

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

ISABELLY TEIXEIRA ESPINOÇA

EFEITO ANTITROMBÓTICO DO ÓLEO DA POLPA DE BOCAIÚVA - *Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd. ex Mart (Arecaceae)

CAMPO GRANDE - MS

2024

ISABELLY TEIXEIRA ESPINOÇA

EFEITO ANTITROMBÓTICO DO ÓLEO DA POLPA DE BOCAIÚVA - *Acrocomia aculeata* (JACQ.) Lodd. ex Mart. (Arecaceae)

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

Área de concentração: Biotecnologia

Linha de Pesquisa: Aplicada à saúde humana e animal.

Orientador: Prof. Dr. Eduardo Benedetti Parisotto

Coorientadora: Prof. Dra. Ana Cristina Jacobowski

CAMPO GRANDE – MS

2024

AGRADECIMENTOS

Aos meus amigos e familiares, em especial aos meus pais, irmãos e companheiro pelo incentivo e apoio nos momentos em que achei que não seria possível prosseguir.

Ao meu orientador, o professor Dr. Eduardo Benedetti Parisotto por sua paciência e dedicação em seus ensinamentos, pela oportunidade e confiança em mim depositados sem mesmo me conhecer. E a minha coorientadora professora Dra. Ana Cristina Jacobowski pelo apoio e confiança nesse trabalho.

Aos professores doutores (as) Edgar Julian Paredes-Gamero, Maria Lígia Rodrigues Macedo, Denise Brentan Silva e Janaina de Cássia Orlandi Sardi e aos meus companheiros de laboratório, os alunos de iniciação científica Anna Júlia Papa de Araujo e Rafael Seiji Nakano Ota e as doutorandas Denise Caroline Luiz Soares Basilio e Paola Mayara pelo apoio na realização deste trabalho.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e à UFMS pela oportunidade de cursar a Pós-Graduação.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa concedida.

Aos demais colaboradores que fizeram parte das etapas de pesquisa ao longo dos dois últimos anos, aos docentes do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e a todas as pessoas que voluntariamente se dispuseram a fazer parte desta pesquisa.

RESUMO

A *Acrocomia aculeata* é uma espécie de palmeira pertencente à família *Aracaceae*. Oriunda de regiões tropicais, é conhecida por diversos nomes populares, entre eles bocaiúva e macaúba. O óleo extraído da polpa de bocaiúva (OPAA) contém uma série de compostos capazes de controlar o estado redox e assim, prevenir o estresse oxidativo. O desequilíbrio no estado redox pode levar ao desenvolvimento de doenças cardiovasculares (DCV) e trombose, que estão entre as principais causas de morte no Brasil e no mundo. Além disso, os medicamentos utilizados no tratamento de DCVs e trombose continuam a causar interações e efeitos colaterais, necessitando da investigação de novos compostos que sejam eficazes e seguros. Portanto, este trabalho objetivou estudar o efeito antitrombótico do OPAA *in natura*. Para isso, o OPAA foi extraído por solvente e caracterizado por cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massas (CG-EM), onde os principais compostos identificados foram o ácido oleico (35,10%), ácido palmítico (16,02%), ácido láurico (2,69%), ácido caprílico (2,02) e esqualeno (1,79%). Posteriormente, foram realizados testes de toxicidade *in vitro* e *in vivo*, que mostraram que o OPAA não apresenta efeito tóxico. Os ensaios de agregação mostraram que o OPAA inibiu a agregação plaquetária na maioria das concentrações testadas, quando ADP e epinefrina foram usados como agonistas. No entanto, o OPAA não apresentou efeito anticoagulante, conforme evidenciado pelos valores de tempo de protrombina (TP) e tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPa). Quanto ao seu potencial de inibição da ativação plaquetária, observou-se que o OPAA modula a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) nas plaquetas, reduzindo a produção de EROs na maioria das concentrações testadas. Esses resultados corroboram com os resultados encontrados nos ensaios de citometria de fluxo, onde observou-se uma diminuição da expressão de P-selectina na membrana de plaquetas previamente tratadas com OPAA e estimuladas com ADP. Portanto, o OPAA exibiu atividade antiagregante sem apresentar toxicidade. Inibiu a ativação plaquetária observada pela diminuição da expressão da P-selectina e da produção de EROs. Além disso, os componentes majoritários presentes no OPAA destacam o efeito antioxidante envolvido no mecanismo de ação antiplaquetário.

Palavras-chave: trombose, hemostasia, agregação, *A. aculeata*, anticoagulantes.

ABSTRACT

Acrocomia aculeata is a species of palm tree belonging to the Aracaceae family. Coming from tropical regions, it is known by several popular names, including bocaiúva and macaúba. The oil extracted from bocaiúva pulp (AAPO) contains a series of compounds capable of controlling the redox state and thus preventing oxidative stress. The imbalance in the redox state can lead to the development of cardiovascular diseases (CVD) and thrombosis, which are among the main causes of death in Brazil and around the world. Furthermore, medications used to treat CVD and thrombosis continue to cause interactions and side effects, necessitating the investigation of new compounds that are effective and safe. Therefore, this work aimed to study the antithrombotic effect of AAPO *in natura*. For that, AAPO was extracted by solvent and characterized by gas chromatography coupled to a mass spectrometer (GC-MS), where the main compounds identified were oleic acid (35.10%), palmitic acid (16.02%), lauric acid (2.69%), caprylic acid (2.02) and squalene (1.79%). Subsequently, *in vitro* and *in vivo* toxicity tests were carried out, which demonstrated that AAPO has no toxic effect. Aggregation assays demonstrated that AAPO inhibited platelet aggregation at most testicular concentrations when ADP and epinephrine were used as agonists. However, AAPO did not present an anticoagulant effect, as evidenced by the prothrombin time (PT) and activated partial thromboplastin time (aPTT) values. Regarding its potential to inhibit platelet activation, it was observed that AAPO modulates the production of reactive oxygen species (ROS) in platelets, reducing the production of ROS at most concentrations tested. These results corroborate the results found in flow cytometry assays, where a decrease in P-selectin expression was observed in the membrane of platelets previously treated with AAPO and stimulated with ADP. Therefore, AAPO exhibited antiaggregation activity without presenting toxicity. Inhibited platelet activation observed by decreasing P-selectin expression and ROS production. Furthermore, the majority components present in AAPO highlight the antioxidant effect involved in the antiplatelet mechanism of action.

Keywords: thrombosis, hemostasis, aggregation, *A. aculeata*, anticoagulants.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	8
LISTA DE TABELAS	9
INTRODUÇÃO	10
CAPÍTULO I - FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	12
1. HEMOSTASIA	12
1.1 Plaquetas	12
1.2 Fatores de coagulação	14
1.3 Endotélio vascular	14
1.4 Hemostasia primária	15
1.5 Hemostasia secundária	17
1.6 Controle do processo de coagulação e fibrinólise	19
1.7 Fibrinólise ou hemostasia terciária	19
2. ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO E FORMAÇÃO ANORMAL DE TROMBOS	21
3. ANTIAGREGANTES E ANTICOAGULANTES	23
4. BIOTECNOLOGIA E O DESENVOLVIMENTO DE PRODUTOS NATURAIS	25
4.1 <i>Acrocomia aculeata</i> (Jacq) Lodd. x Mart	26
4.2 Óleo da polpa de Bocaiúva	28
5. REFERÊNCIAS	30
OBJETIVOS	39
Objetivo geral	39
Objetivos específicos	39
CAPÍTULO II - ARTIGO	40
Antithrombotic effect of oil from the pulp of Bocaiúva - <i>Acrocomia aculeata</i> (Jacq.) Lodd. ex Mart. (Arecaceae)	40
ABSTRACT	41
1. INTRODUCTION	42
2. MATERIALS AND METHODS	43
2.1 Obtaining the oil from the pulp of <i>A. aculeata</i> (AAPO)	43
2.2 Gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) analysis	43
2.3 Blood collection and obtaining plasma	43
2.4 Toxicity assays	44

2.4.1 Evaluation of <i>in vitro</i> toxicity by the Trypan blue exclusion test	44
2.4.2 Evaluation of <i>in vivo</i> systemic toxicity in <i>Galleria mellonella</i> model ...	44
2.5 Determination of platelet aggregation	45
2.6 Evaluation of blood coagulation	45
2.7 Platelet activation	46
2.7.1 Expression of platelet surface P-selectin	46
2.7.2 Assessment of platelet activation by intraplatelet content of ROS	46
2.8 Statistical analysis	46
3. RESULTS AND DISCUSSION	47
3.1 Chemical analyses of AAPO	47
3.2 <i>In vitro</i> and <i>in vivo</i> toxicity	49
3.3 Effect of AAPO on human platelet aggregation	51
3.4 Effect of AAPO on blood coagulation	52
3.5 Platelet activation	54
3.5.1 Effects of AAPO on platelet surface P-selectin expression	54
3.5.2 Content of ROS produced by platelets after exposure to AAPO	56
4. CONCLUSION	58
5. ACKNOWLEDGMENT AND SOURCES OF SUPPORT	58
7. AUTHOR CONTRIBUTIONS	58
8. AUTHOR DECLARATIONS	58
9. REFERENCES	59
CONSIDERAÇÕES FINAIS	66
PERSPECTIVAS	68
ANEXO I - TCLE	69
ANEXO II – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos (CEP/UFMS)	72

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I

Fundamentação teórica.

Figura 1. Estrutura funcional plaquetária	13
Figura 2. Representação ilustrativa das etapas da Hemostasia Primária	16
Figura 3. Modelo celular de coagulação	17
Figura 4. Representação do processo fibrinolítico.	20
Figura 5. Características da <i>Acrocomia aculeata</i>	27
Figura 6. Representação esquemática dos resultados obtidos no estudo.	67

CAPÍTULO II

Artigo: Antithrombotic effect of oil from the pulp of Bocaiúva - *Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd. ex Mart. (Arecaceae).

Figure 1. Toxicity in human platelets and systemic in <i>G. mellonella</i>	50
Figure 2. Effect of AAPO on platelet aggregation induced by ADP and epinephrine.	52
Figure 3. Expression of platelet surface P-selectin after exposure of platelets to AAPO.	55
Figure 4. Intraplatelet content of ROS in AAPO-treated platelets.	57

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO II

Artigo: Antithrombotic effect of oil from the pulp of Bocaiúva - *Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd. ex Mart. (Arecaceae)

Table 1. Constituents identified from AAPO by GC-MS.	48
Table 2. PT and aPTT coagulation parameters measured in human plasma treated with heparin and AAPO.	53

INTRODUÇÃO

Acrocomia aculeata é uma palmeira oleaginosa pertencente à família *Aracaceae* (de Lima *et al.*, 2018). O gênero *Acrocomia* inclui palmeiras espinhosas morfologicamente diversas e com frutificação abundante (de Lima *et al.*, 2018). A *A. aculeata* destaca-se por sua ampla distribuição geográfica, sendo nativa de florestas tropicais (Borges *et al.*, 2021). Além disso, pode ser comumente conhecida como ucajá, bocaiúva, coco espinho e macaúba (de Lima *et al.*, 2018; de Souza *et al.*, 2020). A polpa de bocaiúva possui importância econômica, industrial e medicinal (Arena *et al.*, 2018; Colombo *et al.*, 2018; de Souza *et al.*, 2020). Ainda, o óleo extraído da polpa de *A. aculeata* (OPAA) é caracterizado por sua riqueza em ácidos graxos, β -caroteno e α -tocoferol, que possuem propriedades antioxidantes (Arena *et al.*, 2018; Colombo *et al.*, 2018).

As espécies reativas de oxigênio (EROs) são produzidas em resposta a estímulos endógenos ou exógenos (Halliwell; Gutteridge, 2015; Qiao *et al.*, 2018). Na homeostasia, as EROs estão envolvidas na regulação da função plaquetária e na vasorregulação (Halliwell; Gutteridge, 2015; Qiao *et al.*, 2018). Por outro lado, a produção desordenada de EROs e deficiências nos níveis de antioxidantes estão associados ao desenvolvimento de doenças cardiovasculares (DCVs), trombose, neurodegeneração, aterosclerose, diabetes e ao envelhecimento (Halliwell; Gutteridge, 2015; Qiao *et al.*, 2018; Roth *et al.*, 2020; Wendelboe *et al.*, 2016).

A trombose é a patologia subjacente mais comum entre as DCVs (Raskob *et al.*, 2014). O tromboembolismo venoso (TEV) inclui a embolia pulmonar (EP) e a trombose venosa profunda (TVP), uma doença comum e potencialmente fatal cuja principal complicação é a embolia pulmonar (Albricker *et al.*, 2022). A TVP pode ocorrer em pacientes internados, ambulatoriais e com sintomas inespecíficos, razão pela qual o diagnóstico apresenta baixa sensibilidade e especificidade (Albricker *et al.*, 2022).

A descoberta de medicamentos antitrombóticos revolucionou o tratamento de DCVs e foi considerado um marco para o tratamento de TEV (Chan; Sobieraj-Teague; Eikelboom, 2020). Embora eficazes, os antitrombóticos podem apresentar diversas características indesejáveis que dificultam e limitam o tratamento, como interações e resistência medicamentosa (Chan; Sobieraj-Teague; Eikelboom, 2020;

Levy; Connors, 2021), interferências nutricionais e uma estreita faixa terapêutica (Chan; Sobieraj-Teague; Eikelboom, 2020; Melnikova *et al.*, 2009).

Diante disso, os avanços na área farmacêutica e a necessidade de se obter novas terapias impulsionaram as pesquisas no campo da anticoagulação na última década, permitindo assim o surgimento de anticoagulantes orais diretos (DOACs) (Milling; Truman.; Ziebell, 2020). No entanto, ainda há necessidade de busca por novos antitrombóticos que superem as complicações causadas e possibilitem um tratamento que atenda às especificidades de cada paciente (Lamponi, 2021). Por isso, devido ao potencial antioxidante já documentado do OPAA na literatura (Jacobowski *et al.*, 2021; Sant'ana *et al.*, 2023), o objetivo central deste estudo foi avaliar o efeito antitrombótico do OPAA *in natura* sobre plaquetas humanas em um modelo experimental *in vitro* .

CAPÍTULO I - FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

1. HEMOSTASIA

O processo de hemostasia ocorre pela resposta hemostática quando há dano ao endotélio vascular, tendo como finalidade manter a integridade e equilíbrio corporal. Esse processo depende da interação entre plaquetas, endotélio vascular e fatores de coagulação, e é controlado por fatores pró e anticoagulantes (Periyah; Halim; Saad, 2017).

1.1 Plaquetas

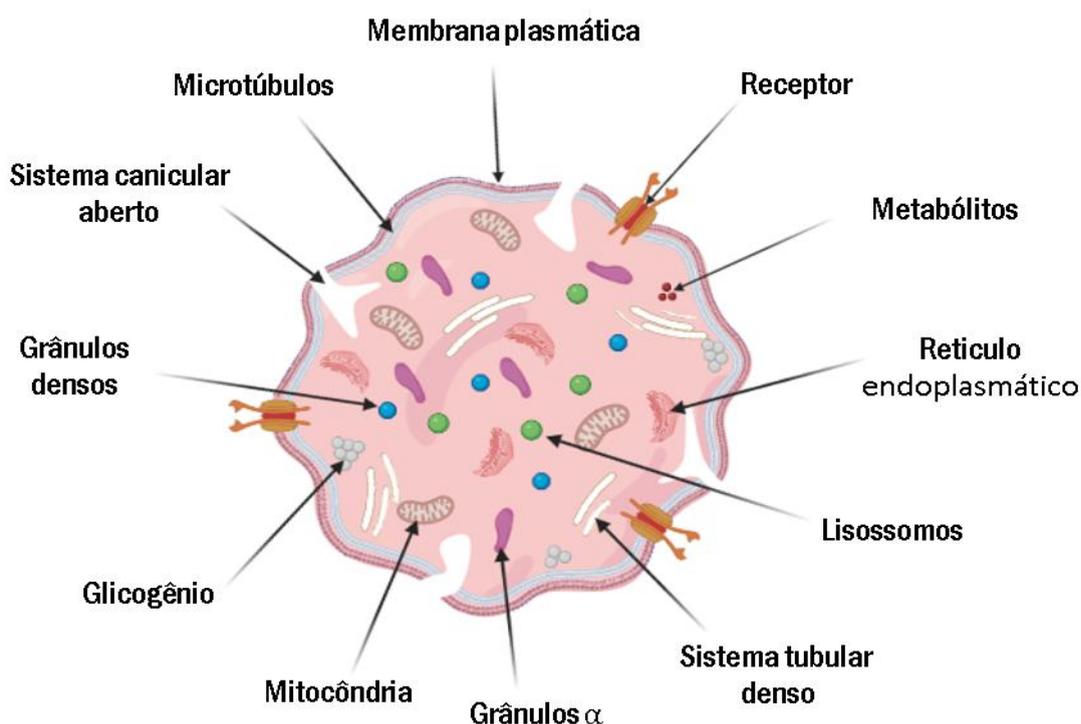
As plaquetas são fragmentos celulares, anucleados, com formato discóide e cerca de 2-4 μm de diâmetro (Van der Meijden; Heemskerk, 2019). São produzidas na medula óssea por fragmentos do citoplasma de megacariócitos, sendo a trombopoetina (TPO) o principal hormônio regulador desse processo (Van der Meijden; Heemskerk, 2019). O valor plasmático plaquetário é mantido entre 150 e 400 x 10³/ μL , e a sobrevivência plaquetária varia de 7 a 10 dias (Quach; Chen; Li, 2018).

As plaquetas apresentam funções de captação, secreção e produção de componentes que participam de um extenso processo de comunicação bidirecional (Van der Meijden; Heemskerk, 2019). Os produtos secretados por plaquetas podem influenciar não apenas na hemostasia, mas também em processos inflamatórios, na imunidade e até mesmo no crescimento tumoral (Van der Meijden; Heemskerk, 2019).

