

UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA NUTRIÇÃO

CRISTIANE COSMO SILVA LUIS

**AÇÃO ANTITROMBÓTICA, ANTIAGREGANTE, ANTIOXIDANTE E
MODULADORA DA FUNÇÃO VASCULAR EM RATOS SUPLEMENTADOS COM
O ÓLEO DA AMÊNDOA DO BARU (*Dipteryx alata* Vog.)**

João Pessoa-PB

2018

CRISTIANE COSMO SILVA LUIS

**AÇÃO ANTITROMBÓTICA, ANTIAGREGANTE, ANTIOXIDANTE E
MODULADORA DA FUNÇÃO VASCULAR EM RATOS SUPLEMENTADOS COM
O ÓLEO DA AMÊNDOA DO BARU (*Dipteryx alata* Vog.)**

João Pessoa-PB

2018

CRISTIANE COSMO SILVA LUIS

**AÇÃO ANTITROMBÓTICA, ANTIAGREGANTE, ANTIOXIDANTE E
MODULADORA DA FUNÇÃO VASCULAR EM RATOS SUPLEMENTADOS COM
O ÓLEO DA AMÊNDOA DO BARU (*Dipteryx alata* Vog.)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Nutrição, Centro de Ciências da Saúde, da Universidade Federal da Paraíba em cumprimento aos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências da Nutrição.

Área de concentração: Clínica e Epidemiologia aplicada à Nutrição

Orientador: Prof. Dr. Robson Cavalcante Veras

João Pessoa-PB

2018

Catálogo na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

L953a Luis, Cristiane Cosmo Silva.

AÇÃO ANTITROMBÓTICA, ANTIAGREGANTE, ANTIOXIDANTE E
MODULADORA DA FUNÇÃO VASCULAR EM RATOS SUPLEMENTADOS
COM O ÓLEO DA AMÊNDOA DO BARU (*Dipteryx alata* Vog.) /
Cristiane Cosmo Silva Luis. - João Pessoa, 2018.
94 f.

Orientação: Robson Cavalcante Veras.
Dissertação (Mestrado) - UFPB/CCS.

1. Trombose. 2. Agregação plaquetária. 3. Reatividade
vascular. 4. Óleo da *Dipteryx alata* Vog. 5. Vitamina E.
I. Veras, Robson Cavalcante. II. Título.

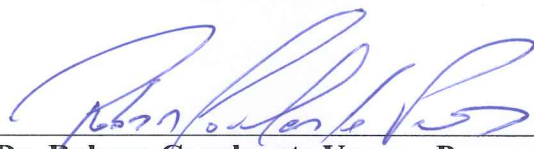
UFPB/BC

CRISTIANE COSMO SILVA LUIS

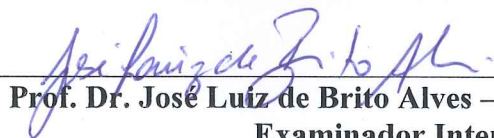
**AÇÃO ANTITROMBÓTICA, ANTIAGREGANTE, ANTIOXIDANTE E
MODULADORA DA FUNÇÃO VASCULAR EM RATOS SUPLEMENTADOS COM
O ÓLEO DA AMÊNDOA DO BARU (*Dipteryx alata* Vog.)**

Dissertação de Mestrado aprovada em 21 / 03 /2018.

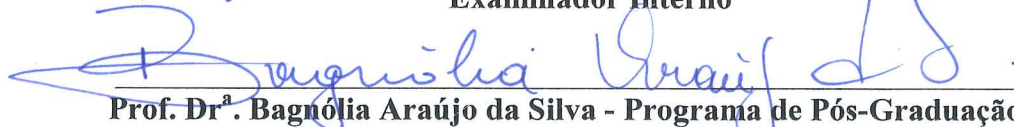
BANCA EXAMINADORA



**Prof. Dr. Robson Cavalcante Veras – Programa de Pós-Graduação
em Ciências da Nutrição (PPGCN) do Centro de Ciências da Saúde (CCS) da
Universidade Federal da Paraíba (UFPB)
Coordenador da Banca Examinadora**



**Prof. Dr. José Luiz de Brito Alves – PPGCN/CCS/UFPB
Examinador Interno**



**Prof. Dr.ª. Bagnólia Araújo da Silva - Programa de Pós-Graduação em
Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos (PPGPNSB)/ CCS/UFPB
Examinadora Externa**

**Prof. Dr.ª. Jailane de Sousa Aquino – PPGCN/CCS/UFPB
Examinadora Suplente Interna**

**Prof. Dr.ª. Islania Giselia Albuquerque Gonçalves –
CCS/UFPB
Examinadora Suplente Externa**

À minha mãe, Maria, por ser exemplo de força, humildade e amor, ao meu pai (in memoriam), Luiz, meu exemplo de perseverança, ao meu esposo Alixandre, pelo companheirismo e incentivo.

Dedico.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, pelo dom da vida, Nele, sei que tudo posso, pois a fé que possuo me moveu e move em todos os instantes, principalmente durante esta longa jornada.

Ao meu orientador Prof. Dr. Robson Cavalcante Veras, por toda paciência ao me orientar, pelos conhecimentos passados e ensinamentos, pela disponibilidade perante todos os momentos de dúvidas e aflições com metodologias e equipamentos.

Ao Programa de Pós-graduação em Ciências da Nutrição nas pessoas do coordenador Prof. Dr. Evandro Leite de Sousa, vice-coordenador José Luiz de Brito Alves e seus professores pela oportunidade de realizar minha pesquisa

Ao professor Dr. Isac Almeida de Medeiros do Laboratório de Farmacologia Cardiovascular, por permitir a pesquisa em seu laboratório, por ter usado equipamentos e substâncias.

.Ao Prof. Dr. Josean Fachine Tavares do Laboratório Multiusuário de Caracterização e Análise, pela compra dos padrões de tocoferóis e pelo uso do seu laboratório e substâncias.

À Prof. Dr^a Mariana Vieira Sobral e a doutoranda Viviane Mendes Manguiera do Laboratório de OncoFarmacologia pela realização do teste de toxicidade.

Ao Prof. Dr. José Alixandre de Sousa Luis da Universidade Federal de Campina Grnade pelas contribuições com o desenvolvimento da pesquisa e pela caracterização de tocoferóis no óleo e no plasma. E como meu esposo por todo o amor dispensado a mim, pelo companheirismo e força nos momentos difíceis dessa jornada, por estar sempre ao lado me apoiando, me ensinando e incentivando a chegar aos meus objetivos.

Ao doutorando Yuri Manguiera do Nascimento do Laboratório Multiusuário de Caracterização e Análise pelo desenvolvimento da caracterização de tocoferóis no óleo e no plasma.

Ao aluno vinculado ao Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica (PIBIC) do Laboratório de Farmacologia Cardiovascular Júlio César Pinheiro Lúcio de Oliveira pela ajuda com os experimentos de reatividade vascular, trombose e agregação plaquetária.

À coodernadora do Laboratório de Farmacologia Cardiovascular Fátima de Lourdes Assunção Araújo de Azevedo e a doutoranda no Laboratório de Farmacologia Cardiovascular Lorena Soares Bezerra pelas contribuições com os experimentos da análise de radical livre no plasma e reatividade vascular, respectivamente.

À minha mãe Maria José Cosmo da Silva, por ser uma mãe maravilhosa, compreensiva, amorosa, guerreira. Por ter me dado apoio todos esses anos, desde a graduação até este momento. Por ter assumido o papel de mãe e pai, educando, protegendo e guiando pelos caminhos certos.

Ao meu pai Luiz Cosmo da Silva (*in memoriam*), por ter sido um pai amoroso, brincalhão, educador, um professor da vida. Com ele aprendi a lutar, a buscar os meus objetivos, a nunca desistir dos meus sonhos, a nunca me deixar abater e cruzar os braços diante de uma dificuldade, a lutar pela vida até o último instante, como ele fez. Agradeço-te papai por ter deixado esses valores para mim e para os meus irmãos.

As colegas de laboratório doutorandas Priscilla Maria Pereira Maciel, Luciana Tavares Toscano e mestrandas Tays Amanda Felisberto da Silva, por terem me ajudado nos momentos nos quais precisei, tirando dúvidas e contribuindo com a execução de alguns experimentos.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) pela concessão da bolsa de pesquisa e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo suporte financeiro

A percepção do desconhecido é a mais fascinante das experiências. O homem que não tem os olhos abertos para o misterioso passará pela vida sem ver nada.

Albert Einstein

RESUMO

A trombose é uma Doença Cardiovascular (DCV) que aumenta o risco de morte quando relacionada aos mecanismos patológicos de Doença Isquêmica Cardíaca e Acidente Vascular Encefálico Isquêmico. O desenvolvimento das DCVs está inversamente relacionado ao consumo de alimentos ricos nos nutrientes vitamina E (Vit.E), ômega 3 e 9. Assim, objetivou-se avaliar o efeito da suplementação do óleo da amêndoa da *Dipteryx alata* Vog. (*D. alata* Vog.) sobre a trombose induzida e agregação plaquetária em ratos. Por conseguinte, realizou-se a quantificação de tocoferóis no óleo e avaliou-se a toxicidade sobre o Sistema Nervoso Central (SNC) e Autônomo (SNA). O tratamento oral teve duração de 10 dias, o grupo Controle recebeu 1 mL de NaCl 0,9 %, os dois grupos suplementados com o óleo da *D. alata* Vog. receberam as doses 7,2 mg/kg/dia e 14,4 mg/kg/dia cada e o grupo Vit. E recebeu 0,42 mg/Kg/dia de uma formulação farmacêutica de Vit. E diluída em 0,2 mL de óleo mineral. No 11º dia após o período de 10 dias de suplementação foi dado início ao protocolo experimental com indução da trombose na artéria carótida com FeCl₃ e monitoramento do fluxo sanguíneo com posterior dissecação da carótida para remoção do trombo; no plasma foram analisados agregação plaquetária, produção de ânion superóxido (O₂•-) e quantificação de tocoferóis; a artéria aorta torácica foi dissecada para a análise da reatividade vascular. De acordo com os resultados obtidos o teor de tocoferóis encontrado no óleo foi de 2,89% e a avaliação da toxicidade mostrou que as doses testadas de 300 e 2000 mg/kg do óleo não provocaram alterações comportamentais e nem mortes dos animais. O óleo da *D. alata* Vog. na dose 14,4 mg/kg teve efeito antitrombótico promovendo aumento no tempo de oclusão nesse grupo de 138,6% e redução dos pesos dos trombos úmido e seco de 24 h em 62,9 e 61,8%, respectivamente, comparados ao controle. A dose *D. alata* Vog. 14,4 mg/kg também causou diminuição de 31% na agregação plaquetária induzida pelo ADP em relação ao Controle. A medida da fluorescência do DHE mostrou diminuição da produção de O₂•- de 43% no grupo *D. alata* Vog. 7,2 mg/kg e de 32,8% no Vit. E. Já a emissão da fluorescência do DHE na plaqueta agregada foi de 75,1% no *D. alata* Vog. 7,2 mg/kg, 76,6% no *D. alata* Vog. 14,4 mg/kg e 79,4% no Vit.E, todas as medidas de emissão em relação aos controles. O estudo de reatividade mostrou que o óleo da *D. alata* Vog. nas doses 7,2 mg/kg, 14,4 mg/kg e a Vit. E 0,42 mg/kg reduziram o E_{max} de contração da Phe no vaso em 36,4; 57,7 e 42 %, respectivamente, comparados ao Controle. Já nos anéis sem endotélio o óleo da *D. alata* Vog. na dose 7,2 mg/kg diminuiu em 33,8 % e na dose 14,4 mg/kg diminuiu em 35,2 % o E_{max} de contração da Phe no vaso comparados ao Controle, porém esse efeito foi mais acentuado na presença de endotélio. No grupo suplementado com o óleo da *D. alata* Vog. dose 14,4 mg/kg, houve aumento no pD₂ dos agentes vasorelaxantes ACh em 14,6 % comparado ao grupo Vit. E 0,42 mg/kg e NPS em 17,6; 15,5 e 13,8 % comparados ao Controle, *D. alata* Vog. 7,2 mg/kg e Vit. E 0,42 mg/kg, respectivamente. Portanto, os achados indicam que o óleo não é tóxico nas doses testadas, previne trombose, reduz agregação plaquetária e a produção de O₂•- e modula a função vascular, apresentando efeito superior ao suplemento de Vit. E. Assim, seu uso pode ser uma possível estratégia para a prevenção de DCVs.

Palavras-chave: Trombose. Agregação plaquetária. Reatividade vascular. Óleo da *Dipteryx alata* Vog. Vitamina E.

ABSTRACT

Thrombosis is a Cardiovascular Disease (CVD) that increases the risk of death when it is related to the pathological mechanisms of Ischemic Heart Disease and Ischemic Stroke. The development of CVDs is inversely related to the consumption of foods rich in vitamin E nutrients (Vit. E), omegas 3 and 9. The objective of this study was to evaluate the effect of supplementation of the almond oil of *Dipteryx alata* Vog. (*D. alata* Vog.) On induced thrombosis and platelet aggregation in rats. Therefore, tocopherols were quantified in the oil and toxicity was assessed on the Central Nervous System (CNS) and Autonomous System (ANS). The oral treatment lasted 10 days, the Control group received 1 mL of 0.9 % NaCl, the two groups supplemented with the oil of *D. alata* Vog. received doses of 7.2 mg/kg/day and 14.4 mg/kg/day each and Vit. E received 0.42 mg/kg/day of a pharmaceutical formulation of Vit. E diluted in 0.2 mL of mineral oil. On the 11th day after the 10-day supplementation period, the experimental protocol with induction of thrombosis in the carotid artery with FeCl_3 and monitoring of blood flow with subsequent dissection of the carotid artery to remove the thrombus was started; in plasma were analyzed platelet aggregation, superoxide anion production ($\text{O}_2^{\bullet-}$) and tocopherols quantification; the thoracic aorta artery was dissected for vascular reactivity analysis. According to the results obtained the tocopherols content found in the oil was 2.89 % and the toxicity evaluation showed that the doses tested of 300 and 2000 mg/kg of the oil did not caused behavioral alterations nor neither deaths of the animals. The oil of *D. alata* Vog. in the dose 14.4 mg/kg had an antithrombotic effect promoting an increase in the occlusion time in this group of 138.6 % and a reduction in the weights of the wet and dry thrombi of 24 h in 62.9 and 61.8 %, respectively, compared to control. The dose *D. alata* Vog. 14.4 mg/kg also caused a 31 % decrease in ADP-induced platelet aggregation in relation to Control. The measurement of the DHE fluorescence showed a decrease in the $\text{O}_2^{\bullet-}$ production of 43 % in the *D. alata* Vog. 7.2 mg/kg group and 32.8 % in the Vit. E. The emission of the fluorescence of the DHE in the aggregate platelet was 75.1 % in *D. alata* Vog. 7.2 mg/kg, 76.6 %, in *D. alata* Vog. 14.4 mg/kg and 79.4 % in Vit.E, all emission measurements in relation to controls. The reactivity study showed that the oil of *D. alata* Vog. at doses 7.2 mg/kg, 14.4 mg/kg and Vit. E 0.42 mg/kg reduced the Phe contraction E_{max} in the vessel at 36.4; 57.7 and 42 %, respectively, compared to Control. Already in the rings without endothelium the oil of *D. alata* Vog. at 7.2 mg/kg decreased by 33.8 % and at the dose 14.4 mg/kg decreased the E_{max} of contraction of Phe in the vessel by 35.2 % compared to Control, but this effect was more pronounced in the presence of endothelium. In the group supplemented with the oil of *D. alata* Vog. dose 14.4 mg/kg, there was an increase in pD_2 of the vasorelaxant agents, ACh in 14.6 % compared to Vit. E 0.42 mg/kg and NPS at 17.6; 15.5 and 13.8 % compared to Control, *D. alata* Vog. 7.2 mg/kg and Vit. E and 0.42 mg/kg, respectively. Therefore, the findings indicate that the oil is non-toxic at the doses tested, prevents thrombosis, reduces platelet aggregation and produces $\text{O}_2^{\bullet-}$ and modulates vascular function, showing superior effect to Vit.E. Thus, its use may be a possible strategy for the prevention of CVDs.

Keywords: Thrombosis. Platelet aggregation. Vascular reactivity. Oil of *Dipteryx alata* Vog. Vitamin E.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1- Fruto e amêndoa <i>Dipteryx alata</i> Vog.....	21
Figura 2- Participação das plaquetas no processo de hemostasia durante a formação do tampão.....	27
Figura 3- Estimulação, adesão, ativação e agregação plaquetária.....	28
Figura 4- Estrutura química da vitamina E.....	32
Figura 5- Hidrólise do ATP e do ADP promovida pela vitamina E e consequente inibição da interação dos mesmos com seus receptores-alvos (P2X ₁ , P2Y ₁ e P2Y ₁₂). ..	37
Figura 6- Cromatógrafo Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan.....	41
Figura 7- Fluxograma de realização do teste de toxicidade aguda com uma dose inicial de 300 mg/kg.....	42
Figura 8- Sistema de aquisição de dados acoplado (T106 Transonic Systems Inc.) a sonda ultrassônica X1.....	45
Figura 9- Monitoramento do fluxo sanguíneo.....	45
Figura 10- Agregômetro (AgreGO, São Paulo, Brasil).....	47
Figura 11- Citômetro FACS Canto-II (BD).....	48
Figura 12- Banho de órgão acoplado ao transdutor de força (MLT020, AD Instruments, Austrália).....	50
Figura 13- Representação da verificação da viabilidade do órgão e da integridade do endotélio vascular.....	51

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Programa do gradiente de eluição dos solventes na separação de Tocoferóis em óleo da <i>Dipteryx alata</i> Vog. e plasma dos animais.....	40
Tabela 2- Composição da solução HEPES.....	48
Tabela 3- Composição da solução de KREBS para aorta torácica isolada de rato.....	52
Tabela 4- Composição da solução de KCl 60mM para aorta torácica isolada de rato...	52

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AVE	Acidente Vascular Encefálico
AOCS	<i>American Oil Chemists' Society</i>
AA	Ácido araquidônico
cAMP	Monofosfato cíclico de adenosina
AMP	Monofosfato de adenosina
ADP	Difosfato de adenosina
ATP	Trifosfato de adenosina
ADA	Desaminase de adenosina
APLT	Translocase de aminofosfolipídeo
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CCS	Centro de Ciências da Saúde
cGMP	Guanosina 3',5'-cíclica monofosfato
CMLV	Células do Músculo Liso Vascular
COX	Ciclo-oxigenase
DCV	Doenças Cardiovasculares
DIC	Doença Isquêmica Cardíaca
DRG	Dieta rica em gordura
DRI	<i>Dietary Refence Intakes</i> (Ingestão Dietética de Referência)
DV	Digestibilidade verdadeira
DHE	Dihidroetidina
DPPH	2,2-difenil-1-picril-hidrazila
E _{max}	Efeito máximo
EP	Embolia pulmonar
E-NPP	5'-nucleotidase, ectonucleótido-pirofosfatase/fosfodiesterase
eNOS	Sintase deóxido nítrico endotelial

FeCl ₃	Cloreto férrico
FHDE	Fator Hiperpolarizante Derivado do Endotélio
gama-GCS	Gama-glutamilcisteína
GC	Clicase de guanilil
GHS	<i>Globally Harmonized Classification System</i> (Sistema de Classificação Globalmente Harmonizado)
GP	Glicoproteína
GTP	Trifosfato de guanosina
GPCRs	Receptores como os acoplados a proteína G
HDL	Lipoproteína de alta densidade
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i> (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência)
IGDFR	Impacto global das doenças, lesões e fatores de risco
IOM	<i>Institute of Medicine</i> (Instituto de Medicina)
IpeFarM	Instituto de Pesquisa em Farmacor e Medicamentos
KCl	Cloreto de potássio
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
MDA	Malondialdeído
MUFA	Ácidos graxos monoinsaturados
NO	Óxido nítrico
NTPDase	Ectonucleósido trifosfato difosfoidrolase
OMS	Organização Mundial da Saúde
OECD	<i>Organisation for Economic Co-operation and Development</i> (Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Económico)
OncoFar	Laboratório de OncoFarmacologia
PARF	Poder antioxidante reduzido férrico
PDCAAS	Escore químico de aminoácido corrigido pela digestibilidade de proteína
pD ₂	Logaritmo negativo na base 10 da CE ₅₀
PE	Fosfatidiletanolamina

PGI ₂	Prostaciclina
PI3-K	Cinase 3-fosfoinositol
PKA	Proteína cinase A
PKC	Proteína cinase C
PKG	Proteína cinase G
PMA	Forbol-12-miristato-13-acetato
PPP	Plasma Pobre em Plaquetas
PPgPNSB	Programa de Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos
PRP	Plasma Rico em Plaquetas
PS	Fosfatidilserina
RDA	<i>Recommended Dietary Allowance</i> (Ingestão diária recomendada)
SNA	Sistema Nervoso Autônomo
SNC	Sistema Nervoso Central
SOD	Superóxido dismutase
TC	Toxicidade Controle
TEV	Tromboembolismo venoso
TVP	Trombose venosa profunda
TXB ₂	Tromboxano inativo estável B ₂
TXA ₂	Tromboxano A ₂
UFPB	Universidade Federal da Paraíba
VASP	Fosfoproteína vasodilatadora
Vit. E	Vitamina E
vWF	fator de von Willebrand
WHO	<i>World Health Organization</i> (Organização Mundial da Saúde)

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	18
2 REFERENCIAL TÉORICO.....	20
2.1 ASPECTOS BOTÂNICOS, ECOLÓGICOS DO BARU (<i>Dipteryx alata</i> Vog.) E COMPOSIÇÃO NUTRICIONAL DE SUA AMÊNDOA.....	20
2.1.1 Utilização do Baru (<i>Dipteryx alata</i> Vog.), uso medicinal e estudos <i>in vivo</i> e em <i>in vitro</i>.....	23
2.2 ETIOLOGIA DA TROMBOSE, SISTEMA HEMOSTÁSICO E FUNÇÃO VASCULAR.....	25
2.3 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DA VITAMINA E (TOCOFEROL) ATUAÇÃO D SOBRE A AGREGAÇÃO PLAQUETÁRIA E TROMBOSE.....	31
3 ABORDAGEM METODOLÓGICA.....	39
3.1 TIPO DE PESQUISA.....	39
3.2 ASPECTOS ÉTICOS.....	39
3.3 DETERMINAÇÃO DE TOCOFERÓIS NO ÓLEO DA <i>Dipteryx alata</i> Vog.....	39
3.4 ANIMAIS DE EXPERIMENTAÇÃO.....	41
3.5 AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE NÃO-CLÍNICA AGUDA.....	41
3.6 DESENHO EXPERIMENTAL.....	43
3.7 ANÁLISES PRÉ-EUTANÁSIA.....	43
3.7.1 Indução da trombose e monitoramento do fluxo sanguíneo.....	43
3.8 DESCRIÇÃO DO MÉTODO DE EUTANÁSIA.....	46
3.9 ANÁLISE PÓS-EUTANÁSIA.....	46
3.9.1 Obtenção do sangue total e preparação das plaquetas lavadas de rato.	46
3.9.2 Medida da agregação plaquetária por transmissão luminosa.....	46
3.9.3 Avaliação da produção de ânions superóxidos (O₂•-) no plasma rico em plaquetas.....	47
3.9.4 Determinação de α-tocoferol no plasma.....	48
3.9.5 Estudo da reatividade vascular em aorta.....	49
3.10 ANÁLISE ESTATÍSTICAS.....	52
REFERÊNCIAS.....	54
APÊNDICES.....	61

Apendice 1 – Carta de Anuência.....	62
Apêndice 2- Supplementation with <i>Dipteryx alata</i> Vog. almond oil: a natural alternative for thrombus prevention and vascular response improvement.....	63
ANEXOS.....	91
Anexo 1- Certidão emitida pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da UFPB.....	92
Anexo 2-Triagem farmacológica comportamental.....	93
Anexo 3- Laúdo Técnico do óleo de Baru.....	94

1 INTRODUÇÃO

O Barueiro (*Dipteryx alata* Vog) popularmente chamado de Baru é uma espécie da família Leguminosae encontrada principalmente nas matas e cerrados do Brasil Central, envolvendo terras dos estados de Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Goiás, Minas Gerais e Distrito Federal; ocorrendo também, em menor frequência, nos estados do Maranhão, Tocantins, Pará, Rondônia, Bahia, Piauí e norte de São Paulo (CARRAZZA; ÁVILA, 2010). Sendo também encontrada no Paraguai e próximo ao complexo do Pantanal (SANO; RIBEIRO; BRITO, 2004).

O Baru é uma vítima da ação predatória do ser humano e vem enfrentando risco de extinção em função de seu uso na indústria moveleira e da construção civil. Alguns estados brasileiros têm elaborado leis, como a Lei “Pró-Pequi” que proíbem a derrubada de espécies frutíferas do Cerrado, dentre as quais o barueiro, e prevêm incentivos para a produção agroextrativista. O fruto do Baru é aproveitado integralmente pela população local, a polpa é utilizada na produção de farinhas e geléias e sua amêndoa (semente) é bastante consumida, principalmente pelas alegações afrodisíacas (CARRAZZA; ÁVILA, 2010).

A amêndoa do Baru possui um elevado valor alimentar devido à sua composição nutricional, com teores significativos de minerais e vitamina E (α -, β -, γ -, e δ -tocoferol), compostos bioativos fenólicos, fitoesteróis, ômega 9, 6 e 3. Destaca-se também a composição de macronutrientes como: proteínas digeríveis compostas de aminoácidos essenciais, fibras, lipídios com alto grau de insaturação com predominância dos ácidos graxos oléico (ômega 9) e linoléico (ômega 6), e baixas concentrações de ácidos graxos saturados (TAKEMOTO et al., 2001; SANO; RIBEIRO; BRITO, 2004; VERA et al., 2009; SOUSA et al., 2011; BORGES, 2013).

A composição nutricional do Baru, principalmente pela abundância de ácido oléico e vitamina E, está associada à prevenção de Doenças Cardiovasculares (DVC), dentre elas as ateroscleróticas e hemostáticas, como a trombose. A vitamina E apresenta papel fundamental na neutralização das espécies de radicais livres decorrentes dos processos do metabolismo e do próprio meio ambiente. Atua protegendo os lipídeos da bicamada celular e as LDLs circulantes da oxidação, promovendo assim, benefícios ao organismo como um todo. No sistema hemostático em particular, a vitamina E age diminuindo a coagulação sanguínea, consequentemente a trombose (NAGÃO et al., 2012; GUINAZI et al., 2013).

Neste contexto, o potencial benéfico do óleo da *Dipteryx alata* Vog. sobre as DCV deve-se pela presença do nutriente vitamina E e dos compostos bioativos ômega 9 e 3,

compostos fenólicos e fitoesteróis em teores significativos, tornando-o um alimento nutricionalmente interessante para ser utilizado como suplemento ou complemento alimentar (SILVA et al. 2014). O consumo desse nutriente e dos compostos bioativos estão inversamente relacionados ao aparecimento das DCV. Desse modo, fontes alimentares naturais que possuam principalmente a vitamina E, como as amêndoas e seus óleos são importantes para introdução como suplementação alimentar, numa estratégia para a prevenção de doenças, principalmente as relacionadas ao sistema cardiovascular, além de serem mais baratos, acessíveis e eficazes, são mais seguros, pois o consumo a partir de alimentos *in natura* apresenta menor risco de toxicidade quando comparado à suplementação farmacológica isolada da vitamina E. Portanto, este estudo não-clínico visou investigar se o óleo da amêndoa de *Dipteryx alata* Vog. causa alguma proteção contra a formação de trombos e agregação plaquetária excessiva, consequentemente, melhorando de forma eficaz o fluxo sanguíneo.

