ao resultado do grupo II (sem pré-tratamento + exposição a PCT). Portanto, baixas doses de OELO não exerceram efeitos hepatoprotetores (Figura 2).

A atividade hepatoprotetora de produtos naturais é comumente associada à presença elevada de monoterpenos e flavonoides no óleo essencial (Uchida *et al.*, 2017). Um estudo anterior sobre OELO conduzido por nosso grupo de pesquisa identificou quatro monoterpenos principais: α -acetato de terpinila (36,67%), β -felandreno (36,21%), β -mirceno (10,66%) e (Z)- β -ocimeno (4,61%) (Basilio *et al.*,

2024). O β -felandreno foi identificado em óleos essenciais de *L. officinale* e *Angelica purpurascens* (Apiaceae), conhecidos por sua ação antioxidante (Basilio *et al.*, 2024; Boiangiu *et al.*, 2022). O β -mirceno possui propriedades antioxidantes e, conseqüentemente, efeitos hepatoprotetores, restaurando as características bioquímicas do fígado, protegendo-o de danos oxidativos e melhorando os parâmetros histopatológicos (Tian *et al.*, 2020). A justificativa para o uso de altas doses de OELO para aumentar as concentrações *in vivo* desses terpenos foi totalmente apoiada pelo notável efeito hepatoprotetor do óleo essencial nas doses de 200 e 400 mg/Kg.

Os resultados revelaram que o pré-tratamento com OELO causou uma diminuição significativa nas concentrações de TBARS e restaurou os valores de GSH em todas as doses administradas. Assim, a atividade hepatoprotetora do OELO está provavelmente associada à sua atividade antioxidante. Chen e colaboradores (2022) relataram que um aumento no conteúdo de GSH juntamente com níveis persistentes de TBARS no fígado de ratos tratados com PCT foi sugestivo de agressão oxidativa grave. Após a sobredose de PCT, o excesso de NAPQI induz a depleção de GSH (Oyman *et al.*, 2022, Teixeira *et al.*, 2025). A capacidade antioxidante das células hepáticas é reduzida quando os níveis de GSH estão baixos, resultando em uma maior proporção de glutathiona oxidada (GSSG) e um estado de estresse oxidativo (Averill-Bates, 2023). A GSH é considerada o principal sequestrador de radicais livres (Halliwell, Gutteridge, 2015). Sua reação com NAPQI minimiza as respostas tóxicas (Chowdhury *et al.*, 2019).

O pré-tratamento com 50 ou 200 mg/kg de OELO protegeu contra esse processo oxidativo, devido às propriedades antioxidantes do óleo essencial, que ajudaram a manter os níveis de GSH, provavelmente por meio da neutralização de EROs. Além disso, o pré-tratamento com OELO nessas doses proporcionou resultados semelhantes aos de 200 mg/kg de SLM. As concentrações de PC não diferiram entre os grupos de tratamento e controle. O PCT interage diretamente com proteínas modificadas oxidativamente, formando complexos que podem exacerbar os efeitos tóxicos (Jaeschke, Ramachandran, 2024). Estudos demonstraram que o tratamento preventivo com produtos naturais atenua a hepatotoxicidade aguda causada pelo PCT (Teixeira *et al.*, 2025), particularmente pela diminuição da carbonilação de proteínas, diferindo dos resultados obtidos aqui. Tais efeitos são atribuídos à ação antioxidante dos produtos naturais.

O recrutamento e a ativação de neutrófilos são etapas cruciais no processo inflamatório (Pérez-figueroa *et al.*, 2021). A migração celular para o local da inflamação é essencial para sua resolução (Margraf *et al.*, 2022). No entanto, a ativação excessiva de fagócitos durante a inflamação pode estar relacionada a uma maior incidência de danos teciduais (de Freitas *et al.*, 2022). No presente estudo, o OELO dificultou a migração de leucócitos no ensaio de quimiotaxia *in vitro*, demonstrando a atividade anti-inflamatória dos monoterpenos do OELO. De fato, o OELO em concentrações de 3, 10, 30 e 60 µg/mL preveniu a quimiotaxia de leucócitos induzida por fMLP (Figura 4). Os achados corroboram os de Freitas *et al.* (2022), que investigaram o efeito anti-inflamatório *in vitro* e *in vivo* de óleos essenciais contendo monoterpenos.

Intervenções que atuam na prevenção ou eliminação de EROs mitocondriais e peroxinitrito (ONOO⁻) são atualmente consideradas as principais abordagens terapêuticas para o tratamento da hepatotoxicidade induzida por PCT (Chau *et al.*, 2022). OELO suprimiu a produção de •NO, a atividade de MPO bem como diminuiu a migração de neutrófilos, demonstrando potencial hepatoprotetor. Além disso, a melhora no estado redox sugere que a ação hepatoprotetora do OELO provavelmente se deve à sua atividade antioxidante.

Este estudo forneceu informações inovadoras sobre o efeito hepatoprotetor do OELO. Portanto, o OELO é um candidato promissor para desenvolvimento posterior em um protótipo farmacêutico estável, atóxico e homogêneo, principalmente para administração oral. A otimização da administração deste óleo essencial por meio de nanossistemas pode ajudar a manter ou melhorar seu efeito hepatoprotetor, permitindo sua administração por via oral, o que não é possível com formulações convencionais de óleos essenciais.

Conclusão

Este estudo demonstrou que o pré-tratamento com OELO mitigou ou preveniu eficazmente as lesões hepáticas pelo PCT. Seu efeito hepatoprotetor pode envolver a modulação das vias de desintoxicação no fígado. Além disso, o OELO atua inibindo o estresse oxidativo e as respostas inflamatórias, minimizando a produção de •NO por meio de sua atividade de eliminação de radicais livres. Este estudo propõe que o

OELO pode ter um efeito protetor contra lesão hepática aguda induzida por PCT e outras formas de dano mediado por estresse oxidativo em camundongos.

