

METABÓLITOS SECUNDÁRIOS DE ORIGEM VEGETAL: UMA FONTE POTENCIAL DE FÁRMACOS ANTITROMBÓTICOS

Douglas Siqueira de Almeida Chaves e Sônia Soares Costa*

Núcleo de Pesquisas de Produtos Naturais, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 21941-902 Rio de Janeiro - RJ, Brasil

Ana Paula de Almeida

Curso de Farmácia, Universidade Severino Sombra, Vassouras - RJ, Brasil / Faculdade de Farmácia, Universidade do Porto, Rua Aníbal Cunha, 164, 4050-047 Porto, Portugal

Flávia Frattani, Mariane Assafim e Russolina Benedeta Zingali

Instituto de Bioquímica Médica, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 21941-902 Rio de Janeiro - RJ, Brasil

Recebido em 19/3/09; aceito em 2/7/09; publicado na web em 8/12/09

SECONDARY METABOLITES FROM VEGETAL ORIGIN: A POTENTIAL SOURCE OF ANTITHROMBOTIC DRUGS. Cardiovascular diseases are responsible for the largest number of deaths among humans worldwide, including heart attacks, strokes, and thrombosis. The treatment of thrombosis is generally through the administration of anticoagulant and/or antiplatelet drugs, which have some clinical limitations. Plants synthesize a wide variety of bioactive metabolites in response to different stimuli. This review focuses on a number of molecules of vegetal origin belonging to different chemical classes, with significant anticoagulant and antiplatelet effects. Their promising antithrombotic profile confirms the potential of natural products as a source of lead molecules for drug development in the prevention and treatment of thrombosis.

Keywords: natural anticoagulant; natural antiplatelet; cardiovascular diseases.

INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, vem aumentando a incidência de doenças cardiovasculares e acidentes vasculares. De acordo com a Organização Mundial de Saúde, as doenças cardiovasculares serão, em 2015, as principais causas de óbitos nos países desenvolvidos e em desenvolvimento.^{1,2}

As diversas possibilidades de alvos terapêuticos, bem como as limitações relacionadas a alguns fármacos em uso clínico, incentivam a busca de novas substâncias que apresentem ação anticoagulante e/ou antiplaquetária.

Produtos de origem natural têm sido investigados, mundialmente, quanto à sua ação anticoagulante e/ou antiplaquetária através de ensaios *in vitro*. As substâncias do reino vegetal, o qual já contribuiu com diversas moléculas em uso na profilaxia e tratamento de diversas patologias, vêm sendo as mais estudadas dentre os produtos naturais, sob este enfoque.

Nesta revisão, realizada com base nos bancos de dados disponíveis (*ScienceDirect e ISI Web of Science*), serão apresentadas 43 substâncias de origem vegetal com atividade anticoagulante e antiplaquetária *in vitro*, que apresentam ou não similaridade química com os fármacos utilizados na clínica nos últimos 25 anos. As substâncias que atuam inibindo os fatores componentes da coagulação plasmática são denominadas anticoagulantes, enquanto que aquelas que atuam inibindo a agregação plaquetária, ou os receptores plaquetários, são denominadas substâncias antiplaquetárias.

O enfoque deste trabalho foi dado ao extenso e variado leque de classes químicas de substâncias com significativa ação anticoagulante e/ou antiplaquetária *in vitro*, que representam um enorme potencial para o desenvolvimento de novos fármacos antitrombóticos.

SISTEMA HEMOSTÁTICO

O sistema vascular, definido como o conjunto de vasos (artérias,

veias e capilares) que conduzem o sangue no organismo, exerce um papel fundamental no transporte de oxigênio e nutrientes para os tecidos, além de regular o extravasamento de fluidos, solutos, hormônios e macromoléculas. A manutenção da integridade do sistema vascular é absolutamente vital para o organismo humano, uma vez que a perda de uma quantidade significativa de sangue através de uma injúria vascular é incompatível com a vida.^{3,4} O sistema hemostático é um mecanismo complexo que reconhece o dano vascular e recruta uma combinação apropriada de componentes celulares e proteínas plasmáticas solúveis, produzindo um tampão insolúvel, que cessa a perda sanguínea.⁴⁻⁶ Os principais constituintes deste tampão incluem as plaquetas e um polímero insolúvel de fibrina, que é formado a partir de uma proteína plasmática solúvel denominada fibrinogênio. O sistema hemostático é relativamente quiescente se o dano vascular não está presente. Entretanto, em caso de injúria vascular, ocorre a deposição de plaquetas e fibrina rapidamente no local. O tamanho deste tampão dependerá da extensão da lesão.^{4,7,8}

HEMOSTASIA PRIMÁRIA

As plaquetas são células anucleadas, derivadas da fragmentação do citoplasma do megacariócito, uma célula formada na medula óssea. O sangue humano apresenta normalmente de 200.000 a 400.000 plaquetas/mm³.^{10,11}

Em condições normais, as plaquetas circulam no sangue em estado de repouso sob a forma discóide, sendo impedidas de interagir com a matriz subendotelial graças ao endotélio vascular que funciona como uma barreira que exerce ativamente funções antiadesivas e antiagregantes, principalmente através da liberação de PGI₂ e óxido nítrico (NO). Entretanto, quando recrutadas devido a alterações dessas células endoteliais e à exposição de moléculas do subendotélio, principalmente colágeno e fator de von Willebrand, as plaquetas sofrem uma drástica mudança morfológica.^{3,12} Quando expostas a agonistas, tais como adenosina difosfato (ADP), serotonina, trombina ou colágeno, são ativadas, mudando da forma discóide para a esférica, com extensa emissão de pseudópodos - processo chamado

*e-mail: sscbh@terra.com.br

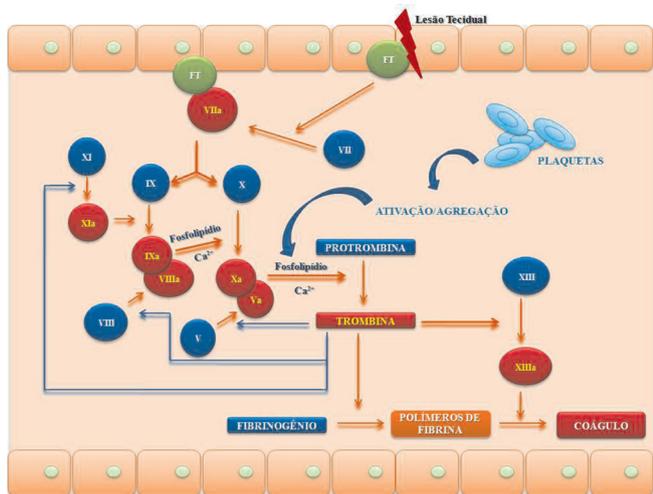


Figura 1. Processo de coagulação sanguínea: a coagulação é iniciada pela exposição do fator tecidual, após uma lesão tecidual, que se associa ao fator VII ativado (Fator VIIa). O complexo fator tecidual - fator VIIa (tenase extrínseco) catalisa a conversão do fator X em Xa, além da conversão de IX em IXa. O complexo Xa, Va, fosfolipídio e Ca^{2+} , denominado protrombinase, ativa a protrombina em trombina que, por sua vez, ativa os fatores V, VIII e XI em Va, VIIIa e XIa aumentando a atividade dos complexos tenase intrínseco (IXa, VIIIa, X, fosfolipídios e cálcio) e protrombinase (Xa, Va, protrombina, fosfolipídios e cálcio). A trombina gerada também ativa o fator XIII em XIIIa e cliva fibrinogênio, uma proteína insolúvel, em um polímero de fibrina que se torna estável na presença do fator XIIIa. Alternativamente, o complexo tenase extrínseco também catalisa a conversão do fator IX em IXa – que, junto ao fator VIIIa, fosfolipídio e Ca^{2+} , forma o complexo tenase intrínseco - ativando o fator X em Xa com auxílio do complexo tenase extrínseco. Adaptada da ref. 9

de mudança de forma (*shape change*) - e aderindo rapidamente ao local da lesão vascular.^{13,14}