As plaquetas são constituídas por uma membrana plasmática composta por uma bicamada de fosfolípidios contendo diversas moléculas, receptores e microdomínios em sua superfície (Thon; Italiano, 2012). Além disso, possuem um citoesqueleto com microtúbulos, espectrina e actina, que são responsáveis por manter a forma discóide de plaquetas não ativadas (Thon; Italiano, 2012). Ademais, possuem um sistema canicular aberto que permite a interação entre substâncias intra e extracelulares e um sistema tubular denso que armazena o cálcio (Heijnen; Korporaal, 2017), bem como lisossomos, ricos em enzimas proteolíticas (**Figura 1**) (Rauch; Paris, 2018).

Além disso, possuem dois tipos granulares, os grânulos densos, que são constituídos principalmente por adenosina difosfato e trifosfato (ADP e ATP, respectivamente), serotonina, pirofosfato, histamina e cálcio (Rauch; Paris, 2018), e os grânulos- α , que têm em sua composição inúmeras proteínas, como o fator de von Willebrand (FvW) e o fibrinogênio, receptores de membrana, mediadores de coagulação, inflamação e angiogênese, bem como quimiocinas e fatores de crescimento (Heijnen; Korporaal, 2017).

Figura 1. Estrutura funcional plaquetária



Fonte: A autora, 2022 – Criado com BioRender.

Apesar de apresentarem estruturas funcionais bem definidas a heterogeneidade estrutural e de resposta pode ser observada nas plaquetas em diferentes indivíduos e entre plaquetas, podendo diferir umas das outras na extensão de sua sinalização e em suas funções, como em sua adesão e ativação (Van der Meijden; Heemskerk, 2019). Por isso, as populações plaquetárias podem incluir plaquetas com ou sem secreção (esgotadas), plaquetas com revestimento de fibrina (revestidas) e plaquetas com fosfatidilserina exposta em sua membrana (pró-coagulantes) (Van der

Meijden; Heemskerk, 2019).

1.2 Fatores de coagulação

O fator de von Willebrand (FvW) é uma glicoproteína adesiva produzida por megacariócitos e células endoteliais (CEs), e é responsável pela ponte de ligação entre plaqueta-subendotélio e plaqueta-plaqueta, e por formar um complexo de ligação com o fator VIII, protegendo-o da degradação proteolítica e da ativação prematura (de Norme; Vanhoorelbeke; de Meyer, 2019). Assim como o FvW, outros fatores de coagulação exercem papel essencial na hemostasia, estando diretamente envolvidos na formação de um coágulo estável (Lasne; Jude; Susen, 2006). Esses fatores incluem o fibrinogênio (fator I), protrombina (fator II), fator tecidual (FT), fatores IV, V, VII, fator VIII, fator IX, fator X, fator XI, fator XIII, fator de Fletcher (Precalicroína) e cininogênio de alto peso molecular (Lasne; Jude; Susen, 2006).

1.3 Endotélio vascular

A parede dos vasos sanguíneos é composta principalmente por uma monocamada de células endoteliais (CEs), que estão em contato direto com os componentes sanguíneos e com o subendotélio, e corpos de *Weibel-Palade*, responsáveis por armazenar proteínas contendo FvW e P-selectina (Annichino-Bizzacchi; de Paula, 2018; Neubauer; Zieger, 2021). A matriz subendotelial por sua vez é composta por proteínas de adesão, como o colágeno (Annichino-Bizzacchi; de Paula, 2018).

O endotélio vascular tem funções de regulação e proteção, atuando nos principais sistemas do organismo, como o imunológico e vascular (Kazmi; Boyce.; Lwaleed, 2015). Sob condições fisiológicas, as CEs fornecem mecanismos pró-coagulantes, bem como anticoagulantes, pela liberação de substâncias como óxido nítrico (NO) e prostaciclina (PGI₂). Além disso, inibidores de fatores de coagulação como moléculas semelhantes à heparina (HEP), que servem como cofator para a antitrombina III, bem como inibidores da via do fator tecidual (TFPI) e trombomodulina (TM) também são liberados (Kazmi; Boyce.; Lwaleed, 2015; Neubauer; Zieger, 2021). Entretanto, frente a uma lesão vascular, as CEs podem

produzir fatores que induzem e modulam a função plaquetária, o processo de coagulação e a fibrinólise (Neubauer; Zieger, 2021).

1.4 Hemostasia primária

A hemostasia primária tem início quando a integridade vascular é prejudicada e abrange a vasoconstrição, adesão, ativação, secreção e agregação plaquetária, conforme ilustra a **Figura 2** (Austin, 2017). A vasoconstrição retarda o extravasamento sanguíneo e diminui o fluxo no local lesionado (Dorgalaleh *et al.*, 2018). Ela é produzida por meio do sistema nervoso simpático em resposta ao dano vascular e à liberação de endotelina-1 das CEs e plaquetas (Dorgalaleh *et al.*, 2018).

Fisiologicamente, as plaquetas são expostas às altas forças de cisalhamento da parede do vaso, produzindo breves contatos com as células endoteliais (Austin, 2017; Qiao *et al.*, 2018). Quando o endotélio é rompido, essa velocidade de rolamento é diminuída a fim de facilitar a adesão plaquetária, que por sua vez é mediada por receptores de glicoproteína VI (GPVI) e GPIb-IX-V através do reconhecimento do FvW e do colágeno (Austin, 2017; Qiao *et al.*, 2018).

De modo geral, as plaquetas são ativadas à medida que se aderem a matriz subendotelial, levando à ativação das CEs, expressão e secreção de quimiocinas e mudança conformacional plaquetária (Austin, 2017). Diferentes agonistas ligam-se a receptores específicos presentes na membrana plaquetária, causando ativação plaquetária mediada pela proteína G (Sira; Eyre, 2016) e monofosfato de adenosina cíclico (cAMP), que diminui após a ativação de plaquetas, aumentando assim a mobilização de cálcio (Austin, 2017).

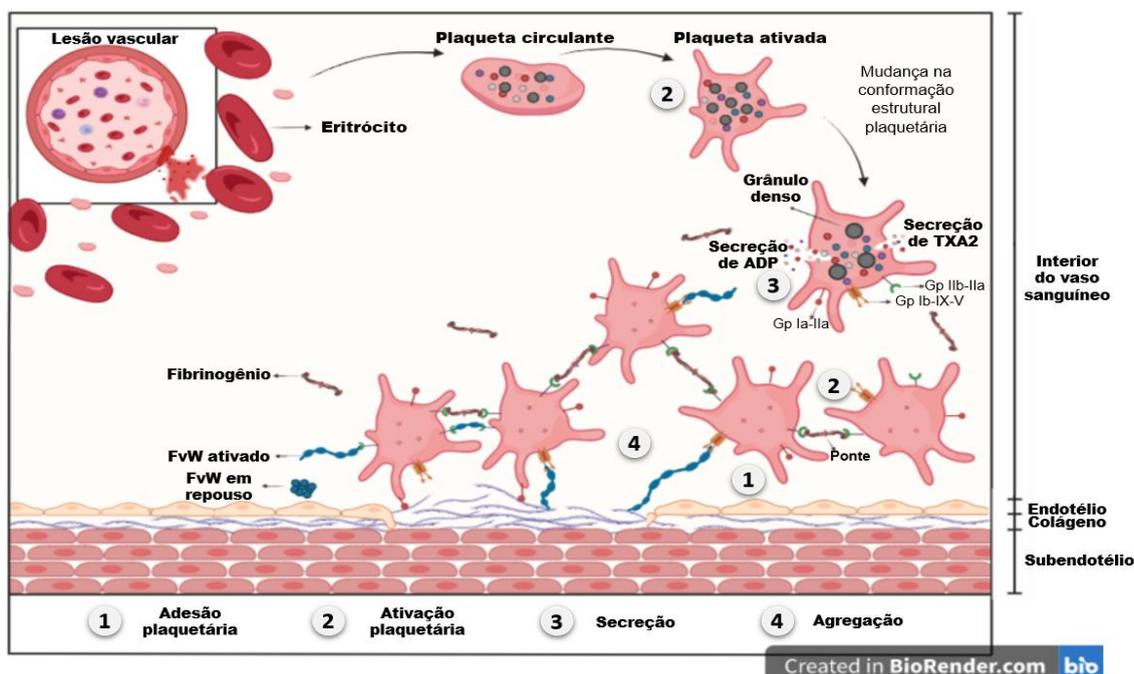
Entre os principais agonistas plaquetários estão o ADP, epinefrina, trombina, tromboxano A2 (TXA2) e colágeno (Dorgalaleh *et al.*, 2018; Zaidi; Green, 2019). A liberação de ADP e TXA2 leva à ativação dos receptores purinérgicos P2Y12 e P2Y1, e do receptor de TXA2 (TP) (Van der Meijden; Heemskerk, 2019). P2Y12 e P2Y1 são receptores acoplados à proteína G, ambos são ativados pelo ADP e inibidos pelo ATP (Koupenova; Ravid, 2018). O primeiro leva à inibição da adenilil ciclase, que medeia a conversão de ATP em cAMP, além disso, ativa a fosfatidilinositol 3-quinase (PI 3-K) (Koupenova; Ravid, 2018). Tais mecanismos promovem a ativação e amplificação da agregação plaquetária, assim como a formação estável de

trombos (Koupenova; Ravid, 2018). Por outro lado, o P2Y1 e o TP estimulam a fosfolipase C (PLC) e a ativação da proteína quinase C (PKC) (Van der Meijden; Heemskerk, 2019), o que resulta no aumento do cálcio intracelular, alteração conformacional plaquetária e agregação reversível (Cattaneo, 2019).

A epinefrina é outro importante mediador da ativação e agregação plaquetária, atuando sinergicamente com outros agonistas plaquetários (Martin *et al.*, 2020). Além disso, a ligação da epinefrina ao receptor adrenérgico (α 2A), exposto na membrana plaquetária, contribui para a diminuição da concentração de cAMP e ativação de PI 3-K (Martin *et al.*, 2020).

A medida que as plaquetas se tornam ativas liberam diferentes constituintes de seus grânulos (secreção), como o TXA2, ADP, proteínas adesivas e de coagulação, que recrutam e ativam outras plaquetas circulantes (Bye; Unsworth; Gibbins, 2016). Por fim, as interações entre plaquetas e com o subendotélio via receptores, agonistas, colágeno, FvW e outros, levam à agregação e formação do tampão plaquetário inicial, que se consolidará durante o processo de coagulação sanguínea (Vayne; Guel; Pouplard, 2021).

Figura 2. Representação ilustrativa das etapas da Hemostasia Primária



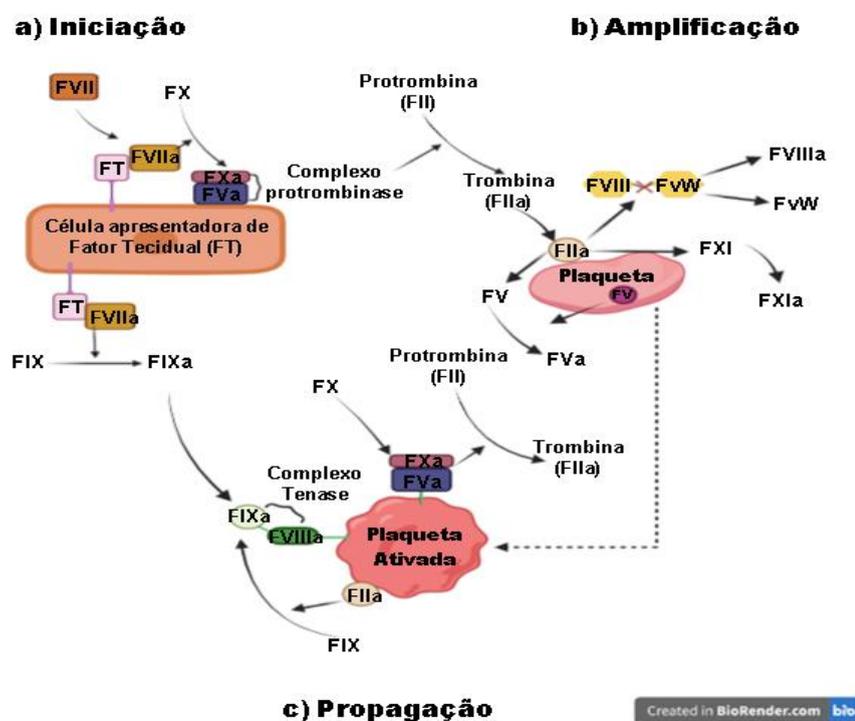
Fonte: Adaptado de Vayne, Guel e Pouplard (2021) – Criado com BioRender.

1.5 Hemostasia secundária

Davie, Ratnoff e MacFarlane (1964) propuseram inicialmente que a coagulação sanguínea poderia ser mediada por um modelo de cascata de coagulação, onde uma enzima ativa outra sucessivamente até que o substrato final (fibrinogênio, que posteriormente é convertido em fibrina) seja alcançado. Esse conceito funcionou muito bem *in vitro*, o que permitiu o desenvolvimento de inúmeros testes de coagulação utilizados até os dias atuais (Gil, 2019).

Enquanto o modelo de cascata considera duas vias principais e independentes, a via intrínseca e a extrínseca, que posteriormente se fundem em uma via comum, o modelo atual, denominado de “modelo celular de coagulação” representa o mecanismo *in vivo*, onde as vias de coagulação são integradas, podendo ser divididas em três estágios que enfatizam a interação de fatores plasmáticos com superfícies celulares específicas, são eles: iniciação, amplificação e propagação, conforme mostra a **Figura 3** (Austin, 2017; Gil, 2019).

Figura 3. Modelo celular de coagulação



Fonte: Adaptado de Hoffman, 2003 – Criado com BioRender.

A fase de iniciação, está resumidamente ilustrada na **Figura 3a**. Essa etapa ocorre na superfície de células que expressam a proteína transmembrânica FT (fator tecidual) na corrente sanguínea por meio de células musculares lisas e fibroblastos (Versteeg *et al.*, 2013). O FT age como receptor para o fator VII, promovendo a proteólise e ativação do mesmo, formando o complexo FVIIa/FT, que por sua vez ativa os fatores X e IX, transformando-os em FXa e FIXa, respectivamente (Versteeg *et al.*, 2013). O FXa associa-se ao cofator FVa para formar o complexo protrombinase, esse complexo converte protrombina (fator II) em trombina (Dorgalaleh *et al.*, 2018; Mussbacher *et al.*, 2019).

Durante a fase de amplificação, a trombina gerada interage com as plaquetas e com o complexo FVIII/FvW, resultando no aumento da adesão no local de lesão e na formação estável de fibrina (Gil, 2019). A trombina formada na primeira fase participa ainda da ativação dos cofatores FV e FVIII na superfície plaquetária, o FvW pode então se desassociar do FVIII para realizar a mediação de uma maior adesão e agregação plaquetária, o FXI também é ativado (FXIa) por meio da trombina (**Figura 3b**), e por fim, simultaneamente todos esses fatores são recrutados por fatores quimiotáticos à superfície plaquetária, onde se iniciará a fase de propagação (Hoffman, 2003).

A fase de propagação, ilustrada na **Figura 3c**, ocorre em superfícies como as de plaquetas ativas, pois apresentam fosfolípidios pró-coagulantes em sua composição (Versteeg *et al.*, 2013). O fator IXa (ativado na fase de iniciação) liga-se ao FVIIIa (desassociado do FvW na fase de amplificação) presente na superfície das plaquetas, formando assim o complexo tenase (FIXa/FVIIIa), que auxilia na rápida ativação de FX (Gil, 2019). O FXa associa-se ao fator Va (ligado à plaqueta na fase de amplificação), o que resulta na formação do complexo protrombinase (FXa/FVa) (Gil, 2019). Nessa fase há um grande recrutamento de plaquetas, formação de complexos tenase e protrombinase, e consequentemente conversão de grandes quantidades de protrombina em trombina (Hoffman, 2003). A trombina é responsável por clivar o fibrinogênio em fibrina consolidando assim o tampão plaquetário e a formação de um coágulo estável (Mussbacher *et al.*, 2019).

1.6 Controle do processo de coagulação e fibrinólise

Uma vez formado, o coágulo de fibrina deve se limitar ao sítio de lesão (Dorgalaleh *et al.*, 2019). Nesse processo, quatro anticoagulantes naturais controlam a ativação e formação do coágulo: o inibidor da via do fator tecidual (TFPI), a proteína C (PC), proteína S (PS) e a antitrombina (AT) (Dorgalaleh *et al.*, 2019). O primeiro é um anticoagulante multifuncional que atua principalmente nos estágios iniciais da cascata de coagulação e é responsável por impedir a geração de trombina por meio da formação do complexo FT/FVIIa/FXa/TFPI (Mast; Ruf, 2022).

A trombomodulina (TM) é um receptor de trombina presente na membrana de células endoteliais, e a ligação entre trombina e TM ativa a proteína C, que forma um complexo com a proteína S (Neubauer; Zieger, 2022). A PS atua como cofator para a PC, que uma vez ligadas e ativadas, regulam a coagulação sanguínea principalmente pela inativação dos fatores Va e VIIIa (Neubauer; Zieger, 2022).

A ativação da PC pode estimular o processo de fibrinólise, pois está envolvida na inativação do inibidor do ativador de plasminogênio-1 (PAI-1) (Neubauer; Zieger, 2022). Por outro lado, o complexo formado por trombina e TM pode ativar o inibidor de fibrinólise ativado pela trombina (TAFI) e catalisar a inativação da pró-uroquinase, reduzindo assim o processo de fibrinólise (Chapin; Hajjar, 2015).