Agradecimentos

Este trabalho contou com o apoio da Fundação de Apoio ao Desenvolvimento do Ensino, Ciência e Tecnologia do Estado de Mato Grosso do Sul (FUNDECT), o Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES, Código Financeiro 001) e Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS). DCLSB, PKMBL, ITE, PMVC e JSL receberam bolsas da CAPES. OLL recebeu bolsa PIBIC do CNPq.

Conflito de interesses

Os autores declaram não haver conflitos de interesse.

Referências

AFARNEGAN, H., SHAHRAKI, A., SHAHRAKI, J. The hepatoprotective effects of aquatic extract of *Levisticum officinale* against paraquat hepatocyte toxicity. **Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences**. v.30, n. 6, p. 2363-2368, 2017.

AHMED, S.M., MASOUD, M.A. *Salvia hispanica* L. (chia seeds) alleviates paracetamol-induced acute liver injury in mice by modulating oxidative stress and inflammation. **Egyptian Pharmaceutical Journal**. 2024.

AHMED, H. M., SHEHATA, H. H., MOHAMED, G. S., ABO-GABAL, H. H., EL-DALY, S. M. Paracetamol overdose induces acute liver injury accompanied by oxidative stress and inflammation. **Egyptian Journal of Chemistry**. v.66,n.3, p.399-408, 2023.

ALAMRI, Z.Z.The role of liver in metabolism: an updated review with physiological emphasis. **International Journal of Basic & Clinical Pharmacology**. v.7, n.11, p. 2271-2276, 2018.

AVERILL-BATES, D.A. The antioxidant glutathione. **Vitamins and hormones**. p.109-141, 2023.

AVOLA, R., FURNARI, A. G., GRAZIANO, A. C. E., RUSSO, A., CARDILE, V. Management of the brain: Essential oils as promising neuroinflammation modulator in neurodegenerative diseases. **Antioxidants**, v. 13, n. 2, p. 178, 2024.

BAROUKI, R., SAMSON, M., BLANC, E. B., COLOMBO, M., ZUCMAN-ROSSI, J., LAZARIDIS, K.N., COUMOUL, X. The exposome and liver disease-how environmental factors affect liver health. **Journal of Hepatology**. v.79,n.2, p.492-505, 2023.

BASILIO, D.C.L.S., ESPINOÇA, I.T., CORONEL, P.M.V., OTA, R.S.N., DE ARAUJO, A.J.P., CASSEMIRO, N. S., PARISOTTO, E. B. Chemical profile and antithrombotic activity of the essential oil of *Levisticum officinale* WDJ Koch (Apiaceae). **Chemical Papers**, p.1-10, 2024.

BOIANGIU, R.S., BAGCI E., DUMITRU G., HRITCU L., TODIRASCU-CIORNEA, E. *Angelica purpurascens* (Avé-Lall.) Gilli. Essential oil improved brain function via cholinergic modulation and antioxidant effects in the scopolamine-induced zebrafish (*Danio rerio*) model. **Plants**. v.11, p.1096, 2022.

BRADLEY, P.P., PRIEBAT, D.A., CHRISTENSEN, R.D., ROTHSTEIN, G. Measurement of cutaneous inflammation: estimation of neutrophil content with an enzyme marker. **Journal of Investigative Dermatology**. v.78, n.3, p.206-209, 1982.

BRAYNER, N.F., DA SILVA, A.A., DE ALMEIDA, F.R.O risco do uso irracional do paracetamol na população brasileira e seus efeitos na hemostasia. **Revista Científica da Faculdade Sete de Setembro**. v.12, n.16, p.138-153, 2018.

BIRD, R.P., DRAPER, A.H. Comparative studies on different methods of malondyaldehyde determination. **Methods Enzymol**. v.90, p.105–10, 1984.

BEUTLER, E., DURON, O., KELLY, B.M. Improved method for the determination of blood glutathione. **J Lab Clin Med**. v.61, p.882–90, 1963.

CARDIA, G.F.E., SILVA-FILHO, S.E., SILVA, E.L., UCHIDA, N.S., CAVALCANTE, H.A.O., CASSAROTTI, L.L., CUMAN, R.K.N. Effect of lavender (*Lavandula angustifolia*) essential oil on acute inflammatory response. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**. 2018.

CARDIA, G.F.E., DE SOUZA SILVA-COMAR, F.M., BONETTI, C.I., DA ROCHA, E.M.T., ZAGOTO, M., DO AMARAL, V., CUMAN, R. K. N. Hepatoprotective effect of β -myrcene pretreatment against acetaminophen-induced liver injury. **Avicenna Journal of Phytomedicine**. v.12, n. 4, p.388, 2022.

CHAU, J.H., ZHANG, R., LEE, M.M., LAM, K.W., ERIC, Y.Y., LAM, J.W., TANG, B.Z. A ratiometric theranostic system for visualization of ONOO⁻ species and reduction of drug-induced hepatotoxicity. **Biomaterials Science**. v.10, n.4, p.1083-1089, 2022.

CHEN, X., LIU, J., CHEN, S., ZHANG, Q., WANG, Z., ZHU, H. Protective effects of silymarin against acetaminophen-induced liver injury in mice. **Frontiers in Pharmacology**. v.13, p. 835462, 2022.

CHILVERY, S., YELNE, A., KHURANA, A., SAIFI, M. A., BANSOD, S., ANCHI, P., GODUGU, C. Acetaminophen induced hepatotoxicity: An overview of the promising

protective effects of natural products and herbal formulations. **Phytomedicine**. v.108, p.154510, 2023.

CHOWDHURY, A., LU, J., ZHANG, R., NABILA, J., GAO, H., WAN, Z., SUN, Y. Mangiferin ameliorates acetaminophen-induced hepatotoxicity through APAP-Cys and JNK modulation. **Biomedicine & Pharmacotherapy**. v.117, p.109097, 2019.