As plaquetas mobilizam alguns receptores de membrana, particularmente a glicoproteína IIb/IIIa ($GP\alpha_{IIb}\beta_3$), em resposta aos sinalizadores extracelulares que podem ser solúveis como ADP e trombina, ou como o colágeno que está presente no subendotélio.³

Plaquetas ativadas secretam ADP (presentes nos grânulos densos) que, por sua vez, ativam outras plaquetas via dois receptores: P2Y1 e P2Y12, receptores estes que são acoplados à proteína G. O receptor P2Y1 está acoplado à proteína Gq, regulando os eventos de sinalização Ca^{2+} -dependentes, enquanto o receptor P2Y12 é um *Gai-linked* e ativa a $GP\ IIb/IIIa$ por um mecanismo envolvendo a inibição da produção de AMPc pela adenilato ciclase.¹⁵⁻¹⁷

Muitos agonistas plaquetários promovem suas respostas através de um mecanismo de transdução de sinal que envolve a ativação da fosfolipase C. Esta enzima converte fosfatidilinositol bifosfato (PIP2), um tipo de fosfolipídio presente na bicamada da membrana das plaquetas, em diacilglicerol (DAG) e inositol trifosfato (IP_3). O DAG ativa proteína quinase C (PKC), e o IP_3 ativa canais de Ca^{2+} presentes na membrana do sistema tubular denso (que serve de reservatório intracelular de Ca^{2+} plaquetário) proporcionando, assim, a saída de íons Ca^{2+} deste compartimento, aumentando a sua concentração no citoplasma.¹⁸ O aumento de Ca^{2+} , além de promover várias respostas celulares, também ativa a fosfolipase A_2 , que gera ácido araquidônico através da clivagem de fosfolipídios de membrana. A enzima ciclo-oxigenase-1 (COX-1), presente nas plaquetas, converte ácido araquidônico em endoperóxidos cíclicos (prostaglandina G_2 (PGG_2) e prostaglandina H_2 (PGH_2)). A enzima tromboxana sintase converte estes endoperóxidos em tromboxana A_2 . Estes produtos da COX-1 plaquetários (PGG_2 , PGH_2 e TXA_2) são potentes vasoconstritores e ativadores plaquetários. Por se ligarem aos seus receptores especifi-

cos plaquetários, eles ativam mecanismos, via proteína G acoplada à fosfolipase C, deste modo, completando um *feedback* positivo no processo de ativação.¹⁹⁻²³

Três receptores plaquetários de membrana, chamados de glicoproteína (GP Ib), receptor ativado por protease-1 (PAR 1) e receptor ativado por protease-4 (PAR 4), têm sido descritos atualmente como receptores de α -trombina em plaquetas humanas.^{17,24,25} A ativação destes receptores está associada à concentração de trombina no meio. Assim, a trombina vai ativar quinases da família Src (ativação GP Ib), ou proteínas G (receptores tipo PAR). Os receptores do tipo PAR são ativados por proteases de forma irreversível. São rapidamente fosforilados e desacoplados da sinalização após a ativação pela trombina. Esta fosforilação impede uma interação adicional com proteínas G.^{17,18,26,27}

A mudança morfológica é também acompanhada pela redistribuição de fosfolipídios plaquetários, na qual os fosfolipídios de membrana carregados negativamente (fosfatidilserina e fosfatidiletanolamina) são mais expostos na face externa da membrana plaquetária. Esses fosfolipídios carregados negativamente formam nas plaquetas ativadas uma superfície para ligação de fatores e cofatores da coagulação, formando uma conexão entre a hemostasia primária e moléculas subendoteliais, plaquetas e outras células sanguíneas periféricas e a coagulação sanguínea.^{3,4,28-30}

HEMOSTASIA SECUNDÁRIA

A coagulação sanguínea envolve uma ativação sequencial, por uma série de reações enzimáticas, na qual uma proteína plasmática inativa (zimogênio) é convertida em um produto ativo. O zimogênio é convertido em uma forma ativa através da hidrólise de uma ou duas ligações peptídicas, culminando na geração de uma grande quantidade de trombina.³¹⁻³³

O mecanismo hemostático conduz a reações pró-coagulantes de extrema relevância envolvendo três complexos enzimáticos: o complexo “protrombinase”, o complexo “tenase intrínseco” e o complexo “tenase extrínseco”. Os fatores II, VII, IX e X são sintetizados no fígado e sofrem uma alteração pós-traducional que consiste na gama-carboxilação de resíduos de ácido glutâmico (Glu) no N-terminal dessas proteínas, por uma carboxilase vitamina K-dependente (a vitamina K oxidase e redutase). Estes resíduos de ácido gama-carboxiglutâmico (Gla) são essenciais para a ligação aos íons Ca^{2+} e aos fosfolipídios na superfície das plaquetas e cruciais para a ativação e interação entre os vários fatores para a formação dos complexos.^{34,35}

Durante a coagulação sanguínea, estes complexos se organizam junto à superfície da membrana da plaqueta ativada resultando na ativação dos zimogênios, fator X e protrombina.^{4,25,30} Os complexos protrombinase e tenase intrínseco contêm componentes plasmáticos, enquanto que o complexo tenase extrínseco possui também componentes de origem celular ou tecidual.^{4,36} O processo de coagulação tem sido revisto e muitos estudos têm proposto a divisão deste mecanismo em três fases: iniciação, amplificação e propagação.

A fase de iniciação é disparada pela exposição do fator tecidual que se associa ao fator VIIa presente no sangue (cerca de 1 a 2% do fator VII total)³⁷ formando o complexo denominado “tenase extrínseco”. Este complexo ativa os fatores IX e X,⁴ apresentando uma meia-vida curta no plasma, sendo essencial para iniciar o processo de coagulação, através da produção de pequenas quantidades de trombina.

Na fase de amplificação, esta pequena quantidade de trombina formada se liga às plaquetas, aderidas no local de injúria vascular, aumentando sua ativação através da clivagem dos receptores do tipo PAR.^{29,38}

A fase de propagação seria controlada pela α -trombina inicialmente gerada, que ativa os fatores, V, VIII e XI. O fator XIa ativa

o fator IX, e o fator IXa forma um complexo com o fator VIIIa, fosfolipídios e cálcio, denominado complexo “tenase intrínseco”. Este complexo, por sua vez, ativa o fator X de forma idêntica ao complexo tenase extrínseco, porém com uma eficiência catalítica cerca de 50 vezes maior.^{36,39} A ativação do fator V gerando o fator Va⁴⁰ e a associação com o fator Xa na superfície de células ativadas, em uma reação dependente de cálcio, forma o complexo denominado “protrombinase”. Este complexo passa, então, a ser o principal responsável pela ativação da protrombina. A α -trombina é a única enzima gerada no processo de coagulação capaz de converter o fibrinogênio em fibrina. Este processo é mediado por proteólise limitada sobre a molécula de fibrinogênio, uma proteína solúvel do plasma, que é então convertido em um monômero de fibrina. Os monômeros de fibrina interagem entre si através de interações eletrostáticas formando uma rede insolúvel, porém instável, de fibrina. A consolidação deste polímero é feita pela ação do fator XIIIa, uma enzima que também é ativada pela α -trombina, a qual une, covalentemente, as moléculas de fibrina presentes na rede instável.⁴¹⁻⁴³ A trombina também ativa os fatores da coagulação sanguínea V, VIII, XI e XIII amplificando, assim, sua própria produção.^{25,32,42,44} Este processo é finamente controlado por inibidores presentes no plasma, como a antitrombina, a α 2-macroglobulina ou a proteína C ativada.⁸

DOENÇAS CARDIOVASCULARES

O aumento do consumo de alimentos com alto nível de colesterol e a diminuição da atividade física, nos últimos anos, vem contribuindo sobremaneira para a crescente incidência de doenças cardiovasculares na população.