Por fim, a antitrombina, uma serpina (inibidor de serina proteases), está entre os principais inibidores de trombina, possuindo também uma forte afinidade pelos fatores IXa e Xa, realizando sua inativação (Rezaie; Giri, 2020; Versteeg *et al.*, 2013). A presença de heparina ativa conformacionalmente a AT e aumenta o seu potencial de ação, pois se liga à antitrombina, ao FIXa e ao FXa (Rezaie; Giri, 2020; Versteeg *et al.*, 2013). No entanto, essa alteração não aumenta a inibição de trombina, para isso, é necessário a ligação a uma heparina de alto peso molecular (Rezaie; Giri, 2020; Versteeg *et al.*, 2013).

1.7 Fibrinólise ou hemostasia terciária

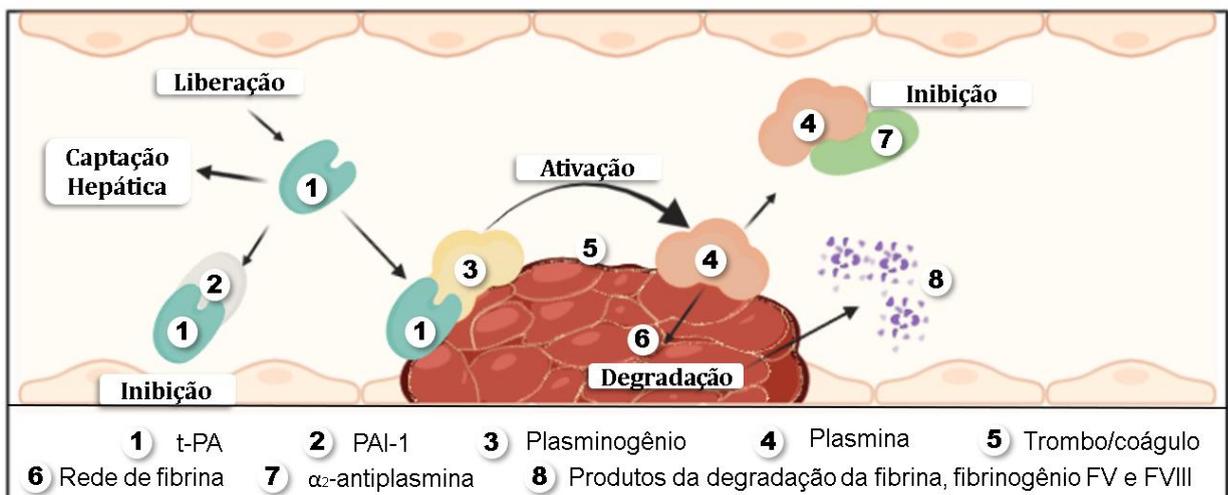
O processo de fibrinólise é responsável pela regulação e regressão da formação de coágulos sanguíneos (Sira; Eyre, 2016). Para restaurar o fluxo sanguíneo, os coágulos de fibrina precisam ser degradados, o que envolve a

ativação de enzimas proteolíticas por ativadores de plasminogênio, como o ativador de plasminogênio do tipo tecidual e uroquinase (t-PA e u-PA, respectivamente) (Zaidi; Green, 2019).

Dessa forma, o plasminogênio circulante adere ao coágulo e é convertido em plasmina pelo t-PA (Neubauer; Zieger, 2022). A plasmina degrada diversas proteínas, incluindo o fibrinogênio, fibrina e fator V, e é responsável pela clivagem dos resíduos de arginina e lisina da fibrina, e então os produtos dessa degradação podem ser eliminados da circulação (Mutch *et al.*, 2019). Por outro lado, a fibrina atua como o principal substrato para plasmina, facilitando a ligação entre t-PA e a plasmina, aumentando assim o potencial de fibrinólise (Mutch *et al.*, 2019).

A fibrinólise é principalmente regulada pela ação PAI-1, que inibe o t-PA, o u-PA e controla a formação de plasmina, e pelo TAFI, que remove os resíduos de lisina C-terminal da fibrina degradada, reduzindo assim a ligação do plasminogênio à fibrina (**Figura 4**) (Miszta *et al.*, 2021; Mutch *et al.*, 2019).

Figura 4. Representação do processo fibrinolítico.



Fonte: A autora, 2022 – Criado com BioRender.

2. ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO E FORMAÇÃO ANORMAL DE TROMBOS

As espécies reativas de oxigênio (EROs) são produzidas em resposta a estímulos endógenos ou exógenos (Halliwell; Gutteridge, 2015; Qiao *et al.*, 2018). No processo de hemostasia, as EROs participam da regulação da função plaquetária, desempenham papéis na vasorregulação e potencializando a agregação plaquetária (Halliwell; Gutteridge, 2015; Qiao *et al.*, 2018).

Quando aderidas ao subendotélio as plaquetas produzem EROs principalmente pela via de NADPH oxidase (Carrim *et al.*, 2015). O peroxinitrito (ONOO*), formado entre a reação de superóxido ($O_2^{\cdot-}$) e o NO exercem efeitos pró e antiplaquetários (Fuentes; Palomo, 2016). A agregação induzida pelo colágeno está associada à liberação de peróxido de hidrogênio (H_2O_2), que atua como mensageiro para a metabolização do ácido araquidônico e para a via da fosfolipase C (Fuentes; Palomo, 2016).

Por outro lado, a produção desordenada de EROs e deficiências nos níveis de antioxidantes estão associadas à neurodegeneração, aterosclerose, diabetes e ao envelhecimento (Halliwell; Gutteridge, 2015; Qiao *et al.*, 2018). O estresse oxidativo regula negativamente a via de NO, causa disfunção endotelial, danifica o revestimento celular, prejudica a vasodilatação, leva à adesão anormal de eritrócitos e, quando associado à lesão endotelial, promove a expressão de FT, permitindo assim a iniciação da cascata de coagulação (Wang; Zennadi, 2020). Ainda, alterações quantitativas ou qualitativas nas plaquetas, fatores de coagulação, secreção e interações plaquetárias podem gerar graves consequências, levando à formação anormal de trombos ou hemorragias (de Norme; Vanhoorelbeke; de Meyer, 2019; Lasne; Jude; Susen, 2006; Veninga *et al.*, 2020).

A formação de trombos está associada a três fatores que juntos originam a tríade de Virchow, são eles: a lesão endotelial, o fluxo sanguíneo anormal e a hipercoagulabilidade (Gonzalez-Gonzalez; Ziccardi; Mccauley, 2021). A lesão endotelial é associada à presença de toxinas, hipertensão, idade avançada, trauma, cirurgias e cateteres venosos (Albricker *et al.*, 2022). O fluxo sanguíneo anormal é caracterizado por estase ou turbulência devido a aneurismas, placas ateroscleróticas, gravidez, imobilização e insuficiência cardíaca congestiva

(Albricker *et al.*, 2022). Por fim, a hipercoagulabilidade está relacionada à ativação da cascata de coagulação, aumento da atividade plaquetária e comprometimento do processo de fibrinólise (Ding; Gupta; Lip, 2020).

O desenvolvimento desordenado de trombos pode levar ao aparecimento de trombose, que é a patologia subjacente mais comum entre as três principais doenças cardiovasculares: doença cardíaca isquêmica, acidente vascular cerebral e tromboembolismo venoso (TEV) (Raskob *et al.*, 2014). O TEV inclui a trombose venosa profunda (TVP) e embolia pulmonar (EP) (Albricker *et al.*, 2022). A TVP é uma patologia comum e potencialmente fatal, sua principal complicação é a embolia pulmonar, que pode ocorrer em pacientes internados, ambulatoriais e com sintomas inespecíficos, razão pela qual o diagnóstico apresenta baixa sensibilidade e especificidade (Albricker *et al.*, 2022). Esses fatores aliados às diferentes dificuldades no tratamento tornam a trombose uma das principais causadoras de morbidade e mortalidade a nível mundial (Chan; Sobieraj-Teague; Eikelboom, 2020; Wendelboe *et al.*, 2016).

3. ANTIAGREGANTES E ANTICOAGULANTES

Os fármacos antitrombóticos incluem os anticoagulantes, agentes plaquetários e trombolíticos diretos e são utilizados no tratamento e prevenção de eventos trombóticos a curto e longo prazo (Melnikova, 2009). Nos primórdios da terapia antitrombótica, inúmeros medicamentos como a heparina e o ácido acetilsalicílico (AAS) foram utilizados antes mesmo que seu mecanismo de ação fosse desvendado (Hirsh; Eikelboom; Chan; Sobieraj-Teague; Eikelboom, 2020). Apesar disso, a descoberta dos medicamentos antitrombóticos transformou o tratamento de doenças cardiovasculares, sendo considerado um marco para o tratamento de TEV (Chan; Sobieraj-Teague; Eikelboom, 2020).

As heparinas ligam-se à antitrombina, o que aumenta sua capacidade de inibir a trombina e o fator Xa (Levy; Connors, 2021). Contudo, a resistência e a necessidade de doses elevadas para alcançar níveis adequados de anticoagulação são os principais desafios associados a esse medicamento (Levy; Connors, 2021). Outra classe importante de anticoagulantes são os antagonistas de vitamina K, sendo a Varfarina o mais utilizado, tendo como mecanismos de ação a inibição da síntese hepática de fatores de coagulação, como o FII, FVII, FIX e FX, e das proteínas C e S (Dornbos; Nimjee, 2018; Melnikova, 2009). A Varfarina foi por anos o único agente biodisponível de alta eficácia administrado por via oral, porém, os efeitos colaterais associados a esse fármaco podem ser graves, incluindo sangramentos significativos e, em casos mais extremos, fatais (Dornbos; Nimjee, 2018; Melnikova, 2009).

Embora eficazes, os antitrombóticos podem apresentar inúmeras características indesejáveis que dificultam e limitam o tratamento, como interações e resistência medicamentosa (Chan; Sobieraj-Teague; Eikelboom, 2020; Levy; Connors, 2021), interferências nutricionais e uma estreita janela terapêutica (Chan; Sobieraj-Teague; Eikelboom, 2020; Melnikova *et al.*, 2009). Os avanços na área farmacêutica e a necessidade de se obter novas terapias impulsionaram as pesquisas no campo da anticoagulação na última década, permitindo assim o surgimento dos anticoagulantes orais diretos (DOACs) (Milling; Truman.; Ziebell, 2020).

Os DOACs atuam sobre as proteínas de coagulação e são projetados para

minimizar as interações com alimentos e medicamentos, possuindo doses fixas e eliminando a necessidade de monitoramento de coagulação de rotina (Chan; Sobieraj-Teague; Eikelboom, 2020). O Dabigatrano, que é um inibidor seletivo de fator IIa, e os inibidores de Fator Xa, como Rivaroxabana, Apixabana e Edoxabano, são os principais DOACs utilizados no tratamento de eventos trombóticos (Bertoletti *et al.*, 2017).

Apesar das vantagens oferecidas pelos DOACs ainda há um número limitado de antitombóticos aprovados e a necessidade de busca por novos compostos com potencial terapêutico e capacidade de superar as complicações causadas, com propriedades que reduzam a necessidade de terapia conjunta e permitam tratamentos que atendam às especificidades de cada paciente (Lamponi, 2021; Streiff *et al.*, 2016).

4. BIOTECNOLOGIA E O DESENVOLVIMENTO DE PRODUTOS NATURAIS

Embora o termo "biotecnologia" tenha sido utilizado pela primeira vez em 1919 pelo engenheiro húngaro Karl Eriky, existem relatos de que processos biotecnológicos foram utilizados desde a antiguidade, como a fermentação produzida por microrganismos para a fabricação de bebidas alcoólicas, queijos e pães (Gupta *et al.*, 2017). Atualmente, a biotecnologia desempenha um papel crucial no desenvolvimento de produtos e processos científicos e tecnológicos, utilizando sistemas biológicos e seus derivados, tendo aplicações nas áreas da ciência humana, animal (Gupta *et al.*, 2017) e vegetal (Anjanappa; Gruissem, 2021).

Na biotecnologia vegetal os produtos naturais (PNs) derivados de bactérias, fungos, plantas e organismos marinhos abrangem uma gama de compostos com ampla atividade biológica (Katz; Baltz, 2016). O uso de PNs é citado historicamente na forma de medicamentos tradicionais, poções e óleos, como os óleos de *Cupressus sempervirens* (Cipreste) e *Commiphora espécies* (mirra) documentados na Mesopotâmia em 2.600 a.C., que ainda são utilizados no tratamento de tosse, resfriados e inflamações (Dias; Urban; Roessner, 2012). O Papiro de Ebers, datado de 2.900 a.C., descreve 700 medicamentos à base de plantas no Egito, enquanto a medicina chinesa registrou diversas prescrições de produtos naturais ao longo dos séculos, como os registos de Wu Shi Er Bing Fang, Shennong Herbal e Tang Herbal. Ainda, os registros do médico grego Dioscórides no século I d.C. incluem a coleta e uso de plantas medicinais (Dias; Urban; Roessner, 2012).

Após a descoberta da estreptomicina na década de 1940, as empresas farmacêuticas, especialmente nos Estados Unidos, Europa e Japão, intensificaram seus esforços para desenvolver produtos a partir de PNs (Katz; Baltz, 2016). No Brasil, o desenvolvimento da fitoterapia teve origem na combinação do conhecimento e uso de plantas medicinais pelos povos indígenas com o conhecimento trazido pelos colonizadores, assim como com as plantas introduzidas pelos povos africanos escravizados, que as utilizavam em rituais religiosos e como forma de tratamento farmacológico (Santana *et al.*, 2018).

Exemplos importantes de plantas medicinais são a *Ilex paraguariensis* (mate), *Myroxylon balsamum* (bálsamo de Tolu), *Paullinia cupana* (guaraná), *Psidium guajava* (guava), *Spilanthes acmella* (jambú), *Tabebuia sp.* (lapacho), *Uncaria*

tomentosa (unha-de-gato), *Copaifera sp.*(copaíba) (Brasil, 2012). Apesar do Brasil deter a maior biodiversidade do mundo, estimada em mais de 2 milhões de espécies distintas de plantas, animais e microrganismos, o uso de plantas como matéria-prima biotecnológica para o desenvolvimento de novos medicamentos ainda é minimamente explorado (Brasil, 2012).

Em suma, a biotecnologia desempenha um papel significativo no desenvolvimento e melhoramento de PNs. Além disso, os PNs são empregados na alimentação, dentre eles destacam-se os óleos vegetais, que hoje representam uma crescente demanda mundial, impulsionando assim o emprego de bases biotecnológicas desde a produção de sementes até técnicas de extração, processamento e melhoramento nutricional (Msanne; Kim; Cahoon, 2020).

4.1 *Acrocomia aculeata* (Jacq) Lodd. x Mart

O gênero *Acrocomia* pertence à família *Aracaceae* e é composto por palmeiras espinhosas com morfologia diversificada e produção abundante de frutos (de Lima *et al.*, 2018). A espécie *A. aculeata*, uma planta oleaginosa e monóica, foi inicialmente descrita por Jacquin em 1763 (de Lima *et al.*, 2018). Nativa de florestas tropicais, a *A. aculeata* é uma palmeira com maior incidência na América do Sul, especialmente no sudeste do Brasil (Borges *et al.*, 2021). Sua ampla distribuição geográfica faz com que a planta tenha diferentes denominações dependendo do país ou região em que se encontra, sendo comumente conhecida como ucajá, bocaiúva, coco espinho e macaúba (de Lima *et al.*, 2018; de Souza *et al.*, 2020).

A *A. aculeata* pode atingir até 15 metros de altura e 20-30 centímetros de diâmetro (**Figura 5A**), possuindo raízes subterrâneas ou aéreas (da Silva César *et al.*, 2015; de Souza *et al.*, 2020). A frutificação ocorre durante todo o ano, e os frutos tornam-se maduros entre 12-13 meses após a fertilização (**Figura 5B e C**) (Colombo *et al.*, 2018). As folhas dispostas em diferentes planos apresentam aspecto plumoso, são pinadas curtas ou longas e as inflorescências são monóicas (**Figura 5A, D e E**) (da Silva César *et al.*, 2015; de Souza *et al.*, 2020).

Figura 5. Características da *Acrocomia aculeata*



A) Planta adulta. **B)** Cacho com frutos maduros. **C)** Detalhe do fruto e mesocarpo. **D)** Inflorescência aberta. **E)** Detalhes da inflorescência monóica. **Fonte:** Colombo *et al.*, 2018.

Os frutos maduros são globulares, compostos por um epicarpo (casca) espesso, um mesocarpo (polpa) mucilaginoso e fibroso de coloração amarelo/alaranjado (Mazzottini-dos-Santos *et al.*, 2015; de Souza *et al.*, 2020). As sementes circundadas por um pirênio espesso são rígidas e brancas, e seu endosperma envolve o embrião para posterior processo de germinação (Mazzottini-dos-Santos *et al.*, 2015).

Tradicionalmente, a polpa de bocaiúva é consumida *in natura* ou na forma de doces, sorvetes e farinhas (de Souza *et al.*, 2020). Além disso, é conhecida por seus efeitos contra infecções respiratórias e é frequentemente utilizada pela comunidade como laxante (Colombo *et al.*, 2018). Além de seu valor medicinal e alimentar, a polpa também desempenha um importante papel econômico na indústria de cosméticos e na produção de energia (Arena *et al.*, 2018).

A diversidade de produtos que podem ser obtidos a partir da bocaiúva, sua alta plasticidade em relação às condições ambientais, incluindo a breve tolerância ao congelamento (-5 °C), fogo e seca, juntamente com sua capacidade de

armazenamento estável, permitindo a descentralização do armazenamento e da produção, além do potencial mercado local e internacional existente, tornam-na promissora para uma expansão econômica sustentável (Poetsch *et al.*, 2012). A produção de derivados de *A. aculeata* permite ainda que pequenos produtores diversifiquem suas fontes de renda, tendo ainda capacidade de integrar o portfólio global de óleos vegetais (Poetsch *et al.*, 2012).