Desta forma o presente estudo contemplou como objetivo geral: avaliar o efeito da suplementação do óleo da amêndoa *Dipteryx alata* Vog. sobre a trombose induzida e agregação plaquetária em ratos e como objetivos específicos 1: determinar o teor de tocoferóis no óleo e no plasma dos animais; 2: avaliar a toxicidade do óleo da *Dipteryx alata* Vog. sobre o Sistema Nervoso Central e Autônomo e o risco de morte dos ratos; 3: avaliar o efeito da suplementação do óleo da *Dipteryx alata* Vog. sobre o tempo de oclusão do fluxo sanguíneo pela formação de trombos induzidos pelo FeCl₃ na artéria carótida de ratos; 4: avaliar o efeito da suplementação do óleo da *Dipteryx alata* Vog. sobre a agregação plaquetária; 5: analisar o efeito antioxidante da suplementação do óleo *Dipteryx alata* Vog. sobre as plaquetas; 6: analisar o efeito da suplementação do óleo da *Dipteryx alata* Vog. sobre a reatividade vascular.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 ASPECTOS BOTÂNICOS, ECOLÓGICOS DO BARU (*Dipteryx alata* Vog.) E COMPOSIÇÃO NUTRICIONAL DE SUA AMÊNDOA

O Barú (*Dipteryx alata* Vog.) é uma árvore de grande porte, medindo em torno de 25 metros de altura e 70 cm de diâmetro, apresenta vida útil em volta de 60 anos. Possui uma copa densa e arredondada e, crescimento rápido, apresentando grande importância na fixação de carbono da atmosfera. Sua primeira frutificação ocorre com cerca de 6 anos, porém pode variar dependendo das condições de solo e água. (CARRAZZA; ÁVILA, 2010). Floresce de outubro a janeiro e os frutos amadurecem entre março e agosto, produzindo em média de 2000 a 6000 frutos por planta. Contudo, a safra pode apresentar-se de maneira intermitente com variações bruscas na quantidade de frutos de um ano para o outro, considerando uma safra para a utilização comercial a cada 2 anos. O fruto da árvore, caracterizado como sendo do tipo drupa, por possuir polpa fibrosa com um centro endurecido contendo uma única semente, apresenta comprimento variando entre 1,5 a 5 cm, possui coloração marrom-clara e aspecto achatado ovóide. As sementes (amêndoas) apresentam formato elipsóide, com comprimento e largura variando entre 1,0 a 3,5 cm e 0,9 a 1,3 cm, respectivamente. A amêndoa de *Dipteryx alata* Vog. é totalmente comestível, possui uma fina casca marrom pálido e polpa amarela, com sabor doce e aspecto duro (Figura 1) (FREITAS; NAVES, 2010; CRUZ et al., 2011; ZUFFO; ANDRADE; ZUFFO JÚNIOR, 2014).

A amêndoa *Dipteryx alata* Vog. possui alto valor calórico (476 e 560 kcal/100g), em função da elevada presença de óleos (38,2 a 40,2%) sendo este o macronutriente de maior porcentagem, seguido das proteínas (23,9 a 29,6%) e carboidratos (7,3 a 15,8%) em 100g. O quantitativo de proteínas da amêndoa *Dipteryx alata* Vog. é superior ao quantitativo encontrado na ervilha (*Pisum sativum* L.) com 22%, no feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) com 21%, no grão de bico (*Cicer arietinum* L.) com 18% e na lentilha (*Lens culinaris*) com 21%. Apresenta ainda, valores de proteína maiores em relação a outras oleaginosas como a amêndoa (*Prunus dulcis*), castanha do Brasil (*Bertholletia excelssa*), caju (*Anacardium occidentale*), macadâmia (*Macadamia roatografi*), pecã (*Carya illinoensis*), pinhão (*Pinus pinea*), pistache (*Pistacia vera*), nozes (*Juglans regia*) e amendoim (*Arachis hypogaea*), cujos valores destas oleaginosas variam entre 7 e 22% (TAKEMOTO et al, 2001; SANO; RIBEIRO; BRITO, 2004; VERA et al., 2009; CRUZ et al., 2011; SOUSA et al., 2011).

Figura 1- Fruto e amêndoa *Dipteryx alata* Vog.



Fonte: 21roma://paessevenboys.wordpress.com/2014/07/09/castanha-de-Baru-do-brasil-para-o-mundo

Fernandes et al., (2010) compararam a digestibilidade do Baru e constatou ser superior à caseína e ao amendoim, atingindo um escore químico de aminoácido corrigido pela digestibilidade protéica (PDCAAS) de 73,10%, para a dieta que continha amêndoa *Dipteryx alata* Vog.. Outro estudo, realizado por Sousa et al., (2011), também analisou a digestibilidade em experimentos com ratos e obteve valores maiores para a Digestibilidade Verdadeira (DV; 86.38%) e para PDCAAS (90.70 %) em relação ao estudo anterior e às dietas compostas de caseína, amendoim, amêndoa de pequi e castanha de caju.

Assim, além da elevada digestibilidade das proteínas, a amêndoa *Dipteryx alata* Vog. também possui um significativo conteúdo de aminoácidos essenciais. De acordo com o requerimento padrão de aminoácidos essenciais estabelecido pela *World Health Organization* (Organização Mundial da Saúde) (WHO, 2007), as proteínas da amêndoa do Baru suprem 100% das necessidades nutricionais. As quais são compostas pelos aminoácidos essenciais (mg/100 g de proteína) metionina + cisteína (29,8), fenilalanina + tirosina (88,5), histidina (23,4), isoleucina (32,5), leucina (74,4), lisina (66,4), treonina (55,3), triptofano (11,2), valina (55,6). Além de fornecer também aminoácidos não-essenciais como aspartato (101,6), glutamato (216,8), alanina (46,1), arginina (85,6), glicina (47,2), prolina (55,3) e serina (44,1) (SANO; RIBEIRO; BRITO, 2004; FREITAS; NAVES, 2010; FERNANDES et al., 2010; SOUSA et al., 2011).

Com relação aos teores de fibras totais, solúveis e insolúveis presentes em 100 g da amêndoa *Dipteryx alata* Vog. foram encontrados os valores (13,4 a 19%), (2,5 a 4,9%) e (10,9 a 14,1%), respectivamente. Já para a composição de micronutrientes, em mg/100 g da amêndoa são encontrados teores significativos de potássio (827), fósforo (358), magnésio (178), manganês (4,9), ferro (4,24), zinco (4,1), cálcio (140) e cobre (1,45). Além de apresentar valores significativos de Vit. E (TAKEMOTO et al, 2001; SANO; RIBEIRO; BRITO, 2004; VERA et al., 2009; SOUSA et al., 2011).

Quanto à composição do óleo da amêndoa da *Dipteryx alata* Vog. o qual é obtido por extração mecânica a frio, este é rico em compostos bioativos como ácido gálico, ômega 3, 6 e 9, os quais possuem atividade antioxidante. O óleo também é rico em compostos esteróis, sendo o β -sitosterol (83,63), o mais expressivo, mas também estão presentes os esteróis estigmasterol (14,26), campesterol (5,78), sitostanol (5,35), Colesterol (2,16) sendo o total de esteróis em mg/100g de óleo de 115,20. Os esteróis possuem estrutura química similar ao do colesterol e por isso promovem a inibição da absorção das moléculas de colesterol dietético por se ligarem aos sítios de absorção dessas moléculas. Além desses compostos, o óleo ainda possui elevado teor de insaturação (75,6 a 81,2% p/p de metil ésteres), sendo similar ao óleo de oliva, apresentando potencial para ser usado em preparações culinárias. O elevado grau de insaturação deve-se à predominância de ácidos oléico (50,4%) e linoléico (28,9%), cujos valores estão de acordo com a faixa aplicada pelos padrões de identificação do Brasil e da *American Oil Chemists' Society* (AOCS) para o óleo de amendoim, com os seguintes valores, respectivamente, de cada ácido graxo: C18:1, Brasil, 35,0-72,0%; AOCS, 36,4-67,1%; C18:2, Brasil, 13,0-45,0%, AOCS, 14,0-43,0%. (TAKEMOTO et al, 2001; SANO; RIBEIRO; BRITO, 2004; VERA et al., 2009; BORGES, 2013).

A composição de ácidos graxos insaturados do óleo da *Dipteryx alata* Vog. Em g/100 g se faz pela presença das concentrações dos ácidos oléico (47,15 a 50,4%) e gadoléico (2,7%), os quais compõem os ácidos graxos monoinsaturados (ômega 9), logo, os ácidos graxos poli-insaturados são compostos pelos ômega 6-linoléico (30,13 %) e ômega 3-linolênico (2,22 %), onde a relação ômega 6/ômega3 é de 13,57 (TAKEMOTO et al, 2001; VERA et al., 2009; SILVA et al. 2014).

Já as concentrações de ácidos graxos saturados em comparação às concentrações de ácidos graxos insaturados se mostraram baixas (18,8 a 22,92%). Os ácidos graxos saturados presentes são: ácidos palmítico (6,10 a 7,6 %), mirístico (0,03 %), margárico (0,06 %), esteárico (5,27 a 5,4 %), araquídico (1,07 a 1,39 %), heneicosanóico (0,09 %), beênico (2,6 a

4,39 %), tricosanóico (0,13 %) e lignocérico (2,1 a 5,42 %) (TAKEMOTO et al, 2001; VERA et al., 2009).

O óleo da *Dipteryx alata* Vog. também apresenta teores de vitamina E, nas formas dos compostos alfa, gama e beta tocoferol, onde os conteúdos em alfa, gama e beta tocoferol foram de 4,40 a 5,00 mg; 4,3 a 4,49 mg e 3,65 mg/100g, respectivamente, sendo o total de tocoferóis presentes no óleo de 12,35 a 13,14 mg/100g. Além da concentração significativa de ácidos graxos, a concentração de alfa tocoferol do óleo de Baru é comparável aos níveis desse mesmo isômero no óleo de amendoim (4,9-37,3 mg/100 g), determinado pela AOCS, já os níveis de gama tocoferol quando comparado ao óleo de amendoim (8,8-38,9 mg/100 g), por este mesmo método, se encontrou um pouco menor. O óleo de amendoim é utilizado como padrão (TAKEMOTO et al, 2001; FREITAS; NAVES, 2010).

2.1.1 Utilização do Baru (*Dipteryx alata* Vog.), uso medicinal e estudos *in vivo* e em *in vitro*

O Baru é um fruto cujo aproveitamento é completo pela população local, a polpa é utilizada para produzir farinha, geleias e o seu resíduo lenhoso é bastante aproveitado na confecção de peças artesanais. Já a semente pode ser consumida torrada ou pode ser usada para extração do óleo ou produzir manteigas. A semente também é bastante empregada pela população local como parte de preparações como paçoca, doce pé-de-moleque e rapadura (CARRAZZA; ÁVILA, 2010).

Além do uso na alimentação ao fazer parte de preparações, a amêndoa é muito consumida pela população local por ter relatos de propriedades afrodisíacas, sendo conhecida como “viagra do cerrado”. Já o óleo extraído da amêndoa possui alegações medicinais de ser um agente anti-reumático e anti-inflamatório (SILVA et al., 2015), além de apresentar propriedades sudoríferas, tônicas e reguladora da menstruação (SANO; RIBEIRO; BRITO, 2004).

O estudo de Bento et al., (2014) avaliou o efeito da suplementação da amêndoa *Dipteryx alata* Vog. sobre a oxidação e perfil lipídico em 20 indivíduos ligeiramente hipercolesterolêmicos. O modelo metodológico consistiu um estudo randomizado, cruzado, placebo controlado, composto de dois períodos de 6 semanas de tratamento com 20 g/dia da amêndoa *Dipteryx alata* Vog. com uma pausa entre esses dois períodos de 4 semanas fazendo uso do placebo (uma cápsula de amido de milho/dia). Os resultados obtidos em comparação ao placebo mostraram a diminuição do colesterol total e da lipoproteína de baixa densidade

(LDL), sem diminuição da lipoproteína de alta densidade (HDL). Assim, a suplementação dietética de indivíduos ligeiramente hipercolesterolêmicos com amêndoas *Dipteryx alata* Vog. promoveu melhora nos parâmetros lipídicos séricos, de forma que este alimento pode ser incluído em dietas para redução do risco de DCV, por ser rica em ácidos graxos monoinsaturados (MUFA), fibra dietética, vitamina E e zinco, os quais além de exercerem efeitos positivos nos lipídios séricos também exerceu ação sobre marcadores de oxidação reduzindo-os.

Em outro estudo, foi visto que o uso da farinha da amêndoa de Barú alterou o perfil lipídico de ratas alimentadas com dieta hipercolesterolêmica pela atenuação dos níveis de colesterol sérico e de triacilgliceróis hepático. Seu efeito também foi observado no aumento da excreção fecal assim como da excreção de lipídios totais. Os níveis de glutathione reduzida mostraram-se altos nos animais que receberam a farinha, bem como a expressão relativa de mRNA da síntese de gama-glutamylcisteína (gama-GCS) e atividade da enzima catalase, caracterizando o potencial antioxidante *in vivo* da amêndoa, além de um importante agente hipocolesterolêmico (REIS, 2015).

O estudo de Silvério; Castro; Miranda, (2013) avaliou a concentração de fenóis, a atividade antioxidante (CE50), a capacidade de quelação dos íons cobre e a capacidade de inibição da tirosinase do extrato das folhas da espécie *Dipteryx alata* Vog. A concentração de fenóis totais encontrado foi de 112,3 mg EAG.g-1 no extrato etanólico e 45 mg EAG.g-1 no extrato hexânico. A capacidade antioxidante dos extratos indica que o extrato etanólico, em comparação ao hexânico e ao hidroxitolueno butilado (BHT), apresentou teores de compostos antioxidantes maior, apresentando os respectivos valores sobre a quantidade de extrato necessária para decrescer a concentração inicial de DPPH em 50%: $52,9 \pm 1,3$ ppm, $169,1 \pm 2,3$ ppm, e 181 ± 6 ppm. A avaliação da capacidade de quelação dos íons cobre mostrou que o extrato etanólico mostrou capacidade de quelação insignificante. Já o ensaio de inibição da tirosinase do extrato etanólico mostrou potencial para inibir a enzima de 42% após uma hora.

Já o estudo de Siqueira et al., (2013) mostrou que o consumo da amêndoa *Dipteryx alata* Vog. protege os tecidos contra o dano do estresse oxidativo induzido pelo ferro, sendo este efeito atribuído parcialmente ao ácido fítico da amêndoa, contudo, podem também estar envolvidos outros compostos, tais como fenóis e ácidos graxos presentes na amêndoa. O conteúdo fenólico da amêndoa *Dipteryx alata* Vog. é composto pelos ácidos p-coumárico, elágico, cafeíco, ferúlico, gálico e hidroxibenzóico, catequina e epicatequina. No sistema cardiovascular, um dos efeitos destes compostos é prevenir os danos causados pelos radicais

livres por meio da ação antioxidante que possuem, evitando dessa forma uma possível disfunção endotelial e consequentemente um desequilíbrio hemostático (LEMOS et al., 2012).

2.2 ETIOLOGIA DA TROMBOSE, SISTEMA HEMOSTÁSICO E FUNÇÃO VASCULAR

O processo trombótico, geralmente é iniciado pela ativação da cascata de coagulação e refere-se ao surgimento de elementos sanguíneos de massa anormal nos vasos ou artérias. Assim, vários fatores como vasculares, celulares e humorais na corrente sanguínea interagem levando ao aparecimento da trombose arterial ou do Tromboembolismo Venoso (TEV), que corresponde a um depósito intravascular composto de fibrina e glóbulos vermelhos, com plaquetas e leucócitos em quantidades variáveis, formando-se em regiões de fluxo sanguíneo lento ou nos anômalos dos seios valvares (CASTRO et al., 2006; MOREIRA et al., 2009).

A trombose é uma das principais causas de doenças cardiovasculares e cerebrovasculares, incluindo o processo de angina e AVE, devido a este processo patológico causa oclusão embólica de vasos sanguíneos (JANG et al., 2014).

A origem da patogenia do TEV está baseada na tríade de Virchow, onde os fatores agindo de forma conjunta ou isolada, como estase venosa, lesão do endotélio e hipercoagulabilidade estão relacionados com a sua etiopatogenia. O TEV é constituído das situações de trombose venosa profunda (TVP) e da embolia pulmonar (EP). Apesar de serem doenças diferentes, integram manifestações de um mesmo processo dinâmico, visto que, a TVP é a principal causa de EP, a qual, por sua vez, pode ser a primeira manifestação clínica da TVP, que se refere à formação de trombos em veias do sistema venoso profundo, podendo ser um processo oclusivo, interrompendo todo o fluxo sanguíneo, ou parcial (MESQUITA JUNIOR et al., 2013; DIAZ et al., 2012).

A TVP pode apresentar-se na fase aguda e crônica. A fase aguda caracteriza-se por complicações graves e potencialmente fatais, a exemplo da EP. A fase crônica está associada à síndrome pós-trombótica, que acarreta as sequelas incapacitantes da insuficiência venosa crônica. A TEV constitui uma patologia de extrema importância pela sua elevada frequência e pela alta morbimortalidade, além do mais, as suas complicações promovem elevados custos socioeconômicos (MESQUITA JUNIOR et al., 2013).

Vários fatores podem estar relacionados à tríade de Virchow que levam ao desenvolvimento da TVP, como doenças tromboembólicas prévias, cirurgias de grande porte, politraumatismo, neoplasias, sepse, uso de anticoncepcionais orais e vasculites. Além desses

fatores, há também os fatores hereditários e outros fatores ambientais que estão associados à TVP e as suas complicações de EP (MOREIRA et al., 2009).

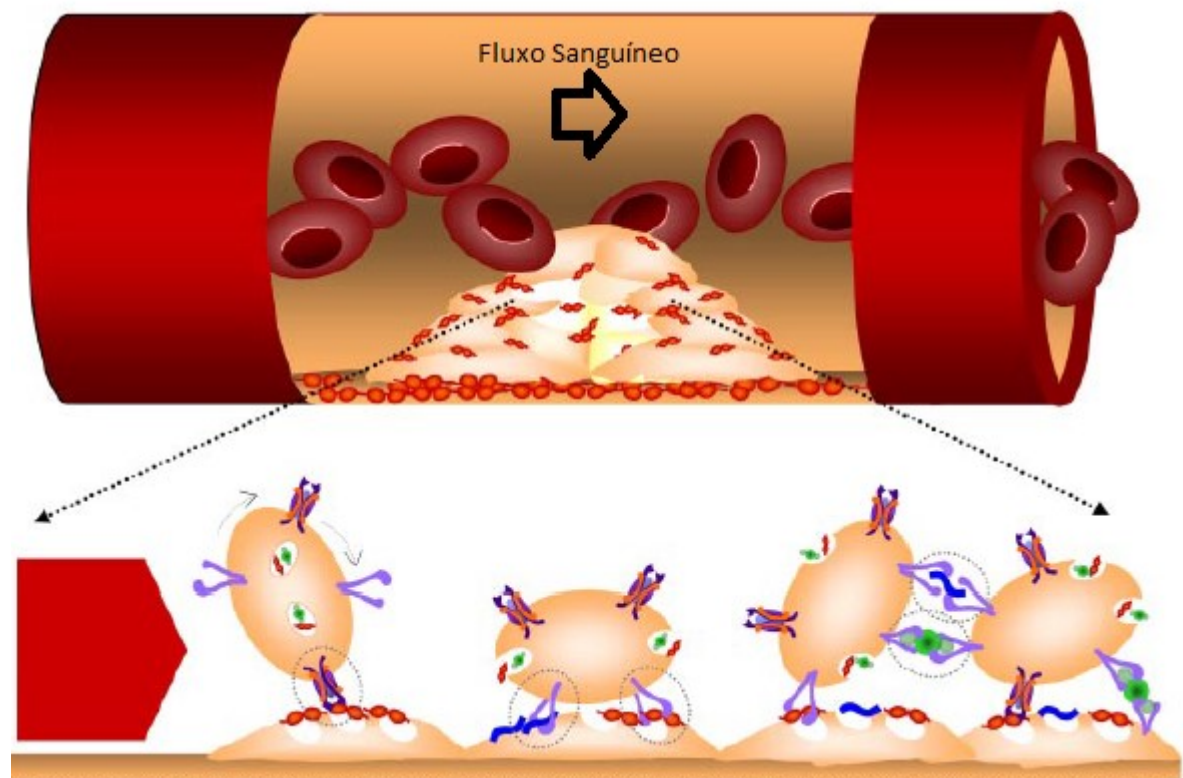
Com relação aos fatores de riscos genéticos os que implicam no aumentado do estado de coagulação ocorrem da mutação G1691A do gene do fator V de Leiden, mutação G20210A do gene da protrombina e um polimorfismo C677T no gene MTHFR (ROSENDAAL; REITSMA, 2009). Já os outros fatores de risco ambiental que aumentam a coagulabilidade, se dão pelo dano no endotélio e/ou estase venosa os quais estão relacionados com o uso de cigarros, que eleva os níveis de fibrinogênio plasmático, além de ativar a via intrínseca da coagulação, por meio do dano na parede vascular ou anóxia; outro fator é o envelhecimento, promovendo um desequilíbrio no sistema hemostático, deixando o indivíduo susceptível a eventos trombóticos, tanto no sistema venoso como no arterial. (MESQUITA JUNIOR et al., 2013; WESTRICK; WINN; EITZMAN, 2007).

O sistema hemostático é intrinsecamente responsável pela manutenção do fluxo sanguíneo e integridade vascular, sendo constituído por plaquetas, fatores de coagulação, fatores fibrinolíticos e células endoteliais (CASTRO et al., 2006). Assim, a hemostasia é o processo no qual visa à prevenção da perda excessiva de sangue após lesões que interrompem o fluxo sanguíneo, configurando-se como uma resposta crítica de sobrevivência conseguida pela formação rápida e altamente regulada de tampões hemostáticos. Este é um processo complexo que desencadeia uma série de acontecimentos, incluindo a vasoconstrição, a adesão de plaquetas, a ativação, a agregação, a liberação de grânulos, e a atividade coagulante, finalmente, conduzindo à formação de trombos ricos em fibrina no local da lesão em poucos minutos (Figura 2) (SACHS; NIESWANDT, 2007; WESTRICK; WINN; EITZMAN, 2007). Os eventos de vasoconstrição, adesão, ativação, agregação plaquetária e secreção, constituem a hemostasia primária, a qual tem o seu funcionamento influenciado pelas plaquetas, vasos sanguíneos e, principalmente, pelo endotélio vascular. Já o processo de hemostasia secundária é conhecido como coagulação (CASTRO et al., 2006).

A trombose se configura como uma extensão patológica do processo hemostático (MOROI; WATSON, 2015). Desta forma, o equilíbrio trombo-hemorrágico envolve a participação de vários mecanismos complexos como sistemas hemostáticos primários, compostos pelos vasos sanguíneos e plaquetas, que são fragmentos anucleados de megacariócitos que circulam na corrente sanguínea com o formato de disco achatado quando não estão ativadas (FALCÃO et al., 2013), e sistemas secundários que compreendem as proteínas da coagulação. A regulação desse equilíbrio ocorre por meio do sistema fibrinolítico, pelo fluxo sanguíneo diluindo os fatores ativados da coagulação, por elementos

anticoagulantes fisiológicos (proteínas C e S, antitrombina III) (SACHS; NIESWANDT, 2007; WESTRICK; WINN; EITZMAN, 2007) e inibidores plaquetários produzidos pelo endotélio como a prostaciclina (PGI_2), o óxido nítrico (NO) e ectonucleotidase CD394, que juntos fornecem uma defesa contra a formação de trombos, deixando a camada endotelial com característica antitrombótica (FALCÃO et al., 2013).

Figura 2- Participação das plaquetas no processo de hemostasia durante a formação do tampão



Legenda:

Integrina $\alpha\text{IIb}\beta_3$



GPIb/V/IX



FvW



Fibrinogênio



Fibronectina



Grânulos α



Processo de injúria (lesão) com exposição de tecido subendotelial, adesão e agregação das plaquetas

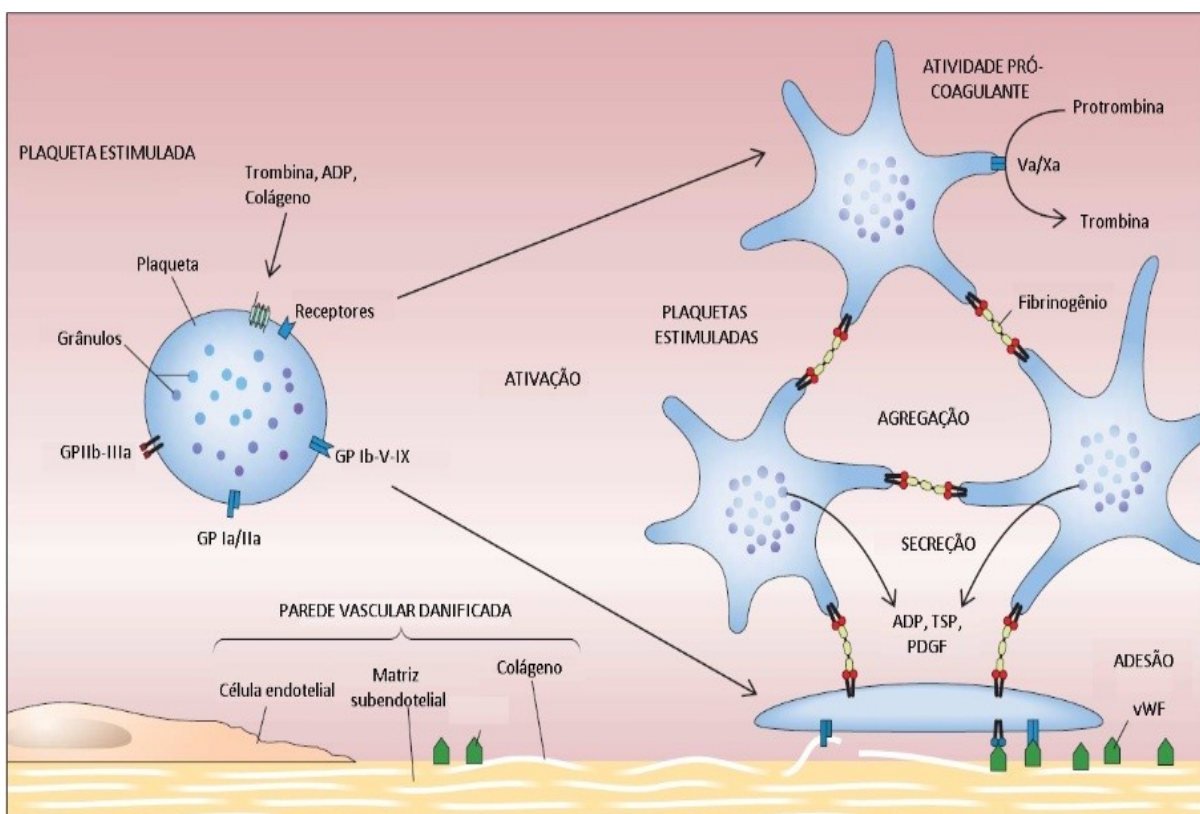
Fonte: Adaptado de Jackson, S.P., 2007, Blood 109, 5087-5095.

A adesão plaquetária à parede do vaso lesionado constitui a primeira etapa da hemostasia que abrange a participação das plaquetas, cuja membrana é rica em receptores como os acoplados à proteína G (GPCRs): receptores de trombina (PAR-1 e PAR-4), receptores de adenosina difosfato-ADP (P2Y_1 e P2Y_{12}) e receptores de tromboxano A_2 - TxA_2 ($\text{TP}\alpha$ e $\text{TP}\beta$); receptores do tipo integrinas ($\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$, $\alpha_2\beta_1$, $\alpha_5\beta_1$, $\alpha_6\beta_1$, $\alpha_v\beta_3$); receptores da superfamília das imunoglobulinas (GPVI, FcγRIIA); receptores com repetição rica em

leucina, receptores da família (GPIb/V/IX); receptores lectina tipo C (P-selectina e CLEC - 2); receptor de Canal Ca^{2+} (P2X_1) (MOROI; WATSON, 2015), os quais estão envolvidos no processo de ativação plaquetária.