COOPER, T.E., FISHER, E., ANDERSON, B., WILKINSON, N.M., WILLIAMS, D.G., ECCLESTON, C. Paracetamol (acetaminophen) for chronic non-cancer pain in children and adolescents. **Cochrane Database of Systematic Reviews**. n.8, 2017.

DU, K., RAMACHANDRAN, A., JAESCHKE, H. Oxidative stress during acetaminophen hepatotoxicity: Sources, pathophysiological role and therapeutic potential. **Redox biology**. v. 10, p.148-156, 2016.

DE FREITAS JUNIOR, R.A., LOSSAVARO, P.K.D.M.B., KASSUYA, C.A.L., PAREDES-GAMERO, E.J., FARIAS JÚNIOR, N.C., SOUZA, M.I.L., SILVA-FILHO, S.E. Effect of *Ylang-Ylang* (*Cananga odorata* Hook. F. & Thomson) Essential Oil on Acute Inflammatory Response *In Vitro* and *In Vivo*. **Molecules**. v.27, n.12, p.3666, 2022.

FU, S., WU, D., JIANG, W., LI, J., LONG, J., JIA, C., ZHOU, T. Molecular biomarkers in drug-induced liver injury: Challenges and future perspectives. **Frontiers in Pharmacology**. v.10, p.1667, 2020.

GARCIA-MANIERI, J., CÔRREA, V., BACKES, E., SÁ-NAKANISHI, A., BRACHT, L., COMAR, J., CORRÊA, R., PERALTA, R., BRACHT, A. A Critical Appraisal of the Most Recent Investigations on the Hepatoprotective Action of Brazilian Plants. **Plants**. v. 11, n. 24, p. 3481, 2022.

GREEN, L.C., WAGNER, D.A., GLOGOWSKI, J., SKIPPER, P.L., WISHNOK, J.S., TANNENBAUM, S. R. Analysis of nitrate, nitrite, and [15N] nitrate in biological fluids. **Analytical biochemistry**. v.126, n.1, p.131-138, 1982.

GUO, H., SUN, J., LI, D., HU, Y., YU, X., HUA, H., XU, J. Shikonin attenuates acetaminophen-induced acute liver injury via inhibition of oxidative stress and inflammation. **Biomedicine & Pharmacotherapy**. v.112, p.108704, 2019.

HALLIWELL, B., GUTTERIDGE, J.M.C. **Free radicals in biology and medicine**. Oxford university press, 2015.

HISSIN, P.J., HILF, R. A fluorometric method for determination of oxidized and reduced glutathione in tissues. **Analytical biochemistry**. v.74, n.1, p.214-226,1976.

ILUKHO, F.A., FASIPE, O.J., AIGBE, F.R. Evaluating the hepatoprotective, ameliorative and antioxidant potentials of the crude aqueous leafy extracts of *Mangifera indica* plant against acute paracetamol-induced hepatotoxicity in a mouse model. **Future Science OA**. v. 8, n. 6, p. FSO801, 2022.

JAESCHKE, H., RAMACHANDRAN, A. Acetaminophen hepatotoxicity: paradigm for understanding mechanisms of drug-induced liver injury. **Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease**, v. 19, n. 1, p. 453-478, 2024.

LEVINE, R. L., GARLAND, D., OLIVER, C. N., AMICI, A., CLIMENT, I., LENZ, A. G., STADTMAN, E. R. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. **Methods Enzymol.** v.186, p.464–478,1990.

LI, X., LAO, R., LEI, J., CHEN, Y., ZHOU, Q., WANG, T., TONG, Y. Natural Products for Acetaminophen-Induced Acute Liver Injury: A Review. **Molecules**. v.28, n.23, p.7901, 2023.

LOWRY, O.H. Measurement with the folin phenol reagent. **J Biol Chem**. v.193, p. 265-275, 1951.

KARGAPOLOVA, Y., GEIßEN, S., ZHENG, R., BALDUS, S., WINKELS, H., ADAM, M. The enzymatic and non-enzymatic function of myeloperoxidase (MPO) in inflammatory communication. **Antioxidants**. v.10, n.4, p.562, 2021.

KE, L., LU, C., SHEN, R., LU, T., MA, B., HUA, Y. Knowledge mapping of drug-induced liver injury: a scientometric investigation (2010–2019). **Frontiers in Pharmacology**. v.11, p.842, 2020.

KWO, P.Y., COHEN, S.M., LIM, J.K. ACG clinical guideline: evaluation of abnormal liver chemistries. **Official Journal of the American College of Gastroenterology| ACG**. v.112, n. 1, p.18-35, 2017.

MARGRAF, A., LOWELL, C.A., ZARBOCK, A. Neutrophils in acute inflammation: current concepts and translational implications. *Blood*, **The Journal of the American Society of Hematology**. v.139, n.14, p.2130-2144, 2022.

MHADI, A.A., ONG, S.C., ABED, Y., ABU ALI, K.A. Irrational use of medicine in Arab countries: findings from a systematic review of literature (2000–2019). **International Journal of Pharmacy Practice**. v.31, n.2, p.165-175, 2023.

MOHAJAN, H. K. A Study on Functions of Liver to Sustain a Healthy Liver. **Innovation in Science and Technology**. v.4, n.1, p.77-87, 2025.

NDETAN, H., EVANS, M.W., TANUE, T., OSUAGWU, C.C., ELUEZE, E., SINGH, K.P., CALHOUN, K. Therapeutic Use of Acetaminophen and Light to Moderate Alcohol: Are There Early Disparate Risks for Kidney Disease?. **Health Equity**. v.4, n.1, p.518-524, 2020.

OYMAN, A., UNSAL, G., AYDOGDU, N., USTA, U. Protective effects of Silymarin on Acetaminophen-induced toxic hepatitis. **EURASIAN JOURNAL OF MEDICAL ADVANCES**, v. 2, n. 1, p. 1-6, 2022.