4.2 Óleo da polpa de Bocaiúva

Nas últimas décadas, os óleos vegetais vêm substituindo os de origem animal na alimentação, exemplos comuns incluem o óleo de oliva, de palma, de soja, de coco, girassol e de canola (Costa *et al.*, 2020). À medida que aumenta a ingestão desses óleos na dieta, pesquisas acerca de seus benefícios na prevenção e tratamento de doenças também tem se intensificado (Costa *et al.*, 2020). Um exemplo é o azeite de oliva, onde pode ser observado em sua composição a presença de antioxidantes e ácidos graxos (Costa *et al.*, 2020).

O óleo extraído da polpa da *A. aculeata* (OPAA) é caracterizado por sua riqueza em ácidos graxos, com destaque para o ácido oleico, seguido pelos ácidos palmítico e linoleico, bem como β -carotenos e α -tocoferol, que possuem propriedades antioxidantes, capazes de diminuir ou inibir o estresse oxidativo e a peroxidação lipídica (Arena *et al.*, 2018; Colombo *et al.*, 2018). Nunes e colaboradores (2018) observaram o efeito do óleo de semente de *A. aculeata* sobre ratos com diabetes tipo 2, onde os animais que receberam em sua dieta diferentes concentrações do óleo apresentaram efeito hipoglicemiante, redução do ganho de peso e baixa deposição de AGCM (ácidos graxos de cadeia média) no tecido adiposo epididimal (Nunes *et al.*, 2018).

Silva e colaboradores (2019) constataram a redução significativa nos níveis de glicose no sangue em todas as concentrações de OPAA administradas em ratos normoglicêmicos e com diabetes induzida por estreptozotocina, sendo a menor concentração (3 mg/kg) a de maior potencial hipoglicemiante. Além disso, os ensaios de citotoxicidade não mostraram redução na viabilidade das células epiteliais renais com concentrações de até 500 μ g/mL (Silva *et al.*, 2019). Já Lescano e colaboradores (2015) relatou efeitos diurético e anti-inflamatório do OPAA *in natura* e

microencapsulado em ratos Wistar, com efeitos não apenas antiedematogênico e aumento significativo na excreção urinária, mas também na inibição da migração de leucócitos e o extravasamento plasmático (Lescano *et al.*, 2015).

Foi observado recentemente que o óleo da polpa de bocaiúva possui uma maior capacidade antioxidante total em camundongos alimentados com uma dieta rica em gorduras (Sant'ana *et al.*, 2023). Além disso, Jacobowski e colaboradores (2021) relataram que um modelo animal colocado sob estresse crônico apresenta déficit na atividade locomotora, aumento no comportamento semelhante à ansiedade, bem como a supressão do comportamento exploratório, dano oxidativo, aumento na peroxidação lipídica e depleção do conteúdo de glutathiona reduzida (GSH) (Jacobowski *et al.*, 2021). Entretanto, o tratamento com OPAA *in natura* e microencapsulado apresentou efeitos neuroprotetores, diminuindo a atividade da catalase (CAT) em todas as frações do cérebro, redução do peso corporal, diminuição na carbonilação de proteínas no hipocampo e atenuação de alterações no córtex, hipocampo e corpo estriado (Jacobowski *et al.*, 2021).

Além desses, diversos estudos tratam do efeito do OPAA principalmente na sua capacidade de controlar o estado redox (Arena *et al.*, 2018; Monteiro-Alfredo *et al.*, 2021). Apesar disso, a literatura carece de investigações que forneçam dados sobre sua atividade antitrombótica, uma vez que foram encontrados apenas estudos em outras espécies da mesma família (Azevedo *et al.*, 2007; Fuentes *et al.*, 2013). Ainda, a necessidade de novos antitrombóticos, o valor agregado à PNs e o potencial descrito do OPAA sustentam a hipótese de sua possível atividade como antiplaquetário natural, abrindo assim caminhos para novos estudos no campo de agentes antitrombóticos.

5. REFERÊNCIAS

ALBRICKER, A. C. L. *et al.* Diretriz Conjunta sobre Tromboembolismo Venoso–2022. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 118, p. 797-857, 2022.

ANJANAPPA, R. B.; GRUISSEM, W. Current progress and challenges in crop genetic transformation. **Journal of Plant Physiology**, v. 261, p. 153411, 2021.

ANNICHINO-BIZZACCHI, J. M.; DE PAULA, E. V. Blood Coagulation and Endothelium. In: **Endothelium and Cardiovascular Diseases**. Academic Press, 2018. p. 147-152.

ARENA, A. C. *et al.* *Acrocomia aculeata* oil: Beneficial effects on cyclophosphamide-induced reproductive toxicity in male rats. **Andrologia**, v. 50, n. 6, p. e13028, 2018.

AUSTIN, S. K. Haemostasis. **Medicine**, v. 45, n. 4, p. 204-208, 2017.

AZEVEDO A. P. S. *et al.* Anti-thrombotic effect of chronic oral treatment with *Orbignya phalerata* Mart. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 111, n. 1, p. 155-159, 2007.

BERTOLETTI, L. *et al.* Direct oral anticoagulants: current indications and unmet needs in the treatment of venous thromboembolism. **Pharmacological research**, v. 118, p. 33-42, 2017.

BORGES, C. E. *et al.* Distribution and future projection of potential cultivation areas for *Acrocomia aculeata* (Arecaceae) worldwide: the emerging energy culture of the tropics. **Theoretical and Applied Climatology**, v. 146, p. 1069-1078, 2021.

BRASIL; MINISTÉRIO DA SAÚDE. Práticas Integrativas e Complementares. Plantas Medicinais e Fitoterapia na Atenção Básica. **Normas e Manuais Técnicos–Caderno de Atenção Básica**, 2012.

BYE, A. P.; UNSWORTH, A. J.; GIBBINS, J. M. Platelet signaling: a complex interplay between inhibitory and activatory networks. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, v. 14, n. 5, p. 918-930, 2016.

CAPRINI, J. A. Risk assessment as a guide for the prevention of the many faces of venous thromboembolism. **The American Journal of Surgery**, 2010, 199.1: S3-S10.

CARRIM, N. *et al.* Thrombin-induced reactive oxygen species generation in platelets: A novel role for protease-activated receptor 4 and GPIIb/IIIa. **Redox biology**, 2015, 6: 640-647.

CATTANEO, M. The platelet P2 receptors. In: **Platelets**. Academic press, 2019. p. 259-277.

CHAN, N.; SOBIERAJ-TEAGUE, M.; EIKELBOOM, J. W. Direct oral anticoagulants: evidence and unresolved issues. **The Lancet**, v. 396, n. 10264, p. 1767-1776, 2020.

CHAPIN, J. C.; HAJJAR, K. A. Fibrinolysis and the control of blood coagulation. **Blood reviews**, v. 29, n. 1, p. 17-24, 2015.

CID-PÉREZ, T. S. *et al.* Antioxidant and antimicrobial activity of Mexican oregano (*Poliomintha longiflora*) essential oil, hydrosol and extracts from waste solid residues. **Plants**, v. 8, n. 1, p. 22, 2019.

COLOMBO, C. A. *et al.* Macauba: a promising tropical palm for the production of vegetable oil. **OCL**, v. 25, n. 1, p. D108, 2018.

COSTA, G. L. A. *et al.* Phytochemical profile, anti-inflammatory, antimutagenic and antioxidant properties of *Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd. pulp oil. **Food Science and Technology**, v. 40, p. 963-971, 2020.

DAVIE, E. W.; RATNOFF, O. D. Waterfall sequence for intrinsic blood clotting. **Science**, v. 145, n. 3638, p. 1310-1312, 1964.

DA SILVA CÉSAR, A. *et al.* The prospects of using *Acrocomia aculeata* (macaúba) a non-edible biodiesel feedstock in Brazil. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 49, p. 1213-1220, 2015.

DIAS, D. A.; URBAN, S.; ROESSNER, U. A historical overview of natural products in drug discovery. **Metabolites**, v. 2, n. 2, p. 303-336, 2012.

DING, W. Y.; GUPTA, D.; LIP, G. Y. H. Atrial fibrillation and the prothrombotic state: revisiting Virchow's triad in 2020. **Heart**, v. 106, n. 19, p. 1463-1468, 2020.

DE LIMA, N. E. *et al.* A review of the palm genus *Acrocomia*: Neotropical green gold. **Organisms Diversity & Evolution**, v. 18, p. 151-161, 2018.

DE NORME, F.; VANHOORELBEKE, K.; DE MEYER, S. F. von Willebrand factor and platelet glycoprotein Ib: a thromboinflammatory axis in stroke. **Frontiers in immunology**, v. 10, p. 2884, 2019.

DORGALALEH, A. *et al.* An overview of hemostasis. **Congenital Bleeding Disorders: Diagnosis and Management**, p. 3-26, 2018.

DORNBOS, D.; NIMJEE, S. M. Reversal of systemic anticoagulants and antiplatelet therapeutics. **Neurosurgery Clinics**, 2018, 29.4: 537-545.

DE SOUZA, F. G. *et al.* Brazilian fruits of *Arecaceae* family: An overview of some representatives with promising food, therapeutic and industrial applications. **Food Research International**, v. 138, p. 109690, 2020.

FUENTES, E. *et al.* *Mauritia flexuosa* presents *in vitro* and *in vivo* antiplatelet and antithrombotic Activities. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2013, p. 1-11, 2013.

FUENTES, E.; PALOMO, I. Role of oxidative stress on platelet hyperreactivity during aging. **Life sciences**, 2016, 148: 17-23.

GIL, M. R. Overview of the coagulation system. In: **Transfusion Medicine and Hemostasis**. Elsevier, 2019. p. 559-564.

GONZALEZ-GONZALEZ, F. J.; ZICCARDI, M. R.; MCCAULEY, M. D. Virchow's triad and the role of thrombosis in COVID-related stroke. **Frontiers in Physiology**, 2021, 12.

GUPTA, V. *et al.* An Introduction to Biotechnology. In: Basic and Applied Aspects of Biotechnology. **Springer**, Singapore, 2017.

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

HEIJNEN, H. F. G.; KORPORAAL, S. J. A. Platelet morphology and ultrastructure. **Platelets in Thrombotic and Non-Thrombotic Disorders: Pathophysiology, Pharmacology and Therapeutics: An Update**, p. 21-37, 2017.

HIRSH, J.; EIKELBOOM, J. W.; CHAN, N. C. Fifty years of research on antithrombotic therapy: Achievements and disappointments. **European Journal of Internal Medicine**, v. 70, p. 1-7, 2019.

HOFFMAN, M. Remodeling the blood coagulation cascade. **Journal of thrombosis and thrombolysis**, v. 16, n. 1, p. 17-20, 2003.

JACOBOWSKI, A. C. *et al.* Neuroprotective Effects of *Acrocomia aculeata* Pulp Oil Microcapsules on Rats Subjected to Chronic Stress. **Journal of Medicinal Food**, v. 24, n. 10, p. 1068-1075, 2021.

KATZ, L.; BALTZ, R. H. Natural product discovery: past, present, and future. **Journal**

of **Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 43, n. 2-3, p. 155-176, 2016.

KAZMI, R. S.; BOYCE, S.; LWALEED, B. A. Homeostasis of hemostasis: the role of endothelium. In: **Seminars in thrombosis and hemostasis**. Thieme Medical Publishers, 2015. p. 549-555.

KOUPENOVA, M.; RAVID, K. Biology of platelet purinergic receptors and implications for platelet heterogeneity. **Frontiers in Pharmacology**, v. 9, p. 37, 2018.

LAMPONI, S. Bioactive natural compounds with antiplatelet and anticoagulant activity and their potential role in the treatment of thrombotic disorders. **Life**, v. 11, n. 10, p. 1095, 2021.

LASNE, D.; JUDE, B.; SUSEN, S. From normal to pathological hemostasis. **Canadian journal of anaesthesia**, v. 53, n. 6 Suppl, p. S2-11, 2006.

LESCANO, C. H. *et al.* Diuretic and anti-inflammatory activities of the microencapsulated *Acrocomia aculeata* (Arecaceae) oil on Wistar rats. **Journal of medicinal food**, v. 18, n. 6, p. 656-662, 2015.

LEVY, J. H.; CONNORS, J. M. Heparin resistance—clinical perspectives and management strategies. **New England Journal of Medicine**, v. 385, n. 9, p. 826-832, 2021.

MACFARLANE, R. G. An enzyme cascade in the blood clotting mechanism, and its function as a biochemical amplifier. **Nature**, v. 202, n. 4931, p. 498-499, 1964.

MARTIN, A. *et al.* Epinephrine restores platelet functions inhibited by ticagrelor: A mechanistic approach. **European Journal of Pharmacology**, v. 866, p. 172798, 2020.

MAST, A. E.; RUF, W. Regulation of coagulation by tissue factor pathway inhibitor: Implications for hemophilia therapy. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, v.

20, n. 6, p. 1290-1300, 2022.

MAZZOTTINI-DOS-SANTOS, H. C. *et al.* Ontogenesis of the pseudomonomerous fruits of *Acrocomia aculeata* (Arecaceae): a new approach to the development of pyrenarium fruits. **Trees**, v. 29, p. 199-214, 2015.

MELNIKOVA, I. The anticoagulants market. **Nature Reviews Drug Discovery**, 2009, 8.5: 353.

MILLING, J.R.; TRUMAN, J.; ZIEBELL, C. M. A review of oral anticoagulants, old and new, in major bleeding and the need for urgent surgery. **Trends in Cardiovascular medicine**, v. 30, n. 2, p. 86-90, 2020.

MISZTA, A. *et al.* Assessing plasmin generation in health and disease. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 5, p. 2758, 2021.

MONTEIRO-ALFREDO, T. *et al.* Hypoglycaemic and antioxidant properties of *Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd ex Mart. extract are associated with better vascular function of Type 2 diabetic rats. **Nutrients**, v. 13, n. 8, p. 2856, 2021.

MSANNE J.; KIM H.; CAHOON, E.B. Biotechnology tools and applications for development of oilseed crops with healthy vegetable oils. **Biochimie**, v. 178, p. 4-14, 2020. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biochi.2020.09.020>.

MUSSBACHER, M. *et al.* Mechanisms of hemostasis: Contributions of platelets, coagulation factors, and the vessel wall. **Fundamentals of Vascular Biology**, p. 145-169, 2019.

MUTCH, N. J. Regulation of Fibrinolysis by Platelets. In: Platelets. **Academic Press**, 2019. p. 417-431.

NEUBAUER, K.; ZIEGER, B. Endothelial cells and coagulation. **Cell and tissue research**, v. 387, n. 3, p. 391-398, 2022.

NUNES, Â. A. *et al.* Effect of *Acrocomia aculeata* kernel oil on adiposity in type 2 diabetic rats. **Plant foods for human nutrition**, v. 73, n. 1, p. 61-67, 2018.

PERIAYAH, M. H.; HALIM, A. S.; SAAD, A. Z. M. Mechanism action of platelets and crucial blood coagulation pathways in hemostasis. **International journal of hematology-oncology and stem cell research**, v. 11, n. 4, p. 319, 2017.

POETSCH, J. *et al.* *Acrocomia aculeata*—a sustainable oil crop. **Rural**, v. 21, n. 3, p. 41-44, 2012.

QIAO, J. *et al.* Regulation of platelet activation and thrombus formation by reactive oxygen species. **Redox biology**, 2018, 14: 126-130.

QUACH, M. E.; CHEN, W.; LI, R. Mechanisms of platelet clearance and translation to improve platelet storage. **Blood, The Journal of the American Society of Hematology**, v. 131, n. 14, p. 1512-1521, 2018.

RASKOB, G. E. *et al.* Thrombosis: a major contributor to global disease burden. **Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology**, v. 34, n. 11, p. 2363-2371, 2014.

REZAIIE, A. R.; GIRI, H. Anticoagulant and signaling functions of antithrombin. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, 2020, 18.12: 3142-3153.

ROTH G.A. *et al.* Global burden of cardiovascular diseases and risk factors, 1990–2019. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 76, n. 25, p. 2982-3021, 2020.

SANT'ANA, C. T. *et al.* Macauba (*Acrocomia aculeata*) Pulp Oil Prevents Adipogenesis, Inflammation and Oxidative Stress in Mice Fed a High-Fat Diet. **Nutrients**, v. 15, n. 5, p. 1252, 2023.

SANTANA, M. D. O. *et al.* O Poder das Plantas Mediciniais: uma Análise Histórica e Contemporânea sobre a Fitoterapia na visão de Idosas. **Multidebates**, v. 2, n. 2, p. 10-27, 2018.

SILVA, P. V. *et al.* Antidiabetic, cytotoxic and antioxidant activities of oil extracted from *Acrocomia aculeata* pulp. **Natural Product Research**, v. 33, n. 16, p. 2413-2416, 2019.

SIRA, J.; EYRE, L. Physiology of haemostasis. **Anaesthesia & Intensive Care Medicine**, 2016, 17.2: 79-82.

STREIFF, M.B. *et al.* Guidance for the treatment of deep vein thrombosis and pulmonary embolism. **Journal of Thrombosis and Thrombolysis**, v. 41, p. 32–67, 2016.

THON, J. N.; ITALIANO, J. E. Platelets: production, morphology and ultrastructure. **Antiplatelet Agents**, p. 3-22, 2012.

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**, 2021, 25.1: 1-10.

VENINGA, A. *et al.* Clonal hematopoietic mutations linked to platelet traits and the risk of thrombosis or bleeding. **Haematologica**, v. 105, n. 8, 2020.