A ativação plaquetária ocorre quando o endotélio se encontra num estado alterado, lesionado. Desta forma, as plaquetas tornam-se aderidas no local da lesão através da interação do receptor GPIb-V-IX com o fator de von Willebrand (vWF), que está ligado ao colágeno subendotelial recentemente exposto. Esta interação permite que o colágeno interaja com o receptor GPVI, iniciando assim eventos de sinalização mediada pela tirosina-quinase (JANG et al., 2014), que conduzem à alteração conformacional (ativação) dos receptores integrinas $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$ (GP IIb/IIIa) e $\alpha_2\beta_1$ (GP Ia/IIa), permitindo que $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$ se ligue ao vWF e fibrinogênio e o $\alpha_2\beta_1$ ao colágeno. A ativação desses receptores, promovem a secreção dos mediadores ADP e TXA_2 pelas plaquetas, os quais irão ativar os seus respectivos receptores de ADP e TXA_2 , favorecendo a função trombótica das plaquetas ou hemostática. O ADP é mediador secundário, que também aumenta a afinidade do $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$ pelo FvW (Figura 3) (MOROI; WATSON, 2015).

Figura 3- Estimulação, adesão, ativação e agregação plaquetária.



PDGF = fator de crescimento derivado de plaqueta; TSP = trombospondina

Fonte: LEUNG, 2012

O ADP ao ser liberado de grânulos densos de plaquetas ativadas, promove cascatas de feedback positivo, levando a ativação rápida de um grande número de plaquetas (GOLEBIEWSKA; POOLE, 2015). O TXA₂ é um dos principais ampliadores da ativação plaquetária, é sintetizado nas plaquetas a partir do ácido araquidônico (AA) pela reação de oxidação catalisada pela ciclooxygenase (COX) e sintase de tromboxano e, em seguida, rapidamente oxidado para um tromboxano B₂ inativo estável (TXB₂). O TXA₂ torna-se um dos mediadores de retroalimentação positiva durante a agregação plaquetária por meio dessas vias. A concentração sanguínea de TXB₂ após coagulação sanguínea é um marcador específico para a avaliação da atividade de COX-1 e da agregação plaquetária (JANG et al., 2014; SANTHAKUMA; BULMER; SINGH, 2014; RO et al., 2015).

As plaquetas ao serem ativadas mudam de forma, degranulam e secretam quimiotaxinas, fatores de coagulação e vasoconstrictores, promovendo assim a geração de trombina, vasoespasmo e acúmulo de plaquetas adicional. Esses eventos aumentam a adesão plaquetária que contribui para a formação de um agregado plaquetário pela ligação ao fibrinogênio (SACHS; NIESWANDT, 2007; SANTHAKUMA; BULMER; SINGH, 2014; RO et al., 2015). Após a formação do agregado plaquetário no local da lesão, a cascata da coagulação conduz à formação da malha de fibrina que encapsula e fortalece o trombo (GOLEBIEWSKA; POOLE, 2015).

As plaquetas possuem influência na hemostasia sanguínea primária, na defesa imune inata, na modulação da resposta inflamatória e ainda participam do processo de cicatrização. Podem apresentar, no mínimo, dois estágios de atividade: ativo, no qual está envolvida no processo de formação de trombos, ou de repouso (JURK; KEHREL, 2005; PIERDONÁ, 2011; MOROI; WATSON, 2015).

Em condições fisiológicas, as plaquetas circulam nas proximidades das paredes vasculares em estado quiescente, protegidas da ativação intempestiva da monocamada endotelial (GOLEBIEWSKA; POOLE, 2015) que reveste o interior dos vasos sanguíneos, incluindo artérias, veias e as câmaras do coração (STORCH et al., 2017). Quando o endotélio se encontra intacto e saudável, a liberação de NO e PGI₂ proporcionam ao endotélio características antiaderente e antiagregante. Mas, em situações de agressões ao endotélio, ocorre resposta inflamatória com a participação de diversos tipos celulares (linfócitos, monócitos, plaquetas e células musculares lisas), que ocasionam um quadro de disfunção endotelial com comprometimento da vasodilatação dependente de endotélio, enrijecimento da parede vascular e formação de placa de aterosclerose (ZARBOCK; POLANOWSKA-GRABOWSKA; LEY, 2007; PIERDONÁ, 2011; KAZMI; BOYCE; LWALEED, 2015).

A PGI_2 , NO e FHDE medeiam relaxamentos dependentes do endotélio induzidas por substâncias vasodilatadoras, a exemplo da acetilcolina ou bradicinina. A ação vasodilatadora do FHDE pode estar relacionada à hiperpolarização das membranas celulares e relaxamento do músculo liso mediados inicialmente por uma sucinta ativação e de forma intermediária pelo cálcio ativando os canais de potássio presentes no endotélio vascular. Assim, sugere-se que o FHDE é inicialmente de origem elétrica e conduzido por hiperpolarização endotelial que se espalha de forma severa na parede do vaso através de junções gap mioendoteliais. O FHDE está relacionado com vasodilatação em artérias de resistência, já a vasodilatação promovida pelo NO ocorre principalmente em artérias de condução (KOBUCHI et al., 2015; FÉLÉTOU; VANHOUTTE, 2017).

O NO é um gás com uma meia-vida curta de 1-2 segundos. É produzido a partir do aminoácido L-arginina, quando esse é catalisado por uma família de enzimas óxido nítrico sintase (NOS). A óxido nítrico sintase endotelial (eNOS), expressa pelo endotélio, torna-se responsável pela produção desse gás no vaso. Estímulos mecânicos como esforço de cisalhamento e tensão cíclica, bem como estímulos bioquímicos como trombina, ADP, serotonina, acetilcolina e bradicina causam a síntese de NO pelo endotélio. Esses estímulos promovem a liberação de íons de cálcio das reservas intracelulares que se ligam à calmodulina, formando um complexo cálcio-calmodulina, que irá ativar a eNOS, esta oxida o átomo de nitrogênio guanidínico terminal da L-arginina. Assim, após a sua síntese o NO difunde-se para as células adjacentes do músculo liso através da membrana das células endoteliais, ativando a enzima guanilato ciclase (GC) ao se ligar à sua porção heme, essa por sua vez promove a transformação de guanosina trifosfato (GTP) causando aumento da Guanosina 3',5'-cíclica monofosfato (cGMP), o aumento intracelular de cGMP leva à diminuição do influxo de cálcio e relaxamento da célula da musculatura lisa através do estímulo da proteína cinase G (PKG) (DIAS; NEGRÃO; KRIEGER, 2011; BONDONNO et al., 2015).

A inibição da agregação plaquetária e da contratilidade das células do músculo liso vascular (CMLV) pela PGI_2 , ocorre pela ligação dessa substância ao seu receptor, IP tipo I, o qual é um receptor de membrana específico acoplado à proteína G, que ativa a ciclase de adenilil e gera monofosfato cíclico de adenosina (cAMP) que irá agir como um segundo mensageiro para ativar a proteína cinase A (PKA), a qual medeia o relaxamento das CMLV e a inibição da reatividade plaquetária. A PGI_2 inibe a agregação plaquetária de vários agonistas fisiológicos, principalmente a causada pelo TXA_2 . Portanto, a via de sinalização de IP torna-se essencial para evitar a formação de trombos e doenças vasculares. Desse modo, foi

visto em camundongos que a deleção genética de receptores de IP aumentou o risco de formação de trombos, hiperplasia da camada íntima e aterogênese (CHU; LIOU; WU, 2015; STORCH et al., 2017).

Além dos compostos endógenos PGI₂ e NO, que atuam sobre o endotélio proporcionando-lhe característica antiaderente e sobre as plaquetas reduzindo a sua função de agregação, os compostos exógenos decorrentes de alimentos a exemplo da vitamina E, também atuam sobre as plaquetas reduzindo a função de agregabilidade e consequentemente a formação de trombos. A vitamina E é considerada um dos nutrientes mais antioxidantes que existe e que promove benefícios ao organismo evitando o desenvolvimento de doenças decorrentes da ação de radicais (KIM et al., 2011).

2.3 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DA VITAMINA E (TOCOFEROL) E ATUAÇÃO SOBRE A AGREGAÇÃO PLAQUETÁRIA E TROMBOSE

A Vit. E foi descoberta no ano de 1922 por Evans e Bishop como um fator dietético necessário para a reprodução em ratos (TRABER; ATKINSON, 2007). Adamstone (1947) relatou a tendência trombótica em pintos que apresentaram deficiência da Vit. E, sendo assim, desde então é estudada a influência dessa vitamina sobre o sistema de coagulação (KIM et al., 2011).

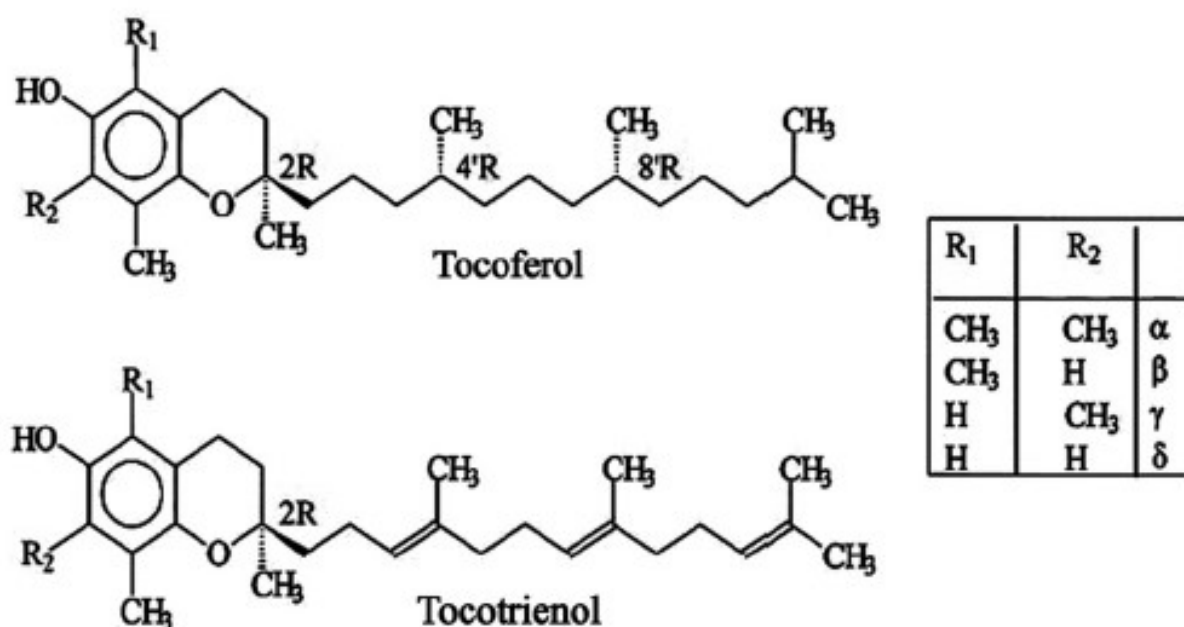
A Vit. E por apresentar característica lipofílica, localiza-se na porção lipídica das membranas celulares, agindo como um antioxidante fisiológico dessas estruturas, protegendo os fosfolípidios insaturados da degradação oxidativa das espécies de oxigênio altamente reativas e de outros radicais livres. Faz parte do sistema de defesa antioxidante do organismo, junto da vitamina C, dos minerais zinco e selênio e das enzimas superóxido dismutase, glutathione peroxidase e catalase. As funções antioxidantes da vitamina E, ocorrem por meio de sua capacidade de reduzir os radicais em metabólitos não prejudiciais por meio da doação de um hidrogênio (TRABER; ATKINSON, 2007; FREITAS; NAVES, 2010).

O termo “vitamina E” é utilizado de forma genérica para designar oito diferentes compostos, nomeados de α -, β -, γ - e δ - (alfa, beta, gama e delta) tocoferóis e tocotrienóis (Figura 4). Tanto os tocoferóis como os tocotrienóis ocorrem em uma variedade de isômeros que diferem na estrutura de acordo com o número e a localização de grupos substituintes no anel cromanol. Estes isômeros são encontrados em proporções variáveis em plantas, sendo que as fontes principais são os óleos vegetais, germe de trigo, semente de oleaginosas, vegetais folhosos verde-escuros e alimentos de origem animal, principalmente gema de ovo e

figado. Sendo que o alfa e o gama tocoferóis, são os isômeros encontrados em maior quantidade nesses alimentos. Desta forma, alimentos adicionados de vitamina E, classificados como enriquecidos e fortificados, não podem ser considerados como fontes ricas nesse micronutriente (TRABER; ATKINSON, 2007; GUINAZI et al., 2013).

A vitamina E, além de agir como “limpador” de radicais livres, atua protegendo o sistema vascular contra o processo de aterogênese, por meio da inibição da oxidação do colesterol das lipoproteínas de baixa densidade (LDL), promovendo vários outros efeitos favoráveis como a estabilidade das placas, inibição da agregação plaquetária e da trombose (TRABER; ATKINSON, 2007; FREITAS; NAVES, 2010; LI et al., 2016).

Figura 4- Estrutura química da vitamina E



Fonte: GUINAZI et al., 2013

Esta vitamina também exerce propriedades anti-inflamatórias, as quais são atribuídas à sua capacidade de inibir a 5-lipoxigenase e subsequente síntese de leucotrienos inflamatórios e redução da produção de citocinas inflamatórias. Desempenhando também papel na sinalização celular e expressão genética (COSTA et al., 2013).

A Vit. E, especificamente α-tocoferol é encontrada na membrana das plaquetas, bem como em outras células, sendo transportada no plasma em altas concentrações nas LDLs. Porém, o efeito antioxidante da vitamina inibe a oxidação das LDLs. Em testes *in vitro* o α-tocoferol inibe a ativação das plaquetas bem como a liberação de grânulos e a adesão plaquetária. Sendo assim, a incorporação de α-tocoferol nas plaquetas, promove inibição da

agregação plaquetária pela via proteína cinase C (PKC) (GUTIERRES et al., 2014). Desta forma, a Vit. E também inibe a agregação plaquetária e a adesão provocada pelo forbol-12-miristato-13-acetato (PMA) por interferir com a PKC (KIM et al., 2011), inibindo sua atividade em nível celular (AZZI; RICCIARELLI; ZINGG, 2002). A PKC possui um papel central na regulação da produção de moléculas de sinalização, tais como espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, as quais participam de processos inflamatórios e proliferativos, além de serem um regulador positivo da ativação plaquetária, secreção de grânulos, síntese de tromboxano, ativação e disseminação de integrinas. Sendo assim, a inibição da PKC pela vitamina E, pode induzir uma regulação negativa em muitas respostas plaquetárias, além do mais, torna-se fator importante para elucidar os efeitos antiateroscleróticos desta vitamina (HARPER; POOLE, 2010).

As plaquetas possuem uma membrana de bicamada lipídica, onde em repouso o folheto externo é composto por fosfolípidos de colina e fosfatidilserina (PS) carregada negativamente e no folheto interno fosfatidiletanolamina (PE). A manutenção assimétrica dos fosfolípidos da membrana plaquetária é realizada pela aminofosfolípido translocase (APLT), uma proteína que promove o tráfego de fosfolípidos transmembranares, transportando o PS do folheto da membrana externa para a membrana interna. Já Scramblase é uma proteína responsável pela translocação de fosfolípidos entre as duas monocamadas da bicamada lipídica de uma membrana celular. Desta forma, sendo também responsável pela rápida transferência de PS e PE do folheto da membrana interna para a externa. Portanto, as plaquetas ativadas propiciam uma significativa superfície pró-coagulante, uma vez que a PS exposta carregada negativamente é um cofator importante da cascata de coagulação, que inclui a ativação do fator X e da protrombina. Sendo assim, a atividade pró-coagulante das plaquetas é largamente determinada pela exposição superficial de PS (KIM et al., 2011).

Desta forma, por Vit. E ser um nutriente antioxidante, Kim et al., (2011) investigaram se o principal isômero da vitamina E, o α -tocoferol, teria capacidade de inibir a exposição à PS e a consequente alteração da atividade pró-coagulante na superfície das plaquetas. Assim, anexina A5 foi utilizada como marcador para detectar a exposição da PS na membrana plaquetária, por apresentar capacidade de se ligar à PS. A oxidação da PS ocorre antes da sua externalização no processo de apoptose. Desse modo, os antioxidantes lipídicos são capazes de bloquear a oxidação do PS, resultando na inibição da externalização do PS, visto que a PS na superfície das plaquetas é relevante devido a este fosfolípido carregado negativamente ser um importante cofator nas reações da cascata de coagulação. Os resultados mostram a inibição significativa pela Vit. E da externalização da PS em plaquetas estimuladas por PMA

e trombina; e a inibição da geração de trombina nas superfícies plaquetárias no ensaio protrombinase, sugerindo que a vitamina E foi eficaz para atenuar o potencial trombogênico das plaquetas (KIM et al., 2011).

O estudo de Murohara et al., (2004) relatou a ação da vitamina E na supressão da adesão das plaquetas aos monócitos por meio da inibição da expressão plaquetária de P-selectina. A Vit. E atua também promovendo inibição da expressão de monócitos do fator tecidual. Como os monócitos em repouso não expressam fator tecidual, este mecanismo inibitório da vitamina E pode explicar sua tendência anticoagulante apenas em condições estimuladas, como a endotoxemia, ou seja, pela presença de endotoxinas no sangue (FERRO et al., 1999; KIM et al., 2011).

Também foi visto que baixas doses de Vit. E (0,05-0,10 mM), por suplementação podem inibir a ativação dos receptores da superfície plaquetária induzida por PMA, incluindo alterações conformacionais do complexo glicoproteína IIb/IIIa e P-selectina. Desta forma, a ativação plaquetária promove alteração conformacional do complexo de glicoproteína IIb/IIIa por sinalização de dentro para fora. Assim, as plaquetas ao serem submetidas à fortes condições de ativação, ocorre um aumento no nível de cálcio intracelular e expressam PS, o qual aumenta a formação de trombina na superfície, sendo assim, as plaquetas são denominadas de plaquetas pró-coagulantes (COSEMANS et al., 2008; KIM et al., 2011).

A trombina (fator II ativado), no estado inativo é denominada de protrombina sendo clivada pela enzima fator X para a forma ativa. É uma proteína (enzima) tipo serina protease, que possui um papel chave nos processos de hemostase e trombose. A função da trombina é converter fibrinogênio (fator I) em fibrina (fator Ia), necessária para a formação do tampão plaquetário. O fibrinogênio é uma glicoproteína hexamérica codificada por três genes – FGA, FGB e FGG – localizados no braço longo do cromossomo 1 (GALLWITZ et al., 2012; CHAHAL; THORPE; HELLMAN, 2015; HANDLEY et al., 2015). Além de ser uma proteína de fase aguda, o fibrinogênio possui papel crítico na hemostasia e coagulação por meio da ligação das plaquetas ativadas no processo de agregação plaquetária, contribuindo para a viscosidade do sangue. O fibrinogênio é constituído por três pares de cadeias polipeptídicas ($A\alpha$, $B\beta$ e γ) ligadas por pontes dissulfeto, sofrendo ação da trombina nas cadeias $A\alpha$ e $B\beta$, originando desta forma o fibrinopeptídeo A e B, respectivamente. Desta forma, os monômeros remanescentes polimerizam-se formando fibrina, proteína filamentar, que promove a formação do coágulo (COSTA et al., 2013)

Durante o processo de formação do coágulo pela fibrina, a glicoproteína adesiva fibronectina liga-se covalentemente à fibrina pela ação do fator XIIIa (COSTA et al., 2013),

alterando a estrutura da rede de fibrina, tendo como possível papel na formação de coágulos, mediar a interação de células ou plaquetas e fibrina (CHO; MOSHER, 2006).

O estudo de Costa et al., (2013) comparou os níveis circulantes de α -tocoferol com um número de proteínas plasmáticas em sangue humano, com o intuito de identificar vias biológicas que fossem reguladas por esta vitamina. Para realização do estudo, os sujeitos foram recrutados do Nutrigenomics e do Estudo de Saúde de Toronto. O total de participantes foi de 1.022, incluindo homens e mulheres que preencheram um questionário de saúde geral e estilo de vida e um questionário de 196 itens de frequência alimentar, além de fornecerem uma amostra de sangue em jejum. As concentrações plasmáticas de α -tocoferol foram medidas por cromatografia líquida de alta eficiência e 54 proteínas plasmáticas foram ensaiadas por um método de monitorização de reação múltipla baseado em espectrometria de massas. Os níveis plasmáticos de α -tocoferol foram significativamente associados a sete das proteínas plasmáticas, cinco das quais estão envolvidas na coagulação e hemostasia, incluindo as cadeias fibrinogênicas alfa, beta e gama, fibronectina e fibrinopeptídeo A. Estes resultados mostram que os níveis circulantes de α -tocoferol estão significativamente associados às proteínas plasmáticas específicas e sugerem novos efeitos fisiológicos da vitamina E.

Gutierrez et al., (2014) ao considerar o papel da alimentação sobre as doenças metabólicas e cardiovasculares, bem como as propriedades antioxidantes e antiagregantes do α -tocoferol, realizaram estudos com ratos, visando observar se o tratamento com α -tocoferol e dieta rica em gordura (DRG), poderiam alterar as atividades das enzimas ectonucleósido trifosfato difosfoidrolase (NTPDase), 5'-nucleotidase, ectonucleótido-pirofosfatase/fosfodiesterase (E-NPP) e desaminase de adenosina nas membranas das plaquetas e o perfil de agregação plaquetária em ratos, os quais foram divididos nos grupos DRG, α -tocoferol e DRG + α -tocoferol e grupo dieta padrão.

As atividades das E-NPP e 5'-nucleotidase apresentaram-se diminuídas nas plaquetas do grupo DRG, enquanto a atividade da desaminase de adenosina obteve aumento significativo em relação aos demais grupos. Já a atividade dessas enzimas no grupo DRG + α -tocoferol, foram semelhantes ao controle, porém a atividade da desaminase de adenosina, a qual é uma enzima envolvida no metabolismo das purinas (bases nitrogenadas), além de ser promotora da agregação plaquetária, apresentou-se aumentada de forma notável em relação aos grupos controles e α -Toc. Estes resultados mostram que a DRG altera a agregação plaquetária e a sinalização purinérgica nas plaquetas e que o tratamento com α -tocoferol foi capaz de modular a hidrólise de nucleotídeos de adenina nesta condição experimental. Portanto, o efeito do α -tocoferol sobre as atividades das enzimas nas plaquetas, mostrou

proteger as mesmas da agregação excessiva, promovendo diminuição na atividade da desaminase de adenosina, enzima conversora da adenosina em inosina, e aumento na hidrólise de adenosina trifosfato (ATP), ADP e adenosina monofosfato (AMP) (GUTIERRES et al., 2014).

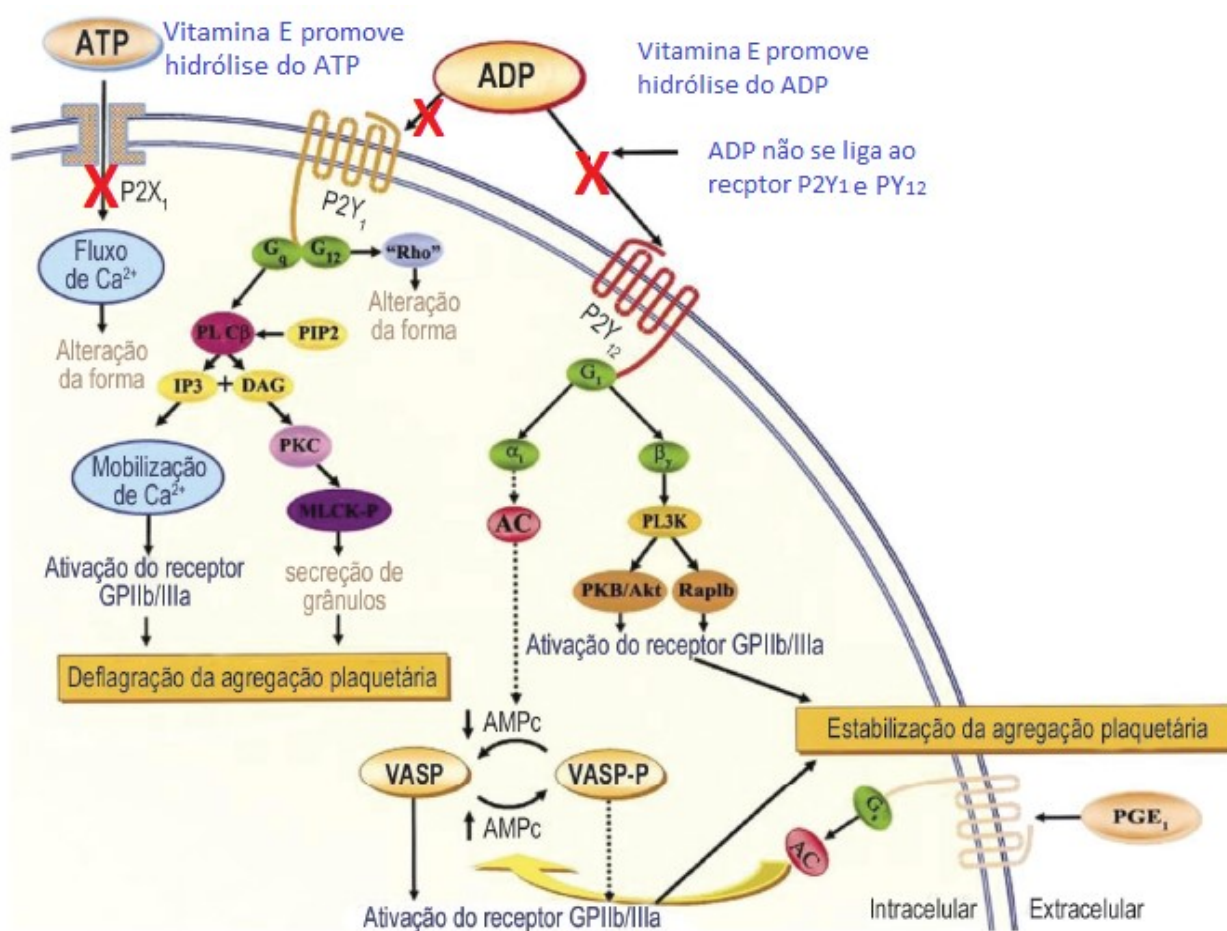
O ATP liga-se ao receptor de $P2X_1$, o qual é responsável por uma alteração conformacional transitória nas plaquetas associada ao rápido influxo de cálcio. Já o ADP é um potente fator de recrutamento de plaquetas induzindo a agregação plaquetária através da interação dos receptores $P2Y_1$ e $P2Y_{12}$. O $P2Y_1$ está presente em diversos tecidos, incluindo tecido nervoso, testículo, próstata, ovário, células musculares lisas, coração e vasos sanguíneos. Em resposta a ativação mediada pelo ADP, ocorre uma mobilização de cálcio proveniente das reservas plaquetárias, o que leva a uma alteração conformacional e uma transitória agregação. Este receptor desempenha um papel-chave no início da ativação induzida pelo ADP, porém, para a efetiva estabilização do trombo plaquetário é necessário a ativação de outros receptores. Já os receptores $P2Y_{12}$, presentes em células endoteliais, musculares lisas e da micróglia, desempenham papel central na amplificação da agregação induzida por todos os agonistas plaquetários, como o próprio ADP, o colágeno, TXA_2 , adrenalina e serotonina. A ativação desse receptor promove intracelularmente a inibição da produção de cAMP, desfosforilação da fosfoproteína vasodilatadora (VASP) e ativação da fosfoinositol 3-quinase (PI3-K), GTPase e da Rap1B (FALCÃO et al., 2013). A hidrólise do ATP e ADP, torna-se benéfica por não permitir as suas ligações aos seus respectivos receptores ficando impedido o desencadeamento das cascatas que levam à agregação plaquetária e formação do trombo e também por gerar mais adenosina, a qual contribui para o controle da hemostase e tromboregulação (Figura 5).