PÉREZ-FIGUEROA, E., ÁLVAREZ-CARRASCO, P., ORTEGA, E., MALDONADO-BERNAL, C. Neutrophils: many ways to die. **Frontiers in immunology**, v. 12, p. 631821, 2021.

RAHMAN, M.S., MATANJUN, D., D'SOUZA, U.J.A., SAUDI, W.S.W., KADIR, F., SONG, T. T., SANI, M.H.M. Irrational use of drugs. **Borneo Journal of Medical Sciences (BJMS)**. v. 15, n.1, p.5-5, 2021.

RIZO-TÉLLEZ, S.A., SEKHERI, M., FILEP, J.G. Myeloperoxidase: regulation of neutrophil function and target for therapy. **Antioxidants**. v.11, n. 11, p. 2302, 2022.

ROCHA, B.A., RITTER, A.M.V., AMES, F.Q., GONÇALVES, O.H., LEIMANN, F.V., BRACHT, L., NATALI, M.R.M., CUMAN, R.K.N., BERSANI-AMADO, C.A. Acetaminopheninduced hepatotoxicity: Preventive effect of trans anethole. **Biomedicine & Pharmacotherapy**. v.86, p.213–220, 2017.

SANABRIA-CABRERA, J., TABBAL, S., NIU, H., ALVAREZ-ALVAREZ, I., LICATA, A., BJÖRNSSON, E., LUCENA, M.I. N-acetylcysteine for the management of non-acetaminophen drug-induced liver injury in adults: A systematic review. **Frontiers in Pharmacology**. v.13, p.876868, 2022.

SHARMA, N., SINGH, B., WANI, M.S., GUPTA, R.C., HABEEB, T.H. Determination of the volatile composition in essential oil of *Azadirachta indica* A. Juss from different areas of north indian plains by gas chromatography/mass spectrometry (GC/MS). **Analytical Chemistry Letters**. v.11, n.1, p.73-82, 2021.

SPRÉA, R.M., FERNANDES, Â., CALHELHA, R.C., PEREIRA, C., PIRES, T.C., ALVES, M.J., FERREIRA, I.C. Chemical and bioactive characterization of the aromatic plant *Levisticum officinale* WDJ Koch: A comprehensive study. **Food & Function**. v.11, n. 2, p.1292-1303, 2020.

TEIXEIRA, C.D., BARBOSA, P.O., LIMA, W.G., BREGUEZ, G.S., DE ANDRADE FAGUNDES, M.M., COSTA, D.C., DE SOUZA, M. O. Preventive treatment with guarana powder (*Paullinia cupana*) mitigates acute paracetamol-induced hepatotoxicity by modulating oxidative stress. **Toxicology Reports**. v.14, p.101946, 2025.

TIAN, J., ZHANG, R., WENG, Y., QIN, Q., ZHANG, X., LIU, A., LIN, N. Myrcene enhances the cardioprotective effect through matrix remodelling in an experimental model of heart failure. **Arch Med Sci**. v.16, p.1-12, 2020.

UCHIDA, N.S., SILVA-FILHO, S.E., AGUIAR, R.P., WIIRZLER, L.A.M., CARDIA, G.F.E., CAVALCANTE, H.O., CUMAN, R.K.N. Protective effect of *Cymbopogon citratus* essential oil in experimental model of acetaminophen-induced liver injury. **The American Journal of Chinese Medicine**. v.45, n. 3, p.515-532, 2017.

ZHANG, H., JACOB, J. A., JIANG, Z., XU, S., SUN, K., ZHONG, Z., SHANMUGAM, A. Hepatoprotective effect of silver nanoparticles synthesized using aqueous leaf extract of *Rhizophora apiculata*. **International journal of nanomedicine**. p.3517-3524, 2019.

ZHOU, Y., WANG, J., ZHANG, D., LIU, J., WU, Q., CHEN, J., PEI, J. Mechanism of drug-induced liver injury and hepatoprotective effects of natural drugs. **Chinese Medicine**. v.16, n.1, p.135, 2021.

10. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Através dos resultados do presente estudo verificou-se que OELO possui propriedades antiagregante plaquetária, evidenciando a inibição da produção de EROs e expressão de P-selectina na membrana plaquetária que acometem no declínio dos eventos que levam ao recrutamento, ativação e agregação plaquetária.

Além disso, através desse estudo verificou-se que o OELO tem um efeito protetor contra lesão hepática aguda causada por paracetamol. Ressaltando que seu efeito hepatoprotetor pode envolver a modulação de vias de desintoxicação no fígado, além de atuar inibindo o estresse oxidativo e a resposta inflamatória, diminuindo a produção de $\bullet\text{NO}$, principalmente devido à sua atividade antioxidante de eliminação de radicais livres.

11.PERSPECTIVAS

Os resultados obtidos no presente trabalho abrem novas perspectivas. Em relação à atividade antitrombótica, pretende-se:

- Avaliar o efeito do OELO sobre o influxo de cálcio plaquetário.
- Produzir e avaliar o efeito antitrombótico de nanoformulações contendo OELO em modelos experimentais *in vitro* e *in vivo*.

Referente à atividade hepatoprotetora, pretende-se:

- Realizar ensaios sobre as citocinas através da análise de conteúdo de TNF- α , IL-1 β e IL-17.
- Explorar novas formas de administração através da obtenção de nanoformulações com intuito de melhorar biodisponibilidade, absorção, estabilidade, permeabilidade no trato gastrointestinal e capacidade de direcionamento ao sítio de ação, mantendo a segurança e eficácia do OELO.