VERSTEEG, H.H. *et al.* New fundamentals in hemostasis. **Physiological reviews**, 2013, 93.1: 327-358.

WANG, Q.; ZENNADI, R. Oxidative stress and thrombosis during aging: the roles of oxidative stress in RBCs in venous thrombosis. **International journal of molecular**

sciences, 2020, 21.12: 4259.

WENDELBOE, A. M.; RASKOB, G. E. Global burden of thrombosis: epidemiologic aspects. **Circulation research**, v. 118, n. 9, p. 1340-1347, 2016.

ZAIDI, A.; GREEN, L.. Physiology of haemostasis. **Anaesthesia & Intensive Care Medicine**, 2019, 20.3: 152-158

OBJETIVOS

Objetivo geral

Estudar a ação antitrombótica do óleo da polpa de *A. aculeata* (OPAA) *in natura* num modelo experimental *in vitro*.

Objetivos específicos

- Avaliar a toxicidade do OPAA *in natura in vivo* e *in vitro*;
- Avaliar o efeito do OPAA *in natura* sobre a agregação plaquetária;
- Avaliar o efeito OPAA *in natura* sobre a coagulação sanguínea;
- Investigar a influencia do OPAA na ativação plaquetária por meio de:
 - Produção intraplaquetária de espécies reativas de oxigênio;
 - Expressão de P-selectina na membrana de plaquetas ativadas.

CAPÍTULO II - ARTIGO

Antithrombotic effect of oil from the pulp of Bocaiúva - *Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd. ex Mart. (Arecaceae)

Isabelly Teixeira Espinoça ¹, Denise Caroline Luiz Soares Basilio ¹, Anna Júlia Papa de Araujo ¹, Rafael Seiji Nakano Ota ¹, Kamylla Fernanda Souza de Souza ², Nadla Soares Cassemiro^{1,3}, Edgar Julian Paredes-Gamero^{1,2}, Maria Lígia Rodrigues Macedo¹, Denise Brentan Silva^{1,3}, Janaina de Cássia Orlandi Sardi⁴, Danilo Wilhelm-Filho⁵, Ana Cristina Jacobowski¹ and Eduardo Benedetti Parisotto¹.

¹ Faculty of Pharmaceutical Sciences, Food and Nutrition (FACFAN), Federal University of Mato Grosso do Sul (UFMS), Campo Grande, MS, Brazil,

² Department of Biochemistry, Federal University of São Paulo, São Paulo 4044-020, Brazil

³ Laboratory of Natural Products and Mass Spectrometry (LAPNEM), Faculty of Pharmaceutical Sciences, Food and Nutrition (FACFAN), Federal University of Mato Grosso do Sul (UFMS), Campo Grande, MS, Brazil

⁴ Dental Research Division, Guarulhos University, Guarulhos 07023-070, Brazil

⁵ Department of Ecology and Zoology, Center for Biological Sciences (CCB), Federal University of Santa Catarina, Florianópolis, Santa Catarina, Brazil

*Corresponding author: Eduardo Benedetti Parisotto

Federal University of Mato Grosso do Sul (UFMS)

Faculty of Pharmaceutical Sciences, Food and Nutrition (FACFAN).

Av. Costa e Silva, Bairro Universitário, Campo Grande, MS, 79070-900, Brazil

Phone number: +55 (067) 3345-7641

E-mail: eduardo.parisotto@ufms.br; parisotto.edu@gmail.com

ORCID: 0000-0001-5934-0323

ABSTRACT

Cardiovascular diseases are one of the main causes of death in the world. Platelets play an important role in thrombosis and atherosclerosis. The study aimed to evaluate the antithrombotic action of *Acrocomia aculeata* pulp oil (AAPO) *in natura*, as well as *in vitro* experimental model. AAPO was obtained by solvent extraction and its chemical characterization was performed by gas chromatography coupled to mass spectrometer (GC-MS). *In vitro* toxicity was evaluated with *Trypan* blue exclusion test, and *in vivo* by *Galleria mellonella* model. ADP/epinephrine-induced platelet aggregation after treatment with AAPO (50, 100, 200, 400 and 800 µg/mL) was evaluated by turbidimetry, and coagulation was determined by prothrombin activity time (PT) and activated partial thromboplastin time (aPTT). Platelet activation was measured by expression of P-selectin on the platelet surface by flow cytometry and intraplatelet content of reactive oxygen species (ROS) by fluometry. The results GC-MS showed that AAPO has as major components such as oleic acid (35,10%), palmitic acid (16,02%), lauric acid (2,69%), caprylic acid (2,02) and squalene (1,79%). AAPO showed no toxicity *in vitro* or *in vivo*. Platelet aggregation decreased significantly ($p < 0.001$) against agonists after treatment with different concentrations of AAPO. On the other hand, the oil did not interfere significantly in PT and aPTT. Moreover, it expressively decreased ROS-induced platelet activation and P-selectin expression on the platelet surface. Therefore, AAPO showed antiplatelet action since it decreased platelet activation verified by the decrease in P-selectin expression as well as in ROS production.

Keywords: *Acrocomia aculeata*; toxicity; cardiovascular disease; reactive oxygen species; antiaggregant; antioxidant.

1. INTRODUCTION

Cardiovascular diseases are one of the main causes of death in the world, and platelets play an important role in thrombosis and atherosclerosis [1]. Platelets are small cellular fragments derived from medullary polyploid megakaryocytes responsible for controlling processes related to health and disease [2], and reactive oxygen species (ROS) play an important role in regulating their function [3]. An imbalanced ROS production and deficits of antioxidants lead to hemostatic instabilities, which are responsible for increasing the risk of developing thrombotic and cardiovascular diseases [3,4].

Platelet activity is different among different human populations, which could explain the variability of cardiovascular diseases [5]. Moreover, antiplatelet therapy presents numerous difficulties and limitations, such as drug and nutritional interactions and a narrow therapeutic window, resulting in the need to investigate antiplatelet agents with greater efficacy and safety [6,7].

Brazil has one of the greatest biodiversities in the world and may be a source of natural bioactive compounds [8]. Among the promising plants for the development of natural products is *Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd. ex Mart., popularly known as bocaiúva or macaúba [9]. It is a palm tree belonging to the Arecaceae family, native to tropical regions, and prevalently occurs in South America, mainly in the Brazilian Cerrado and Pantanal [9,10].

The bocaiúva pulp has great economic, industrial, and nutritional importance [11]. Traditionally, bocaiúva pulp is consumed *in natura* or in the form of sweets, ice cream and flour [11]. In addition, it is widely recognized in folk medicine for its analgesic, healing and laxative effects [12]. The pulp oil of *A. aculeata* (AAPO) is rich in compounds with antioxidant action [8,11], such as β -carotene, tocopherols and fatty acids, such as oleic and palmitic acid [8,12].

Several studies have already demonstrated beneficial effects of bioactive compounds derived from *A. aculeata*, such as hypoglycemic [13], neuroprotective [14] and antioxidant effect [15,16]. However, the antiaggregant and anticoagulant action of AAPO lacks additional studies. Thus, we sought to investigate the effect of AAPO on human hemostasis by using an *in vitro* experimental model.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1 Obtaining the oil from the pulp of *A. aculeata* (AAPO)

Ripe fruits of *A. aculeata*, intact and without signs of contamination and/or physical damage were collected in January 2019, the period of greatest fruiting, in Campo Grande, Mato Grosso do Sul (20°27'54°39" S54°38'43.732" O), under authorization from the National System for the Management of Genetic Heritage and Associated Traditional Knowledge (SISGEN; nº A0F9FD6).

The fruit pulp was dehydrated (50° C) in a tray dryer at an airflow of 0.5 m/s for 18 h and AAPO was obtained by solvent extraction using the exhaust method for 48 h with petroleum ether and hexane (2:1). The extracted oil was evaporated in a rotary evaporator, placed under a nitrogen flow (30 min), kept in a desiccator for 2 h, and stored in an amber bottle, protected from light in a cool place (10° C) until analysis [14,17]. For the tests, dimethyl sulfoxide (DMSO 0,5%) was used as vehicle.

2.2 Gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) analysis

AAPO was analyzed by gas chromatography (Shimadzu QP2010) coupled to a mass spectrometer (GC-MS) equipped with a COA-20i autoinjector. The carrier gas was helium and the pressure 79.7 kPa. The injection temperature was 250° C, and the temperature program was the following: 60-240° C increasing 3° C.min⁻¹, 240-310° C increasing 15° C.min⁻¹, and 310° C for 10 min (isothermic). A RTX-5MS capillary column (30 mm x 0.25 mm x 0.25 µ) was used and the mass spectra were obtained by electron ionization (EI), applying the energy 70 eV. The retention indices (RI) were calculated using C8-C40 alkane standards (Sigma Aldrich). Identification of constituents was performed comparing the mass spectra registered with NIST, WILEY and FFNSC libraries, and retention indices described according to the literature [18].

2.3 Blood collection and obtaining plasma

Human blood samples (5 mL) were collected by venipuncture from healthy

donors, with no history of bleeding or thrombosis, after prior consent. Sodium citrate (3.8%) (9:1; m/v) was used as an anticoagulant. PRP (platelet-rich plasma) was obtained after centrifugation for 10 min at 123 g at room temperature, and a PPP (platelet-poor plasma) containing approximately 10,000 platelets was obtained by diluting PRP in saline. The study protocol was approved by the Ethics Committee of the Federal University of Mato Grosso do Sul (CAAE: 57842022.2.0000.0021), in accordance to national and international standards for research involving human subjects.

2.4 Toxicity assays

2.4.1 Evaluation of *in vitro* toxicity by the Trypan blue exclusion test

For the experiment, 400 μL of PRP pool were incubated (37°C for 5 min) with 5 μL of different AAPO concentrations (50, 100, 200, 400 and 800 $\mu\text{g}/\text{mL}$) and controls. Positive control: Triton X100 (1%, v/v); Negative control: DMSO (0.6%). Then, 50 μL of Trypan blue (0.4%) were added to an equal volume of PRP incubated with compounds and controls. Subsequently, they were transferred to a Neubauer chamber and the viable and non-viable platelets were quantified. The results were expressed as mean percentage of platelet viability. All experiments were performed in triplicate, not exceeding 3 h after collection [19].

2.4.2 Evaluation of *in vivo* systemic toxicity in *Galleria mellonella* model

For the experiment, 10 μL of AAPO of the two smallest and the two largest concentrations (50, 100, 400 and 800 $\mu\text{g}/\text{mL}$) or controls were injected into the hemocoel of each larva through the last left proleg using a Hamilton[®] syringe (Hamilton Inc, NV, USA). Ten larvae weighing between 0.2 and 0.3 g without signs of melanization were used per group. Saline and DMSO (100%) were used as negative and positive control, respectively. The larvae were incubated in the dark at 37°C and their survival was recorded at selected intervals for 72 h, where larvae that showed no movement to touch and high levels of melanization were counted as dead [20].

2.5 Determination of platelet aggregation

Platelet aggregation was assessed by turbidimetry using a semi-automatic aggregometer (EasyAgreg 4.0, Qualitem®) [21]. Platelets were counted in automatic counting equipment (Sysmex XP-300®) and adjusted with saline solution, obtaining a value between 200,000 and 250,000 platelets/mm³. Aliquots of 400 and 600 µL of the PRP pool were used for aggregation with adenosine diphosphate (ADP, 30 µM; Calbiochem®, Canada) or epinephrine (5 µg/mL; Hipolabor®, Minas Gerais, Brazil), respectively. The PRP pool was pre-incubated with 5 µL of AAPO (50, 100, 200, 400 and 800 µg/mL) at 37° C for 5 minutes. Aggregation was measured in percentage (%) and recorded continuously for 5 or 10 minutes after the addition of agonists. DMSO (0.6%) was used as a negative control, and its average aggregation percentage was assumed to be 100%. PPP was used to adjust the baseline turbidity of the sample and Ticlopidine (10 µM) as a positive control. All tests were performed in triplicate on three independent days, not exceeding 3 hours after collection.

2.6 Evaluation of blood coagulation

For coagulation evaluation, Prothrombin Time (PT) and Activated Partial Thromboplastin Time (aPTT) were measured following the manufacturer's guidelines (Wiener Lab®, Rosario, Argentina), in triplicate and using a semi-automated coagulation system (CLOTimer®, Quick Timer). Briefly, a PPP pool was obtained after centrifugation for 15 min at 1,107 × g and 8° C of human blood samples collected with sodium citrate (3.8%) (9:1; m/v). 100 µL PPP was pre-incubated with 1.3 µL of AAPO at different concentrations (50 - 1000 µg/mL) or controls for 5 min at 37 °C. For normal (Standart) and positive controls, plasma without added vehicle and/or treatment and heparin (17 IU/mL blood) were used, respectively. DMSO (0.6%) was used as negative control [21].

2.7 Platelet activation

2.7.1 Expression of platelet surface P-selectin

Platelet surface P-selectin expression was determined after incubation of PRP (400 μ L) pool with 5 μ L of AAPO (50, 100, 200, 400 and 800 μ g/mL) or DMSO (0.6%) for 5 min at room temperature. Subsequently the samples were stimulated with ADP (30 μ M) and incubated for 5 min. Activated platelets were then labeled with FITC Mouse Anti-Human CD42b (5 μ L) and P-selectin with PE Mouse Anti-Human CD62P (5 μ L), and remained in the shelter of light for 15 min. Unlabeled controls, samples labeled only with CD42b-FITC and only CD62P-PE were used for data calibration. The assay was performed on a CytoFLEX flow cytometer (CytoFLEX, Beckman Coulter, CA, USA) and 10,000 events were collected, and the data analyzed in FlowJo[®] v10.8 software (BD Life Sciences) [22].

2.7.2 Assessment of platelet activation by intraplatelet content of ROS

To evaluate platelet activation by intraplatelet content of ROS, concentrations of 50, 100, 200, 400 and 800 μ g/mL of AAPO were used. DMSO (vehicle, 0.6%) was used as a negative control and hydrogen peroxide (H_2O_2) as a positive control. A pool of PRP (200 μ L) was incubated with 2.5 μ L of AAPO concentrations or controls for 5 min. ROS content was determined by fluorescence intensity at 485 nm (excitation) and 520 nm (emission) using a multimode microplate reader (Synergy[™] H1, BioTek Instruments[®], Vermont, United States) after 30 min of incubation with 10 μ L 2',7'dichlorodihydrofluorescein-diacetate (DCFH-DA, 10 μ M) [23].

2.8 Statistical analysis

Statistical analysis was performed using multiple comparisons of analysis of variance (ANOVA), complemented by the Tukey-Kramer test, when necessary, assuming a minimum significance level of $p < 0.05$ between different concentrations of AAPO and controls. For the *G. mellonella* model, differences in survival were compared using the log-rank test. The software used was GraphPad[®] Prism version 8.0.2.

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1 Chemical analyses of AAPO

Oilseed plants can be affected by different environmental, climatic, cultivation, harvesting, processing and storage factors, consequently changing the chemical composition of the extracted oils [24,25]. Despite this, the main compounds observed in AAPO by GC-MS were similar to those found in the literature [26,27] and are summarized in **Table 1**. Oleic acid (35.10%) was predominant, followed by palmitic acid (16.02%), and other fatty acids were also observed to a minor extent, such as lauric acid (2.69%), caprylic acid (2.02%), and squalene (1.79%).

Recently, SANT'ANA and collaborators (2023) [15] observed an oleic acid content of approximately 49.32% in AAPO, which reflected in a greater total antioxidant capacity in C57Bl/6 mice [15]. In addition, the study by PERDOMO and collaborators (2015) [28] suggested that oleic acid reduces PAI-1 levels (Plasminogen activator-1 inhibitor) induced by TNF- α in vascular smooth muscle cells, thereby protecting the endothelium and modulating inflammation.

In addition, pre-treatment with physiological concentrations of oleic and palmitic acid maintains glutathione (GSH) levels and protects human endothelial cells from oxidative stress [29]. Palmitic acid is a fatty acid responsible for the palmitoylation of proteins (reversible process involving the addition of palmitic acid to specific cysteines through a thioester bond, which provides dynamic regulation of protein functions, including processes such as phosphorylation and ubiquitination) and by the biosynthesis of palmitoylethanolamine, which has neuroprotective and anti-inflammatory capacity [30]. Our findings corroborate those found by COSTA and collaborators (2020), where a concentration of approximately 15.80% palmitic acid was observed in AAPO [12].

Although less prevalent, medium-chain fatty acids lauric and caprylic, as well as squalene, a triterpene present in several vegetable oils, such as soybean oil, have already been reported to have the ability to attenuate oxidative stress [31,32,33]. Furthermore, a previous study demonstrated a concentration of approximately 31.2 mg/100g of ascorbic acid, 46.9 mg/100g of β -carotene and 12.6 mg/100g of α -tocopherol in the pulp oil of *A. aculeata* [14].

Table 1. Constituents identified from AAPO by GC-MS.