Sabe-se que, nos Estados Unidos, cerca de 13 milhões de pessoas sofrem de angina e de outras doenças coronarianas. Estas constituem as principais causas de óbito naquele país (aproximadamente 495.000 mortes em 2002).⁴⁵

Dados apontam um número crescente de óbitos relacionados às doenças cardiovasculares desde 1990. Atualmente, estima-se que aproximadamente 17 milhões de pessoas são vítimas destas doenças, representando em torno de 30% dos óbitos em todo o mundo (Figura 2).^{1,2,46-50}

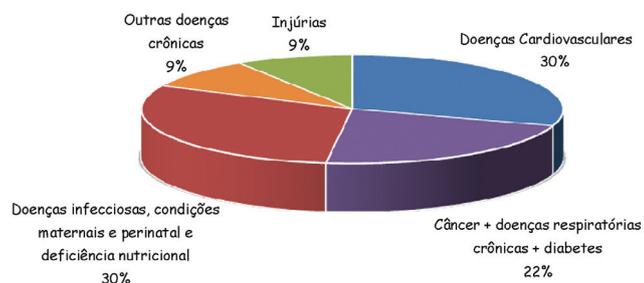


Figura 2. Distribuição das causas de óbito no mundo de acordo com a Organização Mundial da Saúde. Adaptada da ref. 2

A doença cardiovascular é causada por uma alteração do sistema sanguíneo, e inclui doenças coronarianas, doenças cerebrovasculares, hipertensão, doença arterial periférica e doença reumática do coração. Os principais fatores de risco para as doenças cardiovasculares são o uso de tabaco, a inatividade física e uma dieta não controlada.²

TROMBOSE

A trombose refere-se a uma formação patológica de um tampão hemostático no interior do vaso sanguíneo, na ausência de sangramento.⁵¹ A doença trombótica e tromboembólica é comum e tem graves

consequências, tais como, infarto do miocárdio, acidente vascular cerebral, trombose venosa profunda e embolia pulmonar. Os principais fármacos utilizados na prevenção ou tratamento da trombose venosa são os anticoagulantes orais e injetáveis. Já os principais fármacos utilizados na trombose arterial consistem nos antiplaquetários.⁵¹

O processo hemostático ativado inespecificamente pode resultar na oclusão de vasos sanguíneos levando à trombose, além de causar problemas hemorrágicos.^{31,48,52} As causas predisponentes da trombose venosa profunda foram descritas por Virchow, em 1856, e incluem estas: estase sanguínea, injúria vascular e alterações dos fatores de coagulação do sangue, o que conduz à hipercoagulabilidade. Os diversos fatores de risco, adquiridos ou herdados, atuam através de no mínimo um dos três componentes da tríade de Virchow e o seu reconhecimento auxilia no diagnóstico e profilaxia da doença tromboembólica.^{31,48,52}

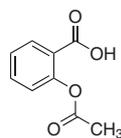
Sendo assim, muitas condições clínicas podem estar associadas com o alto risco de trombose arterial, trombose venosa e tromboembolia. A aterosclerose, o fumo, a hipertensão e o diabetes são alguns fatores relacionados com a trombose arterial, enquanto que a cirurgia geral, a cirurgia ortopédica, o trauma e o câncer estão entre as condições associadas com episódios de trombose venosa.⁵³

FÁRMACOS ANTIPLAQUETÁRIOS EM USO CLÍNICO

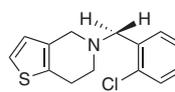
Os principais fármacos antiplaquetários (Figura 3) - aspirina[®] (ácido acetil salicílico), clopidogrel e ticlopidina - são utilizados na clínica para o tratamento das doenças cardiovasculares, com o objetivo de prevenir ou diminuir a formação de coágulos sanguíneos.⁴⁵

A aspirina[®] foi desenvolvida a partir de um metabólito secundário (salicina) isolado do gênero *Salix*.⁵⁴ Estudos mostraram que a aspirina[®] pode reduzir o risco de infarto do miocárdio e doenças coronarianas em pacientes sem doenças cardiovasculares prévias⁵⁵ e exerce seu efeito pela acetilação irreversível da ciclo-oxigenase-1 no interior das plaquetas, impedindo a biossíntese de tromboxana A₂ (TXA₂).⁵⁶ Entretanto, o consumo da aspirina[®] resulta em um aumento de 2,5 vezes no risco de sangramento gastrointestinal em pacientes.⁵⁷

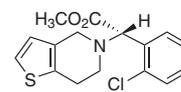
O clopidogrel, outro fármaco antiplaquetário muito utilizado na clínica, é um derivado tienopiridínico que está quimicamente relacionado à ticlopidina, a qual inibe irreversivelmente a agregação plaquetária induzida por adenosina difosfato (ADP), bloqueando seletivamente os receptores de ADP localizados na superfície das plaquetas.⁵⁸ O clopidogrel apresenta um perfil de segurança superior à ticlopidina porque, ao contrário desta, não está associado ao risco de neutropenia e trombocitopenia. Além desta vantagem, não requer monitorização hematológica nos primeiros meses de tratamento.⁵⁹



Ácido acetil salicílico (aspirina[®])



Ticlopidina



Clopidogrel

Figura 3. Principais fármacos antiplaquetários

FÁRMACOS ANTICOAGULANTES EM USO CLÍNICO

Os principais fármacos anticoagulantes podem ser classificados em dois grandes grupos: heparina e heparinoides, de administração subcutânea e parenteral e, anticoagulantes indiretos ou orais derivados da cumarina (Figura 4).^{51,60}

A heparina, um anticoagulante bastante utilizado clinicamente, consiste em uma mistura heterogênea de polímeros de um polissacarídeo natural, extraído de mucosa intestinal suína ou também de

pulmão bovino, com peso molecular variando entre 17.000 e 20.000 daltons. A interação da heparina com a antitrombina provoca uma mudança conformacional nesta última, respondendo, assim, por seu principal efeito anticoagulante. Esta interação aumenta a inativação pela antitrombina de enzimas da coagulação, tais como a trombina e os fatores Xa e IXa.^{61,62}

A utilização da heparina por longos períodos também leva ao sangramento, seguido de plaquetopenia. Outros efeitos adversos relacionados à heparina são osteoporose, no uso por longo prazo, hipersensibilidade e necrose de pele.⁶¹

A varfarina, cuja estrutura química resulta de uma modificação de uma cumarina isolada do gênero *Melilotus*, é um anticoagulante oral que atua como inibidor da vitamina K epoxidredutase e vitamina K redutase. Seu mecanismo de ação implica no impedimento da redução da vitamina K, um cofator essencial para a síntese de fatores da coagulação (II, VII, IX e X) dependentes de vitamina K.⁶³

Outras moléculas com o esqueleto químico das cumarinas, como acenocumarol, femprocumona e dicumarol, apresentam atividade anticoagulante e são muito utilizadas na clínica. No entanto, estes fármacos anticoagulantes possuem algumas limitações. No caso da terapia com varfarina, a janela terapêutica estreita faz com que a administração da droga seja problemática.⁶⁴

A complicação mais comum relacionada à utilização da varfarina é a hemorragia que pode ser agravada pela administração concomitante de aspirina® e de outros fármacos anti-inflamatórios não esteroidais. Outro potente efeito adverso resultante da administração de varfarina é a necrose da pele.⁶⁵ O uso concomitante da varfarina com extrato de *Ginkgo biloba* pode potencializar o efeito anticoagulante resultando em uma hemorragia significativa.⁶⁶