UNIVERSIDADE FEDERAL DO
MATO GROSSO DO SUL -
UFMS



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Efeitos biológicos de óleos derivados de *Acromia aculeata* e *Levisticum officinale* e da biomassa resultante

Pesquisador: EDUARDO BENEDETTI PARISOTTO

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 57842022.2.0000.0021

Instituição Proponente: Universidade Federal de Mato Grosso do Sul - UFMS

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 5.445.802

Apresentação do Projeto:

A trombose associada a doenças arteriais é a principal causa de morbidade e mortalidade podendo levar a uma obstrução arterial, ocasionando déficit sanguíneo e perturbações no metabolismo celular das áreas afetadas. Objetivos: Investigar a ação antitrombótica do óleo essencial de *Levisticum officinale* e da polpa da *Acrocomia aculeata*, assim como seus respectivos microencapsulados, num modelo experimental in vitro. Metodologia: O plasma rico em plaquetas será avaliado na presença e ausência (veículo) de óleo essencial de *L. officinale* e da polpa da *A. aculeata*. A avaliação da agregação plaquetária será realizada por turbidimetria. A medida da secreção plaquetária será por fluorescência. A avaliação da coagulação será realizada em sistema semi-automatizado de coagulação. O estudo dos possíveis mecanismos de ação será feito por avaliação dos receptores plaquetários por citometria de fluxo e pelo estudo do balanço redox por espectrofotometria

Objetivo da Pesquisa:

Estudar a ação antitrombótica do óleo essencial de *Levisticum officinale* e do óleo da polpa e da *Acrocomia aculeata*, microencapsulado, num modelo experimental in vitro.

Objetivo Secundário:

1 Avaliar o efeito do óleo essencial e microencapsulado de *Levisticum officinale* e do óleo da polpa da *Acrocomia aculeata*, in natura e microencapsulado, sobre ativação plaquetária;

Endereço: Av. Costa e Silva, s/nº - Pioneiros ç Prédio das Pró-Reitorias ç Hércules Maymone ç 1º andar

Bairro: Pioneiros

CEP: 70.070-900

UF: MS

Município: CAMPO GRANDE

Telefone: (67)3345-7187

Fax: (67)3345-7187

E-mail: cepconep.propp@ufms.br



Continuação do Parecer: 5.445.802

- 2 Avaliar o efeito do óleo essencial e microencapsulado de *Levisticum officinale* e do óleo da polpa da *Acrocomia aculeata*, in natura e microencapsulado, sobre a agregação plaquetária;
- 3 Avaliar o efeito do óleo essencial e microencapsulado de *Levisticum officinale* e do óleo da polpa da *Acrocomia aculeata*, in natura e microencapsulado, sobre a secreção plaquetária;
- 4 Avaliar o efeito do óleo essencial e microencapsulado de *Levisticum officinale* e do óleo da polpa da *Acrocomia aculeata*, in natura e microencapsulado, sobre a coagulação sanguínea;
- 5 Investigar os possíveis mecanismos de ação por meio de:• Expressão de receptores plaquetários e espécies reativas de oxigênio (EROs);• Avaliação do balanço redox.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Como riscos são apresentados que a retirada de sangue venoso é um método corriqueiro na investigação clínica e científica, sem graves consequências para o doador. Contudo é considerada uma técnica invasiva visto que a agulha penetra na pele até chegar na veia. O maior problema é uma leve dor, e o desconforto de agulhas e da punção; porém se houver qualquer desconforto, o participante tem o direito de desistir a qualquer momento. Em raras ocasiões pode ocorrer: hematomas (durante ou após a realização da punção venosa); punção em artéria; anemia iatrogênica (em casos de volumes maiores a 100 mL); lesão nervosa; infecção. Em caso de qualquer complicação o contratante dos pesquisadores arcará com as despesas produzidas pelo procedimento. O risco associado de quebra de sigilo aos dados do participante será minimizado por meio do uso somente de um número de identificação e somente os pesquisadores terão acesso aos dados.

O principal benefício esperado pelo pesquisador é a partir deste estudo poderá ser identificada uma nova biomolécula que pode beneficiar o tratamento de doenças cardiovasculares associadas à trombose.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Trata-se de um projeto de pesquisa em que serão coletados 5 mL de sangue de 30 participantes, todos brasileiros, maiores de 18 anos e sem históricos de hemorragia ou trombose. O estudo possui financiamento próprio.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Carta resposta

Endereço: Av. Costa e Silva, s/nº - Pioneiros ç Prédio das Pró-Reitorias çHércules Maymoneç ç 1º andar
Bairro: Pioneiros **CEP:** 70.070-900
UF: MS **Município:** CAMPO GRANDE
Telefone: (67)3345-7187 **Fax:** (67)3345-7187 **E-mail:** cepconep.propp@ufms.br



Continuação do Parecer: 5.445.802

Recomendações:

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Após a análise dos novos documentos apresentados, o parecer é APROVADO.

Pendência 1. Após a apreciação do projeto e demais documentos apresentados, não fica claro porque o projeto se encaixa em Área Temática Especial, a saber: Projetos de pesquisa que envolvam organismos geneticamente modificados (OGM), células-tronco embrionárias e organismos que representem alto risco coletivo, incluindo organismos relacionados a eles, nos âmbitos de: experimentação, construção, cultivo, manipulação, transporte, transferência, importação, exportação, armazenamento, liberação no meio ambiente e descarte. Por favor, esclarecer porque optou por esta classificação.

Resposta: Ocorreu um equívoco ao selecionar a Área Temática Especial do futuro estudo, pois o estudo em questão não se enquadra em nenhuma das áreas apresentadas. Levando em consideração a afirmação "indique todas as áreas temáticas do projeto, se aplicável" a correção foi realizada na plataforma.

Análise: Pendência atendida.

Pendência 2. Tanto a Resolução CNS nº 441/2011 quanto a Portaria do Ministério da Saúde nº 2.201/2011 do Ministério da Saúde definem o biorrepositório como uma "coleção de material biológico humano, coletado e armazenado ao longo da execução de um projeto de pesquisa específico, conforme regulamento ou normas técnicas, éticas e operacionais pré-definidas, sob responsabilidade institucional e sob gerenciamento do pesquisador, sem fins comerciais".