RT (min)	Compound	Area (%)	RI
6.67	Caproic acid	1.26	991
8.05	β -phellandrene	1.29	1034
13.58	Caprylic acid	2.02	1186
14.21	Ethyl octanoate	0.12	1200
21.36	Capric acid	0.24	1375
29.24	Lauric acid	2.69	1573
36.35	Myristic acid	0.73	1768
39.82	Isobutyl phthalate	0.21	1870
41.47	7,11,15-Trimethyl-3-methylene-hexadeca-1,6,10,14-tetraene	0.41	1920
42.32	Palmitoleic acid	0.86	1947
43.16	Palmitic acid	16.02	1973
43.91	Ethyl palmitate	0.20	1996
48.66	Oleic acid	35.10	2154
49.13	NI	3.99	2170
57.25	NI	2.53	2466
61.15	Hexacosane	0.47	2619
63.35	NI	2.32	2705
64.99	NI	5.14	2766
65.20	Squalene	1.79	2831
66.37	Nonacosane	0.35	2901
70.96	NI	2.03	3221
71.02	NI	2.37	3225
72.27	NI	3.58	3324
72.47	NI	3.73	3340

NI: not identified; RT: retention time; RI: retention indices on RTx-5MS capillary column. NI compounds of up 2% relative percentage (RI): 1- 0.07% (1596); 2- 0.26% (2255); 3- 0.13% (2298); 4- 0.19% (2301); 5- 1.64% (2430); 6- 0.43 % (2438); 7- 1.36% (2477); 8- 0.09% (2683); 9- 0.46% (2895); 10- 0.52% (3097); 11- 0.76% (3100); 12- 1.55% (3101); 13- 0.26% (3148); 14- 0.60% (3245); 15- 0.40% (3256); 16- 0.57% (3277); 17- 1.26% (3408).

3.2 *In vitro* and *in vivo* toxicity

The panoply of bioactive compounds present in different plant products may impact positively or negatively the human and animal health [34]. The hematopoietic system is one of the most sensitive targets for toxic substances [34], for this reason the *in vitro* and *in vivo* toxicological assays have been performed to establish the safety criteria, quality, and efficacy, as well as to select the suitable concentrations for their therapeutic use [35].

The *in vitro* toxicity results showed no toxicity to human platelets at the tested AAPO concentrations (50, 100, 200, 400 and 800 $\mu\text{g}/\text{mL}$) (**Figure 1A**). There was no significant difference between concentrations and the negative control (NC) and the percentage range of platelet viability obtained fell between 97.4 and 99.1%. The *in vivo* toxicity test using *G. mellonella* larvae confirmed the absence of systemic toxicity at the concentrations tested (50, 100, 400 and 800 $\mu\text{g}/\text{mL}$), being equivalent to the NC (**Figure 1B**), without high levels of melanization or larvae death.

These results corroborate the data found by Traesel and colleagues (2014) [17], who demonstrated through an *in vivo* model using Wistar rats, low acute and subacute (28 days) toxicity of AAPO on blood cells, suggesting toxicity only at high concentrations of AAPO (50% oral lethal dose higher than 2000 mg/kg).

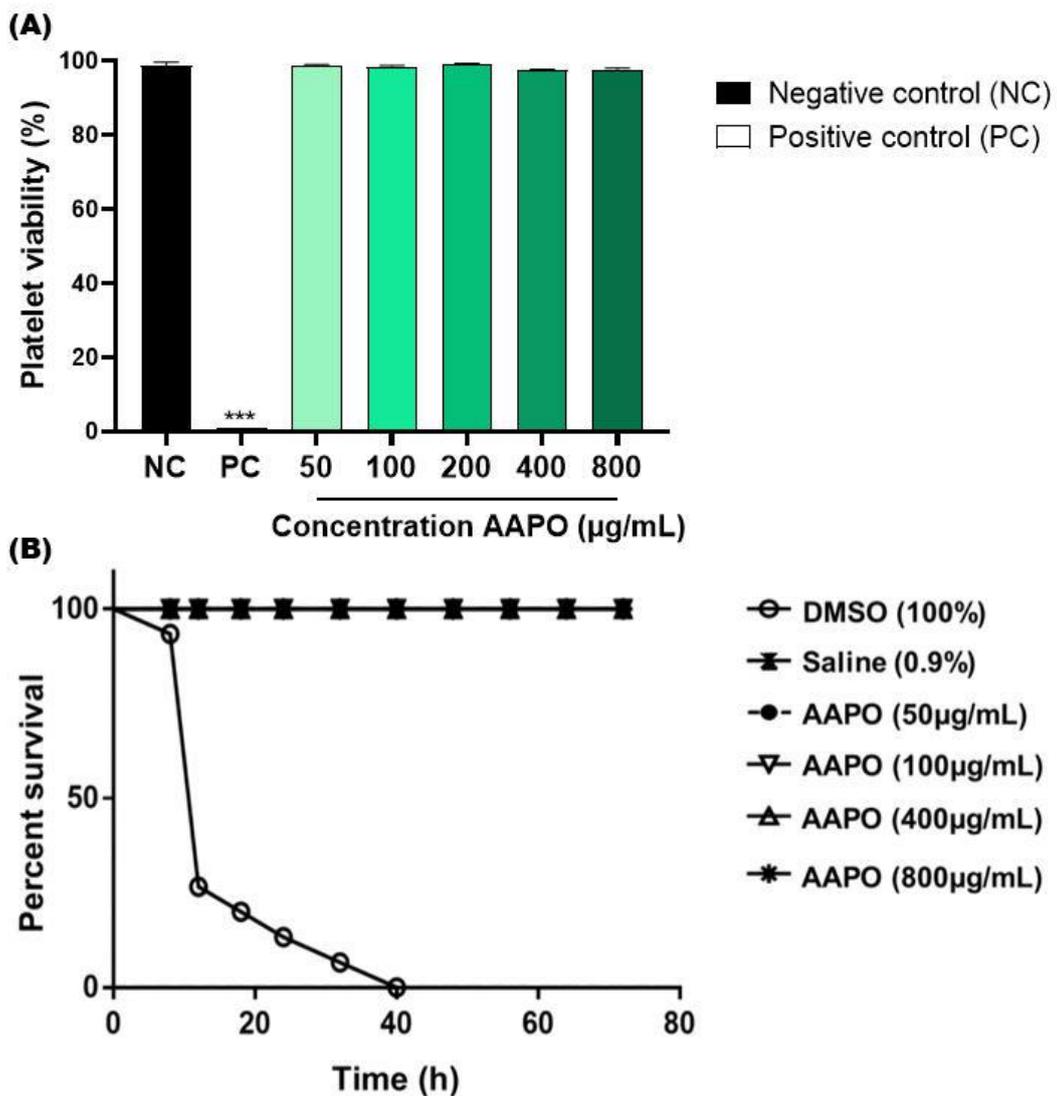


Figure 1. Toxicity in human platelets and systemic in *G. mellonella*. (A) Percentage (%) of human platelet viability obtained in PRP treated with *Acrocomia aculeata* (AAPO) pulp oil at different concentrations (50, 100, 200, 400 and 800 µg/mL). Negative control (NC): vehicle (DMSO, 0.6%); Positive control (PC): Triton X100 (1%). (***) indicates statistical difference with $p < 0.001$ compared to NC. (B) *In vivo* systemic toxicity in *G. mellonella* model treated with different concentrations (50, 100, 400 and 800 µg/mL) of AAPO. The percentage of survival was evaluated for 72 h. Negative control (NC): saline; Positive control: DMSO (100%). Difference estimates in survival were compared using $p < 0.05$ log-rank test.

3.3 Effect of AAPO on human platelet aggregation

ADP is concentrated in the dense granules of platelets, when released it binds to two purinergic receptors, P2Y₁₂ and P2Y₁ [36]. The first mediates the inhibition of adenylyl cyclase activity, activates phosphatidylinositol 3-kinase (PI3-K), promotes the activation and amplification of platelet aggregation, forming stable thrombi [36]. On the other hand, P2Y₁ leads to increased intracellular calcium, altered platelet shape, and reversible aggregation [37]. The results obtained in this study demonstrated significant inhibition of this aggregation pathway in AAPO-treated PRP, with the highest inhibitory percentage (34%) at a concentration of 800 µg/mL (**Figure 2A and B**).

Like ADP, AAPO showed antithrombotic action when epinephrine was used as an agonist. In addition to acting synergistically with other platelet agonists, epinephrine may assist in decreasing the concentration of cyclic adenosine monophosphate (cAMP) and activation of PI3-K, facilitating the thrombus formation process by binding to the adrenergic receptor (α 2A) exposed on the platelet membrane [38]. Aggregation induced by this pathway was inhibited by more than 50% at all concentrations tested, with the highest percentage of inhibition (\approx 87%) in platelets treated with 400 µg/mL of bocaiúva pulp oil (**Figure 2C and D**).

No previous investigations on the antiplatelet effects of AAPO were found, making it difficult to compare the data with other studies. Nevertheless, antiaggregant effects have been previously reported in platelets treated with oil extract of the buriti fruit peel (*Mauritia flexuosa* L. F.), a palm species of the Arecaceae family, with 50% inhibitory concentrations (CI₅₀) of 0.65 mg/mL for ADP and 0.93 mg/mL with collagen [39].

However, the ability of oleic acid to modulate the action of receptors coupled to G proteins, mainly adrenoreceptors, and consequently its influence on adenylyl cyclase activity, has been previously reported [40]. In our study, we can observe that oleic acid is the most significant compound of AAPO (**Table 1**). Thus corroborating the antiplatelet activity of bocaiúva oil, especially when epinephrine is used as an agonist.

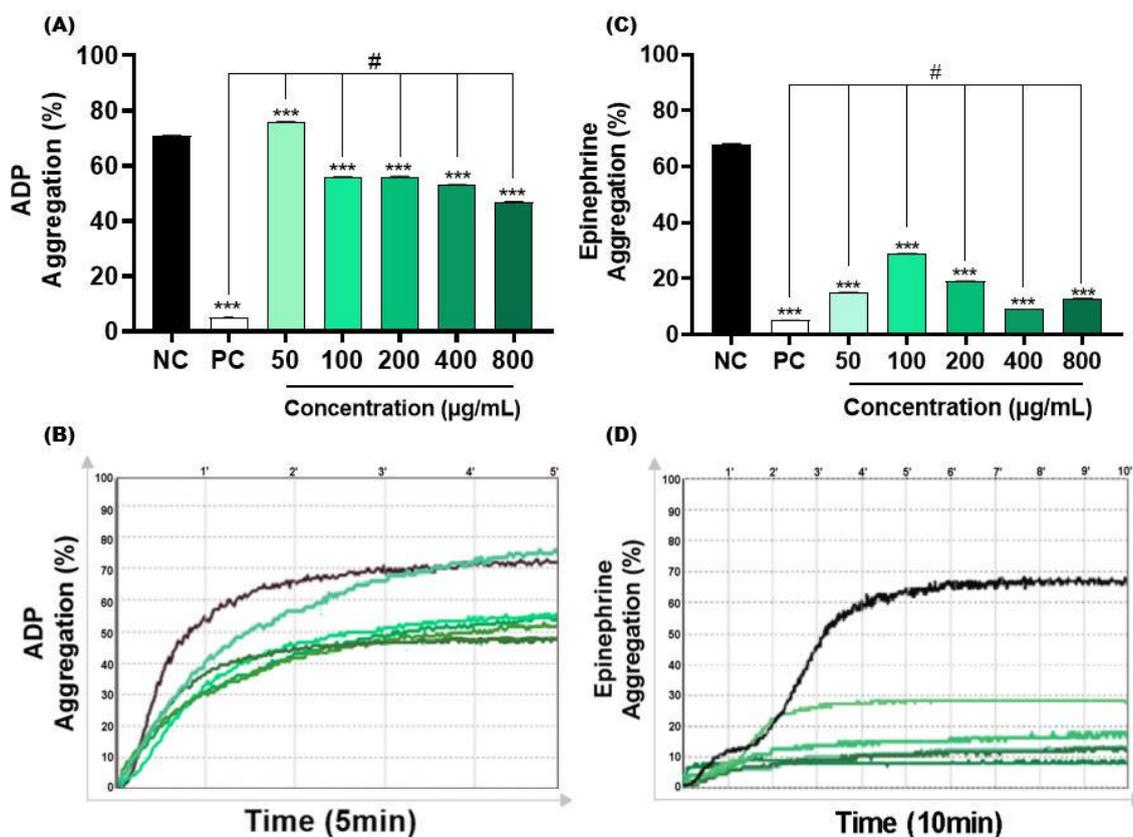


Figure 2. Effect of AAPO on platelet aggregation induced by ADP and epinephrine. Percentage (%) of platelet aggregation at different concentrations of AAPO (50, 100, 200, 400 and 800 µg/mL), induced by ADP (30 µM) (**A and B**) and epinephrine (5 µg/mL) (**C and D**) for 5 and 10 minutes, respectively. Negative control - NC (DMSO 0.6%); Positive control - PC (Ticlopidine 10 µM). (***) statistical difference with $p < 0.001$ compared to negative control (NC). (#) statistical difference with $p < 0.001$ compared to positive control (PC).

3.4 Effect of AAPO on blood coagulation

The anticoagulant activity of AAPO was analyzed by aTTP, which evaluates the integrity of the intrinsic and common coagulation pathways, and by PT, which evaluates changes in the coagulation factors of the extrinsic pathway [41].

Although prolongation in PT and aTTP was reported in plasma of mice treated with flour from the mesocarp of a palm tree of the *Arecaceae*, *Orbignya phalerata* Mart. [42], AAPO *in natura* did not have a significantly increase in PT time and aTTP at all concentrations tested (**Table 2**).

Table 2. PT and aPTT coagulation parameters measured in human plasma treated with heparin and AAPO.

Sample ¹	Blood coagulation test ²			
	PT		aPTT	
	Time (s)	IRN ³	Time (s)	Ratio ⁴
Normal control (Standart)	14 ± 0,32	-	28 ± 2,20	-
Negative control	15 ± 0,22	1.1	26 ± 1,53	0.9
AAPO (50 µg/mL)	16 ± 2,63	1.2	30 ± 0,62	1.1
AAPO (100 µg/mL)	17 ± 1,57	1.2	28 ± 1,24	1.0
AAPO (200 µg/mL)	17 ± 1,22	1.2	26 ± 3,93	0.9
AAPO (400 µg/mL)	17± 1,17	1.3	27 ± 1,12	1.0
AAPO (800 µg/mL)	16 ± 0,76	1.2	24 ± 2,08	0.8
Heparin (17 IU/mL of blood)	> 100	-	> 100	-

¹Oil from *A. aculeata* pulp (AAPO) at different concentrations (50, 100, 200, 400 and 800 µg/mL); negative control (vehicle, 0.6% DMSO) and heparin (positive control).²Prothrombin time (PT) and activated partial thromboplastin time (aPTT) values in seconds (s) measured in AAPO-treated human plasma and expressed as mean ± SD.³International normalized ratio (INR) calculated based on PT results, used to monitor the effectiveness of anticoagulants.

⁴Relationship between the time values of concentrations and the time (s) of the controls.

3.5 Platelet activation

3.5.1 Effects of AAPO on platelet surface P-selectin expression

P-selectin is a transmembrane protein stored in platelet alpha granules and Weibel-Palade bodies in endothelial cells [43]. Different platelet agonists and a high shear stress contribute to the exteriorization of P-selectin in the cell membrane [44]. When bound to PSGL-1 (P-selectin-1 glycoprotein ligand) and platelet glycoprotein (Gp)Ib, it plays an important role in leukocyte and platelet adhesion and rolling, microparticle release, expression of monocyte tissue factor [43] and in the size and stabilization of thrombi mediated by the Gp IIb/IIIa-fibrinogen interaction [22].

We evaluated the expression of P-selectin in the membrane of activated platelets after exposure to AAPO (**Figure 3**) using the flow cytometry technique. As a result, we observed a significant reduction at concentrations of 400 and 800 µg/mL of AAPO. When compared to the results of platelet aggregation tests (**Figure 2**), it is observed that concentrations of 400 and 800 µg/mL present better results.

Furthermore, Fuentes and colleagues (2013) observed thrombin-induced inhibition of P-selectin expression in platelets treated with buriti oil extracts, where concentrations of 0.1 and 1 mg/mL inhibited approximately 18% and 29% of expression of P-selectin, respectively [39].