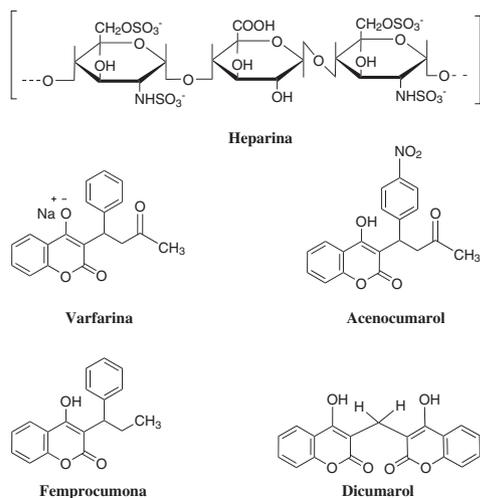


Figura 4. Fármacos anticoagulantes

PANORAMA ATUAL DOS TRATAMENTOS ANTITROMBÓTICOS

Os gastos atuais com os tratamentos antitrombóticos são extremamente altos. No Brasil, aproximadamente US\$ 125 milhões são gastos, anualmente, com a utilização de fármacos antitrombóticos.⁶⁷ Em 1999, a despesa com medicamentos para trombose em Portugal foi de aproximadamente US\$ 20 milhões, e um aumento de 30% em 2003 fez com que fossem gastos cerca de US\$ 26 milhões anuais.⁶⁸ Em países como a Suécia, Inglaterra, Noruega e Dinamarca as despesas com estes fármacos chegam a US\$ 60 milhões anuais.^{68,69} Nos Estados Unidos, em 2003, foram gastos US\$ 2 bilhões com fármacos antitrombóticos. Estima-se que entre 2005 e 2015, os gastos despen-

didados com o tratamento farmacológico de doenças vasculares atinjam US\$ 54 bilhões (Brasil), US\$ 558 bilhões (China), US\$ 260 bilhões (Índia) e US\$ 8 bilhões (Nigéria).⁷⁰

Atualmente diversas substâncias antitrombóticas estão sob avaliação em estudos clínicos (fases I, II, III ou IV). Com base nas informações disponíveis em *Stroke Trials Registry*,⁷¹ cerca de 350 substâncias são candidatas promissoras à categoria de novos fármacos antitrombóticos. Muitas substâncias atualmente sob avaliação clínica são de origem sintética ou semissintéticas, derivadas ou não de produtos naturais.

SUBSTÂNCIAS DE ORIGEM VEGETAL COM ATIVIDADE ANTIPLAQUETÁRIA E ANTICOAGULANTE

A busca por substâncias de origem vegetal que possam interferir no processo hemostático vem sendo intensificada em todo o mundo, uma vez que os produtos naturais têm sido, historicamente, a primeira fonte de substâncias antitrombóticas.⁷²

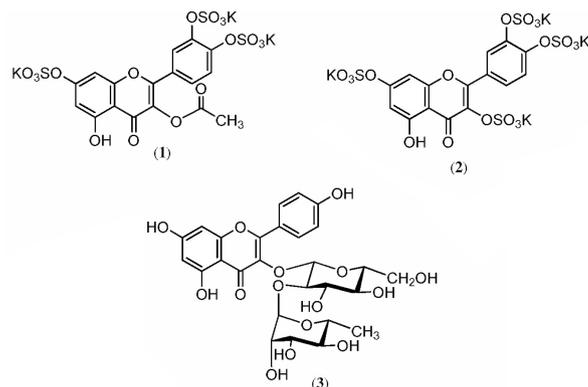
Em uma recente revisão, Koh e Chua apresentaram dados sobre a atividade anticoagulante de diversas substâncias de espécies vegetais que são utilizadas em medicina popular.⁶⁶ A presente revisão focaliza substâncias de origem vegetal com atividade anticoagulante e antiplaquetária, oriundas ou não de espécies medicinais.

Atualmente, vários alvos terapêuticos vêm sendo estudados na busca de substâncias que atuam no sistema hemostático, mas três deles se destacam: inibidores da agregação plaquetária (antiplaquetários), inibidores da trombina e inibidores do fator ativado Xa (anticoagulantes).

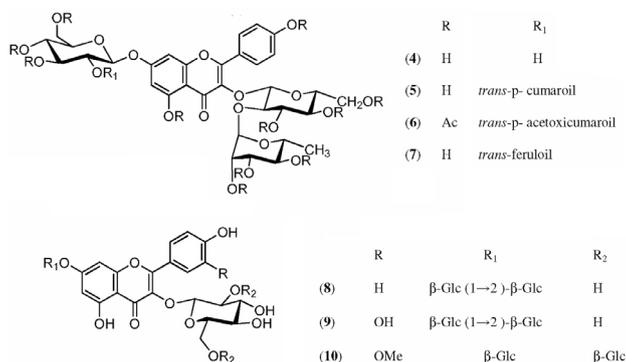
Substâncias de origem vegetal com ação antiplaquetária

Entre os principais agonistas plaquetários, encontram-se a trombina, a adenosina difosfato (ADP) e o colágeno. Sendo assim, extratos vegetais e substâncias de origem vegetal vêm sendo avaliados em ensaios de agregação plaquetária induzida por esses agentes.

Os flavonoides sulfatados 3-acetil-7,3',4'-trissulfato de quercetina (1) e 3,7,3',4'-tetrassulfato de quercetina (2) fazem parte de um grupo de substâncias presentes, principalmente, em espécies da família Asteraceae.⁷³ A incubação de plaquetas com estes flavonoides resultou em uma inibição da agregação plaquetária tempo-dependente frente a diferentes agonistas incluindo ADP, trombina e colágeno. Flavonoides não sulfatados como 3-O-β-glicopiranosídeo de kaempferol (3) e 3-O-β-neo-hesperidósídeo de kaempferol (4) também mostraram atividade inibitória frente ao colágeno.⁷³ Já os flavonoides 3-O-β-neo-hesperidósídeo 7-O-[2-O-(trans-p-cumaroil)]-β-D-glicopiranosídeo de kaempferol (5), 3-O-β-neo-hesperidósídeo 7-O-[2-O-(trans-p-cumaroil)]-β-D-glicopiranosídeo dodeca-acetato de kaempferol (6) e 3-O-β-neo-hesperidósídeo 7-O-[2-O-(trans-feruloil)]-β-D-glicopiranosídeo

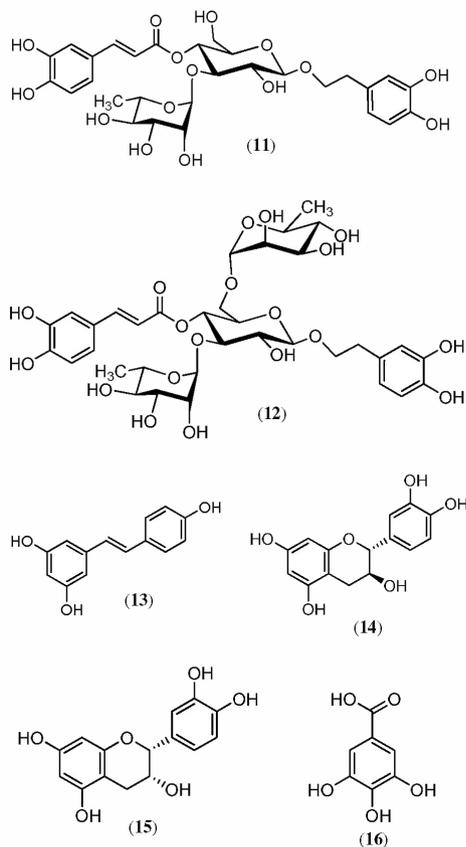


de kaempferol (**7**) isolados do gênero *Allium* apresentaram efeito moderado frente ao colágeno. Os autores sugerem que os substituintes *trans-p*-cumaroil e o maior número de açúcares nas moléculas poderiam estar diminuindo a sua atividade.⁷⁴ Outros flavonoides 3-*O*- β -glicopiranosídeo 7-*O*- β -glicopiranosídeo-(1 \rightarrow 2)-*O*- β -glicopiranosídeo de kaempferol (**8**), 3-*O*- β -glicopiranosídeo 7-*O*- β -glicopiranosídeo-(1 \rightarrow 2)-*O*- β -glicopiranosídeo de quercetina (**9**) e 3-*O*- β -glicopiranosídeo-(1 \rightarrow 2)-*O*- β -glicopiranosídeo 7-*O*- β -glicopiranosídeo de isor-hamnetina (**10**), isolados do mesmo gênero, apresentaram atividade frente à agregação plaquetária induzida por colágeno.^{75,76}