As ecto-enzimas NTPDase, 5'-nucleotidase, E-NPP e desaminase de adenosina, promovem a degradação da adenina nucleotídeos e nucleosídeos. Sendo assim, ATP é um composto derivado de nucleotídeos em que a adenina é a base e o açúcar é a ribose, formando o conjunto adenina mais ribose, o qual é chamado de adenosina. Assim, já é bem determinado que nucleotídeos extracelulares como ATP e o ADP e a correspondente adenosina nucleosídeo, possuem papéis importantes e de forma reconhecida ao desempenharem a modulação de uma variedade de processos ligados à inflamação e à trombose vascular (ROBSON; SEVIGNY; ZIMMERMANN, 2006; GUTIERRES et al., 2014).

Em experimento realizado com animais, os isômeros α -tocoferol e γ -tocoferol preveniram o desenvolvimento de trombose e diminuíram a agregação plaquetária. Assim, o tempo até a formação do trombo foi 25% maior nos ratos alimentados com α -tocoferol e 58%

maior nos ratos alimentados com γ -tocoferol em comparação aos controles. Já a agregação plaquetária foi 16% menor nos ratos alimentados com α -tocoferol, sendo mais baixa ainda nos ratos que receberam γ -tocoferol, com redução de 43% em comparação com os controles (NAGÃO et al., 2012). O composto γ -tocoferol demonstrou possuir propriedades superiores na captura de espécies reativas de nitrogênio e de dióxido de nitrogênio desintoxicante, quando comparada a α -tocoferol vitamina E (GUTIERREZ et al., 2009).

Figura 5- Hidrólise do ATP e do ADP promovida pela vitamina E e consequente inibição da interação dos mesmos com seus receptores-alvos (P2X₁, P2Y₁ e P2Y₁₂)



Fonte: Adaptada de Falcão et al., 2013.

Em humanos, a suplementação mista de tocoferóis durante 8 semanas com 46 indivíduos divididos em 3 grupos: grupo mix de tocoferóis (com 100 mg de γ -tocoferol, 40 mg de δ -tocoferol e 20 mg de α -tocoferol), grupo α -tocoferol (20 mg) e controle, com propósito de observar os efeitos sobre a agregação plaquetária. Desta forma, foi possível observar nos grupos tratados com tocoferóis redução da fosforilação de PKC. Os tocoferóis

não inibiram a expressão de PKC, mas promoveram inibição da ativação da PKC em nível celular causando desfosforilação. A ingestão de α -tocoferol causou diminuição acentuada na ativação da PKC, mas não exerceu efeito sobre a agregação plaquetária. Assim, a agregação plaquetária induzida por PMA, não sofreu alteração pelo mix de tocoferol e nem pelo α -tocoferol isolado, mas teve diminuição na fosforilação após as suplementações. Já a agregação plaquetária induzida pelo ADP, foi inibida pela ação do mix sugerindo que o mix inibe a agregação por este mecanismo. Além do mais, o mix de tocoferóis e α -tocoferol tiveram efeitos associados com aumentos na liberação de NO, ativação da sintase de óxido nítrico endotelial (eNOS) e superóxido dismutase (SOD) e com uma diminuição na ativação de PKC em plaquetas. Porém, os tocoferóis mistos foram mais potentes do que o alfa-tocoferol sozinho na modulação da liberação de NO e da ativação de eNOS, contribuindo dessa forma para a redução da agregação plaquetária (LIU et al., 2003; NAGÃO et al., 2012).

3 ABORDAGEM METODOLÓGICA

3.1 TIPO DE PESQUISA

Esta pesquisa tratou-se de um estudo experimental, não-clínico, envolvendo animais com ensaios farmacológicos e moleculares utilizando técnicas *in vivo* e *in vitro*. A pesquisa foi realizada nas dependências físicas dos seguintes laboratórios: Laboratório de Farmacologia Cardiovascular (indução de trombose, monitoramento de fluxo, análise de radicais superóxido, ensaios de agregação plaquetária e estudos de reatividade vascular); Laboratório Multiusuário de Caracterização e Análises (LCMA) (determinação dos teores de tocoferóis no óleo e no plasma); Laboratório de Oncofarmacologia (OncoFar) (ensaios toxicológicos e farmacológicos sobre os SNC e SNA), todos do Instituto de Pesquisa em Fármacos e Medicamentos (IPeFarM) da Universidade Federal da Paraíba (UFPB), Campus I, João Pessoa.

3.2 ASPECTOS ÉTICOS

Para execução da pesquisa, o projeto foi previamente submetido à Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFPB) com a finalidade de cumprir a Lei 11.794/2008 que regulamenta os procedimentos para o uso científico de animais. Sendo aprovado com parecer nº 128/2016 (anexo 1).

3.3 DETERMINAÇÃO DE TOCOFERÓIS NO ÓLEO DA *Dipteryx alata* Vog.

Para a determinação dos teores de tocoferóis no óleo de Baru e no plasma dos animais tratados foi utilizado um sistema CLAE da Shimadzu (Prominence) equipado com módulo de bombeamento de solvente quaternário LC-20AT, autoinjeter SIL-20A, um sistema de degaseificação DGU-20A, detector RF-20A e CBM-20A. A coluna utilizada foi Shim-pack CLC-ODS (M) (Shimadzu, Japão) (150 x 4.6 mm, com partículas de 5µm), pré-coluna Shim-pack G-ODS-4(4 mm x 3.0 mm d.i. preenchido com partículas 5 µm) (Shimadzu, Japão) (Figura 6).

Para a determinação do teor de tocoferóis no óleo de Baru seguiu-se a metodologia descrita por Lemos et. al., (2016) com modificações. Os solventes orgânicos utilizados foram acetonitrila e metanol, ambos com grau CLAE (TEDIA®, Brazil) e água ultrapura obtida por

sistema de purificação Milli-Q (Millipore®). O Método utilizou os solventes: água (0,2% ácido acético) (A), metanol (B) e acetonitrila (C) (Tabela 1). Gradiente: 17% de A, 8% de B e 75% de C (0,01 - 5,00 min); 0% de A, 100% de B e 0% de C (5,01 – 10,00 min); 0% de A, 100% de B e 0% de C (10,01 – 25,00 min); 27% de A, 8% de B e 75% de C (25,01 - 30,00 min) e permanecendo desta forma por 20 minutos para restabelecer as condições iniciais do método. Fluxo da fase móvel: 0,5 mL/min. Volume de injeção: 20 µL. Detecção: excitação: 290 nm e emissão: 330 nm.

Tabela 1- Programa do gradiente de eluição dos solventes na separação de tocoferóis em óleo de Baru e plasma dos animais.

Tempo (minutos)	Solventes		
	Solvente A (%)	Solvente B (%)	Solvente C (%)
0-5	17	8	75
5-10	0	100	0
10-25	0	100	0
25-30	17	8	75

Solventes: (A) água + 0,2% ácido acético; (B) metanol; (C) acetonitrila

Para a identificação e quantificação de α -, δ - e γ - β -tocoferol utilizou-se uma curva padrão, preparada com os padrões externos correspondentes aos tocoferóis, respectivamente ($y=310236x - 1E+06$, r^2 : 0,9951, α -tocoferol); ($y=584174x - 2E+06$, r^2 : 0,9993, γ - β -tocoferol); ($y=652752x - 2E+06$, r^2 : 0,9975, δ -tocoferol); A quantificação de β -tocoferol foi realizada baseada na curva de calibração do γ - tocoferol, uma vez que estes dois compostos não foram separados no processo cromatográfico (CLAE), sendo quantificados conjuntamente. O conteúdo de tocoferóis foi expresso em µg de tocoferol/mL de óleo de Baru, e o total foi determinado pela soma dos tocoferóis individuais.

Figura 6- Cromatógrafo Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan



Fonte: Luis, C. C. S.

3.4 ANIMAIS DE EXPERIMENTAÇÃO

Foram utilizados ratos da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus*), com idade de 12 semanas, pesando entre 250 e 300g. Os animais foram provenientes da Unidade de Produção Animal do IPeFarM/UFPB, onde ficaram mantidos sob condição controlada de temperatura de $21 \pm 1^\circ\text{C}$, em um ciclo claro-escuro de 12 horas, alimentados com ração comercial e água *ad libitum*. Os animais estiveram acomodados em gaiolas plásticas micro-isoladoras de dimensão 49x34x16 (CxLxA, em cm), contendo 1 animal em cada.

3.5 AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE NÃO-CLÍNICA AGUDA

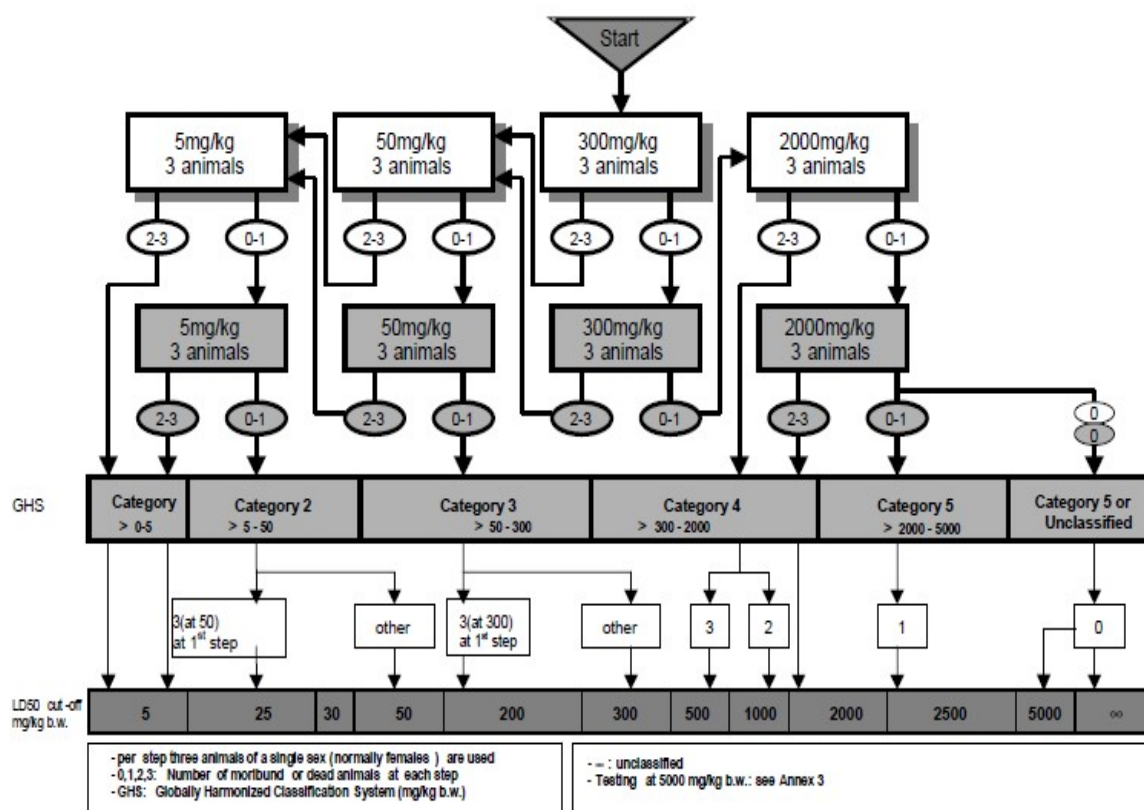
O ensaio de toxicidade aguda em ratos foi realizado de acordo com o “Guidelines for Testing of Chemicals” nº 423/2001 da *Organization for Economic Co-operation and Development* (OECD), com algumas modificações (OECD, 2001).

Foram criados três grupos com seis animais onde cada grupo experimental foi submetidos a doses de 300 mg/kg e 2000 mg/kg do óleo da *Dipteryx alata* Vog. e ao grupo controle foi administrado apenas o veículo (tween80 a 12% em salina).

Tanto o nível de dose para ser usada como a dose de partida foram seleccionadas a partir dos quatro níveis fixos, 5, 50, 300 e 2000 mg/kg. Com relação ao óleo da *Dipteryx alata* Vog. não existem informações na literatura sobre a possível toxicidade do mesmo. Assim, quando não existe qualquer informação sobre a substância a ser testada, por razões de proteção aos animais, é recomendado a utilização de uma dose inicial de 300 mg/kg (Figura 7). Em princípio, o método não se destina a permitir o cálculo preciso da DL₅₀ (dose responsável pela morte de 50% dos animais experimentais), todavia fornece uma estimativa do seu valor, bem como permite uma classificação da substância em categorias de acordo com o “Globally Harmonized Classification System” - GHS.

Com o objetivo de mapear possíveis alterações comportamentais, sugestivas de atividade sobre o Sistema Nervoso Central (SNC) ou Sistema Nervoso Autônomo (SNA), após a administração, foi realizada observação cuidadosa para se detectar sinais tóxicos de caráter geral nos intervalos: 0, 15, 30 e 60 minutos; após 4 horas; e diariamente durante 14 dias, utilizando-se protocolo experimental descrito por Almeida et al. (1999) do Laboratório de Psicofarmacologia do PPgPNSB/CCS/UFPB (anexo 2).

Figura 7-Fluxograma de realização do teste de toxicidade aguda com uma dose inicial de 300mg/



Fonte: OECD, 2001. GUIDELINE FOR TESTING OF CHEMICALS 432, 2001.

3.6 DESENHO EXPERIMENTAL

A determinação da dose da vitamina E para os animais foi baseada na Ingestão Dietética Recomendada (*Recommended Dietary Allowance/ RDA*) de 15mg/dia para adultos de ambos os sexos segundo a Ingestão Dietética de Referência (*Dietary Reference Intakes/DRI*) do Instituto de Medicina (*Institute of Medicine/IOM*) (IOM, 2000). Assim, para a obtenção da dose de 0,21 mg/Kg para o animal, dividiu-se a recomendação de 15 mg pelo peso de um adulto de 70Kg. A partir dessa determinação e da quantificação de tocoferóis no óleo de Baru encontrou-se o volume do óleo a ser administrado para que contivesse ambas as doses de Vitamina E (0,21 mg/Kg e 0,42 mg/kg).

Para atender aos objetivos propostos foram criados 4 grupos com 6 animais cada, o grupo controle recebeu 1 mL de solução NaCl (0,9 %), cada grupo suplementado como óleo de Baru recebeu 7.2 mg/kg ou 14.4mg/kg do óleo, respectivamente, e o grupo Vit. E recebeu 0.42 mg/kg (Aché, Brasil) diluída em 0,2 mL de óleo mineral. Todos os animais foram tratados por via oral (via gavagem) por 10 dias.

3.7 ANÁLISES PRÉ-EUTANÁSIA

3.7.1 Indução da trombose e monitoramento do fluxo sanguíneo

No presente trabalho foi utilizado cloreto férrico (FeCl_3) (KURZ, 1990) para a formação do trombo o qual irá desencadear danos endoteliais vasculares oxidativos, provocando a exposição da matriz subendotelial extracelular. Em seguida, as plaquetas interagiram com colágeno e vWF na matriz através dos seus respectivos receptores de superfície das plaquetas, conduzindo à adesão das plaquetas. As plaquetas ativadas passaram por mobilização de cálcio e a liberação de ADP e TXA_2 para acelerar ainda mais o recrutamento e a agregação de plaquetas para a formação de trombos. Este método de indução de trombose por metais pesados já é bem conhecido para a avaliação da eficácia de potencializadores do fluxo sanguíneo antitrombóticos (JANG et al., 2014).

Os ratos tratados foram anestesiados com uma injeção intraperitoneal de cetamina/xilazina (75mg/kg:10 mg/kg, i.p) e colocados em decúbito dorsal em uma placa cirúrgica aquecida (37 °C). Após a localização da traquéia realizou-se uma incisão na linha média a partir da extremidade caudal da laringe para a supraesternal (RADOMSKI et al., 2005), iniciando a dissecação dos tecidos para localização da artéria carótida comum esquerda,

quando isolada, foi posicionada sobre uma base curva de polietileno (8 cm) para separação dos tecidos adjacentes (TOHTI et al., 2006).

Com a dissecação da artéria carótida, foi dado início ao protocolo de indução de trombose, assim, uma sonda ultrassônica X1 acoplada ao sistema de aquisição de dados (T106 Transonic Systems Inc.) (Figura 8) (RADOMSKI et al., 2005), foi colocado na carótida acoplando-a para ficar no distanciamento da proximidade caudal (Figura 9). O registro do fluxo foi realizado através do software LabChart versão 8.0 (AD Instruments, Austrália), após 10 minutos de registro do fluxo basal foi colocado um papel de filtro Whatman nº 1 (1x2 mm) embebido com 5 µL de solução de FeCl_3 (50%) por 3 minutos (JANG et al., 2014) na superfície ventral da artéria carótida posterior a sonda na proximidade supraesternal (MORISHIMA; KAMISATO; HONDA, 2014; ADOMSKI et al., 2005). Após os 3 minutos, o papel saturado com FeCl_3 foi removido da carótida e dado início ao monitoramento do tempo de oclusão, tempo em que o sistema de aquisição de dados (T106 Transonic Systems Inc.) registrou fluxo zero (ZAKRZESKA et al., 2015). Assim, a trombose é representada como o “tempo para a oclusão após a remoção do papel de filtro” até o fluxo atingir o valor de zero e permanecer por 30 s (OWENS III, 2011).

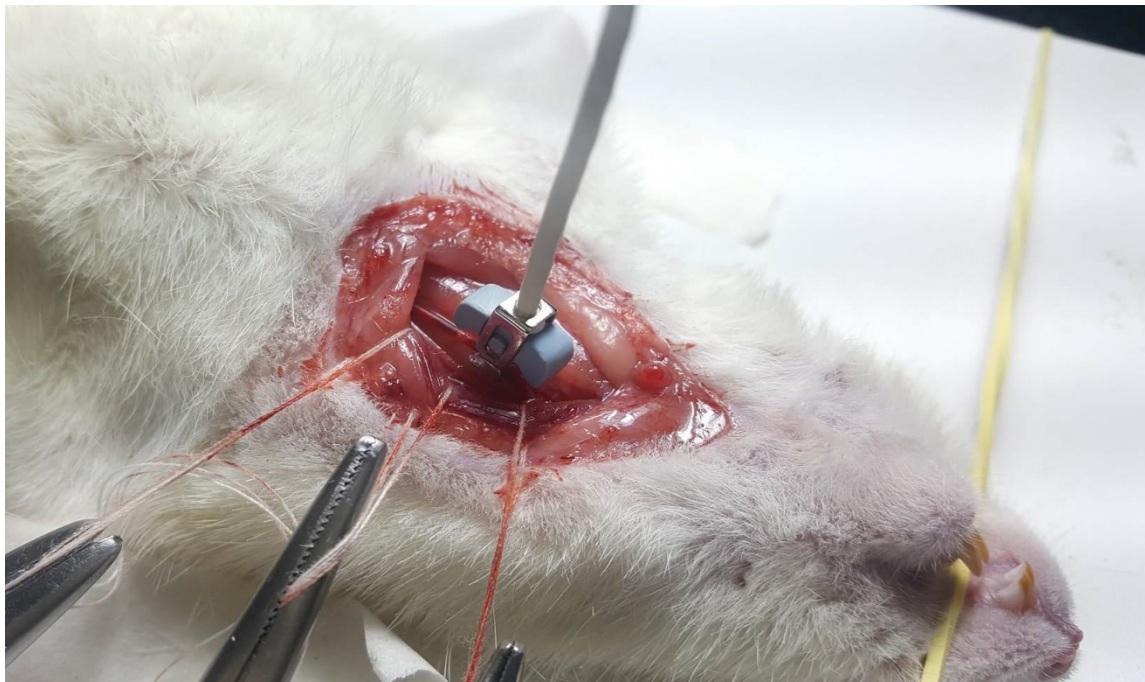
Após o monitoramento do fluxo sanguíneo, um segmento da artéria carótida comum esquerda com o trombo foi cortado em ambos os lados, dissecado, aberto longitudinalmente, e o trombo foi completamente removido, após a remoção, foi realizada a aferição do peso do trombo úmido e depois foi deixado para secar ao ar à temperatura ambiente e pesado após 24h (ZAKRZESKA et al., 2015).

Figura 8- Sistema de aquisição de dados acoplado (T106 Transonic Systems Inc.) a sonda ultrassônica X1



Fonte: Luis, C. C. S.

Figura 9- Monitoramento do fluxo sanguíneo



Fonte: Luis, C. C. S.

3.8 DESCRIÇÃO DO MÉTODO DE EUTANÁSIA

Ao final do período experimental, os animais foram anestesiados com solução de cetamina/xilazina (75mg/kg:10 mg/kg, i.p) foram eutanasiados por exsanguinamento, de acordo com o preconizado pelo COBEA. O sangue foi retirado para os experimentos de agregação plaquetária, avaliação da produção de ânion superóxido e para determinação de tocoferóis. Após o foi realizado a dissecação da artéria aorta para o experimento de reatividade vascular e da artéria carótida para remoção dos trombos.

3.9 ANÁLISES PÓS-EUTANÁSIA

3.9.1 Obtenção do sangue total e preparação das plaquetas lavadas

O sangue foi coletado da veia cava inferior nos ratos anestesiados usando seringas estéreis (5 mL) heparinizadas. Para os protocolos de agregação plaquetária por transmissão luminosa e avaliação da produção de ânions superóxidos ($O_2^{\bullet-}$) no plasma rico em plaquetas (PRP), o sangue foi depositado em tubos de plástico siliconado e, em seguida, centrifugados a 120 rcf por 10 minutos para obtenção do PRP, após a remoção do sobrenadante os tubos receberam uma nova centrifugação a 2.300 rcf por 15 minutos para obtenção do Plasma Pobre em Plaquetas (PPP) (SHATTIL; CUNNINGHAN; HOXIE, 1987; DE CUYPER et al., 2013). Uma parte do sangue total foi centrifugado a 2500 rcf à 4° C por 10 minutos o plasma foi retirado e armazenado em -80°C para posterior quantificação de tocoferóis (CIMADEVILLA et al., 2014).

3.9.2 Medida da agregação plaquetária por transmissão luminosa

O agregômetro (AgreGO, São Paulo, Brasil) (Figura 10) foi calibrado com o PPP (300 µl) para obter o 100 % de transmitância. Para cada canal foi utilizado 300 µl de PRP (ajustado para 2×10^7 plaquetas/mL) incubados à 37 °C por 15 minutos com agitação contínua à 1000 rpm. Após, os PRPs foram diretamente estimulados com os agonistas ADP (16.7 µM) e PMA (100 µM). Na estimulação com ADP o tempo de registro foi de 10 minutos e na estimulação com PMA foi 15 minutos. O grau de agregação foi expresso como uma porcentagem da transmissão máxima de luz obtida na amostra de PPP (HUANG, 2007; YONEDA et al., 2004).

Figura 10-Agregômetro (AgreGO, São Paulo, Brasil)



Fonte: Luis, C. C. S.

3.9.3 Avaliação da produção de ânions superóxidos ($O_2^{\bullet-}$) no plasma rico em plaquetas

Após centrifugação e obtenção do PRP, 20 μ L foram diluídos em 980 μ L de HEPES (Tabela 2). Após diluição a amostra no tubo de ensaio foi levada para o citômetro FACS Canto-II (BD) (Figura 11) equipado com laser de argônio com 15 mW e $\lambda = 488$ nm para realização da leitura, seguido da análise no software DIVA 6.0 (BD, Santa Mônica, CA, EUA), até apadronização de 5×10^7 plaquetas/mL. Depois da padronização do teor de plaquetas, 200 μ L dessa diluição foi retirada e adicionada em um tubo de ensaio junto com 10 μ L Dihidroetidina (DHE) (10^{-2} M) (sonda de ânion superóxido, espécie reativa de oxigênio). Após a junção da diluição de plaquetas com DHE, o tubo de ensaio contendo essa mistura foi protegido da luz com papel alumínio e colocado no banho-maria à 37°C por 30 minutos. Depois dessa etapa a mistura foi levada para o citômetro para avaliação da fluorescência emitida pelo DHE (DE CUYPER et al, 2013). No citômetro foram adquiridos 10.000 eventos, com exclusão de restos celulares, definidos pelo threshold do FSC (Forward scatter), e sinais de fluorescência foram captados nas seguintes faixas de comprimento de onda: 515-545 para o canal 1 (FL1). Mudanças na fluorescência (F1) foram normalizadas com a fluorescência obtida na amostra tratada apenas com HEPES (F0) e foram expressas como F1/F0.

Figura 11- Citômetro FACS Canto-II (BD)



Fonte: Luis, C. C. S.

Tabela 2– Composição da solução HEPES

SUBSTÂNCIA	CONCENTRAÇÃO (mM)
NaCl	132,0
KCl	6,0
MgSO ₄	1,0
KH ₂ PO ₄	1,2
Solução tampão HEPES 99,5“%	20,0
Glicose	5,0

Fonte: DE CUYPER et al, 2013

3.9.4 Determinação de α -tocoferol no plasma

Para a determinação do teor de α -tocoferol no plasma dos animais seguiu-se a metodologia de Cimadevilla et al., (2014) com modificações. Foi preparada uma amostra do padrão externo de α -tocoferol dissolvido em metanol na concentração de 1 mg/mL. Então, foi feita uma nova diluição até chegar à concentração de 20 μ g/mL para ser injetada no aparato

de CLAE e servir de padrão para os cálculos das concentrações nas amostras em estudo e determinação da taxa de recuperação. Para preparação das amostras dos grupos em estudo, 100 μL de plasma do rato foi submetido a uma extração líquido-líquido pela adição de 250 μL de dodecil sulfato de sódio (SDS 0,1 M), 500 μL de etanol e 1 mL de Hexano contendo 0,5 g/L de hidroxitolueno butilado (BHT). Esse procedimento foi realizado também com a adição de 100 μL de uma solução 1 mg/mL do padrão externo de α -tocoferol a 100 μL de plasma controle para fins de comparação e validação do método. Então, os tubos foram colocados em um agitador horizontal por 5 minutos. Após isso, as amostras foram centrifugadas em 2500 g por 10 minutos numa temperatura de 4° C e a fase hexânica foi coletada. Esse processo de extração foi repetido 2 vezes. Posteriormente, o hexano foi seco em câmara de vácuo na temperatura de 40° C por 20 minutos. As amostras secas foram dissolvidas em 100 μL de metanol e assim estavam prontas para serem injetadas no equipamento de CLAE seguindo o gradiente de eluição descrito na tabela 1. Nesse experimento também foi usado o cromatógrafo (Shimadzu, Japão) (Figura 6).