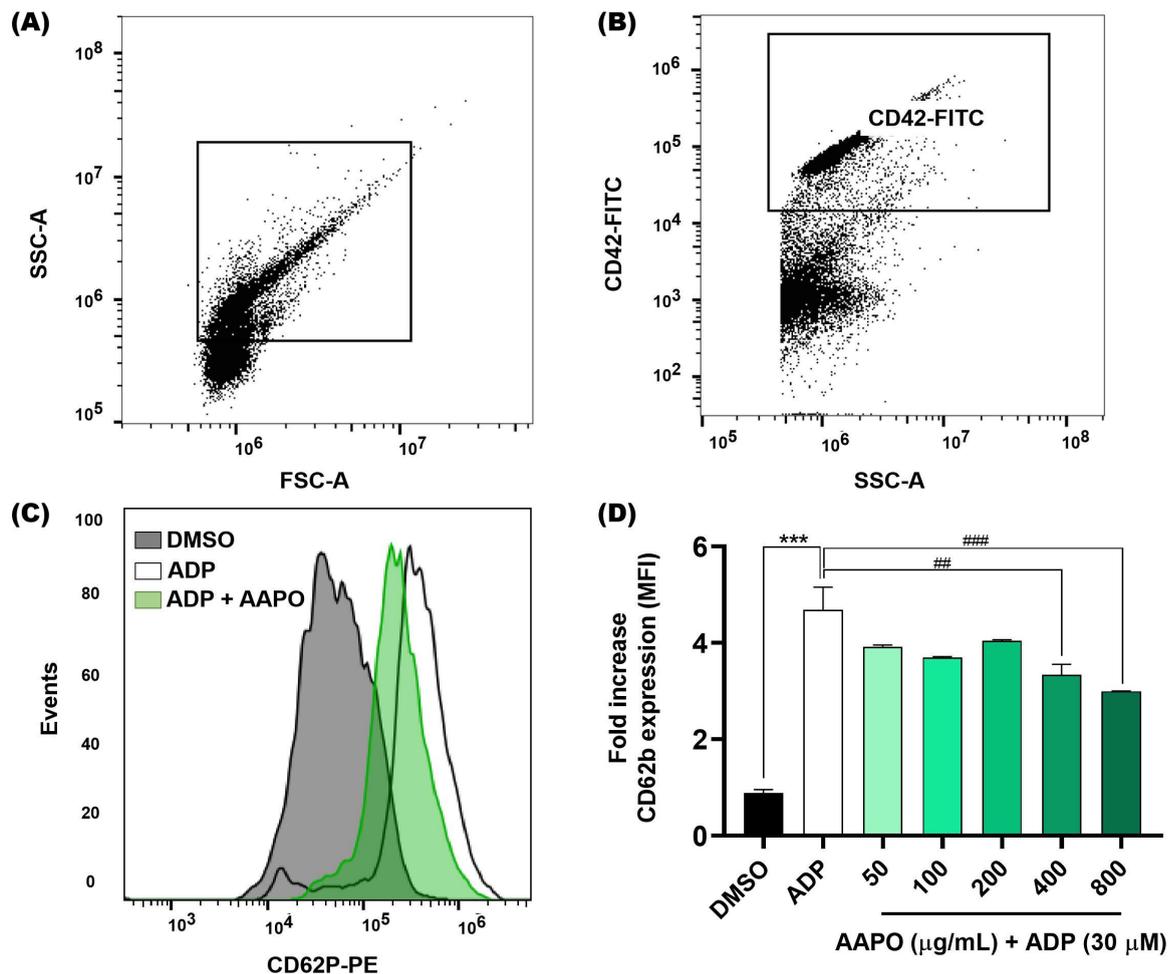


Figure 3. Expression of platelet surface P-selectin after exposure of platelets to AAPO. (A) Representative dot plots generated by FlowJo software. The gate shows the platelet population. (B) Representative dot plot showing a platelet positive population (CD42b-FITC). (C) Representative histograms showing the activation of platelets incubated with AAPO and stimulated by ADP (30 μ M) for 5 min. Activated platelets were labeled with CD42b-FITC (5 μ L) and CD62P (CD62P-PE, 5 μ L), and kept in the dark for 15 min. (D) Mean fluorescence intensity (MFI) of CD62P-PE expressed on the membrane of activated platelets treated with different concentrations of AAPO (50, 100, 200, 400 and 800 μ g/mL). DMSO (0.6%): negative control; ADP (30 μ M): positive control. Three independent experiments were performed. (***) statistical difference with $p < 0.001$ compared to negative control. (##) statistical difference with $p < 0.01$ and (###) statistical difference with $p < 0.001$ compared to ADP group.

3.5.2 Content of ROS produced by platelets after exposure to AAPO

The results obtained showed that concentrations of 50, 100, 300 and 400 µg/mL of AAPO significantly decreased ($p < 0.001$) the production of ROS when compared to the negative control (**Figure 4**). However, the same result was not observed in plasma treated with a concentration of 800 µg/mL. Physiologically, ROS are necessary for the maintenance of cellular function, while an imbalance between pro-oxidants and antioxidants generates a state of oxidative stress [45]. Increased platelet activation is directly associated with ROS generation and platelet adhesion receptor expression [2], so the use of ROS scavengers preserves platelet adhesion to collagen [46].

Recently, a higher total antioxidant capacity of bocaiúva pulp oil was reported in mice fed a high-fat diet [15]. In addition, the aqueous extract of dried leaves of *Acrocomia aculeata* (EA-Aa) revealed protective and hypoglycemic effect in type 2 diabetes promoted by polyphenols present in macaúba extracts (at concentrations of 125, 250, and 500 µg.mL⁻¹) [16]. EA-Aa was able to protect against H₂O₂ at a concentration of 125 µg.mL⁻¹ in human dermal microvascular endothelial cells and also in histological slices of liver, kidney and aorta from Wistar and Goto-Kakizaki, whereas the antioxidant effect of EA- Aa on the vascular wall was also revealed in a tissue-specific manner in microvascular endothelial cell line represented by an improvement (≈22%) in cell viability [16]. Furthermore, our research group previously demonstrated that AAPO has a neuroprotective effect, being able to protect brain structures from oxidative damage induced by chronic restriction stress in Wistar rats, and effect attributable to the relatively high levels of α-tocopherol, β-carotene and ascorbic found in AAPO [14].

Therefore, the data here obtained corroborate those found in the literature and highlight the present results regarding the antiaggregant potential of AAPO, which can be related to its promising ability to inhibit the production and release of ROS by platelets. This beneficial effect as well those demonstrated in related studies, is mainly attributable to the high concentration of compounds that possess a significant antioxidant capacity present in the macaúba fruit.

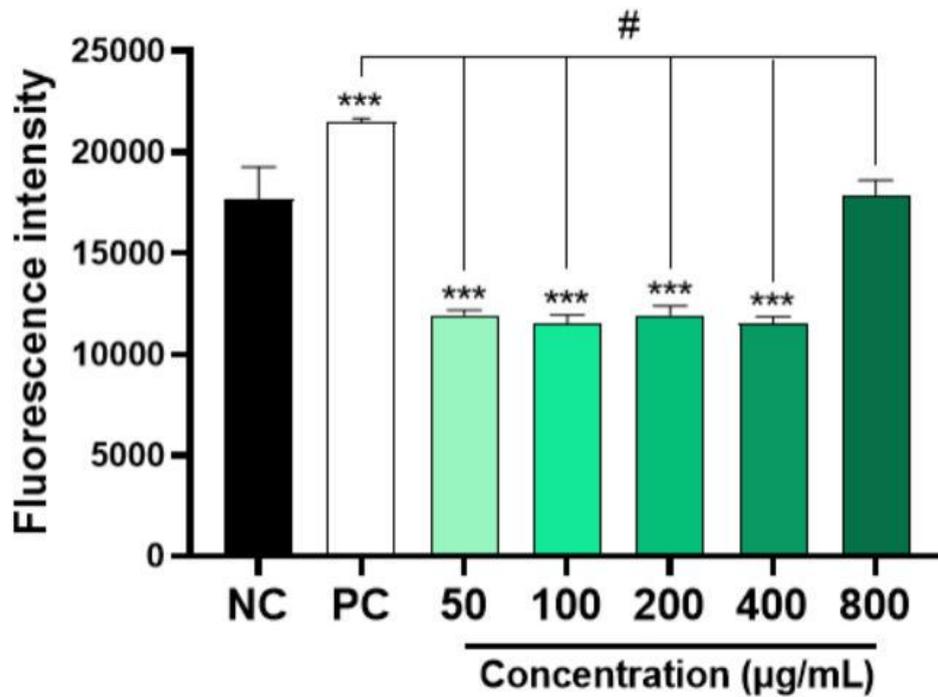


Figure 4. Intraplatelet content of ROS in AAPO-treated platelets. Intraplatelet ROS content after 30 minutes of incubation with DCFH-DA (10 µM), in platelets treated with 50, 100, 200, 400 and 800 µg/mL of *A. aculeata* pulp oil (AAPO) or controls. Negative control - NC (DMSO 0.6%); Positive control - PC (hydrogen peroxide, H₂O₂). (***) statistical difference with p < 0.001 compared to negative control (NC). (#) statistical difference with p < 0.001 compared to positive control (PC).

4. CONCLUSION

AAPO showed no toxicity *in vitro* or *in vivo*. It significantly inhibited platelet aggregation triggered by ADP and epinephrine in most of the concentrations tested, but it was unable to change coagulation parameters. In addition, AAPO decreased the expression of P-selectin on the platelet membrane and in the intraplatelet production of ROS, thus preventing platelet activation resulting in an antithrombotic effect.

5. ACKNOWLEDGMENT AND SOURCES OF SUPPORT

This work was supported by the Fundação de Apoio ao Desenvolvimento do Ensino, Ciência e Tecnologia do Estado de Mato Grosso do Sul (FUNDECT), the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES, Finance Code 001) and UFMS. RSNO and AJPA were awarded a PIBIC scholarship by CNPq and UFMS, respectively.

7. AUTHOR CONTRIBUTIONS

Conceptualization: EBP; writing – original draft: EBP, ITE, NSC, DBS; writing - proofreading and editing: EBP, ITE, DCLSB, DCLG, EJPG, NSC, DBS; data curation: ITE, DCLSB; AJPA; RSNO; DBS; JCOS; KFSS; NSC, MLRM; ACJ; Review and Editing: DWF and EBP; Supervision: EBP and JCB. All authors remained involved in preparing the final version.

8. AUTHOR DECLARATIONS

The authors declare no conflict of interests.

9. REFERENCES

- [1] Khodadi, E. Platelet function in cardiovascular disease: activation of molecules and activation by molecules. **Cardiovascular Toxicology**, v. 20, n. 1, p. 1-10, 2019. <http://dx.doi.org/10.1007/s12012-019-09555-4>.
- [2] van der Meijden PE, Heemskerk JW. Platelet biology and functions: new concepts and clinical perspectives. **Nature Reviews Cardiology**, v. 16, n. 3, p. 166-179, 2018. <http://dx.doi.org/10.1038/s41569-018-0110-0>.
- [3] Qiao J, Arthur JF, Gardiner EF, Andrews RK, Zeng L, Xu K. Regulation of platelet activation and thrombus formation by reactive oxygen species. **Redox Biology**, v. 14, p. 126-130, 2018. <http://dx.doi.org/10.1016/j.redox.2017.08.021>.
- [4] Roth GA, Mensah GA, Johnson CO, Addolorato G, Ammirati E, Baddour LM, *et al.* Global burden of cardiovascular diseases and risk factors, 1990–2019. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 76, n. 25, p. 2982-3021, 2020. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jacc.2020.11.010>.
- [5] Montenont E, Echagarruga C, Allen N, Araldi E, Suarez Y, Berger JS. Platelet WDR1 suppresses platelet activity and is associated with cardiovascular disease. **Blood**, v. 128, n. 16, p. 2033-2042, 2016. <http://dx.doi.org/10.1182/blood-2016-03-703157>.
- [6] Chan N, Sobieraj-Teague M, Eikelboom JW. Direct oral anticoagulants: evidence and unresolved issues. **The Lancet**, v. 396, n. 10264, p. 1767-1776, 2020. [http://dx.doi.org/10.1016/s0140-6736\(20\)32439-9](http://dx.doi.org/10.1016/s0140-6736(20)32439-9).
- [7] Melnikova I. The anticoagulants market. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 8, n. 5, p. 353-353, 2009. LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/nrd2851>.
- [8] Calixto JB. The role of natural products in modern drug discovery. **Anais da**

Academia Brasileira de Ciências, v. 91, n. 3, 2019. <http://dx.doi.org/10.1590/0001-3765201920190105>.

[9] Borges CE, Santos JCB, Evaristo AB, Cunha TG, Veloso RVS, Barroso GM, *et al.* Distribution and future projection of potential cultivation areas for *Acrocomia aculeata* (Arecaceae) worldwide: the emerging energy culture of the tropics. **Theoretical and Applied Climatology**, v. 146, n. 3-4, p. 1069-1078, 2021. <http://dx.doi.org/10.1007/s00704-021-03788-6>.

[10] Ciconini G, Favaro SP, Roscoe R, Miranda CHB, Tapeti CF, Miyahira MAM, *et al.* Biometry and oil contents of *Acrocomia aculeata* fruits from the Cerrados and Pantanal biomes in Mato Grosso do Sul, Brazil. **Industrial Crops and Products**, v. 45, p. 208-214, 2013. <http://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2012.12.008>.

[11] Souza FG, Araújo FF, Farias DP, Zanotto AW, Neri-Numa IA, Pastore GM. Brazilian fruits of Arecaceae family: an overview of some representatives with promising food, therapeutic and industrial applications. **Food Research International**, v. 138, p. 109690, 2020. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109690>.

[12] Costa GLA, Buccini DF, Arruda ALA, Favaro SP, Moreno SE. Phytochemical profile, anti-inflammatory, antimutagenic and antioxidant properties of *Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd. pulp oil. **Food Science and Technology**, v. 40, n. 4, p. 963-971, 2020. <http://dx.doi.org/10.1590/fst.25319>.

[13] Nunes ÂA, Buccini DF, Jaques JA, Portugal LC, Guimarães RC, Favaro SP, *et al.* Effect of *Acrocomia aculeata* kernel oil on adiposity in type 2 diabetic rats. **Plant Foods for Human Nutrition**, v. 73, n. 1, p. 61-67, 2017. <https://doi.org/10.1007/s11130-017-0648-8>.

[14] Jacobowski AC, Parisotto EB, Aydos LR, Souza RS, Viveros S, Colín-Gonzalez AL, *et al.* Neuroprotective Effects of *Acrocomia aculeata* Pulp Oil Microcapsules on

Rats Subjected to Chronic Stress. **Journal of Medicinal Food**, v. 24, n. 10, p. 1068-1075, 2021. <http://dx.doi.org/10.1089/jmf.2020.0186>.

[15] Sant'Ana CT, Agrizzi VT, Grancieri M, Toledo RCL, Tako E, Costa NMB, *et al.* Macauba (*Acrocomia aculeata*) pulp oil prevents adipogenesis, inflammation and oxidative stress in mice fed a high-fat diet. **Nutrients**, v. 15, n. 5, p. 1252, 2023. <http://dx.doi.org/10.3390/nu15051252>.

[16] Monteiro-Alfredo T, Oliveira S, Amaro A, Rosendo-Silva D, Antunes K, Pires AS, *et al.* Hypoglycaemic and antioxidant properties of *Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd ex Mart. extract are associated with better vascular function of Type 2 diabetic rats. **Nutrients**, v. 13, n. 8, p. 2856, 2021. <http://dx.doi.org/10.3390/nu13082856>.

[17] Traesel GK, Souza JC, Barros AL, Souza MA, Schmitz WO, Muzzi RM, *et al.* Acute and subacute (28 days) oral toxicity assessment of the oil extracted from *Acrocomia aculeata* pulp in rats. **Food and Chemical Toxicology**, v. 74, p. 320-325, 2014. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fct.2014.10.026>.

[18] Adams RP. **Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry**, 4th edition, 2007.

[19] Lopez E, Ortega-Liévana MDC, Salido S, Salido GM, Altarejos J, Rosado JA, Redondo PC. Evaluation of the antiaggregant activity of ascorbyl phenolic esters with antioxidant properties. **Journal of Physiology and Biochemistry**, v. 71, n. 3, p. 415-434, 2015. <http://dx.doi.org/10.1007/s13105-015-0421-0>.

[20] Megaw J, Thompson TP, Lafferty RA, Gilmore BF. *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. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2015.06.026>.

[21] Weber SS, Souza ACS, Soares DCL, Lima CC, Moraes ACR, Gkionis SV, *et al.*

Chemical profile, antimicrobial potential, and antiaggregant activity of supercritical fluid extract from *Agaricus bisporus*. **Chemical Papers**, v. 76, n. 10, p. 6205-6214, 2022. <http://dx.doi.org/10.1007/s11696-022-02308-8>.

[22] Merten M, Thiagarajan P. P-Selectin expression on platelets determines size and stability of platelet aggregates. **Circulation**, v. 102, n. 16, p. 1931-1936, 2000. <http://dx.doi.org/10.1161/01.cir.102.16.1931>.

[23] Reiniers MJ, van Golen RF, Bonnet S, Broekgaarden M, van Gulik TM, Egmond MR, Heger M, *et al.* Preparation and practical applications of 2',7'-dichlorodihydrofluorescein in redox assays. **Analytical Chemistry**, v. 89, n. 7, p. 3853-3857, 2017. <http://dx.doi.org/10.1021/acs.analchem.7b00043>.

[24] Lescano CH, Oliveira IP, Silva LR, Baldivia DS, Sanjinez-Argandoña EJ, Arruda EJ, *et al.* Nutrients content, characterization and oil extraction from *Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd. fruits. **African Journal of Food Science**, v. 9, n. 3, p. 113-119, 2015. <http://dx.doi.org/10.5897/ajfs2014.1212>.

[25] Zhou Y, Zhao W, Lai Y, Zhang B, Zhang D. Edible plant oil: global status, health issues, and perspectives. **Frontiers In Plant Science**, v. 11, n. 1, p. 1-16, 28, 2020. <http://dx.doi.org/10.3389/fpls.2020.01315>.

[26] del Río JC, Evaristo AB, Marques G, Martín-Ramos P, Martín-Gil J, Gutiérrez A. Chemical composition and thermal behavior of the pulp and kernel oils from macauba palm (*Acrocomia aculeata*) fruit. **Industrial Crops and Products**, v. 84, p. 294-304, 2016. <http://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2016.02.018>.

[27] Hiane PA, Ramos FMM, Ramos MIL, Macedo MLR. Bocaiúva, *Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd., pulp and kernel oils: characterization and fatty acid composition. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 8, n. 3, p. 256-259, 2005.

[28] Perdomo L, Beneit N, Otero YF, Escribano Ó, Díaz-Castroverde S, Gómez-

Hernández A, Benito M. Protective role of oleic acid against cardiovascular insulin resistance and in the early and late cellular atherosclerotic process. **Cardiovascular Diabetology**, v. 14, n. 1, p. 1-12, 2015. <http://dx.doi.org/10.1186/s12933-015-0237-9>.

[29] Palomino O, Giordani V, Chowen J, Fernández-Alfonso M, Goya L. Physiological doses of oleic and palmitic acids protect human endothelial cells from oxidative stress. **Molecules**, v. 27, n. 16, p. 5217, 2022. <http://dx.doi.org/10.3390/molecules27165217>.

[30] Vesga-Jiménez DJ, Martín C, Barreto GE, Aristizábal-Pachón AF, Pinzón A, González J. Fatty Acids: an insight into the pathogenesis of neurodegenerative diseases and therapeutic potential. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 5, p. 2577, 2022. <http://dx.doi.org/10.3390/ijms23052577>.