O fracionamento do extrato metanólico das folhas de *Eremophila gilesii* (Myoporaceae) resultou no isolamento de dois feniletanoides glicosilados denominados verbascosídeo (**11**) e poliumosídeo (**12**). Estas substâncias foram capazes de inibir em 95% a agregação plaquetária induzida por ADP, na concentração de 1 mg/mL.⁷⁷

O estilbeno resveratrol (**13**), os flavonoides catequina (**14**) e epicatequina (**15**) e o ácido gálico (**16**) foram isolados do extrato de uvas vermelhas. Essas substâncias fenólicas provocaram uma inibição

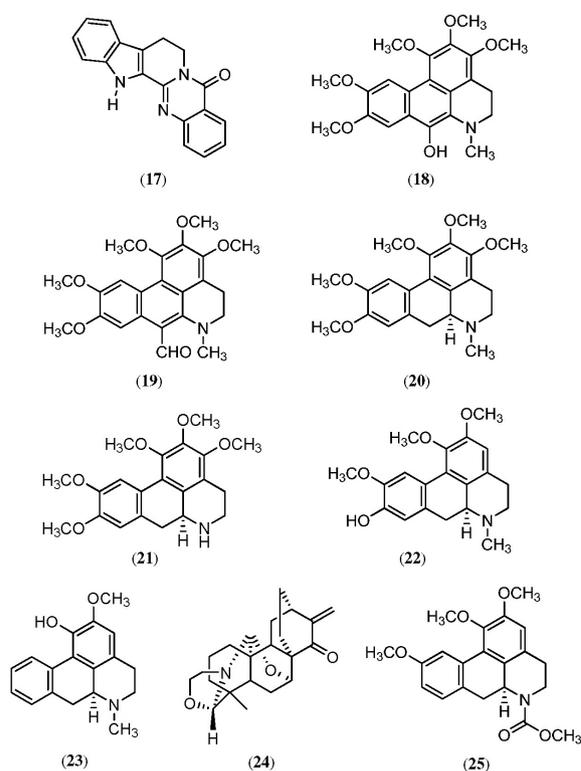


dose-dependente, em ensaio de agregação induzida por ADP, com plasma rico em plaquetas (PRP).⁷⁸

Outra classe importante de metabólitos secundários, no que diz respeito à ação antiplaquetária, é a dos alcaloides. Para rutecarpina (**17**) foi comprovado que sua ação não está relacionada com as glicoproteínas IIb/IIIa. O seu mecanismo de ação se dá através da inibição da fosfolipase C, levando à diminuição da produção de tromboxana A₂ (TXA₂).⁷⁹ Já os alcaloides aporfínicos 7-hidroxi-desidrotalicsimidina (**18**), 7-formil-desidrotalicsimidina (**19**), talicsimidina (**20**), nor-purpureína (**21**), *N*-metil-laurotetanina (**22**) e lirinidina (**23**) inibiram a agregação induzida por colágeno, por ácido araquidônico (AA) e pelo fator de agregação plaquetária (PAF). O alcaloide 7-hidroxi-desidrotalicsimidina (**18**), em baixas concentrações (0,1 mg/mL), apresentou ainda inibição da trombina.^{80,81}

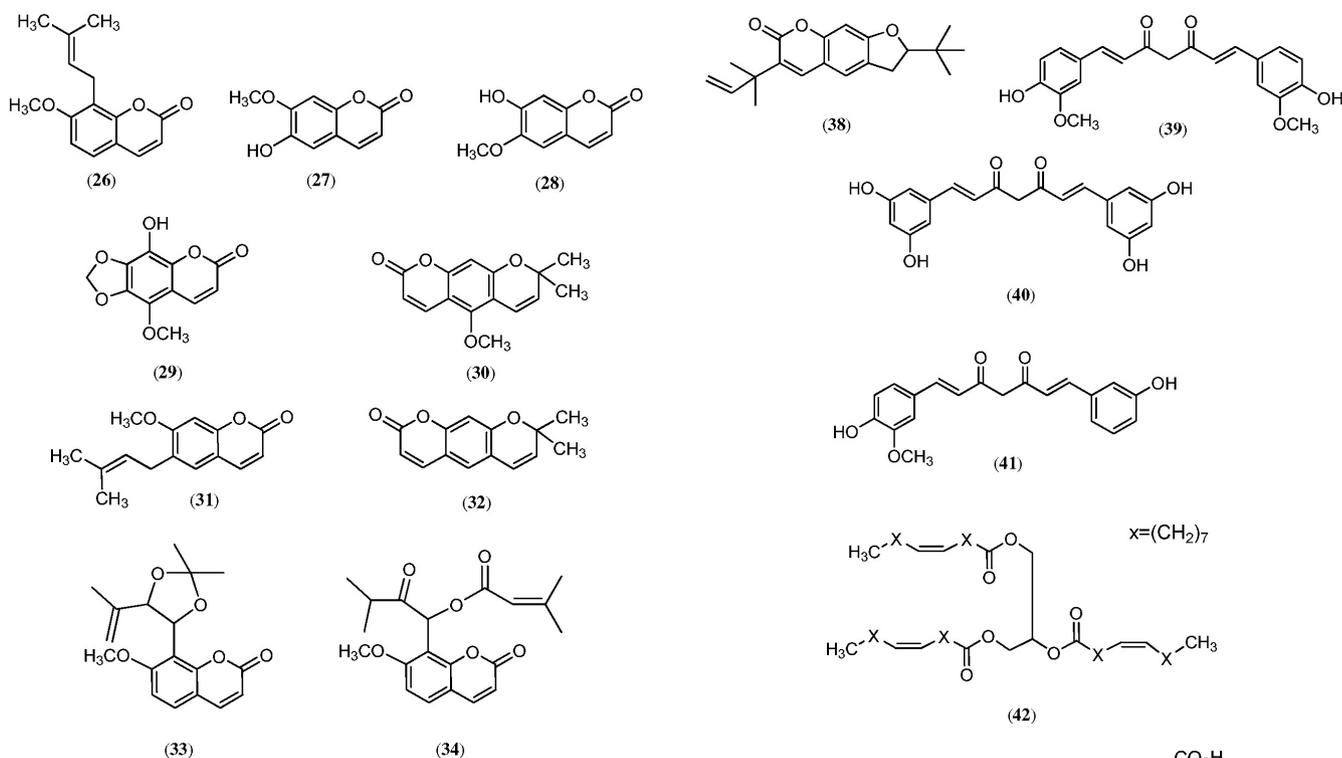
Alcaloides diterpênicos isolados da espécie *Spiraea japonica* (Rosaceae) inibiram a agregação induzida por AA, ADP e PAF em plaquetas de coelhos. O efeito inibitório foi do tipo dose-dependente, e o principal inibidor foi a spiramina C1 (**24**), que se revelou tão eficaz quanto o controle positivo (aspirina®).⁸²

Cinco alcaloides *N*-metoxicarbonil aporfínicos foram isolados de *Rollinia mucosa* (Annonaceae) e avaliados frente à agregação plaquetária. O alcaloide romucosina D (**25**) mostrou-se o inibidor mais potente do AA, colágeno e PAF. Os demais alcaloides apresentaram uma inibição significativa.⁸³



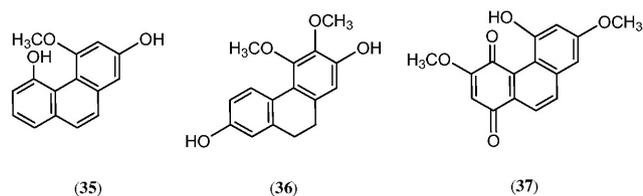
As cumarinas ostole (**26**), iso-escopoletina (**27**), escopoletina (**28**) e artemicapina B (**29**) também inibiram a agregação plaquetária induzida por AA, colágeno, PAF e trombina.⁶⁶ Outras cumarinas, tais como xantoxiletina (**30**), suberosina (**31**) e xantiletina (**32**) apresentaram inibição da agregação plaquetária induzida por AA, colágeno, PAF e ADP. A xantiletina (**32**) inibiu também a síntese de TXA₂ e a hidrólise de fosfatidilinositol.⁸⁴