3.9.5 Estudo da reatividade vascular em aorta

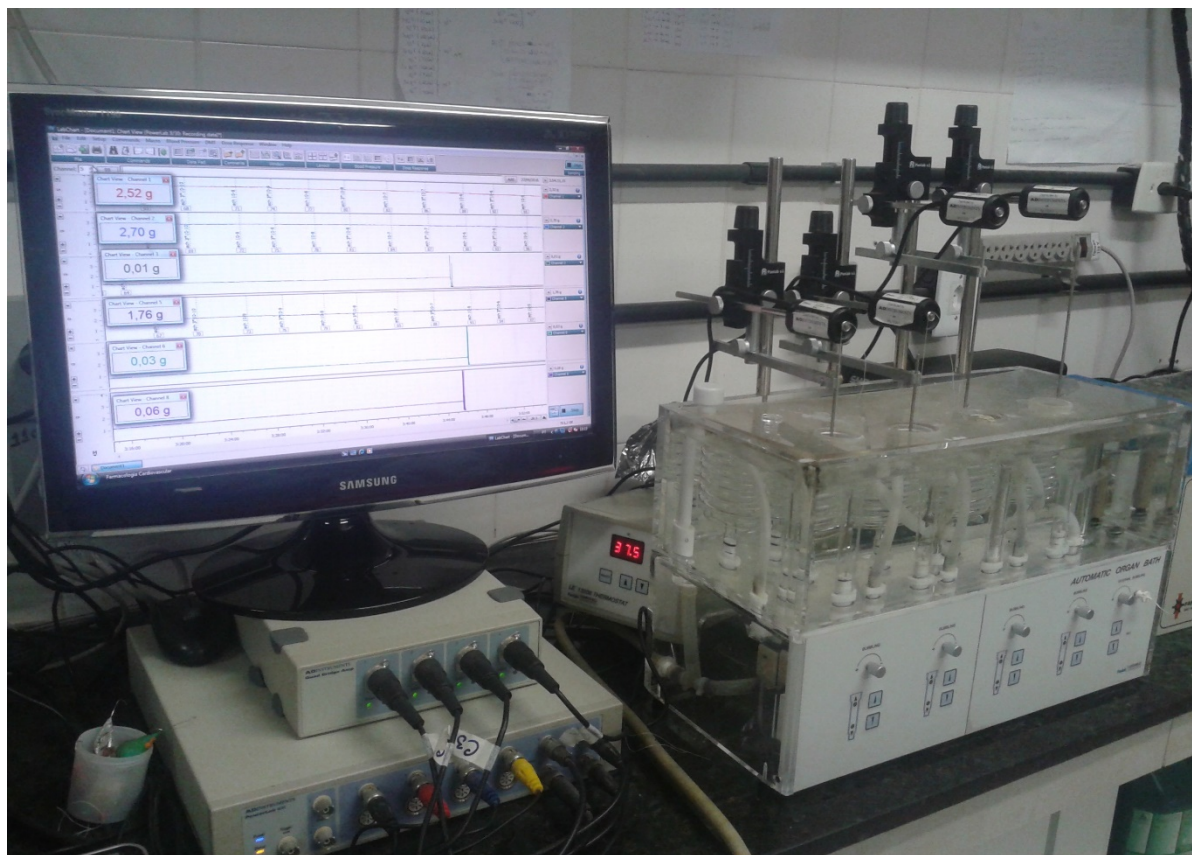
Os animais tratados foram eutanasiados e, por meio de toracotomia, a artéria aórtica torácica foi identificada, cuidadosamente removida e imediatamente posta em placa de petri contendo solução de Krebs (Tabela 3) à 4°C. Posteriormente, todo o tecido conectivo perivascular foi removido e a aorta segmentada em anéis de 1 a 2 milímetros de comprimento. Duas hastes metálicas foram transpassadas na luz do vaso, suspensas verticalmente por linhas de algodão, as quais foram fixadas a um transdutor de força (MLT020, AD Instruments, Austrália) (Figura 12) e imersas em cubas contendo 10 mL de solução Krebs, a 37 °C, aeradas com uma mistura de 95 % de O₂ e 5 % de CO₂ (carbogênio; White Martins, Brasil). As variações na tensão das preparações foram obtidas através de polígrafo digital modelo PowerLab (AD Instruments, Austrália), e registrados através do software LabChart versão 7.0 (AD Instruments, Austrália).

Todos os anéis foram submetidos a uma tensão basal de aproximadamente 1,0 g, por um período de estabilização de 60 minutos (ANDRADE et al., 2015) com troca da solução nutritiva (Krebs) a cada 15 minutos à 37°C na quantidade de 10 mL e ajuste da linha de base, quando necessário (ALTURA; ALTURA, 1970).

A solução de Krebs foi substituída pela solução de cloreto de potássio-KCl 60mM (Tabela 4), após a contração a solução de KCl foi retirada e os anéis foram lavados com

solução de Krebs até tensão basal. Para verificar a viabilidade do tecido e presença da funcionalidade do endotélio, após período de estabilização, foi realizada uma contração com fenilefrina-Phe ($1 \mu\text{M}$). Na fase tônica da contração, a acetilcolina-ACh ($1 \mu\text{M}$) foi adicionada à cuba para avaliar a integridade do endotélio vascular (Figura 13). Anéis sem endotélio funcional foram obtidos pela remoção mecânica da camada endotelial através de fricção mecânica entre a haste e a parede interna do vaso. O endotélio vascular foi considerado íntegro quando os anéis aórticos apresentaram relaxamento induzido pela ACh superior a 60% sobre a pré-contração com $1 \mu\text{M}$ de Phe, a retirada do endotélio foi confirmada com o relaxamento inferior 10 % (FURCHGOTT; ZAWADZKI, 1980). Em seguida, foram obtidas curvas concentração-resposta para Phe (10^{-9} - 10^{-5} M) e para ACh (10^{-9} - 10^{-5} M) e NPS (10^{-12} - 10^{-5} M), logo após a contração induzida por Phe ($10 \mu\text{M}$) atingir sua fase tônica.

Figura 12- Banho de órgão acoplado ao transdutor de força (MLT020, AD Instruments, Austrália).



Fonte: Luis, C. C. S.

Figura 13 - Representação da verificação da viabilidade do vaso e da integridade do endotélio vascular. A- Presença do endotélio e B- Ausência do endotélio funcional

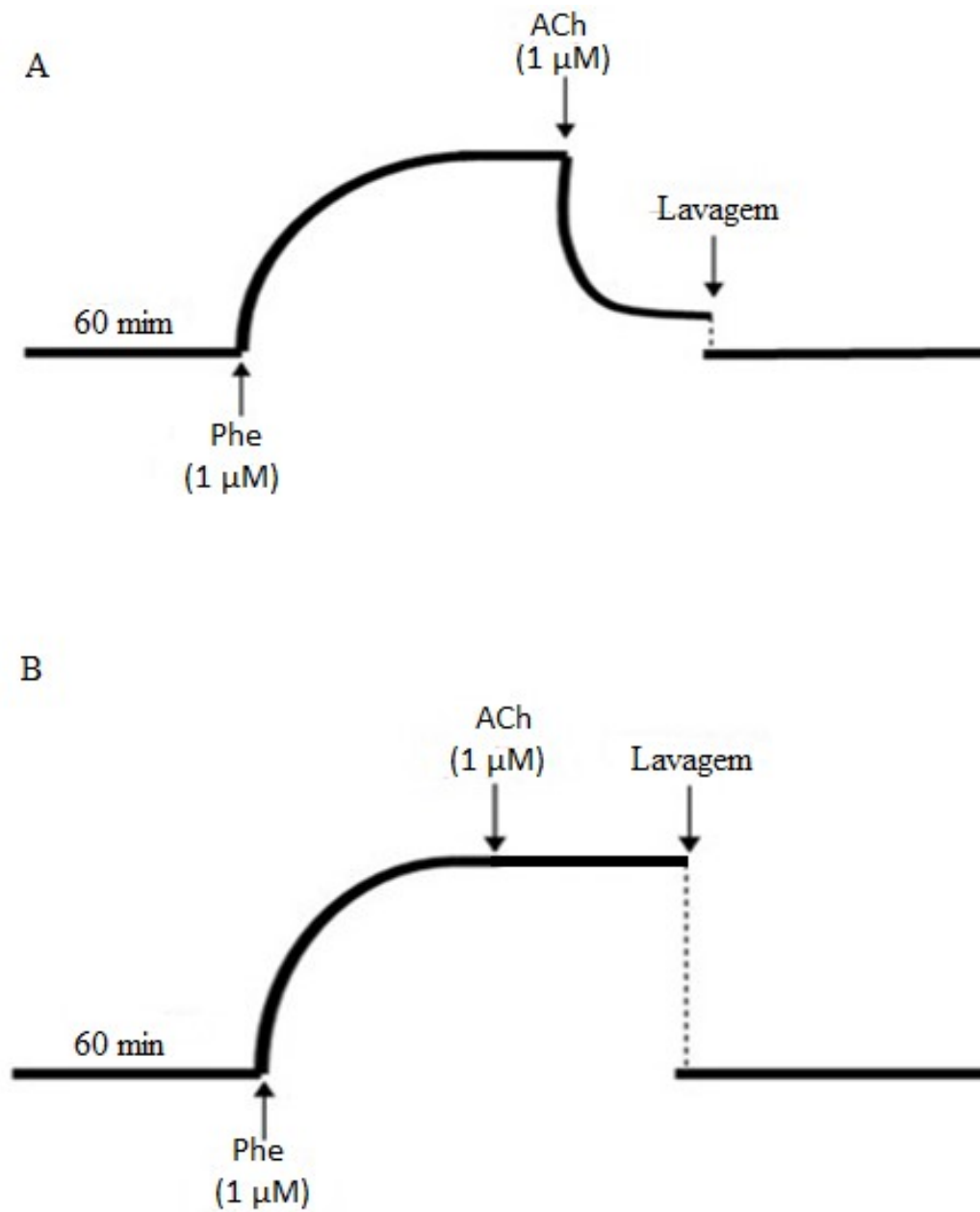


Tabela 3 – Composição da solução de Krebs para aorta torácica isolada de rato

Substâncias	Concentração (mM)
NaCl	118
KCl	4,6
CaCl₂	2,5
MgSO₄	5,7
KH₂PO₄	1,1
NaHCO₃	25
Glicose	11

FONTE: KREBS; HENSELEIT, 1932.

Tabela 4 – Composição da solução de KCl 60mM para aorta torácica isolada de rato

Substâncias	Concentração (mM)
NaCl	58
KCl	60
CaCl₂	2,5
MgSO₄	5,7
KH₂PO₄	1,1
NaHCO₃	25
Glicose	11

FONTE: GUEDES et al., 2004.

3.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todos os dados foram expressos como média $\pm$ EPM (erro padrão da média). Os valores de $E_{\max}$ e do logaritmo (Log) negativo em cuja concentração se tem 50 % do $E_{\max}$ (pD2) para as curvas concentração-resposta foram obtidos através de regressões não-lineares egráfico foi construído com o Log das concentrações versus a resposta correspondente em um modelo sigmoidal de “slope” variável utilizando o “software Graphpad Prism 6.0”. As comparações estatísticas foram realizadas usando a análise de variância ordinária, quando comparados três ou mais grupos, ambos seguidos do pós-teste de Tukey, com a significância atribuída se $p < 0,05$.

Os gráficos de histograma e dot-plot da Citometria de Fluxo para avaliação da produção de ânions superóxidos foram analisados pelo “software DIVA 6.0”.

A quantificação de tocoferóis no óleo foi calculada através da plotagem de gráficos e geração de equação de reta usando o programa Excel do pacote Microsoft Office 2010.

REFERÊNCIAS

- ADAMSTONE, F. B. Histologic comparison of the brains of vitamin A-deficient and vitamin E-deficient chicks. **Archives of Pathology**, v. 43, p. 301-312, 1947.
- ALMEIDA, R. N. et al. Metodologia para avaliação de plantas com atividade no Sistema Nervoso Central e alguns dados experimentais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 80, p. 72-76, 1999.
- ALTURA, B.M.; ALTURA, B.T. Differential effects of substrate depletion on drug-induced contractions of rabbit aorta. **America Journal of Physiology**, v. 219, p. 1698-1705, 1970.
- ANDRADE, D. M. L. et al. Vasorelaxant and Hypotensive Effects of Jaboticaba Fruit (*Myrciaria cauliflora*) Extract in Rats. **Hindawi Publishing Corporation**, v. 2015, p.8, 2015.
- AZZI, A.; RICCIARELLI, R.; ZINGG, J. M. Non-antioxidant molecular functions of alphanatocopherol (vitamin E). **FEBS Letters**, v. 519, p. 8–10, 2002.
- BENTO, A. P. N. et al. Baru almond improves lipid profile in mildly hypercholesterolemic subjects: A randomized, controlled, crossover study. **Nutrition, Metabolism & Cardiovascular Diseases**, v.24, p.1330-1336, 2014.
- BONDONNO, C. P. et al. Dietary flavonoids and nitrate: effects on nitric oxide and vascular function. **Nutrition Reviews**, v. 73, n.4, p.216–235, 2015.
- BORGES, T. H. P. **Estudo da caracterização e propriedades das amêndoas do Baru e óleo de Baru bruto submetido ao aquecimento**. Goiânia, 2013. Dissertação de Mestrado. Escola de Agronomia e Engenharia de Alimentos. Universidade Federal de Goiás, 2013.
- CASTRO, H. C et al. Plaquetas: ainda um alvo terapêutico. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 42, n. 5, p. 321-332, 2006.
-
- CARRAZZA, L; ÁVILA, J. C. C. **Manual Tecnológico de Aproveitamento Integral do Fruto do Baru**. Brasília – DF. Instituto Sociedade, População e Natureza (ISPAN). Brasil, 2010.
- CEDERHOLM. A.; FROSTEGARD, J. Annexin A5 as a novel player in prevention of atherothrombosis in SLE and in the general population. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1108, n.1, p. 96-103, 2007.
-
- CIMADEVILLA, H. M. et al. Development and validation of a single HPLC method for determination of α -tocopherol in cell culture and in human or mouse biological samples. **Biomedical Chromatography**, v. 29, n. 6, p. 843-852, 2014.
- CHAHAL, G.; THORPE, M.; HELLMAN. The Importance of Exosite Interactions for Substrate Cleavage by Human Thrombin. **Plosone**, v. 10, n.6, p. 1-23, 2015.
- CHO, J.; MOSHER, D. F. Role of fibronectin assembly in platelet thrombus formation. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, v.4, p. 1461–1469, 2006.

CHU, L-Y; LIOU, J-Y; WU, K.K. Prostacyclin protects vascular integrity via PPAR/14-3-3 pathway. **Prostaglandins Other Lipid Mediat**, 2015.

COSEMANS, J. M. et al. Multiple ways to switch platelet integrins on and off. **Journal of Thrombosis and Haemostasis** v. 6, p. 1253–1261, 2008.

COSTA, L. A. et al. Association between the plasma proteome and plasma α -tocopherol concentrations in humans. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 24, p.396–400, 2013.

CRUZ, K. S.; SILVA, M. A.; FREITAS, O.; NEVES, V. A. Partial characterization of proteins from Baru (*Dipteryx alata* Vog) seeds. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 91, p. 2006–2012, 2011.

DE CUYPER, I. M. et al. A novel flow cytometry-based platelet aggregation assay. **Blood**, v. 121, n. 10, p. e70-80, 2013.

DERBALI, A. et al. Cardioprotective effect of linseed oil against isoproterenol-induced myocardial infarction in Wistar rats: a biochemical and electrocardiographic study. **Journal of Physiology and Biochemistry**, v. 71, p. 281-288, 2015.

DIAS, R. G.; NEGRÃO, C. E.; KRIEGER, M. H. Nitric Oxide and the Cardiovascular System: Cell Activation, Vascular Reactivity and Genetic Variant. **Arquivos Brasileiros Cardiologia**, v. 96, n.1, p. 68-75, 2011.

DIAZ, J. A. et al. Critical Review of Mouse Models of Venous Thrombosis. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v.32, p. 556-562. 2012.

FALCÃO, F. J. A. et al. Receptores Plaquetários P2Y₁₂: Importância na Intervenção Coronariana Percutânea P2Y₁₂. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 101, n.3, p. 277-282, 2013.

FÉLÉTOU, M.; VANHOUTTE, P. M. Endothelium-dependent hyperpolarizations: Quo vadis? **Acta Physiologica**, v. 219, p.100–107, 2017.

FERNANDES, D. C. et al. Nutritional composition and protein value of the Baru (*Dipteryx alata* Vog.) almond from the Brazilian Savanna. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 90, p. 1650-1655, 2010.

FERREIRA, E. V. et al. Diagnósticos alternativos corroborados por angiotomografia computadorizada de tórax em pacientes com suspeita de tromboembolia pulmonar. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 42, n.2, p. 35-41, 2016.

FERRO, D. et al. Vitamin E reduces monocyte tissue factor expression in cirrhotic patients. **Blood**. v. 93, p. 2945–2950, 1999.

FREITAS, J. B.; NAVES, M. M. V. Composição química de nozes e sementes comestíveis e sua relação com a nutrição e saúde. **Revista de Nutrição**, v. 2, n.2, p. 269-279, 2010.

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

GALLWITZ, M. et al. The Extended Cleavage Specificity of Human Thrombin. **Plosone**, v. 7, n.2, p. 1-16, 2012.

GOLEBIEWSKA, E. M.; POOLE, A. Platelet secretion: From haemostasis to wound healing and beyond. **Blood Reviews**, v. 29, p.153–162, 2015.

GÓRNAS, P. Unique variability of tocopherol composition in various seed oils recovered from by-products of apple industry: Rapid and simple determination of all four homologues (α , β , γ and δ) by RP-HPLC/FLD. **Food Chemistry**, v. 172, p. 129–134, 2015.

GUEDES, D. N. et al. Calcium antagonism and the vasorelaxation of the rat aorta induced by rotundifolone. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 37, p. 1881-1887, 2004.

GUINAZI, M. et al. Tocoferóis e tocotrienóis em óleos vegetais e ovos. **Química Nova**, v. 32, n. 8, p.2098-2103, 2009.

GUTIERRES, J.M. et al. Alterations in the extra cellular catabolism of nucleotides and platelet aggregation induced by high-fat diet in rats: effects of α -tocopherol. **Journal of Physiology and Biochemistry**, v. 70, p.487–496, 2014.

GUTIERREZ, A. D. et al. The response of γ vitamin E to varying dosages of α vitamin E plus vitamin C. **Metabolism Clinical and Experimental**, v. 58, p. 469-478, 2009.

HANDLEY, L. D. et al. Thrombomodulin binding selects the catalytically active form of thrombin. **Biochemistry**, v. 54, n.43, p. 6650-6658, 2015.

HARPER, M. T.; POOLE, A. W. Diverse functions of protein kinase C isoforms in platelet activation and thrombus formation. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, v. 8, p. 454-462, 2010.

HUANG, J. Cinnamaldehyde reduction of platelet aggregation and thrombosis in rodents. **Thrombosis Research**, v. 119, p. 337-342, 2007.

IOM. Institute of Medicine. **Dietary Reference Intakes for Vitamin C, Vitamin E, Selenium, and Carotenoids**. National Academy of Sciences. National Academy Press. Washington. 2000.

ISTH Steering Committee for World Thrombosis Day. Thrombosis: a major contributor to the global disease burden. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, v.12, p. 1580–90, 2014.

JANG, J. Y. et al. Perilla oil improves blood flow through inhibition of platelet aggregation and thrombus formation. **Laboratory Animal Research**, v. 30, n.1, p. 21-27, 2014.

JACKSON, P. The growing complexity of platelet aggregation. **Blood**, v. 109, n. 12, p. 5087-5095, 2007.

JURK, K; KEHREL, B. E. Platelets: physiology and biochemistry. In: **Seminars in thrombosis and hemostasis**. New York: Stratton Intercontinental Medical Book Corporation, p. 381-392, 2005.

KAZMI, R. S.; BOYCE, S.; LWALEED, B. A. Homeostasis of Hemostasis: The Role of Endothelium. **Seminars in thrombosis and hemostasis**, v. 41, n. 6, p. 549-555, 2015.

KREBS, H. A. HENSELEIT, K. Untersuchungen über die Harnstoffbildung im Tierkörper. Hoppe-Seyler's Zeitschrift für **Physiol. Chemie**. v.210, p.33-66.,1932.

- KIM, J. E. et al. Vitamin E inhibition on platelet procoagulant activity: Involvement of aminophospholipid translocase activity. **Thrombosis Research**, v. 127, p. 435-442, 2011.
- KOBUCHI, S. et al. Nitric oxide modulation of endothelium-derived hyperpolarizing factor in agonist-induced depressor responses in anesthetized rats. **European Journal of Pharmacology**, v. 762, p. 26-34, 2015.
- KURZ, K.; MAIN, B.; SANDUSKY, G. Rat model of arterial thrombosis induced by ferric chloride. **Thrombosis research**, v. 60, p. 269-280, 1990.
- LEUNG, L. K. Hemostasis and its Regulation. **American College Of Physicians Medicine**. 2012.
- LEMOS, M. R. B. et al. Tocopherols and Fatty Acid Profile in Baru Nuts (*Dipteryx alata* Vog.), Raw and Roasted: Important Sources in Nature that Can Prevent Diseases. **Food Science & Nutrition Technology**, 1 (1), 2016.
- LEMOS, M. R. B. et al. The effect of roasting on the phenolic compounds and antioxidant potential of Baru nuts [*Dipteryx alata* Vog.]. **Food Research International**, v. 48, n. 2, p. 592-597, 2012.
- LI, G. et al. Circulating tocopherols and risk of coronary artery disease: A systematic review and meta-analysis. **European Journal of Preventive Cardiology**, v. 23, n.7, p. 748–757, 2016.
- LIU, M. et al. Mixed tocopherols inhibit platelet aggregation in humans: potential mechanisms. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 7, p. 700-706, 2003.
- MESQUITA JUNIOR, N. et al. .Prevalência de trombose venosa profunda em paraplégicos de causa traumática. **Jornal Vascular Brasileiro**, v.12, n. 4, p.271-277, 2013.
- MOREIRA, A. M. et al. Fatores de risco associados à trombose em pacientes do estado do Ceará. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia** . v. 31, n. 3, p. 132-136, 2009.
- MORISHIMA, Y.; KAMISATO, C.; HONDA, Y. Treatment of venous thrombosis with an oral direct factor Xa inhibitor edoxaban by single and multiple administrations in rats. **European Journal of Pharmacology**. v. 742, p. 15-21, 2014.
- MOROI, A.J., WATSON, S. P. Impact of the PI3-kinase/Akt pathway on ITAM and hemITAM receptors: haemostasis, platelet activation and antithrombotic therapy. **Biochemical pharmacology**. v. 94, n.3, p. 186-194. 2015.
- MUROHARA, T. et al. Inhibition of platelet adherence to mononuclear cells by alpha-tocopherol: role of P-selectin. **Circulation**. v.110, p. 141-148, 2004.
- NAGAO, M. et al. Relation of Serum α - and γ -Tocopherol Levels to Cardiovascular Disease-Related Mortality Among Japanese Men and Women. **Journal of Epidemiology**, v.22, n.5, p.402-410, 2012.
- NOVELLI, E.L.B. et al. Anthropometrical parameters and markers of obesity in rats. **Laboratory Animals**, v.41, p.111-119, 2007.
- OECD. Test No 423: Acute oral toxicity – acute toxic class method, 2001.

OKUHARA, A. et al. Incidence of deep vein thrombosis and quality of venous thromboembolism prophylaxis. **Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões**, v. 41, n.1, p. 002-006, 2014.

OKUHARA, A. et al. Incidence of deep venous thrombosis and stratification of risk groups in a university hospital vascular surgery unit. **Jornal Vascular Brasileiro**, v. 14, n.2, p. 139-144, 2015.

OWENS III, A. et al. Towards a standardization of the murine ferric chloride-induced carotid arterial thrombosis model. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, v. 9, p.1862-1863, 2011.

PIEGAS, L. S. et al. Acute Coronary Syndrome Behavior: Results of a Brazilian Registry. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 100, n. 6, p. 502-510, 2013.

PIERDONÁ, T. M. **Avaliação das atividades antiagregante plaquetária e anticoagulante em estudo de bioprospecção de *Opercutinamacrocarpa*(L.) Urb. (Jalapa) em plasma humano: determinação do mecanismo de ação.** Fortaleza, 2011. Dissertação. Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza.

PUURUNEN, H. S. M. K. et al. Epidemiology of venous thromboembolism in the Framingham. **Thrombosis Research**, v.145, p. 27–33, 2016.

RADOMSKI, A. et al. Nanoparticle-induced platelet aggregation and vascular thrombosis. **British Journal of Pharmacology**, v. 146, p. 882–893, 2005.

REIS, L.L.T. Efeito da farinha da amêndoa de baru (*Dipteryx Alata* Vog.) na alteração do perfil lipídico e do estresse oxidativo induzido por dieta hipercolesterolêmica em ratas. 2015. 114f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas, Instituto de Ciências Exatas e Biológicas, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, 2015

RO, J. Y. et al. Onion (*Allium cepa* L.) peel extract has anti-platelet effects in rat platelets. **SpringerPlus**, v.4, p.17, 2015.

ROBSON, S. C.; SEVIGNY, J.; ZIMMERMANN, H. The ENTPDase family of ectonucleotidases: structure function relationships and pathophysiological significance. **Purinergic Signalling**, v. 2, p. 409–430, 2006.

ROSENDAAL, F.; REITSMA, P. Genetics of venous thrombosis. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**. v. 7, p. 301-304, 2009.

SACHS, U. J. H.; NIESWANDT, B. In Vivo Thrombus Formation in Murine Models. **Circulation Research**, v.100, p. 979-991, 2007.

SANO, S. M.; RIBEIRO, J. F.; BRITO, M. A. **Baru: biologia e uso.** Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – MAPA. EMBRAPA, p. 52, 2004.

SANTHAKUMAR, A. B.; BULMER, A. C.; SINGH, I. A review of the mechanisms and effectiveness of dietary polyphenols in reducing oxidative stress and thrombotic risk. **Journal of Human Nutrition and Dietetics**, v. 27, p. 1-21, 2014.

- SHATTIL, S.J.; CUNNINGHAM, M.; HOXIE, J.A. Detection of activated platelets in whole blood using activation-dependent Monoclonal antibodies and flow cytometry. **Blood**, v.70, n.1, p.307-313, 1987.
- SIQUEIRA, E. M. A. et al. Consumption of Baru seeds [*Dipteryx alata* Vog.], a Brazilian savanna nut, prevents iron-induced oxidative stress in rats. **Food Research International**, v. 45, p. 427–433, 2012.
- SILVÉRIO, M.D.O.; CASTRO, C.F.S.; MIRANDA, A.R. Avaliação da atividade antioxidante e inibitória da tirosinase das folhas de *Dipteryx alata* Vogel (Baru) **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**. Botucatu, v.15, n.1, p.59-65, 2013.
- SMANIO, P. E. P. et al. Myocardial Scintigraphy in the Evaluation of Cardiac Events in Patients without Typical Symptoms. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 2015, n. 2, p. 112-22, 2015.
- SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA. I Diretriz Brasileira de Prevenção Cardiovascular. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v.101, n. 6, 2013.
- SOUSA, A. G. O. et al. Nutritional quality and protein value of exotic almonds and nut from the Brazilian Savanna compared to peanut. **Food Research International**. v. 44, p. 2319-2325, 2011.
- STORCH, A. S. et al. Métodos de Investigação da Função Endotelial: Descrição e suas Aplicações. **International Journal of Cardiovascular Sciences**. v. 30, n. 3, p. 262-273, 2017.
- TAKEMOTO, M. et al. Composição química da semente e do óleo de Baru (*Dipteryx alata* Vog.) nativo do Município de Pirenópolis, Estado de Goiás. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v.60, n.2, p.113-117, 2001.
- TOHTI, I. et al. Aqueous extracts of *Ocimum basilicum* L. (sweet basil) decrease platelet aggregation induced by ADP and thrombin in vitro and rats arterio—venous shunt thrombosis in vivo. **Thrombosis Research**, v. 118, p. 733—739, 2006.
- TRABER, M. G.; ATKINSON, J. Vitamin E, antioxidant and nothing more. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 43, p. 4-15, 2007.
- VERA, R. et al. Características químicas de amêndoas de Barueiros (*Dipteryx alata* Vog.) de ocorrência natural no cerrado do estado de Goiás, Brasil. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 31, n. 1, p. 112-118, 2009.
- WESTRICK, R. J.; WINN, M. E.; EITZMAN, D. T. Murine Models of Vascular Thrombosis. **Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology**, v.27, p. 2079-2093, 2007.
- WHO. Report of a joint WHO/FAO/ONU expert consultation protein and aminoacid requirements in human nutrition. **WHO technical report series**. n. 935. Geneva. 2007.
- WONG, N.D. Epidemiological studies of CHD and the evolution of preventive Cardiology. **Revista da Sociedade de Cardiologia**, v.11, p. 276–289, 2014.
- YONEDA, K. Identification of the active metabolite of ticlopidine from rat in vitro metabolites. **British Journal of Pharmacology**, v. 142, n. 3, p. 551-557, 2004.

ZAKRZESKA, A. et al. Eplerenone reduces arterial thrombosis in diabetic rats **Journal of the Renin-Angiotensin-Aldosterone System**, v.16, n.4, p. 085–1094, 2015.

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

ZUFFO, A. M.; ANDRADE, F. R.; ZUFFO JUNIOR, J. M. Caracterização biométrica de frutos e sementes de Baru (*Dipteryx alata* Vog.) na região leste de Mato Grosso, Brasil. **Revista de Ciências Agrárias**, v. 37. n.4, p. 463-471, 2014.