Toda pesquisa que envolva a coleta de material biológico humano (MBH) em alguma de suas etapas necessariamente constituirá um biorrepositório. Ele poderá ter a duração de alguns anos, alguns meses, alguns dias e, em determinadas situações, até mesmo algumas horas. A Resolução CNS nº 441/2011 não estabelece um prazo mínimo para a existência de um biorrepositório, embora ela estabeleça um prazo máximo de 10 anos e a possibilidade do uso futuros das amostras em outras pesquisas. O biorrepositório é o nome dado ao MBH coletado durante a execução da pesquisa e que ficará reservado até a realização das análises previstas no protocolo. Tão logo sejam encerradas as etapas experimentais do protocolo e a manutenção do MBH não seja mais necessária, o MBH deverá ser destinado ao descarte ou transferido para um biobanco ou outro biorrepositório, a depender do planejamento feito pelo pesquisador no projeto de pesquisa. No momento em que as amostras forem descartadas ou transferidas, o biorrepositório inicialmente constituído deixará de existir.

Endereço: Av. Costa e Silva, s/nº - Pioneiros ç Prédio das Pró-Reitorias çHércules Maymoneç ç 1º andar
Bairro: Pioneiros **CEP:** 70.070-900
UF: MS **Município:** CAMPO GRANDE
Telefone: (67)3345-7187 **Fax:** (67)3345-7187 **E-mail:** cepconep.propp@ufms.br



Continuação do Parecer: 5.445.802

Desta forma, entende-se que o uso de material biológico acarretará em biorrepositório, e assim deve ser apresentado o regulamento. Por favor, consultar: <https://cep.ufms.br/biobancos-e-biorrepositorios-para-material-biologico-humano/>, no final da página haverá o modelo de biorrepositório.

Resposta: Apesar de futuramente ser realizada a coleta de material biológico humano (MBH), não serão armazenadas amostras dos voluntários em biorrepositório. Levando em consideração que as plaquetas que serão utilizadas como reagente para avaliação antitrombótica possuem estabilidade de apenas 3h após a coleta. Sendo assim, após a utilização para avaliação antitrombótica as amostras serão descartadas em lixo infectante.

Análise: Pendência atendida.

Pendência 3. Os benefícios e riscos estão corretamente apresentados no TCLE, porém na plataforma brasil e no projeto estão incompletos ou parcialmente incorretos. Por favor, ajustar os mesmos riscos e benefícios em todos os documentos. Atenção ao trecho dos benefícios: “O participante não terá nenhum tipo de despesa para participar desta pesquisa, sendo sua colaboração na pesquisa livre e de espontânea vontade”. A isenção de despesas não é benefício e deve ser retirada.

Resposta: Todos os ajustes relacionados a riscos e benéficos foram realizados na plataforma e no projeto detalhado.

Análise: Pendência atendida.

Pendência 4. Quanto ao Termo de consentimento livre e esclarecido

a. Por favor, adequar o campo para rubricas, está aparecendo no meio da segunda página. O TCLE deve campo específico para rubrica em todas as páginas.

b. Segundo a Resolução CNS/MS nº466/2012 – Item IV.2., o TCLE não deve conter trecho final com o seguinte teor: “Eu, _____ declaro que li o TCLE e concordo em participar da pesquisa”. A assinatura do participante atesta a sua vontade em participar da pesquisa. Desta forma, solicita-se retirar.

c. Segundo a resolução CNS/MS nº466/2012 – Item IV.5, alínea d, o TCLE também deve constar o endereço profissional do pesquisador responsável.

d. Também segundo a resolução CNS/MS nº466/2012 – Item IV.5, alínea d, recomendar-se adequação das seguintes informações do CEP/UFMS.

“Campus da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, prédio das Pró-Reitorias ‘Hércules Maymone’ – 1º andar, CEP: 79070900. Campo Grande – MS. e-mail: cepconep.propp@ufms.br; telefone: 3345-7187; atendimento ao público: 07:30-11:30 no período matutino e das 13:30 às

Endereço: Av. Costa e Silva, s/nº - Pioneiros ç Prédio das Pró-Reitorias çHércules Maymoneç ç 1º andar
Bairro: Pioneiros **CEP:** 70.070-900
UF: MS **Município:** CAMPO GRANDE
Telefone: (67)3345-7187 **Fax:** (67)3345-7187 **E-mail:** cepconep.propp@ufms.br



Continuação do Parecer: 5.445.802

17:30 no período vespertino.”

Resposta: Todos os ajustes em relação ao TCLE foram realizados. Podendo ser consultados no TCLE e no projeto detalhado.

Análise: Pendência atendida.

Considerações Finais a critério do CEP:

CONFIRA AS ATUALIZAÇÕES DISPONÍVEIS NA PÁGINA DO CEP/UFMS

1) Regimento Interno do CEP/UFMS

Disponível em: <https://cep.ufms.br/novo-regimento-interno/>

2) Calendário de reuniões

Disponível em <https://cep.ufms.br/calendario-de-reunioes-do-cep-2022/>

3) Etapas do trâmite de protocolos no CEP via Plataforma Brasil

Disponível em: <https://cep.ufms.br/etapas-do-tramite-de-protocolos-no-cep-via-plataforma-brasil/>

4) Legislação e outros documentos:

Resoluções do CNS.

Norma Operacional nº001/2013.

Portaria nº2.201 do Ministério da Saúde.

Cartas Circulares da Conep.

Resolução COPP/UFMS nº240/2017.

Outros documentos como o manual do pesquisador, manual para download de pareceres, pendências frequentes em protocolos de pesquisa clínica v 1.0, etc.