As cumarinas minumicrolina acetônio (**33**) e epimurpaniculol senecioato (**34**) foram isoladas das folhas de *Murraya omphalocarpa* (Rutaceae). Estas substâncias foram avaliadas frente à agregação plaquetária induzida por trombina, ácido araquidônico e colágeno



utilizando plaquetas lavadas de coelho. A cumarina (**33**) mostrou ser ativa frente à trombina (100 µg/mL), enquanto a cumarina (**34**) foi ativa também frente ao ácido araquidônico na concentração de 100 µg/mL. Nenhuma das substâncias inibiu a agregação plaquetária induzida por colágeno.⁸⁵

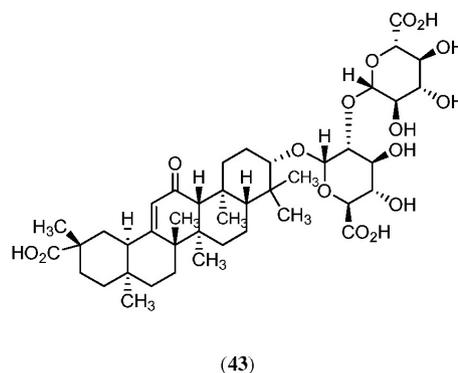
A classe dos fenantrenos, substâncias oriundas do acoplamento oxidativo de anéis aromáticos precursores dos estilbenos, apresenta propriedades antiplaquetárias. Os fenantrenos plicatol-B (**35**), eriantridina (**36**), denbinobina (**37**) foram avaliados frente aos indutores trombina, ácido araquidônico e colágeno, utilizando plaquetas lavadas de coelhos, na concentração de 100 µg/mL. A eriantridina apresentou a maior atividade antiplaquetária frente a estes indutores (IC₅₀ = 9 µM), enquanto que as outras duas substâncias foram menos ativas (IC₅₀ = 24 µM).⁸⁶



Substâncias de origem vegetal com ação anticoagulante

Extratos vegetais e substâncias de origem vegetal vêm sendo avaliados em ensaios anticoagulantes, que se baseiam na capacidade de inibição dos fatores sanguíneos que atuam na coagulação.

Dentre essas substâncias, merece destaque a chalepina (**38**), uma furanocumarina isolada de *Clausena anisata* (Rutaceae); a curcumina (**39**), os fenilpropanoides de *Curcuma longa* (Zingiberaceae) denominados *p,p*-di-hidroxi-dicinamoilmetano (**40**) e *p*-hidroxicinamoilferuloilmetano (**41**) e a trioleína (**42**), um triacilglicerol de *Persicae semen* (Rosaceae). Estas moléculas promovem um aumento no tempo de recalcificação, indicando uma alteração nos fatores da coagulação.⁸⁷⁻⁸⁹



A glicirrizina (GL) (**43**), uma saponina presente no extrato aquoso da raiz da leguminosa *Glycyrrhiza glabra* (alcaçuz-da-europa), tem sido intensamente estudada. Trata-se de um conjugado do ácido glicirrético (GA) com duas moléculas de ácido glucurônico (GU).⁹⁰ Observou-se, em estudos *in vitro*, que a GL exibe uma atividade anticoagulante significativa, através da inibição da trombina. A GL também foi avaliada em ensaios de tempo de recalcificação, mostrando desde um ligeiro aumento do tempo de coagulação, até uma incoagulabilidade total do plasma, em função das doses testadas. Estes ensaios também foram realizados com a aglicona GA e o carboidrato GU, não tendo sido observada ação inibitória.

Estudos para a avaliação do efeito da GL sobre a hidrólise de um pequeno substrato cromogênico específico induzida por trombina, mostraram que a glicirrizina não foi capaz de inibir a hidrólise do substrato cromogênico. Entretanto, a glicirrizina aumentou a atividade catalítica da trombina sugerindo que a glicirrizina não se liga ao sítio catalítico da enzima, porém impede a associação de substratos macromoleculares (como o fibrinogênio) à trombina levando a uma inibição de sua atividade.⁹⁰

A seguir são apresentados os principais ensaios utilizados para avaliar a ação antiplaquetária e anticoagulante *in vitro* das substâncias apresentadas nesta revisão (Tabela 1).

Tabela 1. Métodos utilizados para avaliar as atividades antiplaquetária e anticoagulante

Substâncias Antiplaquetárias (Método Turbidimétrico)				
Classe Química	Substância	Indutor	Ref.	
Flavonoide	(1) 3-acetil-7, 3', 4'-trissulfato de quercetina	ADP, trombina, colágeno	72	
	(2) 3, 7, 3', 4'-tetrassulfato de quercetina	ADP, trombina, colágeno	72	
	(3) 3- <i>O</i> - β -glicopiranosídeo de kaempferol	Colágeno	65, 72	
	(4) 3- <i>O</i> - β -neo-hesperidosídeo de kaempferol	Colágeno	65, 72	
	(5) 3- <i>O</i> - β -neo-hesperidosídeo 7- <i>O</i> -[2- <i>O</i> -(<i>trans</i> - <i>p</i> -cumaroil)]- β -D-glicopiranosídeo de kaempferol	Colágeno	73	
	(6) 3- <i>O</i> - β -neo-hesperidosídeo 7- <i>O</i> -[2- <i>O</i> -(<i>trans</i> - <i>p</i> -cumaroil)]- β -D-glicopiranosídeo dodeca-acetato de kaempferol	Colágeno	73	
	(7) 3- <i>O</i> - β -neo-hesperidosídeo 7- <i>O</i> -[2- <i>O</i> -(<i>trans</i> -feruloil)]- β -D-glicopiranosídeo de kaempferol	Colágeno	73	
	(8) 3- <i>O</i> - β -glicopiranosídeo 7- <i>O</i> - β -glicopiranosídeo-(1 \rightarrow 2)- <i>O</i> - β -glicopiranosídeo de kaempferol	Colágeno	74, 75	
	(9) 3- <i>O</i> - β -glicopiranosídeo 7- <i>O</i> - β -glicopiranosídeo-(1 \rightarrow 2)- <i>O</i> - β -glicopiranosídeo de quercetina	Colágeno	74, 75	
	(10) 3- <i>O</i> - β -glicopiranosídeo-(1 \rightarrow 2)- <i>O</i> - β -glicopiranosídeo 7- <i>O</i> - β -glicopiranosídeo de isorhamnetina	Colágeno	74, 75	
	(14) Catequina	ADP	77	
	(15) Epicatequina	ADP	77	
	Estilbeno	(13) Resveratrol	ADP	77
	Ácido Fenólico	(16) Ácido gálico	ADP	77
	Feniletanoide	(11) Verbascosídeo	ADP	76
(12) Poliumosídeo		ADP	76	
Alcaloide	(17) Rutecarpina	Colágeno	78	
	(18) 7-hidroxi-desidrotalicsimidina	Colágeno, AA, PAF	79, 80	
	(19) 7-formil-desidrotalicsimidina	Colágeno, AA, PAF	79, 80	
	(20) Talicsimidina	Colágeno, AA, PAF	79, 80	
	(21) Nor-purpureína	Colágeno, AA, PAF	79, 80	
	(22) <i>N</i> -metil-laurotetanina	Colágeno, AA, PAF	79, 80	
	(23) Lirinidina	Colágeno, AA, PAF	79, 80	
	(24) Spiramina C1	ADP, AA, PAF	81	
	(25) Romucosina D	AA, colágeno, PAF	82	
	Cumarina	(26) Ostole	AA, colágeno, PAF, trombina	65
(27) Iso-escopoletina		AA, colágeno, PAF, trombina	65	
(28) Escopoletina		AA, colágeno, PAF, trombina	65	
(29) Artemicapina B		AA, colágeno, PAF, trombina	65	
(30) Xantoxiletina		AA, colágeno, PAF, ADP	83	
(31) Suberosina		AA, colágeno, PAF, ADP	83	
(32) Xantiletina		AA, colágeno, PAF, ADP	83	
(33) Minumicrolina acetonídeo		Trombina, AA, colágeno	85	
(34) Epimurpaniculol senecioato		Trombina, AA, colágeno	85	
Fenantreno	(35) Plicatol-B	Trombina, AA, colágeno	86	
	(36) Eriantridina	Trombina, AA, colágeno	86	
	(37) Denbinobina	Trombina, AA, colágeno	86	
Substâncias Anticoagulantes (Método baseado na formação de fibrina)				
Classe Química	Substância	Indutor	Ref.	
Cumarina	(38) Chalepina	Íons cálcio	87-89	
Fenilpropanoide	(39) Curcumina	Íons cálcio	87-89	
	(40) <i>p,p</i> -di-hidroxi-dicnamoilmetano	Íons cálcio	87-89	
	(41) <i>p</i> -hidroxicinamoilferuloilmetano	Íons cálcio	87-89	
Triacilglicerol	(42) Trioleína	Íons cálcio	87-89	
Saponina	(43) Glicirrizina	Íons cálcio ou trombina	90	

AA= Ácido Araquidônico; ADP= Adenosina difosfato; PAF= Fator de agregação plaquetária.