APÊNDICES

Apêndice 1- Carta de Anuência



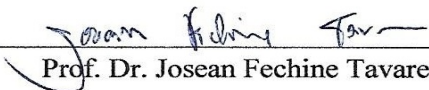
UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
INSTITUTO DE PESQUISA EM FÁRMACOS E MEDICAMENTOS
LABORATÓRIO MULTIUSUÁRIO DE CARACTERIZAÇÃO E ANÁLISE

CARTA DE ANUÊNCIA

Pela presente, JOSEAN FECHINE TAVARES, Professor Associado I do Departamento de Ciências Farmacêuticas do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Paraíba, declara que a quantificação dos tocoferóis no óleo de baru será desenvolvida no Laboratório Multiusuário de Caracterização e Análise do Instituto de Pesquisa em Fármacos e Medicamentos da Universidade Federal da Paraíba sob sua responsabilidade. A quantificação dos mesmos é uma parte do estudo a ser desenvolvido no projeto de pesquisa de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Nutrição da Universidade Federal da Paraíba intitulado AVALIAÇÃO DA SUPLEMENTAÇÃO DO ÓLEO DA AMÊNDOA DE BARU (*Dipteryx alata* Vog.) COMO AGENTE ANTITROMBÓTICO E ANTIAGREGANTE EM RATOS, da mestranda Cristiane Cosmo Silva Luis sob orientação do Professor Drº. Robson Cavalcante Veras.

João Pessoa, 28 de NOVEMBRO de 2016.

Atenciosamente,


Prof. Dr. Josean Fechine Tavares

Centro de Ciências da Saúde, Campus I, Cidade Universitária - João
Pessoa/PB - Brasil, CEP: 58051-900. Telefone: (83) 3216-7785

Apêndice 2

Supplementation with *Dipteryx alata* Vog. almond oil: a natural alternative for thrombus prevention and vascular response improvement

Periódico: *Scientific Reports*

ISSN 2045-2322

Fator de Impacto: 4.2 (Ano de 2016)

QUALIS P/ NUTRIÇÃO: A1– Ano base 2016

Supplementation with *Dipteryx alata* Vog. almond oil: a natural alternative for thrombus prevention and vascular response improvement

Cristiane Cosmo Silva Luis^a, Isac Almeida de Medeiros^{b,c}, José Alixandre de Sousa Luis^c, Josean Fechine Tavares^{b,c}, Yuri Mangueira do Nascimento^c, Lorena Soares Bezerra^a, Fátima de Lourdes Assunção Araújo de Azevedo^c, Júlio César Pinheiro Lúcio de Oliveira^c, Marianna Vieira Sobral^{b,c}, Vivianne Mendes Mangueira^c, Islania Giselia Albuquerque Gonçalves^b, Raul Jorge Hernan Castro-Gomez^d, Robson Cavalcante Veras^{a,b,*}.

^aPost-Graduate Program in Nutritional Sciences, Health Sciences Center, Federal University of Paraíba (Universidade Federal da Paraíba - UFPB), Campus I, 58059-900, João Pessoa, Paraíba – Brazil

^bDepartment of Pharmaceutical Sciences, Health Sciences Center, UFPB, Campus I, 58059-900, João Pessoa, Paraíba – Brazil

^cPost-Graduate Program in Natural and Synthetic Bioactive Products, Health Sciences Center, UFPB, Campus I, 58059-900, João Pessoa, Paraíba – Brazil

^dDepartment of Science and Technology, State University of Londrina (Universidade Estadual de Londrina – UEL), 6001, Londrina, Paraná – Brazil

^ePharmacy Undergraduate Student, Health Sciences Center, UFPB, Campus I, 58059-900, João Pessoa, Paraíba – Brazil

* Corresponding Author: Robson Cavalcante Veras

Universidade Federal da Paraíba – Campus I, 58059-900, Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Ciências Farmacêuticas

João Pessoa, Paraíba, Brazil

Tel.: +55 (83) 3216-7417 Email: drrobveras@gmail.com

This work explored the potential of supplementation with *Dipteryx alata* Vog. (*D. alata* Vog.) almond oil, which is rich in vitamin E, as a food source for the prevention of thrombosis, aggregation, and platelet oxidation and the modulation of vascular function in rats. To this end, the tocopherol content of the oil was determined, and the acute nonclinical toxicity of the oil was evaluated. After 10 days of supplementation, the preventive effect was evaluated. On the 11th day, thrombosis was induced with FeCl₃, the platelet aggregation induced by adenosine diphosphate (ADP) and phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) was measured, antioxidant activity was measured with the dihydroetidine (DHE) probe, and vascular function was analyzed with phenylephrine (Phe), acetylcholine (ACh) and sodium nitroprusside (NPS). The oil of *D. alata* Vog. presented a total tocopherol content of 2.89 %

and was safe for consumption regarding toxicity. Therefore, the results obtained suggest that this oil as a nutritional source has the potential to prevent arterial thrombosis, to reduce both the platelet aggregation mediated by ADP and the formation of the superoxide anion radical in platelets and to promote vascular improvement, reducing the contractile activity of Phe and increasing the action of ACh and NPS in aorta. Thus, the oil of *D. alata* Vog. contributes to the prevention of cardiovascular diseases (CVDs), thereby proving to be useful as a functional food in promoting human health.

Thrombosis is characterized by the formation of an agglomeration of platelets, fibrin and red blood cells due to a hemostatic imbalance within the vascular system, which develops in both arteries and veins^{1,2}. Both forms of thrombosis are part of the spectrum of cardiovascular diseases (CVDs) with a high severity³. Thus, when affecting the arterial system, thrombosis constitutes one of the main causes of death associated with the occurrence of ischemic stroke and acute ischemic myocardial infarction (AIMI), with the number of deaths worldwide at approximately 17.3 million; however, estimates indicate that this number will rise to 23.6 million by the year 2030⁴.

Venous thromboembolism (VTE), composed of deep venous thrombosis (DVT) and pulmonary embolism (PE), has an annual incidence of approximately 8 to 27/10,000 people⁵. The chronic phase of VTE, the post-thrombotic syndrome, which is characterized by chronic venous insufficiency, is a source of morbidity associated with a reduced quality of life⁶. The physiopathology of thrombosis is related to the Virchow triad, represented by platelet hyperaggregability, endothelial dysfunction or lesion and venous stasis, the factors of which can cause the development of the disease when acting individually or synergistically⁷.

Under physiological conditions, platelets circulate in a quiescent state in vessels, without the untimely attraction of the endothelial monolayer⁸. However, when a lesion occurs in a vessel and exposes the subendothelial collagen, the platelets adhere to the injured site and undergo a conformational change, culminating in a platelet aggregate responsible for the initial plug, and this process corresponds to primary hemostasis. However, when there is an imbalance in the hemostatic system, the platelets become key pieces in the development and propagation of a thrombus due to hyperaggregation⁴. Another factor that contributes to platelet aggregation is the production of reactive oxygen species (ROS) within the activated platelets; thus, an imbalance in the antioxidant system leads to a state of platelet hyperaggregability, increasing the risk of thrombus formation⁹.

Research has consistently shown that the consumption of foods rich in vitamin E (Vit. E, tocopherols)¹⁰, monounsaturated fatty acids (omega 9)¹¹ and polyunsaturated fatty acids

(omega 3 and omega 6)¹², in addition to phenolic compounds¹³, avoid misbalances in the hemostatic system and an imbalance between pro- and antioxidant factors, thereby conferring antiaggregant, antithrombotic and free-radical-stabilizing activities.

Vit. E is found mainly in vegetable sources, especially in oilseeds¹⁴ such as the *Dipteryx alata* Vog. (*D. alata* Vog.) almond, commonly called Baru, which is an angiosperm in the family Leguminosae; this species of almond is found in abundance in the Brazilian cerrado biome, with trees up to 25 m high, blooming from October to January¹⁵. The Vit. E content found in this almond, in the form of the compounds α -, β -, γ - and δ -tocopherol, makes the *D. alata* Vog. almond an important source of this nutrient within the oilseed group. In *D. alata* Vog., in addition to Vit. E, the contents of oleic acid, essential fatty acids (linoleic and linolenic acid)¹⁶ and the following phenolic compounds stand out: p-coumaric acid, ellagic acid, caffeic acid, hydroxybenzoic acid, catechin, ferulic acid, epicatechin and gallic acid¹⁷, along with the following phytosterol contents: β -elemene, γ -elemene, α -caryophyllene, β -caryophyllene, campesterol, stigmasterol, β -sitosterol and cycloartenol.

The *D. alata* Vog. almond is widely consumed by the population of the Brazilian cerrado due to reports of its aphrodisiac properties and is known as "viagra of cerrado". The oil of this almond has medicinal claims of being an antiinflammatory and antirheumatic agent¹⁸ and exhibits sudoriferous, tonic and menstrual regulatory properties¹⁹. Therefore, it was hypothesized that the oil of *D. alata* Vog. could have a protective effect on the cardiovascular and hemostatic system, with effects superior to those of Vit. E. The consumption of foods that favor protection against vascular damage and thrombus formation is of great value. Therefore, this study aimed to investigate how much oil of *D. alata* Vog. would be safe for human consumption and to quantify the content of tocopherols to support the hypothesis that this oil, because it contains Vit. E, would prevent the formation of arterial thrombi and would reduce platelet aggregation during primary hemostasis and would furthermore act as an antioxidant by reducing the production of the superoxide anion radical ($O_2^{\bullet-}$) in platelets, thereby avoiding platelet activation and aggregation, in addition to avoiding the loss of endothelial function.

Results

Content of tocopherols in the oil of *D. alata* Vog.

A typical chromatogram of the separation of tocopherols, obtained by reversed-phase liquid chromatography in the analysis of the oil of *D. alata* Vog., has three well-defined peaks, identified by external standards as δ -, (β + γ)- and α -tocopherol (Figure 1).

The contents of tocopherols found in 1 mL of the oil of *D. alata* Vog. were: 3.3 μ g of δ -Tocopherol, 18.3 μ g of (β + γ)-tocopherol and 7.3 μ g of α -tocopherol, totaling 28.9 μ g. The mean contents of the tocopherols obtained among the samples did not show significant intraday or interday differences ($p < 0.05$), indicating that the method was adequate for the quantification.

Plasma α -tocopherol content of treated animals

The liquid/liquid extraction for determining the amount of α -tocopherol in the plasma of the experimental animals obtained the following amounts for the various groups: Control (6.31 ± 0.51 μ g/mL); *D. alata* Vog. 7.2 mg/kg (9.16 ± 0.76 μ g/mL); *D. alata* Vog. 14.4 mg/kg (13.25 ± 2.54 μ g/mL); and Vit. E 0.42 mg/kg (9.74 ± 0.66 μ g/mL) (Figure 2A). The overlap of the chromatograms for the elements of the 4 studied groups is shown in Figure 2B.

Assessment of acute nonclinical toxicity

In the acute nonclinical toxicity test, no toxic effects or deaths were observed over the 14 days of observation at the tested doses of 300 mg/kg and 2000 mg/kg. According to the Globally Harmonized Classification System (GHS) criterion, the LD₅₀ value was estimated to be above 5000 mg/kg for *D. alata* Vog. oil, placing this oil in category 5.

Antithrombotic activity

The supplementation with *D. alata* Vog. oil at a dose of 14.4 mg/kg served as an antithrombotic agent by preventing the thrombus formation caused by FeCl₃. In an analysis of the occlusion time, that is, the time to thrombus formation, the time was greater in this group at 1127.5 ± 83.4 seconds than the occlusion times of the *D. alata* Vog. 7.2 mg/kg (563.4 ± 160.0 seconds), Vit. E 0.42 mg/kg (478.7 ± 206.6 seconds) and Control (472.5 ± 32.0 seconds) groups (Figure 3A).

The supplementation with this oil also promoted the formation of a thrombotic mass that was lower in weight in the *D. alata* Vog. 14.4 mg/kg group, 1.050 ± 0.223 mg for a wet

thrombus and 0.733 ± 0.189 mg for a dry thrombus at 24 hours, than that of the wet thrombotic mass (2.383 ± 0.294 mg) and dry thrombotic mass (1.917 ± 0.296 mg) from the Control group at 24 hours. The *D. alata* Vog. 7.2 mg/kg and Vit. E 0.42 mg/kg groups did not present statistically significant differences between themselves or in relation to the other groups (Figure 3B).

Antiaggregant activity

Oil supplementation decreased the adenosine diphosphate (ADP) agonist-induced platelet aggregation in the *D. alata* Vog. 14.4 mg/kg group by 53.25 ± 4.86 % compared to the Control group (77.14 ± 2.54 %). In contrast, the supplementation with *D. alata* Vog. at 7.2 mg/kg or Vit. E at 0.42 mg/kg did not result in statistically significant differences between these groups and or in relation to the other groups (Figure 4A).

The supplementation with the *D. alata* Vog. oil at both the 7.2 mg/kg and 14.4 mg/kg doses and with Vit. E at 0.42 mg/kg did not decrease the platelet aggregation induced by the PMA agonist; therefore, there were no statistically significant differences between these groups (Figure 4B).

Antioxidant activity

The supplementation with the oil of *D. alata* Vog. at 7.2 mg/kg and with Vit. E at 0.42 mg/kg caused a reduction in the intraplatelet formation of $O_2^{\bullet-}$ and reduced the fluorescence of dihydroetidine (DHE) by 57.0 ± 7.8 % and 67.2 ± 11.5 %, respectively, in relation to the Control group (100 ± 7.1 %). The result from the *D. alata* Vog. 14.4 mg/kg group was not statistically significantly different from those of the other groups (Figure 5A).

Basal $O_2^{\bullet-}$, as evaluated by the fluorescence of DHE in the platelet aggregate, was decreased by 24.9 ± 14.3 % and 23.4 ± 6.9 % in the groups supplemented with *D. alata* Vog. at 7.2 mg/kg and 14.4 mg/kg, respectively, and by 29.6 ± 12.6 % in the Vit. E 0.42 mg/kg group relative to the Control group (100 ± 30.3 %) (Figure 5B).

Effect of supplementation on vascular reactivity

The evaluation of vascular reactivity was based on the maximum effect values (E_{max}) and pD_2 for phenylephrine (Phe), acetylcholine (ACh) and sodium nitroprusside (NPS). The

results show that the supplementation reduced the maximum contraction induced by Phe (10^{-9} - 10^{-5} M) in vessels with endothelium at *D. alata* Vog. doses of 7.2 mg/kg ($E_{\max} = 63.9 \pm 9.9$ %) and 14.4 mg/kg ($E_{\max} = 42.3 \pm 5.9$ %;) and with Vit. E at 0.42 mg/kg ($E_{\max} = 58.0 \pm 3.8$ %) compared to the control ($E_{\max} = 100 \pm 4.8$ %) (Figure 6A). The maximum contraction with Phe was also reduced in vessels without endothelium by supplementation with *D. alata* Vog. oil at doses of 7.2 mg/kg ($E_{\max} = 66.2 \pm 9.7$ %) and 14.4 mg/kg ($E_{\max} = 64.8 \pm 3.0$ %) compared to the control ($E_{\max} = 100 \pm 8.4$ %). The group supplemented with 0.42 mg/kg Vit. E was not statistically significantly different from the other groups (Figure 6B).

The supplementation with *D. alata* Vog. oil did not change the vasorelaxation $E_{\max}$ at the 14.4 mg/kg dose but increased the ACh-induced pD_2 (10^{-9} - 10^{-5} M) ($pD_2 = 8.56 \pm 0.11$ M) in aortic rings with intact functional endothelium pre-contracted with Phe (10 μ M) compared to that of the group supplemented with Vit. E at 0.42 mg/kg ($pD_2 = 7.47 \pm 0.1$ M). The results from the Control group and the *D. alata* Vog. 7.2 mg/kg group were not statistically significantly different from each other or the other groups (Figure 6C).

The supplementation with *D. alata* Vog. oil also did not change the vasorelaxation $E_{\max}$ at the 14.4 mg/kg dose but increased the vasorelaxation pD_2 of NPS (10^{-12} - 10^{-5} M) ($pD_2 = 11.00 \pm 0.04$ M) in aortic rings without a functional endothelium pre-contracted with Phe (10 μ M) compared to the Control ($pD_2 = 9.35 \pm 0.11$ M), *D. alata* Vog. 7.2 mg/kg ($pD_2 = 9.52 \pm 0.12$ M) and Vit. E 0.42 mg/kg ($pD_2 = 9.67 \pm 0.08$ M) groups (Figure 6D).

Discussion

The *D. alata* Vog. almond is an oil seed that stands out among others such seeds due to its nutritional composition of macro- and micronutrients and its high energy content, providing from 476 to 560 kcal/100 g, and lipids (38.2 to 40.2 %) are the macronutrient present in the largest amount, followed by proteins (23.9 to 29.6 %) and carbohydrates (7.3 to 15.8 %)¹⁹⁻²¹. This almond also highlights the presence of phenolic compounds²², which occur in plants as secondary metabolites and act mainly as antioxidants and enhancers of cellular functions. The *D. alata* Vog. almond is also rich in phytosterols¹⁶, substances with chemical structures similar to that of cholesterol, which compete with cholesterol for solubilization in the mixed micelles within the intestinal lumen, thereby decreasing the amount of cholesterol available for absorption. This competition is only one of the mechanisms of action of these bioactive compounds that allows the use of phytosterols in the fight against dyslipidemia,

which is a primary risk factor for atherosclerotic CVD, and reducing LDL-C is associated with the prevention of this disease²³.

The composition of nutrients in the *D. alata* Vog. almond is characterized by the high content of dietary fiber and minerals such as potassium, phosphorus, magnesium, manganese, iron, calcium, copper and zinc^{20,21,24}, which contribute to body homeostasis, and by the levels of Vit. E²², which has potent antioxidant activity and provides protection to the cellular lipid membrane and the lipoproteins that are responsible for cholesterol transport in blood vessels. The development of atheromatous plaques is thus prevented by preventing free radicals from oxidizing LDL, the oxidized lipoprotein of which promotes the deposition of fat on the vessel wall. In the present study, the oil of *D. alata* Vog. was found to have a total tocopherol content of 28.9 µg/mL, which is similar to that obtained by Lemos et al.²².

Due to the lack of toxicological studies with *D. alata* Vog. oil, tests that evaluated behavioral effects suggestive of changes in the central nervous system (CNS) and the autonomic nervous system (ANS) were performed. The results showed that no behavioral changes or deaths occurred, indicating that it is safe to use *D. alata* Vog. oil, which was classified into the GHS category 5.

Treatment with *D. alata* Vog. oil promoted an increase in plasma α -tocopherol concentrations on the order of 45.2 % when given at a dose of 7.2 mg/kg and 109 % when administered at a dose of 14.4mg/kg. This evaluation of the bioavailability of the oil of *D. alata* Vog. utilized the method of Cimadevilla et al.²⁵ with changes in the solvent system; however, since the recovery rate was 80 %, this change did not compromise the identification and quantification of α -tocopherol, which highlighted the good bioavailability of this nutrient from the oil of *D. alata* Vog. Vit. E is absorbed by the intestine and taken up by the liver. Among the α -, β -, γ - and δ -tocopherol compounds, the α -tocopherol transfer protein (α -TTP) of the liver preferentially binds to α -tocopherol due to the high affinity of α -TTP for this compound and incorporates α -tocopherol into the circulating lipoproteins; thus, α -tocopherol is the main form of Vit. E circulating in the blood and is responsible for the plasma level of this nutrient²⁶. According to the Institute of Medicine (IOM), α -tocopherol is the only form that is adequate to the human requirements of Vit. E, able to reverse the symptoms related to the deficiency of this nutrient, such as anemia and a growth deficit²⁷, and able to cease the progression of neurological signs and symptoms caused by the ataxia associated with Vit. E deficiency^{28,29}.

The supplementation with *D. alata* Vog. oil demonstrated pharmacological evidence supporting the hypothesis that this oil exerts antithrombotic, antiaggregant, antioxidant activities and modulates vascular function in rats.

The antithrombotic efficacy was shown *in vivo* by the oral administration of *D. alata* Vog. oil, which delayed the occlusion time in a model of arterial thrombosis induced by FeCl₃ and also notably reduced the weight of the generated intra-arterial thrombotic mass (clot). The oil of *D. alata* Vog. doubled the occlusion time at a dose of 14.4 mg/kg and showed a dose-dependent effect in this study. Similar to the present study, Jang et al.³⁰ evaluated the effect of perilla oil also using the FeCl₃ model to induced thrombosis in the carotid artery and found that perilla oil prevented thrombus formation by delaying occlusion in the carotid artery in a dose-dependent manner, increasing the occlusion time by twofold with 0.5 mL/kg and preventing the occlusion of the vessel with a dose of 2 mL/kg. Clot formation by FeCl₃ occurs through the generation of ROS in the vessel, causing an endothelial lesion and the exposure of the subendothelial matrix that results in the attraction and activation of circulating platelets and the components of the coagulation cascade through interaction with the injured endothelium.

D. alata Vog. oil at the same dose that caused an increased occlusion time, acted as an antiaggregant agent, reducing ADP-mediated platelet aggregation by 31 % relative to the control, which may have potentiated its antithrombotic effect. The mechanism of action by which the oil of *D. alata* Vog. prevents ADP-induced platelet aggregation is not clear. However, we suggest that this oil acts to some extent on platelet membrane receptors, since the oil supplementation did not preclude aggregation mediated by PMA, which permeates the platelet membrane and activates protein kinase C (PKC), a molecular target that is activated when the ADP receptor is in the active form²⁹. PKC is part of an intraplatelet signaling pathway that is common to both the ADP and PMA agonists and that promotes the secretion of granules responsible for an aggregation outbreak^{29,30}. ADP-mediated platelet aggregation is also reduced by peanut oil³¹, an oleaginous source rich in unsaturated fatty acids and Vit.E^{20,21,24}. In the present study, supplementation with Vit. E did not reduce platelet aggregation by any of the agonists used, nor did it increase the occlusion time in the evaluation of the thrombotic process.

The antioxidant activity of *D. alata* Vog. was determined by measuring the fluorescence of DHE, a specific probe used to detect the O₂⁻ ROS. *D. alata* Vog. oil operated as an antioxidative food and reduced the fluorescence of DHE in the platelet pool by 43 % at a dose of 7.2 mg/kg, showing greater potency than Vit. E supplementation, which reduced

fluorescence by 32.8 % relative to the control. On the other hand, the fluorescence of DHE in the aggregated platelets in the basal situation was reduced by 75.1 % with 7.2 mg/kg *D. alata* Vog., by 76.6 % with 14.4 mg/kg *D. alata* Vog. and by 79.4 % with Vit. E, all in relation to the control. The antioxidant activity of Vit. E was expected due to its lipophilic nature and the incorporation of α -tocopherol into the platelet membrane³². However, the oil of *D. alata* Vog. also proved to be a potent antioxidant by reducing the basal formation of the $O_2^{\bullet-}$ radical in platelets. In addition to Vit. E, *D. alata* Vog. oil has other substances, such as mono- and polyunsaturated fatty acids and phenolic compounds, that act as antioxidants^{17,21,33}, such that the consumption of this oil is more beneficial than the pharmaceutical formulation of Vit. E; as seen in the present study, the oil of *D. alata* Vog. produced various effects on the hemostatic system and acted as an antioxidant, antithrombotic and antiaggregant.

The production of ROS has serious implications regarding the balance between the hemostatic and thrombotic states³⁴ because radicals act to regulate platelet function; therefore, the use of substances/foods with antioxidant activity for the prevention and treatment of thrombotic diseases has been widely studied^{9,35}. ROS include $O_2^{\bullet-}$, the hydroxyl radical (OH $\cdot$) and hydrogen peroxide (H_2O_2), which act as second messengers in platelet activation and cause calcium mobilization, the inactivation of nitric oxide gas with an antiaggregant effect and isoprostane formation through the interaction with arachidonic acid⁴. The ROS generated in platelets originate from the activity of NADPH oxidase⁹, which is important for the generation of $O_2^{\bullet-}$, as well as cyclooxygenase, endothelial nitric oxidesynthase (eNOS), xanthine oxidase (XO) and mitochondrial respiration⁴.

Siqueira et al.³³ showed that the consumption of an AIN-93G diet containing 10 % *D. alata* Vog. almonds by Wistar rats with oral iron supplementation reduced oxidative stress, thereby protecting the fatty acids within the membranes of cells that constituted the tissues that were oxidized by that metal. The activity of the diet was attributed to phytic acid and the phenolic compounds of *D. alata* Vog.

The analysis of vascular function showed that the supplementation with the oil of *D. alata* Vog. at doses of 7.2 mg/kg and 14.4 mg/kg improved vascular function in rats, reducing the contractile activity of Phe in vessels with and without endothelium, but this effect was more pronounced in vessels with endothelium. The oil in some way interfered with the action of Phe, causing that agonist to lose the characteristic of a total agonist. Another observed effect of the supplementation with the *D. alata* Vog. oil (14.4 mg/kg dose) was an increased potency of the ACh and NPS vasodilator agonists. These findings demonstrate that the supplementation with the oil of *D. alata* Vog. caused a vascular modulation superior to that

caused by Vit. E against the agonists Phe, ACh and NPS. Thus, the oil interfered in some way with the action of these agonists in the smooth muscle of conductance vessels, which provides benefits to an organism by reducing the chances of the possibility of a stroke or infarction. Since it is necessary to have healthy blood vessels and adequate hemostasis to avoid diseases such as hypertension and thrombosis and their associated events, the discovery of a natural product that can contribute to the health of the cardiovascular system is of great value³⁶.

When investigating the effects of linseed oil on the aortic rings of rats, Nunes et al.³⁷ observed that the oil increased the vascular reactivity to Phe but did not change the vasorelaxation $E_{\max}$ of ACh and NPS compared to the control. A study by Shing et al.³⁸ investigated the effects of α -tocopherol and a mixed tocopherol on endothelial function in the thoracic aortic rings of nephrectomized mice as a model of combined cardiovascular and renal diseases. The mixed tocopherol caused increased reactivity to noradrenaline in the vessel compared to supplementation with α -tocopherol in the control animals. However, both treatments (α -tocopherol and mixed tocopherol) did not alter the vasorelaxation $E_{\max}$ of ACh; however, these treatments improved the endothelium-independent aortic vasorelaxation $E_{\max}$ with the use of NPS.

Conclusion

According to the results obtained with the modified solvent system, the method used had excellent repeatability and reproducibility in the separation of α -, δ - and (β + γ)-tocopherol homologues in *D. alata* Vog. oil and in the plasma of the animals. The method yielded a recovery rate of 80% for α -tocopherol.

D. alata Vog. oil did not cause behavioral changes or any deaths in the rats, proving to be safe for human consumption. According to the pharmacological results, it can be concluded that the antithrombotic, antiaggregant, antioxidant and vascular-function-modulating effects of *D. alata* Vog. oil are more impressive than those obtained with Vit. E. As such, the findings of the present study may contribute to enhancing the use of *D. alata* Vog. oil, a functional natural product rich in nutrients and bioactive compounds, in the prevention of cardiovascular diseases with great relevance to the promotion of human health. However, additional studies are needed to elucidate the mechanism of action of this oil.

Methods

Determination of the tocopherol content in *D. alata* Vog.oil and plasma levels of α -tocopherol in the treated animals

A Shimadzu (Prominence) high-performance liquid chromatography (Japan) (HPLC) system equipped with an LC-20AT quaternary solvent pumping module, SIL-20A autoinjector, DGU-20A degassing system, RF-20A detector and CBM-20A system controller was used. A CLC-ODS (M) Shim-pack column (Shimadzu, Japan) (150mm $\times$ 4.6mm, with particles of 5 μ m) and aG-ODS-4 Shim-pack pre-column (4mm $\times$ 3.0mm i.d. filled with 5 μ m particles) (Shimadzu, Japan) were used. The method described by Lemos et al. with modifications to the solvent system was followed (Supplementary data)²². For the identification and quantification of α -, (β + γ)-and δ -tocopherol, a standard curve prepared with external standards (Sigma-Aldrich, Germany) corresponding to these tocopherols was used: for α -tocopherol, $y=310236x - 1E+06$, $r^2: 0.9951$; for (β + γ)-tocopherol, $y=584174x - 2E+06$, $r^2: 0.9993$; and for δ -tocopherol, $y=652752x - 2E+06$, $r^2: 0.9975$. To determine the plasma α -tocopherol content of the animals, the methodology of Cimadevilla et al.²⁵ with changes to the solvent system was followed (Supplementary data).