Disponíveis em: <https://cep.ufms.br/legislacoes-2/>

5) Informações essenciais do projeto detalhado

Disponíveis em: <https://cep.ufms.br/informacoes-essenciais-projeto-detalhado/>

6) Informações essenciais – TCLE e TALE

Disponíveis em: <https://cep.ufms.br/informacoes-essenciais-tcle-e-tale/>

Endereço: Av. Costa e Silva, s/nº - Pioneiros ç Prédio das Pró-Reitorias çHércules Maymoneç ç 1º andar

Bairro: Pioneiros

CEP: 70.070-900

UF: MS

Município: CAMPO GRANDE

Telefone: (67)3345-7187

Fax: (67)3345-7187

E-mail: cepconep.propp@ufms.br



Continuação do Parecer: 5.445.802

- Orientações quanto aos Termos de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) e aos Termos de Assentimento Livre e Esclarecido (TALE) que serão submetidos por meio do Sistema Plataforma Brasil versão 2.0.

- Modelo de TCLE para os participantes da pesquisa versão 2.0.

- Modelo de TCLE para os responsáveis pelos participantes da pesquisa menores de idade e/ou legalmente incapazes versão 2.0.

7) Biobancos e Biorrepositórios para armazenamento de material biológico humano

Disponível em: <https://cep.ufms.br/biobancos-e-biorrepositorios-para-material-biologico-humano/>

8) Relato de caso ou projeto de relato de caso?

Disponível em: <https://cep.ufms.br/662-2/>

9) Cartilha dos direitos dos participantes de pesquisa

Disponível em: <https://cep.ufms.br/cartilha-dos-direitos-dos-participantes-de-pesquisa/>

10) Tramitação de eventos adversos

Disponível em: <https://cep.ufms.br/tramitacao-de-eventos-adversos-no-sistema-cep-conep/>

11) Declaração de uso de material biológico e dados coletados

Disponível em: <https://cep.ufms.br/declaracao-de-uso-material-biologico/>

12) Termo de compromisso para utilização de informações de prontuários em projeto de pesquisa

Disponível em: <https://cep.ufms.br/termo-de-compromisso-prontuarios/>

13) Termo de compromisso para utilização de informações de banco de dados

Disponível em: <https://cep.ufms.br/termo-de-compromisso-banco-de-dados/>

DURANTE A PANDEMIA CAUSADA PELO SARS-CoV-2, CONSIDERAR:

Solicitamos aos pesquisadores que se atentem e obedeçam às medidas de segurança adotadas pelo locais de pesquisa, pelos governos municipais e estaduais, pelo Ministério da Saúde e pelas demais instâncias do governo devido a excepcionalidade da situação para a prevenção do contágio

Endereço: Av. Costa e Silva, s/nº - Pioneiros ç Prédio das Pró-Reitorias çHércules Maymoneç ç 1º andar

Bairro: Pioneiros

CEP: 70.070-900

UF: MS

Município: CAMPO GRANDE

Telefone: (67)3345-7187

Fax: (67)3345-7187

E-mail: cepconep.propp@ufms.br



Continuação do Parecer: 5.445.802

e o enfrentamento da emergência de saúde pública de importância internacional decorrente do coronavírus (Covid-19).

As medidas de segurança adotadas poderão interferir no processo de realização das pesquisas envolvendo seres humanos. Quer seja no contato do pesquisador com os participantes para coleta de dados e execução da pesquisa ou mesmo no processo de obtenção do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido-TCLE e Termo de Assentimento Livre e Esclarecido-TALE, incidindo sobre o cronograma da pesquisa e outros. Orientamos ao pesquisador na situação em que tenha seu projeto de pesquisa aprovado pelo CEP e em decorrência do contexto necessite alterar seu cronograma de execução, que faça a devida "Notificação" via Plataforma Brasil, informando alterações no cronograma de execução da pesquisa.

SE O PROTOCOLO DE PESQUISA ESTIVER PENDENTE, CONSIDERAR:

Cabe ao pesquisador responsável encaminhar as respostas ao parecer de pendências por meio da Plataforma Brasil em até 30 dias a contar a partir da data de emissão do Parecer Consubstanciado. As respostas às pendências devem ser apresentadas e descritas em documento à parte, denominado CARTA RESPOSTA, além do pesquisador fazer as alterações necessárias nos documentos e informações solicitadas. Ressalta-se que deve haver resposta para cada uma das pendências apontadas no parecer, obedecendo a ordenação deste. Para apresentar a Carta Resposta o pesquisador deve usar os recursos "copiar" e "colar" quando for transcrever as pendências solicitadas e as respostas apresentadas na Carta, como também no texto ou parte do texto que será alterado nos demais documentos. Ou seja, deve manter a fidedignidade entre a pendência solicitada e o texto apresentado na Carta Resposta e nos documentos alterados.

Para que os protocolos de pesquisa sejam apreciados nas reuniões definidas no Calendário, o pesquisador responsável deverá realizar a submissão com, no mínimo, 15 dias de antecedência. Observamos que os protocolos submetidos com antecedência inferior a 15 dias serão apreciados na reunião posterior. Confira o calendário de reuniões de 2022, disponível no link: <https://cep.ufms.br/calendario-de-reunioes-do-cep-2022/> Observar se o atendimento as solicitações remeterá a necessidade de fazer adequação no cronograma da pesquisa, de modo que a etapa de coleta de informações dos participantes seja iniciada somente após a aprovação por este Comitê.

Endereço: Av. Costa e Silva, s/nº - Pioneiros ç Prédio das Pró-Reitorias çHércules Maymoneç ç 1º andar
Bairro: Pioneiros **CEP:** 70.070-900
UF: MS **Município:** CAMPO GRANDE
Telefone: (67)3345-7187 **Fax:** (67)3345-7187 **E-mail:** cepconep.propp@ufms.br



Continuação do Parecer: 5.445.802

SE O PROTOCOLO DE PESQUISA ESTIVER NÃO APROVADO, CONSIDERAR:

Informamos ao pesquisador responsável, caso necessário entrar com recurso diante do Parecer Consubstanciado recebido, que ele pode encaminhar documento de recurso contendo respostas ao parecer, com a devida argumentação e fundamentação, em até 30 dias a contar a partir da data de emissão deste parecer. O documento, que pode ser no formato de uma carta resposta, deve contemplar cada uma das pendências ou itens apontados no parecer, obedecendo a ordenação deste. O documento (CARTA RESPOSTA) deve permitir o uso correto dos recursos “copiar” e “colar” em qualquer palavra ou trecho do texto do projeto, isto é, não deve sofrer alteração ao ser “colado”.