[31] Micera M, Botto A, Geddo F, Antoniotti S, Bertea CM, Levi R, *et al.* Squalene: more than a step toward sterols. **Antioxidants**, v. 9, n. 8, p. 688, 2020. <http://dx.doi.org/10.3390/antiox9080688>.

[32] Alves NFB, Queiroz TM, Travassos RA, Magnani M, Braga VA. Acute treatment with lauric acid reduces blood pressure and oxidative stress in spontaneously hypertensive rats. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, v. 120, n. 4, p. 348-353, 2017. <http://dx.doi.org/10.1111/bcpt.12700>.

[33] Cansız D, Ünal İ, Üstündağ ÜV, Alturfan AA, Altinoz MA, Elmacı İ, Emekli-Alturfan E. Caprylic acid ameliorates rotenone induced inflammation and oxidative stress in the gut-brain axis in Zebrafish. **Molecular Biology Reports**, v. 48, n. 6, p. 5259-5273, 2021. <http://dx.doi.org/10.1007/s11033-021-06532-5>.

[34] Li X, Luo Y, Wang L, Li Y, Shi Y, Cui Y, Xue M. Acute and subacute toxicity of ethanol extracts from *Salvia przewalskii* Maxim in rodents. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 131, n. 1, p. 110-115, 2010. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2010.06.012>.

[35] Yang M, Wu Z, Wang Y, Kai G, Njateng GSS, Cai S, *et al.* Acute and subacute toxicity evaluation of ethanol extract from aerial parts of *Epigynum auritum* in mice. **Food and Chemical Toxicology**, v. 131, p. 110534, 2019. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fct.2019.05.042>.

[36] Bandyopadhyay SK, Azharuddin M, Dasgupta AK, Ganguli B, Senroy S, Patra HK, *et al.* Probing ADP induced aggregation kinetics during platelet-nanoparticle interactions: functional dynamics analysis to rationalize safety and benefits. **Frontiers In Bioengineering and Biotechnology**, v. 7, p. 163, 2019. <http://dx.doi.org/10.3389/fbioe.2019.00163>.

[37] Cattaneo M. The platelet P2 receptors. In: **Platelets**. Academic press, 2019. p. 259-277. <http://dx.doi.org/10.1016/b978-0-12-813456-6.00014-x>.

[38] Martin AC, Zlotnik D, Bonete GP, Baron E, Decouture B, Belleville-Rolland T, *et al.* Epinephrine restores platelet functions inhibited by ticagrelor: a mechanistic approach. **European Journal of Pharmacology**, v. 866, p. 172798, 2020. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejphar.2019.172798>.

[39] Fuentes E, Rodríguez-Pérez W, Guzmán L, Alarcón M, Navarrete S, Forero-Doria O, Palomo I. *Mauritia flexuosa* presents *in vitro* and *in vivo* antiplatelet and antithrombotic Activities. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2013, p. 1-11, 2013. <http://dx.doi.org/10.1155/2013/653257>.

[40] Yang Q, Alemany R, Casas J, Kitajka K, Lanier SM, Escribá PV. Influence of the membrane lipid structure on signal processing via g protein-coupled receptors. **Molecular Pharmacology**, v. 68, n. 1, p. 210-217, 2005. <http://dx.doi.org/10.1124/mol.105.011692>.

[41] Wu Y, Hu S, Ma Y, Zhao B, Yang W, Lu Y, *et al.* Novel Pheretima guillelmi-derived antithrombotic protein DPf3: Identification, characterization, *in vitro* evaluation and antithrombotic mechanisms investigation. **International Journal of Biological**

Macromolecules, v. 154, p. 545-556, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.03.097>.

[42] Azevedo APS, Farias JC, Costa GC, Ferreira SCP, Aragão-Filho WC, Sousa PRA, *et al.* Anti-thrombotic effect of chronic oral treatment with *Orbignya phalerata* Mart. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 111, n. 1, p. 155-159, 2007. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2006.11.005>.

[43] Purdy M, Obi A, Myers D, Wakefield T. P- and E-selectin in venous thrombosis and non-venous pathologies. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, v. 20, n. 5, p. 1056-1066, 2022. <http://dx.doi.org/10.1111/jth.15689>.

[44] Fang J, Sun X, Liu S, Yang P, Lin J, Feng J, *et al.* Shear stress accumulation enhances von willebrand factor-induced platelet P-Selectin translocation in a PI3K/Akt pathway-dependent manner. **Frontiers In Cell and Developmental Biology**, v. 9, p. 642108, 2021. <http://dx.doi.org/10.3389/fcell.2021.642108>.

[45] Wang G, Yang F, Zhou W, Xiao N, Luo M, Tang Z. The initiation of oxidative stress and therapeutic strategies in wound healing. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 157, p. 114004, 2023. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biopha.2022.114004>.

[46] Hosseini E, Solouki A, Roudsari ZO, Kargar F, Ghasemzadeh M. Reducing state attenuates ectodomain shedding of GPVI while restoring adhesion capacities of stored platelets: evidence addressing the controversy around the effects of redox condition on thrombosis. **Journal of Thrombosis and Thrombolysis**, v. 50, n. 1, p. 123-134, 2020. <http://dx.doi.org/10.1007/s11239-020-02137-0>.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

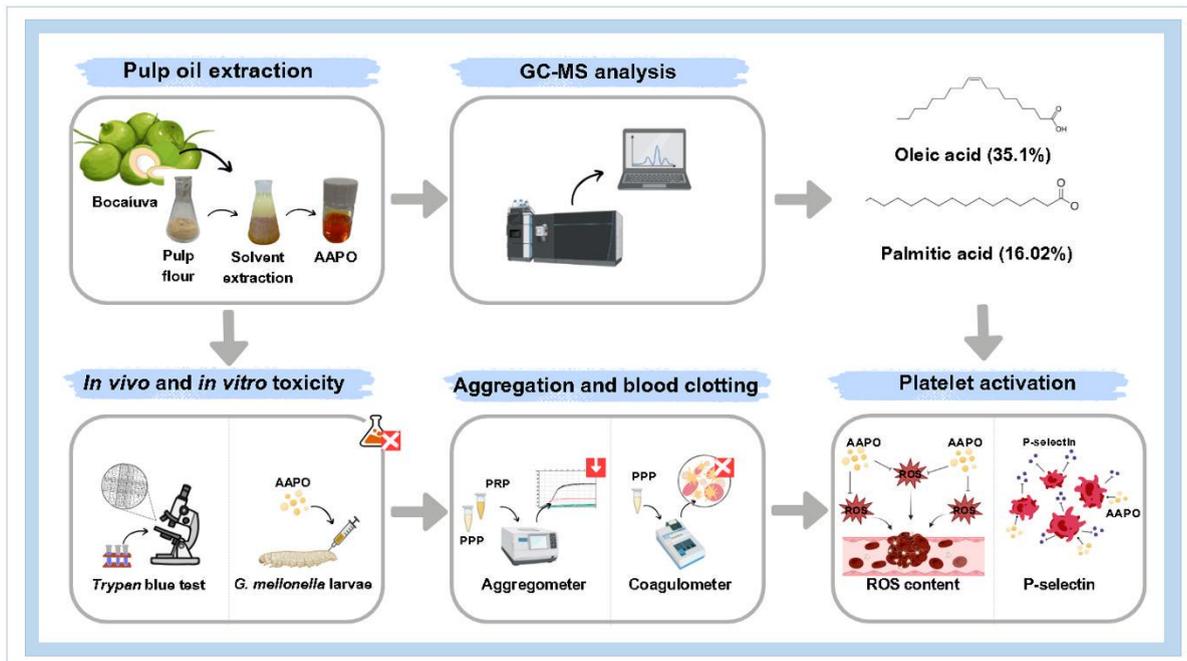
Os resultados obtidos com o presente estudo, permitem concluir que:

- I) O OPAA possui como componentes majoritários compostos com ação antioxidante já relatada, como: ácido oleico (35,10%), ácido palmítico (16,02%), ácido láurico (2,69%), ácido caprilico (2,02) e esqualeno (1,79%). Além disso, um estudo prévio demonstrou concentrações de aproximadamente 31,2 mg/100g de ácido ascórbico, 46,9 mg/100g de β -caroteno e 12,6 mg/100g de α -tocoferol no OPAA (Jacobowski *et al.*, 2021).
- II) O OPAA não demonstrou toxicidade em todas as concentrações utilizadas nos modelos experimentais *in vitro* e *in vivo*.
- III) A agregação plaquetária foi inibida na maioria das concentrações testadas frente aos dois agonistas utilizados (ADP e epinefrina). E o melhor potencial antiagregante foi observado quando epinefrina foi utilizada como agonista plaquetário.
- IV) O OPAA não apresentou a capacidade de interferir nos tempos de protrombina e tromboplastina parcial ativada, e conseqüentemente na coagulação sanguínea.
- V) As concentrações de 400 e 800 μ g/mL foram capazes de impedir eficientemente a expressão de P-selectina na membrana de plaquetas ativadas.
- VI) As concentrações de 50, 100, 200 e 400 μ g/mL foram capazes de impedir a produção de espécies reativas de oxigênio. O que poderia ser explicado pela capacidade antioxidante dos compostos encontrados majoritariamente no OPAA.

Assim, este estudo demonstrou que o óleo extraído da polpa de bocaiúva possui propriedades antitrombóticas, que podem ser evidenciadas pela 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, conforme observado na **Figura 6**.

Figura 6. Representação esquemática dos resultados obtidos no estudo.



PERSPECTIVAS

- I)** Avaliar o efeito do OPAA sobre o influxo de cálcio plaquetário.
- II)** Avaliar o efeito do OPAA em um modelo *in vivo* de infarto agudo do miocárdio.
- III)** Produzir e avaliar o efeito de microemulsões a base de OPAA em modelos experimentais *in vitro* e *in vivo*.
- IV)** Caracterizar e estudar o efeito antitrombótico da biomassa resultante da extração do óleo da polpa de Bocaiúva.

ANEXO I - TCLE

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Título da pesquisa

Efeitos biológicos de óleos derivados de *Acromia aculeata* e *Levisticum officinale* e da biomassa resultante.

Eu, o pesquisador: Eduardo Benedetti Parisotto, convido(a) Sr.(a) a participar desta pesquisa que tem como objetivo: 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*.

Envolvimento na pesquisa: Ao participar deste estudo o Sr.(a) permitirá que sejam coletados 5 mL de sangue venoso com seringa e agulha estéreis e descartáveis por profissional autorizado e capacitado do laboratório didático de Hematologia do Laboratório de Análises Clínicas (LAC/FACFAN). O uso das amostras de sangue serão exclusivamente utilizadas como reagentes (fonte de plasma rico plaquetas) para realização dos testes plaquetários e de coagulação e não serão utilizadas para obtenção de dados adicionais (realização de exames) do participante.

1. SOBRE A PESQUISA: Trata-se de uma pesquisa de caráter experimental com o objetivo de avaliar o possível efeito antitrombótico e anticoagulante dos produtos naturais citados acima.

2. CONFIDENCIALIDADE: todas as informações coletadas neste estudo são estritamente confidenciais. Além disso, não serão realizados quais exames das amostras ou qualquer procedimento de identificação do participante. Não será realizada divulgação de dados que identifique o participante.

3. PAGAMENTO: O(a) Sr.(a) não terá nenhum tipo de despesa para participar desta pesquisa, bem como não terá direito a nenhuma compensação financeira por sua participação, sendo sua colaboração na pesquisa livre e de espontânea vontade.

Rubrica do Participante: _____

Rubrica do Pesquisador: _____

4. RISCOS: 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.

5. BENEFÍCIOS: Não há benefício direto ao participante. Entretanto, ao partir deste estudo poderá ser identificada uma nova biomolécula que pode beneficiar o tratamento de doenças cardiovasculares associadas à trombose.

O Sr.(a) tem liberdade de se recusar a participar e ainda se recusar a continuar participando em qualquer fase da pesquisa, sem qualquer prejuízo para o Sr.(a). Sempre que quiser, poderá pedir mais informações sobre a pesquisa por meio dos e-mails dos pesquisadores e do Comitê de Ética e Pesquisa da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul abaixo discriminados.

O participante possui a garantia de receber uma via deste termo e em caso de qualquer dano decorrente desta pesquisa terá direito à indenização.

Os dados obtidos por meio desta pesquisa serão mantidos em arquivo digital em posse dos pesquisadores responsáveis pelo período de 5 anos contabilizados a partir do encerramento da pesquisa e serão indisponibilizados ao fim deste prazo.

Após estes esclarecimentos, solicitamos o seu consentimento de forma livre e espontânea para participar desta pesquisa. Portanto preencha, por favor, os itens que se seguem

Rubrica do Participante: _____

Rubrica do Pesquisador: _____

CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Tendo em vista os itens acima apresentados de forma livre e esclarecida, manifesto meu consentimento em participar da pesquisa. Declaro que recebi cópia desse termo de consentimento, e autorizo a realização da pesquisa e a divulgação dos dados obtidos neste estudo.

Campo Grande, ____/____/____

Assinatura do participante da pesquisa

Eduardo Benedetti Parisotto

Laboratório de Análises Clínicas – LAC – Hematologia/LAC/FACFAN
Universidade Federal do Mato Grosso do Sul - UFMS
Campus Universitário 79070900 - Campo Grande, MS – Brasil- Telefone: (067)
3345-7962
e-mail: eduardo.parisotto@ufms.br, parisotto.edu@gmail.com

PARA MAIORES ESCLARECIMENTOS

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 17:30 no período vespertino.

ANEXO II – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos (CEP/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*.

Endereço: Av. Costa e Silva, s/nº - Pioneiros & Prédio das Pró-Reitorias & Hércules

Bairro: Pioneiros

CEP:

70.070-900

Município: CAMPO GRANDE

Telefone: (67)3345-7187

Fax: (67)3345-7187

E-mail:

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.
- 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.

Endereço: Av. Costa e Silva, s/nº - Pioneiros & Prédio das Pró-Reitorias & Hércules
Bairro: Pioneiros **CEP:** 70.070-900
Município: CAMPO GRANDE
Telefone: (67)3345-7187 **Fax:** (67)3345-7187 **E-mail:**

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 & Prédio das Pró-Reitorias & Hércules		
Bairro: Pioneiros	CEP:	
70.070-900	Município: CAMPO GRANDE	
Telefone: (67)3345-7187	Fax: (67)3345-7187	E-mail:

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.

Endereço: Av. Costa e Silva, s/nº - Pioneiros & Prédio das Pró-Reitorias & Hércules		
Bairro: Pioneiros	CEP:	
70.070-900	Município: CAMPO GRANDE	
Telefone: (67) 3345-7187	Fax: (67) 3345-7187	E-mail:

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.

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.

Endereço: Av. Costa e Silva, s/nº - Pioneiros & Prédio das Pró-Reitorias & Hércules		
Bairro: Pioneiros	CEP:	
70.070-900	Município: CAMPO GRANDE	
Telefone: (67)3345-7187	Fax: (67)3345-7187	E-mail:

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 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/>

Endereço: Av. Costa e Silva, s/nº – Pioneiros & Prédio das Pró-Reitorias & Hércules		
Bairro: Pioneiros	CEP:	
70.070-900	Município: CAMPO GRANDE	
Telefone: (67)3345-7187	Fax: (67)3345-7187	E-mail:

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/>

– 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/>

Endereço: Av. Costa e Silva, s/nº – Pioneiros & Prédio das Pró-Reitorias & Hércules

Bairro: Pioneiros

CEP:

70.070-900

Município: CAMPO GRANDE

Telefone: (67)3345-7187

Fax: (67)3345-7187

E-mail:

- 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/>

Endereço: Av. Costa e Silva, s/nº - Pioneiros & Prédio das Pró-Reitorias & Hércules
Bairro: Pioneiros **CEP:** 70.070-900
Município: CAMPO GRANDE
Telefone: (67)3345-7187 **Fax:** (67)3345-7187 **E-mail:**

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 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.

Endereço: Av. Costa e Silva, s/nº - Pioneiros & Prédio das Pró-Reitorias & Hércules
Bairro: Pioneiros **CEP:** 70.070-900
Município: CAMPO GRANDE
Telefone: (67)3345-7187 **Fax:** (67)3345-7187 **E-mail:**

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.

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

Endereço: Av. Costa e Silva, s/nº - Pioneiros & Prédio das Pró-Reitorias & Hércules
Bairro: Pioneiros **CEP:** 70.070-900
Município: CAMPO GRANDE
Telefone: (67) 3345-7187 **Fax:** (67) 3345-7187 **E-mail:**

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/>

Endereço: Av. Costa e Silva, s/nº - Pioneiros & Prédio das Pró-Reitorias & Hércules		
Bairro: Pioneiros	CEP:	
70.070-900	Município: CAMPO GRANDE	
Telefone: (67)3345-7187	Fax: (67)3345-7187	E-mail:

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_MAI O2022.pdf	13/05/2022 14:01:31	DENISE CAROLINE LUIZ SOARES	Aceito
Investigador	PROJETO_DETALHADO_MAI O2022.pdf	13/05/2022 14:01:31	DENISE CAROLINE LUIZ SOARES	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_REVISADO_MAI O.pdf	13/05/2022 14:01:15	DENISE CAROLINE LUIZ SOARES	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	RESOLUCAOCASFACFANUF eMSn473de18022022.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

Endereço: Av. Costa e Silva, s/nº - Pioneiros & Prédio das Pró-Reitorias & Hércules
Bairro: Pioneiros **CEP:** 70.070-900 **Município:** CAMPO GRANDE
Telefone: (67) 3345-7187 **Fax:** (67) 3345-7187 **E-mail:**

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 & Prédio das Pró-Reitorias & Hércules
Bairro: Pioneiros **CEP:** 70.070-900
Município: CAMPO GRANDE
Telefone: (67) 3345-7187 **Fax:** (67) 3345-7187 **E-mail:**