Experimental design

All rats were maintained and bred under specific free pathogens conditions in the Unidade de Produção Animal (Animal Production Unit; UPA) of the Instituto de Pesquisa em Fármacos e Medicamentos (Institute for the Research on Drugs and Medications; IpeFarM) of the Universidade Federal da Paraíba (Federal University of Paraíba, UFPB). The experiments were conducted in accordance with the Brazilian Federal Law No. 11794/08, which sets procedures for the scientific use of laboratory animals. Experimental protocols were approved by Comissão de Ética no Uso de Animais (Ethics Committee on the Use of Animals; CEUA) from UFPB, under protocol's code: CEUA 128/2016.

The experiment used 42 male Wistar rats (*Rattus norvegicus*), 12 weeks old and weighing between 250 and 300 g, that were from the UPA of the IpeFarM/UFPB. The animals were kept at a temperature of $21 \pm 1^\circ\text{C}$ with a light-dark cycle of 12 hours and were fed *ad libitum* with commercial feed and water. The determination of the Vit. E dose for the animals was based on the Recommended Dietary Allowance (RDA) of 15 mg/day for humans of both sexes according to the Dietary Reference Intakes (DRI) of the IOM³⁹. Taking into

account an adult weight of 70 kg and the RDA of 15 mg/day Vit. E, we arrived at 0.21 mg/kg/day.

The doses of the *D. alata* Vog. oil (7.2 mg/kg and 14.4 mg/kg) were based on the amount of tocopherols present (28.9 µg/mg of oil) and the RDA for humans. In this way, doses of 0.21 and 0.42 mg/kg/day of tocopherols, respectively, were obtained.

Four groups with 6 animals each were created as follows: the Control group, which received 1 mL of NaCl solution (0.9 %); the *D. alata* Vog. 7.2 mg/kg/day group; the *D. alata* Vog. 14.4 mg/kg/day group; and the Vit. E 0.42 mg/kg/day group, which received a pharmaceutical formulation (Aché, Brazil) diluted in 0.2 mL of mineral oil. All the animals were orally treated (via gavage) for 10 days.

For the nonclinical toxicity experiment, three groups of six animals were distributed among the Control, *D. alata* Vog. oil 300 mg/kg and *D. alata* Vog. oil 2000 mg/kg groups.

Assessment of acute nonclinical toxicity

The acute toxicity test in rats was performed according to the “Guidelines for Testing of Chemicals” No. 423/2001 of the Organization for Economic Cooperation and Development (OECD), with some modifications⁴⁰.

The rats used in the experiment were given doses of 300 mg/kg and 2000 mg/kg of *D. alata* Vog. oil, and the Control group was given the vehicle only [12 % Tween 80 in NaCl solution (0.9 %)].

To map the possible behavioral changes indicative of CNS or ANS activity after administration, careful observation was performed to detect signs of toxicity in the general character of the animals and possible deaths at the following intervals: 0, 15, 30 and 60 minutes; after 4 hours; and daily for 14 days⁴¹.

Induction of thrombosis and monitoring of blood flow

Anesthetized rats were placed in the dorsal decubitus position, and an X1 ultrasound probe coupled to a data acquisition system (T106 Transonic Systems Inc., New York, USA) was implanted into the carotid artery in distal caudal proximity. The flow was recorded using the LabChart software version 8.0 (AD Instruments, Australia), and after 10 minutes of baseline recording, the induction of a thrombus was initiated by inserting a piece of Whatman No. 1 paper embedded with 5 µL of FeCl₃ solution⁴² onto the ventral surface of the carotid

artery^{30,43,44}. The occlusion time is the time at which the flow reaches the value of zero and remains for 30 seconds⁴⁵. Subsequently, a segment of the carotid artery was dissected, and the thrombus was opened and removed for the immediate measurement of the weight of the wet thrombus; the thrombus was then maintained at 37°C for 24 hours for the measurement of the dry weight⁴⁶.

Obtaining whole blood and the preparation of platelets

Blood was collected from the inferior vena cava of anesthetized rats using sterile heparinized syringes. For determining platelet aggregation by light transmission and evaluating the production of $O_2^{\cdot-}$ in platelet-rich plasma (PRP), the blood was deposited in siliconized plastic tubes and centrifuged at 120 g for 10 minutes to obtain the PRP. Platelet-poor plasma (PPP) was obtained after a second centrifugation at 2,300g was performed for 15 minutes^{47,48}.

Measurement of platelet aggregation by light transmission

Initially PPP was used to calibrate the system as 100 % transmittance. In sequence PRP (adjusted to 2×10^7 platelets/ml) was incubated at 37°C for 15 minutes in the aggregometer (AgreGO, Sao Paulo, Brazil) with continuous stirring at 1000 rpm and was calibrated as 0% of transmittance. PRP samples were stimulated with the ADP (16,7 μ M) or PMA (100 μ M). For ADP stimulation, the recording time was 10 minutes, and for PMA the recording time was 15 minutes. The degree of aggregation was expressed as a percentage of the maximum light transmission obtained with PRP^{49,50}.

Evaluation of the production of superoxide anions ($O_2^{\cdot-}$) by dihydroetidine (DHE) fluorescence

PRP was diluted with HEPES solution and adjusted to 5×10^7 platelets/mL. DHE probe (500 μ M) was added to 200 μ L of the platelet suspension, which was protected from light and placed at 37 °C for 30 minutes. After washout, the fluorescence emitted by the DHE in the sample was evaluated with a flow cytometer FACS CANTO II equipped with a 15-mW argon laser with a λ of 488 nm (BD, Santa Monica, CA, USA). A total of 10.000 events were

acquired in the FITC channel (564-606 nm), followed by analysis using the DIVA software 6.0 (BD, Santa Monica, CA, USA)⁴⁸.

Study of vascular reactivity in the aorta

The thoracic aorta artery was removed and placed in a Petri dish containing Krebs⁵¹ (Supplementary Table S1) solution at 4°C for dissection and sectioning into 1-2mm long rings. Each ring was immersed in a organ bath (10mL) and suspended vertically with a platinum rod, which was attached to a force transducer (MLT020, AD Instruments, Australia). The tissues were maintained in Krebs solution at 37°C and aerated with a mixture of 95 % O₂ and 5 % CO₂ (Carbogen, White Martins, Brazil). All the rings were subjected to a basal tension of approximately 1.0g during a stabilization period of 60 minutes, with an exchange of the nutrient solution every 15 minutes and adjustments of the baseline when necessary^{52,53}.

After the stabilization period, to verify tissue viability and the presence of endothelium functionality, a contraction with Phe (1 µM) was performed. In the contraction tonic phase, ACh (1 µM) was added to the vat to evaluate the integrity of the vascular endothelium. Rings without a functional endothelium were obtained by the mechanical removal of the endothelial layer through mechanical friction between the rod and the inner wall of the vessel. Vascular endothelium was considered intact when the aortic rings showed ACh-induced relaxation greater than 60 %. Endothelium removal was confirmed by a relaxation of less than 10 %⁵². Next, concentration-response curves for Phe (10⁻⁹-10⁻⁵ M), ACh (10⁻⁹-10⁻⁵ M) and NPS (10⁻¹²-10⁻⁵ M) were obtained shortly after contraction induced by Phe (10 µM) reached the tonic phase.

Statistical analysis

The quantification of tocopherols in the oil was calculated by plotting the graphs and generating the equation of the line using the Excel program of the Microsoft Office 2010 package.

The data are expressed as the mean ± SEM (standard error of the mean). The E_{max} and pD₂ values for the concentration-response curves were obtained through nonlinear regressions with a variable slope using the Graphpad Prism 6.0 software. Statistical comparisons were performed using an ordinary ANOVA with Tukey's post-test; significance was assigned if $p < 0.05$.

Data availability statement

All data generated or analysed during this study are included in this article (and its Supplementary Information files).

References

- 1 Castro, H. C. *et al.* Platelets: still a therapeutical target. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial***42**, 321-332 (2006).
- 2 Moreira, A. M., Rabenhorst, S. H., Holanda, R. & Pitombeira, M. H. Fatores de risco associados à trombose em pacientes do estado do Ceará. *Rev Bras Hematol Hemoter***31**, 132-136 (2009).
- 3 Day, I. S. C. f. W. T. *et al.* Thrombosis: a major contributor to the global disease burden. *Journal of Thrombosis and Haemostasis***12**, 1580-1590 (2014).
- 4 Fuentes, F., Palomo, I. & Fuentes, E. Platelet oxidative stress as a novel target of cardiovascular risk in frail older people. *Vascular pharmacology***93**, 14-19 (2017).
- 5 Puurunen, M. K. *et al.* Epidemiology of venous thromboembolism in the Framingham Heart Study. *Thrombosis research***145**, 27-33 (2016).
- 6 Ikesaka, R. T. *et al.* The importance of post thrombotic syndrome as an outcome after deep venous thrombosis: A survey of Canadian thrombosis clinicians. *Thrombosis research***159**, 13-15 (2017).
- 7 Stone, J. *et al.* Deep vein thrombosis: pathogenesis, diagnosis, and medical management. *Cardiovascular Diagnosis and Therapy***7**, S276-S284 (2017).
- 8 Zarbock, A., Polanowska-Grabowska, R. K. & Ley, K. Platelet-neutrophil-interactions: linking hemostasis and inflammation. *Blood reviews***21**, 99-111 (2007).
- 9 Qiao, J. *et al.* Regulation of platelet activation and thrombus formation by reactive oxygen species. *Redox biology***14**, 126-130 (2018).
- 10 Li, W., McIntyre, T. M. & Silverstein, R. L. Ferric chloride-induced murine carotid arterial injury: a model of redox pathology. *Redox biology***1**, 50-55 (2013).
- 11 Scoditti, E., Capurso, C., Capurso, A. & Massaro, M. Vascular effects of the Mediterranean diet—Part II: Role of omega-3 fatty acids and olive oil polyphenols. *Vascular pharmacology***63**, 127-134 (2014).
- 12 McEwen, B. J., Morel-Kopp, M.-C., Chen, W., Tofler, G. H. & Ward, C. M. in *Seminars in thrombosis and hemostasis*. 025-032 (Thieme Medical Publishers).
- 13 Rubio-Senent, F., de Roos, B., Duthie, G., Fernández-Bolaños, J. & Rodríguez-Gutiérrez, G. Inhibitory and synergistic effects of natural olive phenols on human platelet aggregation and lipid peroxidation of microsomes from vitamin E-deficient rats. *European journal of nutrition***54**, 1287-1295 (2015).
- 14 Guinazi, M., Milagres, R., Pinheiro-Sant’Ana, H. M. & Chaves, J. B. P. Tocoferóis e tocotrienóis em óleos vegetais e ovos. *Quím Nova***32**, 2098-2103 (2009).
- 15 CARRAZZA, L. R., ÁVILA, J. C. C. & SILVA, M. L. d. Manual tecnológico de aproveitamento integral do fruto e da folha do babaçu. (2012).

- 16 Marques, F. G., Oliveira Neto, J. R. d., Cunha, L. C. d., Paula, J. R. d. & Bara, M. T. F. Identification of terpenes and phytosterols in *Dipteryx alata* (baru) oil seeds obtained through pressing. *Revista Brasileira de Farmacognosia***25**, 522-525 (2015).
- 17 Lemos, M. R. B., de Almeida Siqueira, E. M., Arruda, S. F. & Zambiasi, R. C. The effect of roasting on the phenolic compounds and antioxidant potential of baru nuts [*Dipteryx alata* Vog.]. *Food Research International***48**, 592-597 (2012).
- 18 Silva, V. D. *et al.* Oxidative stability of Baru (*Dipteryx alata* Vogel) oil monitored by fluorescence and absorption spectroscopy. *Journal of Spectroscopy***2015** (2015).
- 19 SANO, S. M., RIBEIRO, J. F. & de Brito, M. A. Baru: biologia e uso. *Embrapa Cerrados-Documentos (INFOTECA-E)* (2004).
- 20 Vera, R. *et al.* Características químicas de amêndoas de barueiros (*Dipteryx alata* Vog.) de ocorrência natural no Cerrado do Estado de Goiás, Brasil. *Revista Brasileira de Fruticultura***31**, 118-112 (2009).
- 21 Freitas, J. B. & Naves, M. M. V. Composição química de nozes e sementes comestíveis e sua relação com a nutrição e saúde Chemical composition of nuts and edible seeds and their relation to nutrition and health. *Revista de Nutrição***23**, 269-279 (2010).
- 22 Lemos, M., Zambiasi, R., de Almeida, E. & de Alencar, E. Tocopherols and Fatty Acid Profile in Baru Nuts (*Dipteryx Alata* Vog.), Raw and Roasted: Important Sources in Nature that Can Prevent Diseases.
- 23 Cabral, C. E. & Klein, M. R. S. T. Phytosterols in the Treatment of Hypercholesterolemia and Prevention of Cardiovascular Diseases. *Arquivos brasileiros de cardiologia***109**, 475-482 (2017).
- 24 Takemoto, E., Okada, I. A., Garbelotti, M. L., Tavares, M. & Aued-Pimentel, S. Composição química da semente e do óleo de baru (*Dipteryx alata* Vog.) nativo do Município de Pirenópolis, Estado de Goiás. *Revista do Instituto Adolfo Lutz***60**, 113-117 (2001).
- 25 Cimadevilla, H. M. *et al.* Development and validation of a single HPLC method for determination of α -tocopherol in cell culture and in human or mouse biological samples. *Biomedical Chromatography***29**, 843-852 (2015).
- 26 Waniek, S. *et al.* Vitamin E (α - and γ -Tocopherol) Levels in the Community: Distribution, Clinical and Biochemical Correlates, and Association with Dietary Patterns. *Nutrients***10**, 3 (2017).
- 27 Traber, M. G. Vitamin E inadequacy in humans: causes and consequences. *Advances in nutrition***5**, 503-514 (2014).
- 28 Di Donato, I., Bianchi, S. & Federico, A. Ataxia with vitamin E deficiency: update of molecular diagnosis. *Neurological sciences***31**, 511-515 (2010).
- 29 Zhao, Y. *et al.* α -Tocopherol Stereoisomers in Human Plasma Are Affected by the Level and Form of the Vitamin E Supplement Used-3. *The Journal of nutrition***145**, 2347-2354 (2015).
- 30 Jang, J.-Y. *et al.* Perilla oil improves blood flow through inhibition of platelet aggregation and thrombus formation. *Laboratory animal research***30**, 21-27 (2014).
- 31 Bazán-Salinas, I. L., Matías-Pérez, D., Pérez-Campos, E., Mayoral, L. P.-C. & García-Montalvo, I. A. Reduction of platelet aggregation from ingestion of oleic and linoleic acids found in *Vitis vinifera* and *Arachis hypogaea* oils. *American journal of therapeutics***23**, e1315-e1319 (2016).
- 32 Gutierrez, J. M. *et al.* Alterations in the extracellular catabolism of nucleotides and platelet aggregation induced by high-fat diet in rats: effects of α -tocopherol. *Journal of physiology and biochemistry***70**, 487-496 (2014).

- 33 de Almeida Siqueira, E. M. *et al.* Consumption of baru seeds [*Dipteryx alata* Vog.], a Brazilian savanna nut, prevents iron-induced oxidative stress in rats. *Food research international***45**, 427-433 (2012).
- 34 Komosa, A. *et al.* Platelets redox balance assessment: current evidence and methodological considerations. *Vascular pharmacology***93**, 6-13 (2017).
- 35 Meshkini, A. & Tahmasbi, M. Antiplatelet Aggregation Activity of Walnut Hull Extract via Suppression of Reactive Oxygen Species Generation and Caspase Activation. *Journal of acupuncture and meridian studies***10**, 193-203 (2017).
- 36 Amrani, S. *et al.* Vasorelaxant and anti-platelet aggregation effects of aqueous *Ocimum basilicum* extract. *Journal of ethnopharmacology***125**, 157-162 (2009).
- 37 Nunes, D. O. *et al.* Flaxseed oil increases aortic reactivity to phenylephrine through reactive oxygen species and the cyclooxygenase-2 pathway in rats. *Lipids in health and disease***13**, 107 (2014).
- 38 Shing, C. M., Fassett, R. G., Peake, J. M. & Coombes, J. S. Effect of tocopherol on atherosclerosis, vascular function, and inflammation in apolipoprotein E knockout mice with subtotal nephrectomy. *Cardiovascular therapeutics***32**, 270-275 (2014).
- 39 Trumbo, P., Yates, A. A., Schlicker, S. & Poos, M. Dietary reference intakes: vitamin A, vitamin K, arsenic, boron, chromium, copper, iodine, iron, manganese, molybdenum, nickel, silicon, vanadium, and zinc. *Journal of the American Dietetic Association***101**, 294-301 (2001).
- 40 Co-operation, O. f. E. & Development. *Test No. 423: Acute Oral Toxicity-Acute Toxic Class Method.* (OECD Publishing, 2002).
- 41 Almeida, R. *et al.* Metodologia para avaliação de plantas com atividade no sistema nervoso central e alguns dados experimentais. *Rev Bras Farm***80**, 72-76 (1999).
- 42 Kurz, K., Main, B. & Sandusky, G. Rat model of arterial thrombosis induced by ferric chloride. *Thrombosis research***60**, 269-280 (1990).
- 43 Morishima, Y., Kamisato, C. & Honda, Y. Treatment of venous thrombosis with an oral direct factor Xa inhibitor edoxaban by single and multiple administrations in rats. *European journal of pharmacology***742**, 15-21 (2014).
- 44 Radomski, A. *et al.* Nanoparticle-induced platelet aggregation and vascular thrombosis. *British journal of pharmacology***146**, 882-893 (2005).
- 45 OWENS III, A. *et al.* Towards a standardization of the murine ferric chloride-induced carotid arterial thrombosis model. *Journal of Thrombosis and Haemostasis***9**, 1862-1863 (2011).
- 46 Zakrzeska, A. *et al.* Eplerenone reduces arterial thrombosis in diabetic rats. *Journal of the Renin-Angiotensin-Aldosterone System***16**, 1085-1094 (2015).
- 47 Shattil, S. J., Cunningham, M. & Hoxie, J. A. Detection of activated platelets in whole blood using activation-dependent monoclonal antibodies and flow cytometry. *Blood***70**, 307-315 (1987).
- 48 De Cuyper, I. M. *et al.* A novel flow cytometry-based platelet aggregation assay. *Blood***121**, e70-e80 (2013).
- 49 Huang, J., Wang, S., Luo, X., Xie, Y. & Shi, X. Cinnamaldehyde reduction of platelet aggregation and thrombosis in rodents. *Thrombosis research***119**, 337-342 (2007).
- 50 Yoneda, K. *et al.* Identification of the active metabolite of ticlopidine from rat in vitro metabolites. *British journal of pharmacology***142**, 551-557 (2004).
- 51 Krebs, H. A. & Henseleit, K. Untersuchungen über die Harnstoffbildung im Tierkörper. *Hoppe-Seyler's Zeitschrift für physiologische Chemie***210**, 33-66 (1932).
- 52 Furchgott, R. F. & Zawadzki, J. V. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *nature***288**, 373 (1980).

- 53 Altura, B. M. & Altura, B. T. Differential effects of substrate depletion on drug-induced contractions of rabbit aorta. *American Journal of Physiology--Legacy Content***219**, 1698-1705 (1970).

Acknowledgments

The authors acknowledge the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq) for financial support, and the Paraíba Development Institute (Instituto de Desenvolvimento da Paraíba - IDEP-PB) for technical support.

Author Contributions

Luis C. C. S. developed the research. Medeiros I. A and Castro-Gomez R. J. H. finalized the formatting of the document. Luis J. A. S., Tavares J. F. and Nascimento Y. M. characterized the tocopherols in the oil and plasma samples. Bezerra L. S, Azevedo F. L. A. A. and Oliveira J. C. P. L. contributed to the development of the aggregation experiments and the analysis of ROS. Sobral M. V. and Manguiera V. M. performed the toxicity experiment. Gonçalves I. G. A. contribution to the reactivity protocols. Veras R. C. advised and designed the study.

Additional information

Conflict of Interest Statement: All the authors declare that this study was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Figures-Subtitles

Figure 1: Typical chromatogram of tocopherols contained in the oil of *D. alata* Vog. using a reversed-phase HPLC column with a fluorescence detector, 290 nm excitation and 330 nm emission, and a gradient with water (0.2 % acetic acid) (A), methanol (B) and acetonitrile (C). Gradient: 17 % A, 8 % B and 75 % C (v, v, v), with flow rate of 0.5mL/min.

Figure 2A: Bars representing the plasma concentration of α -tocopherol from animals treated for 10 days: Control (1mL/day of 0.9 % NaCl saline), *D. alata* Vog. oil at 7.2 mg/kg/day, *D. alata* Vog. oil at 14.4 mg/kg/day or Vit. E at 0.42 mg/kg/day. The data are expressed as the means $\pm$ SEM (n= 6, except for *D. alata* Vog. 14.4 mg/kg, n = 4). * p <0.05 vs Control.

Figure 2B: Typical chromatogram of α -tocopherol extracted from plasma samples of the treated animals. Reversed-phase HPLC column with a fluorescence detector, 290 nm excitation and 330 nm emission, and a gradient with water (0.2 % acetic acid) (A), methanol (B) and acetonitrile (C). Gradient: 17 % A, 8 % B and 75 % C (v, v, v), with a flow rate of 0.5 mL/min.

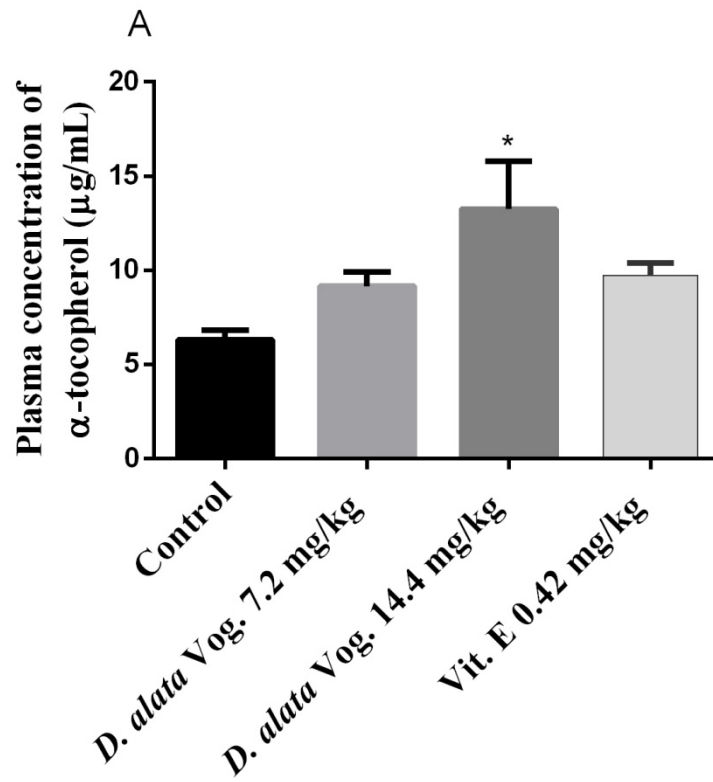
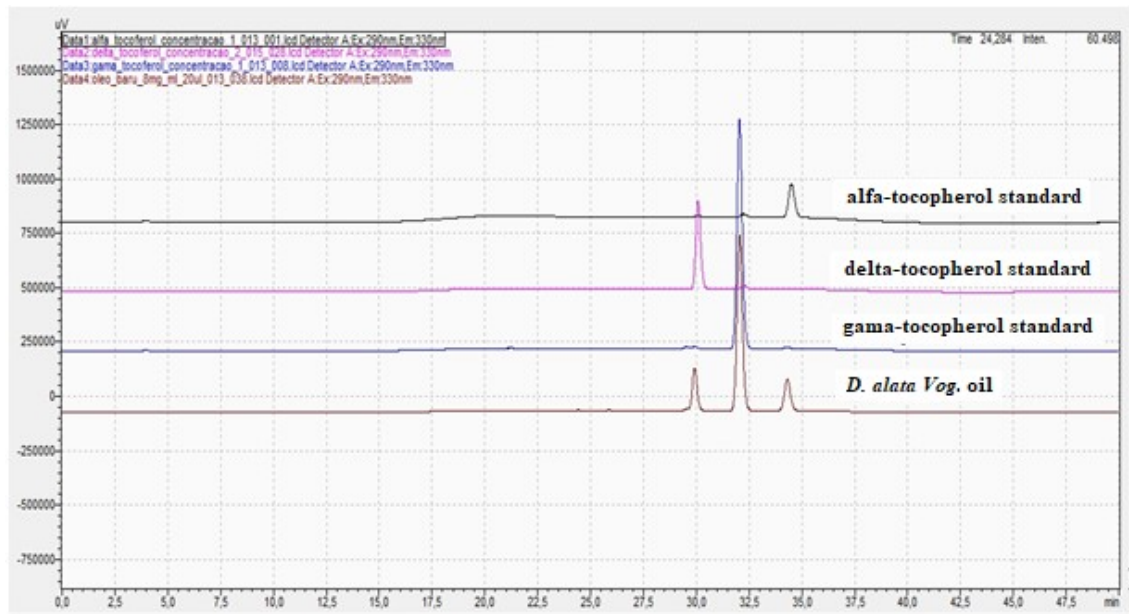
Figure 3: (A) Bars representing the carotid artery occlusion time after the application of FeCl₃ and (B) wet and dry thrombus weight. Control (1 mL/day of 0.9 % NaCl saline), oil of *D. alata* Vog. at 7.2 mg/kg/day, oil of *D. alata* Vog. at 14.4 mg/kg/day and Vit. E at 0.42 mg/kg/day. The data are expressed as the means $\pm$ SEM (n = 6). * p <0.05 vs Control; # p <0.05 vs *D. alata* Vog. 14.4 mg/kg.