Para que os protocolos de pesquisa sejam apreciados nas reuniões definidas no Calendário, o pesquisador responsável deverá realizar a submissão com, no mínimo, 15 dias de antecedência.

Observamos que os protocolos submetidos com antecedência inferior a 15 dias serão apreciados na reunião posterior. Confira o calendário de reuniões de 2022, disponível no link: <https://cep.ufms.br/calendario-de-reunioes-do-cep-2022/>

EM CASO DE APROVAÇÃO, CONSIDERAR:

É de responsabilidade do pesquisador submeter ao CEP semestralmente o relatório de atividades desenvolvidas no projeto e, se for o caso, comunicar ao CEP a ocorrência de eventos adversos graves esperados ou não esperados. Também, ao término da realização da pesquisa, o pesquisador deve submeter ao CEP o relatório final da pesquisa. Os relatórios devem ser submetidos através da Plataforma Brasil, utilizando-se da ferramenta de NOTIFICAÇÃO.

Informações sobre os relatórios parciais e final podem acessadas em <https://cep.ufms.br/relatorios-parciais-e-final/>

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

| Tipo Documento | Arquivo | Postagem | Autor | Situação |
|--------------------------------|---|------------------------|--------------------------------|----------|
| Informações Básicas do Projeto | PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1914322.pdf | 13/05/2022 14:10:03 | | Aceito |
| Outros | CARTARESPOSTA.pdf | 13/05/2022 14:02:44 | DENISE CAROLINE LUIZ SOARES | Aceito |
| Projeto Detalhado / Brochura | PROJETO_DETALHADO_MAIO2022.pdf | 13/05/2022 14:01:31 | DENISE CAROLINE LUIZ SOARES | Aceito |

Endereço: Av. Costa e Silva, s/nº - Pioneiros ç Prédio das Pró-Reitorias çHércules Maymoneç ç 1º andar
Bairro: Pioneiros **CEP:** 70.070-900
UF: MS **Município:** CAMPO GRANDE
Telefone: (67)3345-7187 **Fax:** (67)3345-7187 **E-mail:** cepconep.propp@ufms.br



UNIVERSIDADE FEDERAL DO
MATO GROSSO DO SUL -
UFMS



Continuação do Parecer: 5.445.802

| | | | | |
|---|--|------------------------|--------------------------------|--------|
| Investigador | PROJETO_DETALHADO_MAIO2022.pdf | 13/05/2022 14:01:31 | DENISE CAROLINE LUIZ SOARES | Aceito |
| TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência | TCLE_REVISADO_MAIO.pdf | 13/05/2022 14:01:15 | DENISE CAROLINE LUIZ SOARES | Aceito |
| Declaração de Instituição e Infraestrutura | RESOLUCAOCASFACFANUFMSn473de18022022.pdf | 24/03/2022 11:17:26 | DENISE CAROLINE LUIZ SOARES | Aceito |
| Folha de Rosto | FolhadeRostoProfessorEduardo.pdf | 23/03/2022 17:29:05 | DENISE CAROLINE LUIZ SOARES | Aceito |
| Orçamento | Orcamento.pdf | 23/03/2022 17:21:37 | DENISE CAROLINE LUIZ SOARES | Aceito |
| Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco | materialbiologico.pdf | 23/03/2022 17:11:46 | DENISE CAROLINE LUIZ SOARES | Aceito |

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

CAMPO GRANDE, 02 de Junho de 2022

Assinado por:

Fernando César de Carvalho Moraes
(Coordenador(a))

Endereço: Av. Costa e Silva, s/nº - Pioneiros ç Prédio das Pró-Reitorias çHércules Maymoneç ç 1º andar
Bairro: Pioneiros **CEP:** 70.070-900
UF: MS **Município:** CAMPO GRANDE
Telefone: (67)3345-7187 **Fax:** (67)3345-7187 **E-mail:** cepconep.propp@ufms.br



Serviço Público Federal
Ministério da Educação

Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul



CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Efeito hepatoprotetor do óleo essencial de *Levisticum officinale* em modelo experimental de lesão hepática induzida por paracetamol", registrada com o nº 1.243/2022, sob a responsabilidade de Eduardo Benedetti Parisotto e - que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal - CONCEA, e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA/UFMS) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL, em reunião de 09/09/2022.

| | | |
|-------------------------|-------------------------|----------------|
| Finalidade | () Ensino | (x) Pesquisa |
| Vigência da Autorização | 10/09/2022 a 14/08/2025 | |
| Espécie/linhagem/raça | Camundongo/Balb-c | |
| Nº de animais | 116 | |
| Peso/Idade | 6 semanas, 25 ± 2 g | |
| Sexo | 30 fêmeas/86 machos | |
| Origem | Biotério Central/UFMS | |

Fábio José Carvalho Faria

Coordenador da CEUA/UFMS

Campo Grande, 07 de novembro de 2022



Documento assinado eletronicamente por **Fabio Jose Carvalho Faria, Presidente de Comissão**, em 08/11/2022, às 08:12, conforme horário oficial de Mato Grosso do Sul, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufms.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **3655166** e o código CRC **4374F68B**.

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Av Costa e Silva, s/nº - Cidade Universitária

Fone: (67) 3345-7925

CEP79070-900 - Campo Grande - MS

Referência: Processo nº 23104.020679/2022-12

SEI nº 3655166