CONCLUSÕES

Historicamente, o reino vegetal constitui uma das fontes mais abundantes de substâncias potencialmente ativas, para os mais diversos alvos farmacológicos.

Esta revisão, que abrange os últimos 25 anos, focaliza 43 substâncias de origem vegetal – flavonoides, feniletanoides, fenilpropanoides, alcaloides, cumarinas, ácidos fenólicos, fenantrenos e uma saponina – com atividade antiplaquetária e/ou anticoagulante. Observamos que o ensaio turbidimétrico é o mais utilizado para mostrar a inibição plaquetária mediada pelas moléculas apresentadas. Para avaliar a atividade anticoagulante, a metodologia mais empregada nos trabalhos consultados utiliza a formação da fibrina induzida por íons cálcio. Observamos ainda que as substâncias fenólicas são as mais frequentes, dentre o grupo de moléculas bioativas apresentadas.

A extensão e a gravidade das doenças cardiovasculares que acometem a população mundialmente vêm incitando, cada vez mais, os pesquisadores a buscar moléculas que tenham a capacidade de interferir favoravelmente na coagulação plasmática.

Atualmente somente duas revisões foram publicadas sobre as propriedades anticoagulantes e antiplaquetárias de substâncias de origem vegetal.^{66,72} Entretanto, os dados aqui apresentados confirmam que o reino vegetal constitui uma rica fonte de novas moléculas capazes de agir de maneira eficaz sobre diferentes alvos relacionados com a formação de trombos.

Observamos que os flavonoides sulfatados e os derivados cumarínicos são classes químicas promissoras, considerando que ambas apresentam similaridades estruturais com os fármacos clinicamente utilizados, tais como a heparina e varfarina, respectivamente. Essas classes químicas podem vir a fornecer novos compostos líderes que, após estudos complementares poderão, eventualmente, se tornar candidatos a novos fármacos.

Segundo Newman,⁹¹ nos últimos 25 anos, apenas uma substância de origem natural e cinco derivados de produto natural foram avaliados em ensaios clínicos antitrombóticos. O leque variado de substâncias químicas de origem vegetal com propriedades antiplaquetárias e anticoagulantes, apresentado nesta revisão, permite supor que estudos multidisciplinares combinando a descoberta de moléculas bioativas, a farmacologia e a biologia molecular poderiam mudar esta realidade.

AGRADECIMENTOS

D. S. A. Chaves agradece à CAPES pela bolsa de Pós-Graduação e F. Frattani e A. P. Almeida agradecem ao CNPq pelo apoio financeiro (Bolsas de Doutorado e Pós-Doutorado).

REFERÊNCIAS

1. <http://www.who.int/dietphysicalactivity/publications/facts/cvd/en/>, acessada em Fevereiro 2009.
2. http://www.who.int/cardiovascular_diseases/en/, acessada em Fevereiro 2009.
3. Cauwenberghs, S.; van Pampus, E.; Curvers, J.; Akkerman, J. W. N.; Johan W. M.; Heemskerk, J. W. M.; *Transfusion Medicine Reviews* **2007**, *21*, 287.
4. Kalafatis, M.; Swords, N. A.; Rand, M. D.; Mann, K. G.; *Biochem. Biophys. Acta* **1994**, *1227*, 113.
5. Rosenberg, R. D.; *Thromb. Haemostasis* **2001**, *86*, 41.
6. Davie, E. W.; Fujikawa, K.; Kisiel, W.; *Biochemistry* **1991**, *30*, 103631.
7. Bourin, M. C.; Lindahl, U.; *J. Biochem.* **1993**, *289*, 313.
8. Esmon, C. T.; *Biochem. Biophys. Acta* **2000**, *1477*, 349.
9. Marshal, J. C.; *Nat. Rev. Drug Discovery* **2003**, *2*, 391.
10. Erusalimsky, J. D.; Martin, J. F. Em *Cellular model systems to study megakaryocyte differentiation. Platelets- A practical approach*; Watson, S. P.; Authi, K. S., eds.; Oxford University Press Inc.: New York, 1996, cap. 2.
11. Shore-Lesserson, L.; *Hematology Oncology Clinics North America* **2007**, *21*, 51.
12. Asakura, H.; Okudaira, M.; Ontachi, Y.; Mizutani, T.; Omote, M.; Yoshida, T.; Kaneda, M.; Yamazaki, M.; Morishita, E.; Takami, A.; Miyamoto, K.; Nakao, S.; *Thromb. Haemostasis* **2004**, *91*, 71.
13. Prevost, N.; Woulfe, D.; Tognolini, M.; Brass, L. F.; *J. Thromb. Haemostasis* **2003**, *1*, 1613.
14. Ruggeri, Z. M.; *Thromb. Haemostasis* **1997**, *78*, 611.
15. Andrews, R. K.; Berndt, M. C.; *Thromb. Res.* **2004**, *114*, 447.
16. Gurbel, P. A.; Di Chiara, J.; Tantry, U. S.; *Am. J. Cardiol.* **2007**, *100*, 18M.
17. Offermanns, S.; *Circ. Res.* **2007**, *99*, 1293.
18. Ossovskaya, V. S.; Bunnett, N. W.; *The American Physiological Society* **2004**, *84*, 579.
19. Dubois, C.; Steiner, B.; Meyer Reigner, S. C.; *Thromb. Haemostasis* **2004**, *91*, 733.
20. Fazio, S.; Linton, M. F.; *Curr. Opin. Pharmacol.* **2004**, *4*, 116.
21. O'Brien, J. J.; Ray, D. M.; Spinelli, S. L.; Blumberg, N.; Taubman, M. B.; Francis, C. W.; Wittlin, S. D.; Phipps, R. P.; *Prostaglandins Other Lipid Mediators* **2007**, *82*, 68.
22. Patrignani, P.; *Thromb. Res.* **2003**, *110*, 281.
23. Vane, J. R.; Botting, R. M.; *Thromb. Res.* **2003**, *110*, 255.
24. Ofosu, F. A.; Nyarko, K. A.; *Hematology Oncology Clinics North America* **2000**, *14*, 1185.
25. Monroe, D. M.; Hoffman, M.; Roberts, H. R.; *Arterioscler., Thromb., Vasc. Biol.* **2002**, *22*, 1381.
26. Faruqi, T. R.; Weiss, E. J.; Shapiro, M. J.; Huang, W.; Coughlin, S. R.; *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 19728.
27. Landis, R. C.; *Hematology Oncology Clinics North America* **2007**, *21*, 103.
28. Pham, A.; Wang, J.; *Archives of Pathology and Laboratory Medicine* **2007**, *131*, 1834.
29. Monteiro, R. Q.; *Tese de Doutorado*, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Brasil, 2001.
30. Solum, N. O.; *Arterioscler., Thromb., Vasc. Biol.* **1999**, *19*, 2841.
31. Esmon, C. T.; *Biochim. Biophys. Acta* **2000**, *1477*, 349.
32. Green, D.; *Hemodialysis International* **2006**, *10*, S2.
33. Coughlin, S. R.; *J. Thromb. Haemostasis* **2005**, *3*, 1800.
34. Nelsestuen, G. L.; *Trends in Cardiovascular Medicine* **2001**, *9*, 162.
35. Stafford, D. W.; *J. Thromb. Haemostasis* **2005**, *3*, 1873.
36. Gailani, D.; Rennè, T.; *J. Thromb. Haemostasis* **2007**, *5*, 1106.
37. Morrissey, J. H.; Macik, B. G.; Neuenschwander, P. F.; Comp, P. C.; *Blood* **1993**, *81*, 734.
38. Mann, K. G.; *Thromb. Haemostasis* **1999**, *82*, 165.
39. Ahmad, S. S.; Rawala-Sheikh, R.; Walsh, P. N.; *Thromb. Haemostasis* **1992**, *18*, 311.
40. Suzuki, K.; Dählback, B.; Stenflo, J.; *J. Biol. Chem.* **1982**, *257*, 6564.
41. Mosesson, M. W.; *Thromb. Hemostasis* **1998**, *24*, 169.
42. Bianchini, E. P.; Louvain, V. B.; Marque, P. E.; Juliano, M. A.; Juliano, L.; Bonnicie, B. F.; *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 20527.
43. De Candia, E.; De Cristofaro, R.; *J. Thrombosis Thrombolysis* **2003**, *15*, 151.
44. Furie, B.; Furie, B. C.; *New Eng. J. Med.* **1992**, *326*, 800.
45. <http://www.americanheart.org/>, acessada em Fevereiro 2009.
46. Jackson, S. P.; Schoenwaelder, S. M.; *Nat. Rev. Drug. Discovery* **2003**, *2*, 775.
47. Jackson, S. P.; *Blood* **2007**, *109*, 5087.
48. Mackman, N.; *Nature* **2008**, *45*, 914.
49. Ding, E. L.; Hutflless, S. M.; Ding, X.; Girotra, S.; *Nutrition Metabolism* **2006**, *3*, 1.