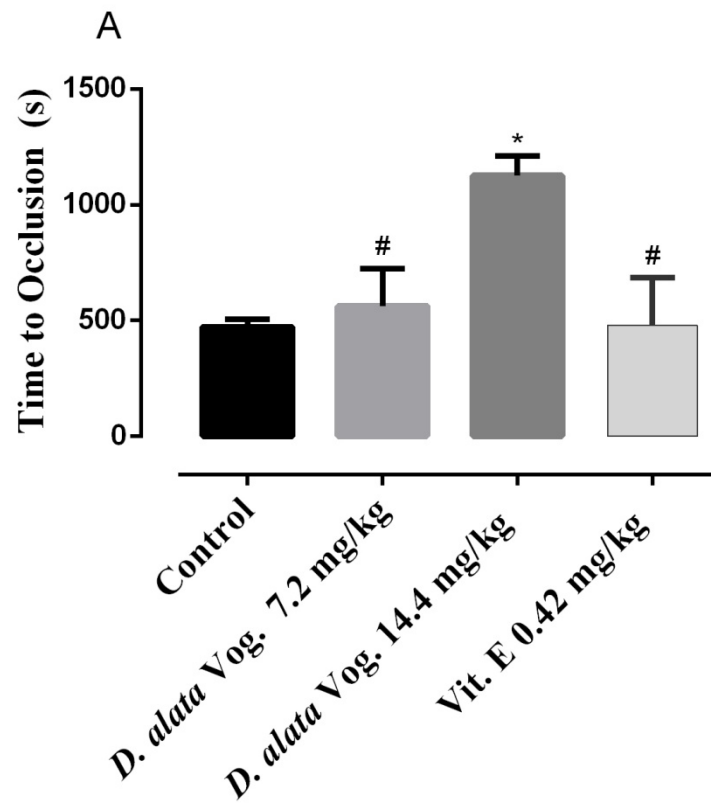
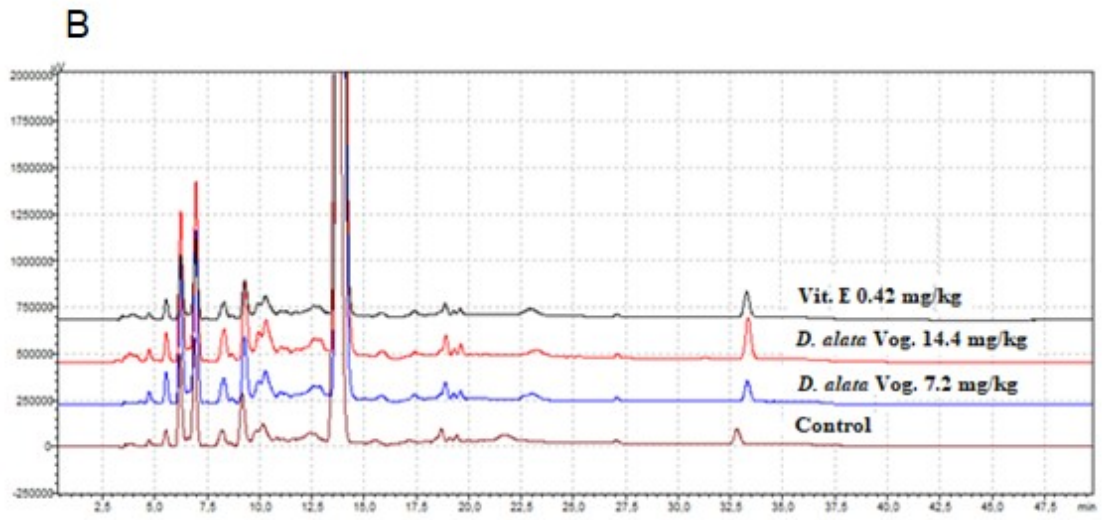
Figure 4: Effect of a 10-day supplementation on platelet aggregation induced by: (A) 16,7 μ M ADP; (B) 100 μ M PMA. Control (1 mL/day of 0.9 % NaCl Saline), oil of *D. alata* Vog. at 7.2 mg/kg/day, oil of *D. alata* Vog. at 14.4 mg/kg/day and Vit. E at 0.42 mg/kg/day. The data are expressed as the means $\pm$ SEM (n = 6). * p <0.05 vs Control.

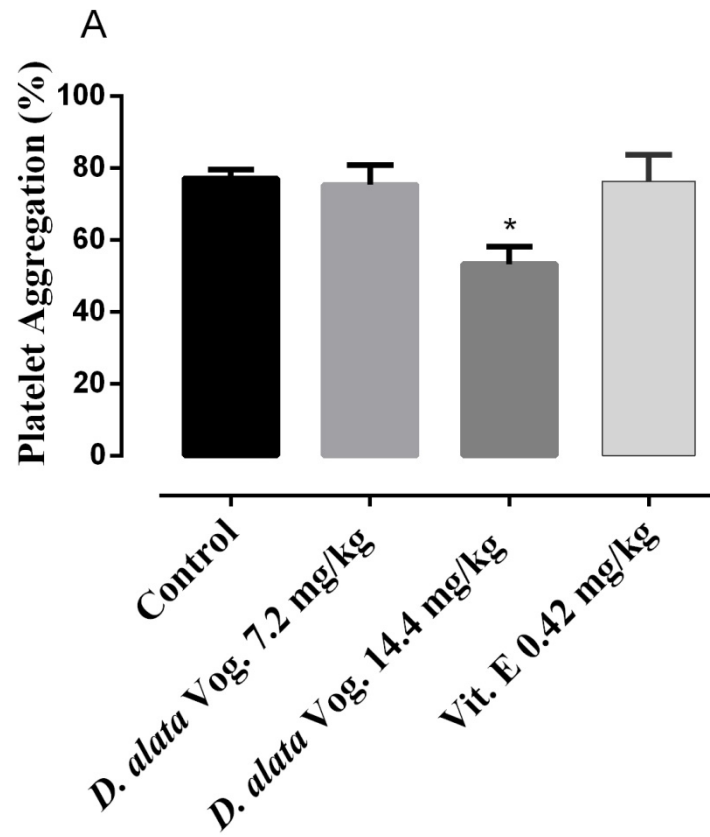
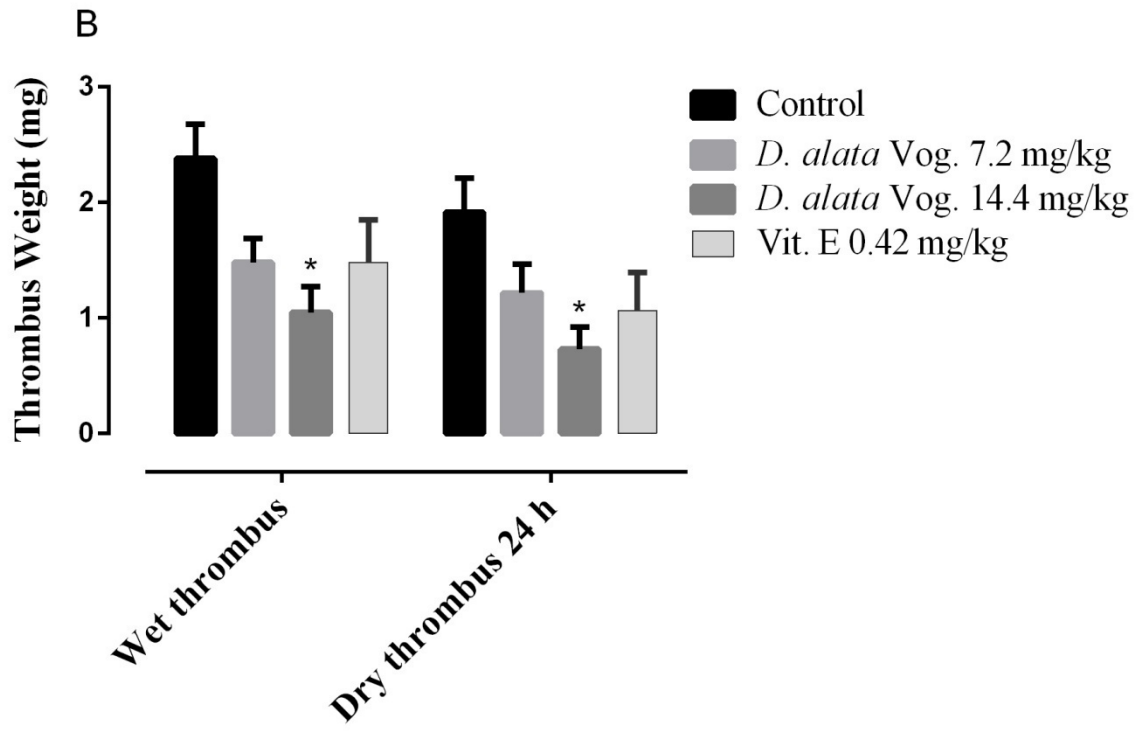
Figure 5: Emission of DHE fluorescence (500 μ M) as determined by flow cytometry: (A) endogenous production of O₂^{•-} in platelets; (B) endogenous production of O₂^{•-} in aggregated platelets. Control (1 mL/day of 0.9 % NaCl saline), oil of *D. alata* Vog. at 7.2 mg/kg/day, oil of *D. alata* Vog. at 14.4 mg/kg/day and Vit. E at 0.42 mg/kg/day. The data are expressed as the means $\pm$ SEM (n = 6). * p <0.05 vs Control. Changes in fluorescence (F1) were normalized according to the fluorescence obtained in the sample treated with HEPES alone (F0) and expressed as F1/F0.

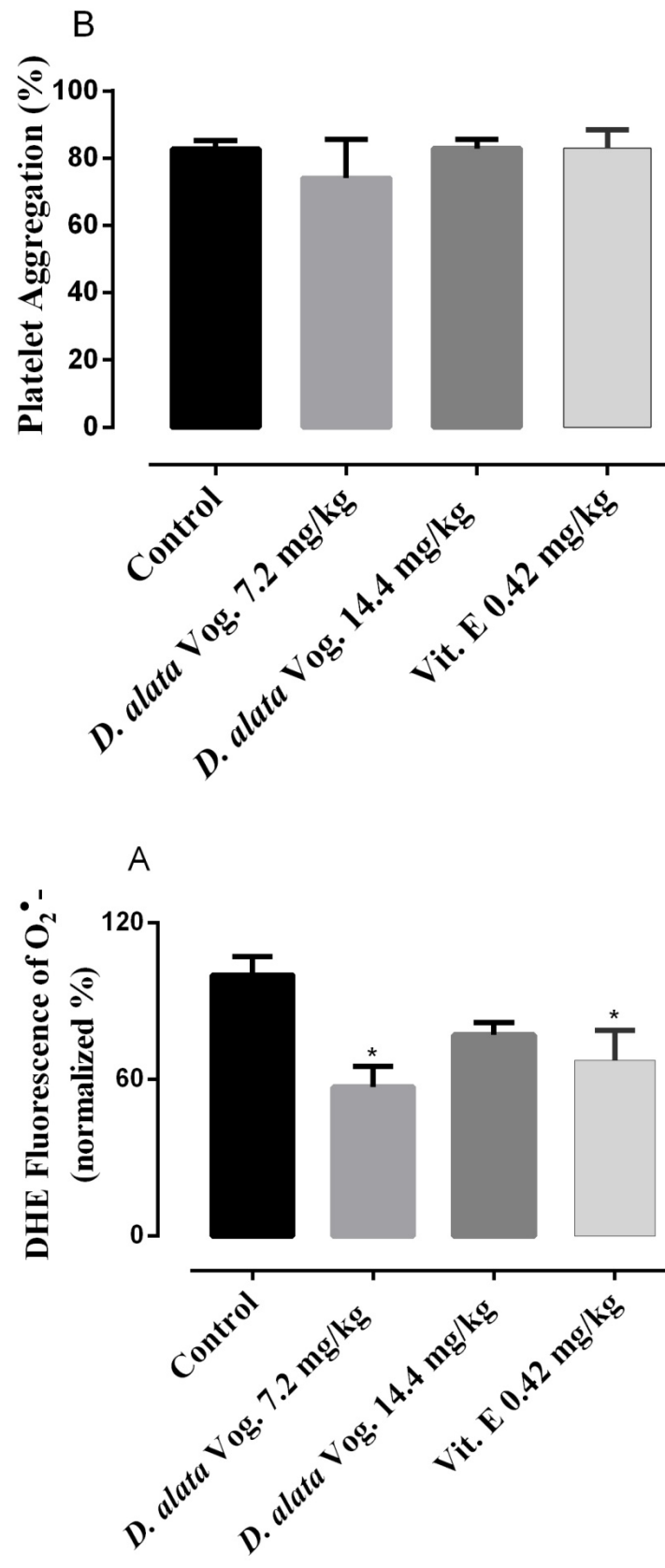
Figure 6: Concentration-response curves of the aortic rings from rats supplemented for 10 days. Control (1 mL/day of 0.9 % NaCl saline), oil of *D. alata* Vog. at 7.2 mg/kg/day, oil of *D. alata* Vog. at 14.4 mg/kg/day and Vit. E at 0.42 mg/kg/day. (A) Phe (10⁻⁹-10⁻⁵ M) in endothelium; (B) Phe (10⁻⁹-10⁻⁵ M) without endothelium; (C) ACh (10⁻⁹-10⁻⁵ M) and D) NPS (10⁻¹²-10⁻⁵ M) samples were pre-contracted with 10 μ M Phe. The data are expressed as the means $\pm$ SEM (n = 6). * p <0.05 vs Control; § p <0.05 vs *D. alata* Vog. 7.2 mg/kg; p <0.05 vs Vit. E 0.42 mg/kg.

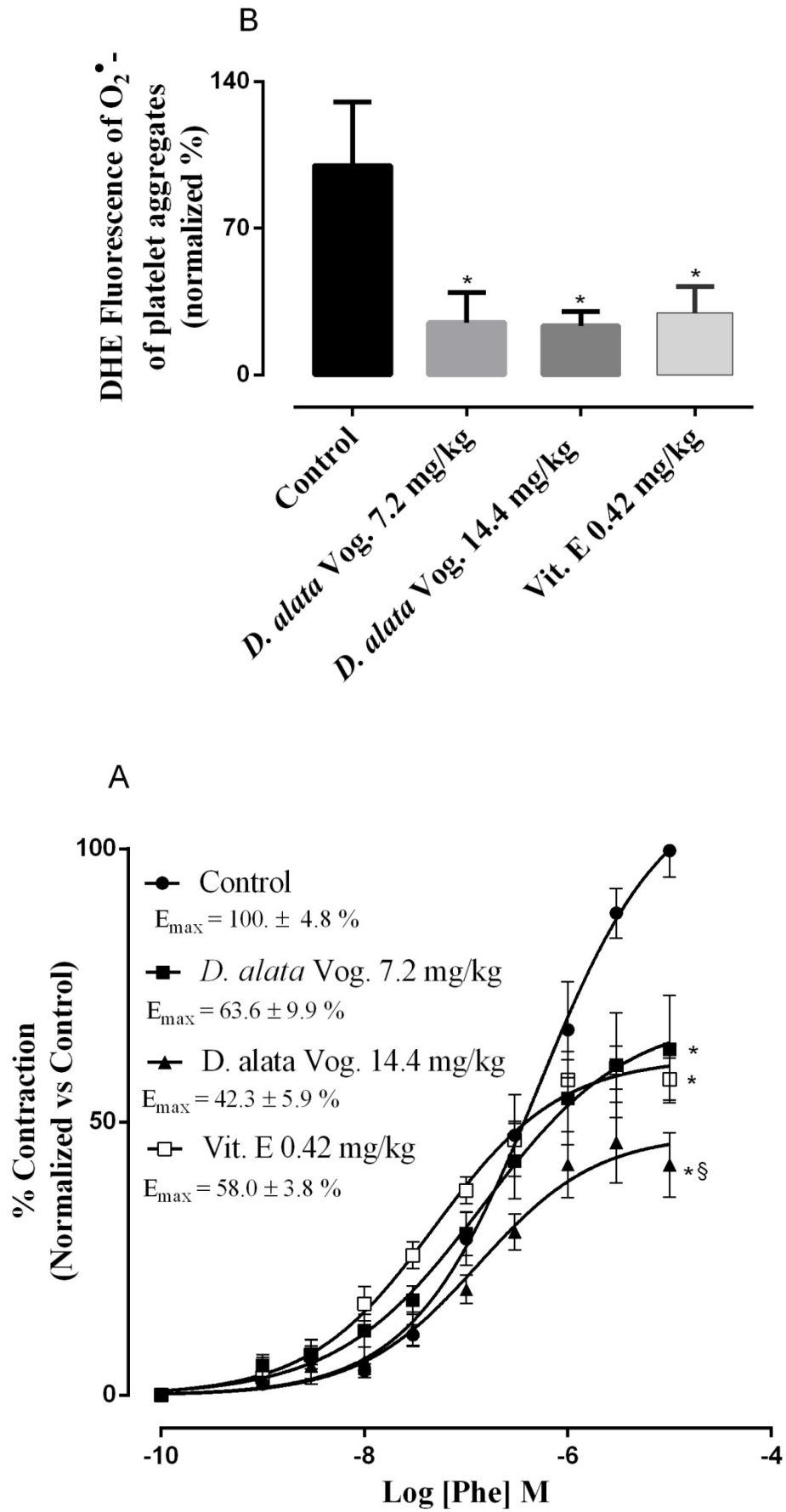
Figures



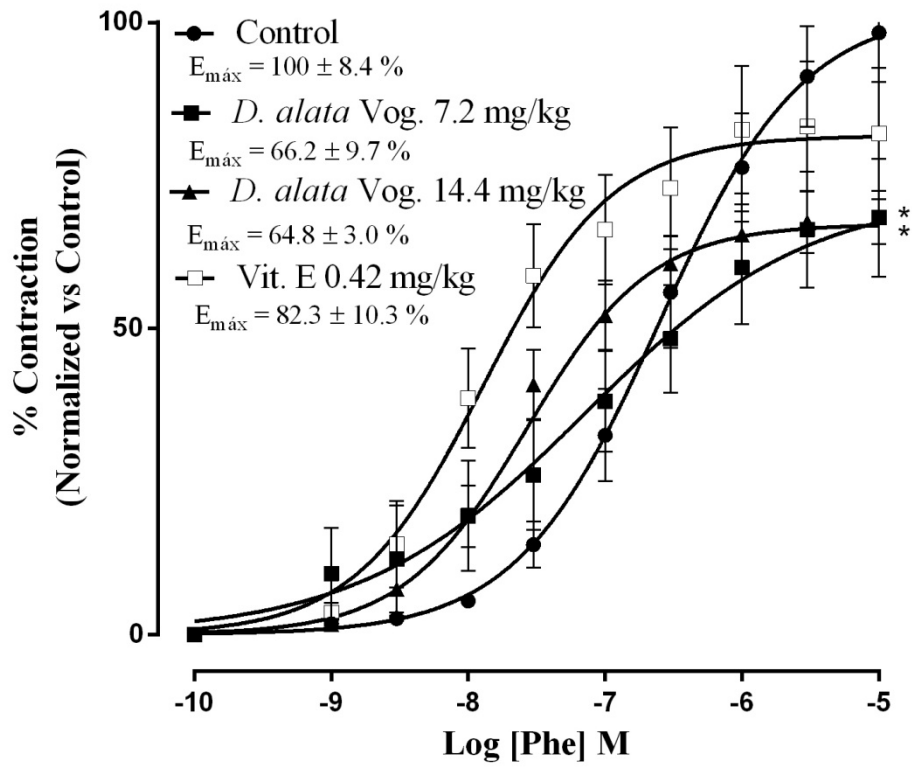




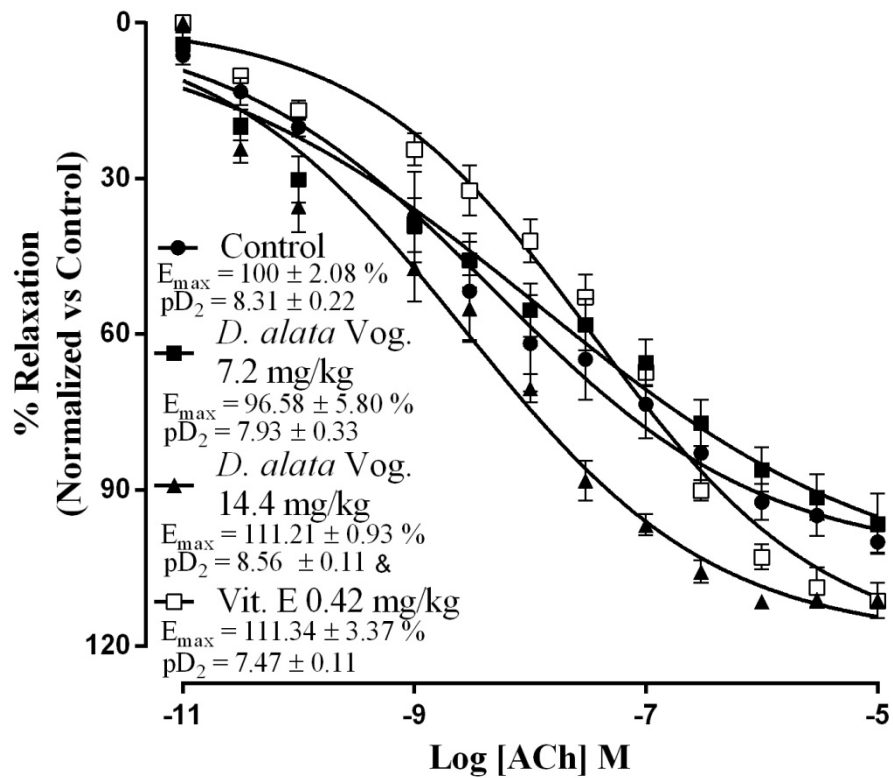


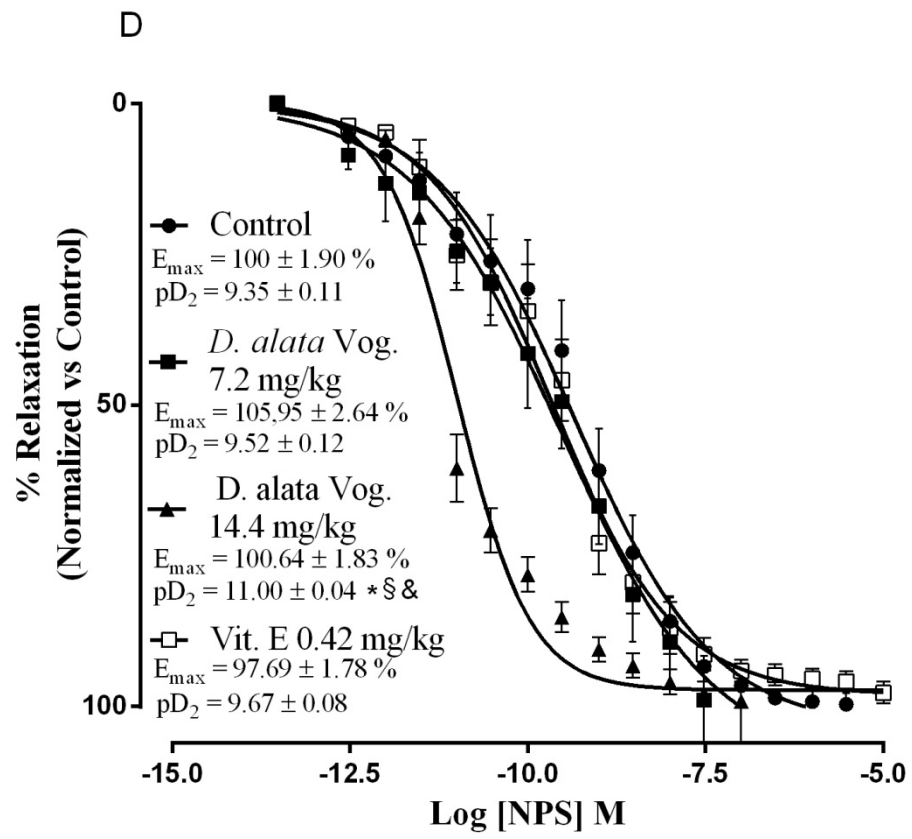


B



C





Supplementary Information

Supplementation with *Dipteryx alata* Vog. almond oil: a natural alternative for thrombus prevention and vascular response improvement

Cristiane Cosmo Silva Luis^a, Isac Almeida de Medeiros^{b,c}, José Alixandre de Sousa Luis^c, Josean Fechine Tavares^{b,c}, Yuri Mangueira do Nascimento^c, Lorena Soares Bezerra^a, Fátima de Lourdes Assunção Araújo de Azevedo^c, Júlio César Pinheiro Lúcio de Oliveira^c, Marianna Vieira Sobral^{b,c}, Vivianne Mendes Mangueira^c, Islania Giselia Albuquerque Gonçalves^b, Raul Jorge Hernan Castro-Gomez^d, Robson Cavalcante Veras^{a,b,*}.

Supplementary data: The organic solvents used in both oil and plasma tocopherol characterization were acetonitrile and methanol, both HPLC grade (TEDIA[®], Brazil) and ultrapure water obtained by Milli-Q purification system (Millipore[®]). The method used the solvents: water (0.2 % acetic acid) (A), methanol (B) and acetonitrile (C). Gradient: 17 % A, 8 % B and 75 % C (0.01 - 5.00 minutes); 0 % A, 100 % B, 0 % C (5.01 -10.00 minutes); 0 % A, 100 % B and 0 % C (10.01 - 25.00 minutes); 27 % A, 8 % B and 75 % C (25.01 - 30.00 minutes) and remaining in this manner for 20 minutes to restore the initial conditions of the method. Flow rate of mobile phase: 0.5mL/minutes. Injection volume: 20µL. Detection: excitation: 290nm and emission: 330nm.

Supplementary Table S1: Composition of the Krebs solution for rat isolated thoracic aorta

Substances	Concentration (mM)
NaCl	118
KCl	4.6
CaCl ₂	2.5
MgSO ₄	5.7
KH ₂ PO ₄	1.1
NaHCO ₃	25
Glucose	11

ANEXOS

Anexo 1 – Certidão emitida pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da UFPB



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA)



CERTIFICADO (2ª VIA)

Certificamos que o projeto intitulado “Avaliação da suplementação do óleo de amêndoas de Baru (*Dipteryx alata* Vog.) como agente antitrombótico e antiagregante em ratos” protocolo nº 128/2016 sob a responsabilidade do pesquisador Dr. Robson Cavalcante Veras – que envolve a produção, manutenção e/ou a utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 08 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal da Paraíba (CEUA-UFPB) em reunião de 15/02/2017. Com aprovação de adendo em reunião de 21/09/2017.

Vigência do Projeto	2017 - 2018
Espécie/linhagem	Rato Wistar (<i>Rattus norvegicus</i>)
Número de animais	90 animais (66 animais para experimentação e 24 animais para treinamento)
Idade/peso	12 semanas (250 - 300 g)
Sexo	Machos
Origem	Unidade de Produção Animal (UPA) do IPeFarM - UFPB

Profa. Dra. Islânia Gisélia Albuquerque Gonçalves
Coordenadora da CEUA-UFPB

Anexo 2– Triagem farmacológica comportamental

ATIVIDADE FARMACOLÓGICA	Quantificação dos efeitos (0) sem efeito, (-) efeito diminuído, (+) efeito presente, (++) efeito intenso				
	0 min	15 min	30 min	60 min	4h
1 – SNC					
a – Estimulante					
Hiperatividade					
Irritabilidade					
Agressividade					
Tremores					
Convulsões					
Piloereção					
Movimento intenso das vibrissas					
Outras _____					
b – Depressora					
Hipnose					
Ptose					
Sedação					
Anestesia					
Ataxia					
Reflexo do endireitamento					
Catatonía					
Analgesia					
Resposta ao toque diminuído					
Perda do reflexo corneal					
Perda do reflexo auricular					
c – Outros comportamentos					
Ambulação					
Bocejo excessivo					
Limpeza					
Levantar					
Escalar					
Vocalizar					
Sacudir a cabeça					
Contorções abdominais					
Abdução das patas do trem posterior					
Pedalar					
Estereotípia					
2 - SN AUTÔNOMO					
Diarréia					
Constipação					
Defecação aumentada					
Respiração forçada					
Lacrimejamento					
Micção					
Salivação					
Cianose					
Tônus muscular					
Força para agarrar					
3 – MORTE					

Anexo 3 – Laudo Técnico do óleo de Baru



LAUDO TÉCNICO

Óleo de Baru
(*Dipteryx alata*)

Lote: B43	
Fabricação: Setembro 2017	Validade: 2 anos
Origem das sementes: Goiás	Extração do Óleo: Ybá Oleos Puros - Brasil (<i>prensagem a frio</i>)
INCI: Dipteryx alata nut Oil	

Ensaio Realizados

TESTE	RESULTADOS	ESPECIFICAÇÕES
Aspecto	De acordo	Límpido e Baixa viscosidade
Odor	De acordo	característico
Cor	De acordo	Amarelo claro (Hansa*)
Impurezas	Isento	Isento
Índice de Acidez	0,40	Max 4
Densidade Relativa a 20°C	0,918	0,912 a 0,922
Resultado:	Aprovado	

* Referência interna

Armazenamento: Armazenado em recipiente original vedado e ao abrigo de luz, calor e umidade.

Por se tratar de um produto natural pode apresentar pequenas variações de cor, sem prejudicar qualidade do produto, no entanto poderá ocorrer alteração nas características físico-químicas se não acondicionado adequadamente.

Transporte: Produto não enquadrado na portaria 204/97 em vigor sobre transporte de produtos perigosos

Conclusão: APROVADO

Referências bibliográficas: Metodologia do fabricante (Laboratório Ybá)

Resp. Técnico: Sandra de Fátima Ferreira da Silva – CRF-GO 6402

Autorização de funcionamento MS: 205166.3

Ybá Óleos Puros Ind. e Com. Ltda. - Rua Gabriel Gomes, quadra II, lote 2, Centro
CEP 73770-000 - Alto Paraíso de Goiás - GO - Tel: (62) 3446.1736