50. Mackay, J.; Mensah, G. A.; *The atlas of heart disease and stroke*, World Health Organization: Switzerland, 2002.
51. Rang, H. P.; Dale, M. M.; Ritter, J. M.; Moore, P. K.; *Farmacologia*, Elsevier Editora Ltda: São Paulo, 2004.
52. Horan, J. T.; Francis, C. W.; *Seminars in Thrombosis and Haemostasis* **2001**, *27*, 657.
53. Bick, R. L.; Fareed, J.; *Thromb. Haemostasis* **1997**, *3*, S1.
54. <http://www.qmc.ufsc.br/qmcweb/artigos/aspirina.html>, acessada em Fevereiro 2009.
55. Kimmey, M. B.; *Am. J. Medicine* **2004**, *117*, 72.
56. Vane, J. R.; *Nature New Biology* **1971**, *231*, 232.
57. Weisman, S. M.; Graham, D. Y.; *Archives of Internal Medicine* **2002**, *162*, 2197.
58. Ersoy, A.; Sevin, K.; Sevin, A.; Serel, E.; *J. Plastic Reconstructive & Aesthetic Surgery* **2007**, *60*, 861.
59. http://www.cadth.ca/media/pdf/ews6_cetap_e.pdf, acessada em Fevereiro 2009.
60. Korolkovas, A.; Burckhalter, J. H.; *Química Farmacêutica*, Guanabara dois: Rio de Janeiro, 1988.
61. Kelton, J. G.; Warkentin, T. E.; *Blood* **2008**, *112*, 2607.
62. Gray, E.; Mulloy, B.; Barrowcliffe, T. W.; *Thromb. Haemostasis* **2008**, *99*, 807.
63. Sadowski, W. J. A.; Suttie, J. W.; *Biochemistry* **1978**, *17*, 1371.
64. Donnan, G. A.; Dewey, H. M.; *Lancet* **2004**, *3*, 305.
65. Weinberg, A. C.; Lieskovsky, G.; Mcgehee, W. G.; *J. Urology* **1983**, *130*, 352.
66. Koh, H. L.; Chua, T. K.; *Mini-reviews in Medicinal Chemistry* **2006**, *6*, 611.
67. <http://www.lava.med.br/>, acessada em Fevereiro 2009.
68. Furtado, C.; *Análise da evolução da utilização dos anticoagulantes e antitrombóticos em Portugal Continental entre 1999 e 2003*, Instituto Nacional de Farmácia e do Medicamento (INFARMED) 2005, p. 1.
69. <http://www.nom-nos.dk/Medicinebook/medicines%20consumption.pdf>, acessada em Fevereiro 2009.
70. Hilbrich, L.; Truelsen, T.; Yusuf, S.; *International Journal of Stroke* **2007**, *2*, 104.
71. http://www.strokecenter.org/trials/index_drugs.aspx?type=1, acessada em Fevereiro 2009.
72. Beretz, A.; Cazenave, J-P.; *Planta Med.* **1991**, *57*, S68.
73. Guglielmone, H. A.; Agnese, A. M.; Montoya, S. C. N.; Cabrera, J. L.; *Thromb. Res.* **2005**, *115*, 495.
74. Carotenuto, A.; Feo, V.; Fattorusso, E.; Lanzotti, V.; Magnot, S.; Cicala, C.; *Phytochemistry* **1996**, *41*, 531.
75. Caratonuto, A.; Feo, V.; Fattorusso, E.; Lanzotti, V.; Magnot, S.; Cicala, C.; *Phytochemistry* **1997**, *44*, 949.
76. Harnafi, H.; Amrani, S.; *Pharmacognosy Reviews* **2007**, *1*, 1.
77. Grice, I. D.; Garhnam, B.; Pierens, G.; Rogers, K.; Tindal, D.; Griffiths, L. R.; *J. Ethnopharmacol.* **2003**, *86*, 123.
78. Lange, D. W.; Van Golde, P. H.; Scholman, W. L. G.; Kraaijenhagenb, R. J.; Akkerman, J. W. N.; Wiel, A.; *Eur. J. Internal Medicine* **2003**, *14*, 361.
79. Sheu, J. R.; Kan, Y. H.; Hung, W. C.; Su, C. H.; Lin, C. H.; Lee, Y. M.; Yen, M. H.; *Thromb. Res.* **1998**, *92*, 53.
80. Chang, F-R.; Wei, J-L.; Teng, C-M.; Wu, Y-C.; *Phytochemistry* **1998**, *49*, 2015.
81. Chia, Y-C.; Chen, K-S.; Chang, Y-L.; Teng, C-M.; Wu, Y-C.; *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1999**, *9*, 3295.
82. Li, L.; Shen, Y-M.; Yang, X-S.; Zuo, G-Y.; Shen, Z-Q.; Chen, Z-H.; Hao, X-J.; *Eur. J. Pharmacol.* **2002**, *449*, 23.
83. Kuo, R-Y.; Chang, F-R.; Chen, C-Y.; Teng, C-M.; Yen, H-F.; Wua, Y-C.; *Phytochemistry* **2001**, *57*, 421.
84. Teng, C. M.; Li, H. L.; Wu, T. S.; Huang, S. C.; Huang, T. F.; *Thromb. Res.* **1992**, *66*, 549.
85. Chia, Y-C.; Chang, F-R.; Wang, J-C.; Wu, C-C.; Chiang, M. Y-N.; Lan, Y-H.; Chen, K-S.; Wu, Y-H.; *Molecules* **2008**, *13*, 122.
86. Kovács, A.; Vasas, A.; Hohmann, J.; *Phytochemistry* **2008**, *69*, 1084.
87. Emerole, G.; Thabrew, M. I.; Anosa, V.; Okorie, D. A.; *Toxicology* **1981**, *20*, 71.
88. Kosuge, T.; Ishida, H.; Ishii, M.; *Chemical Pharmaceutical Bulletin (Tokyo)* **1985a**, *33*, 1496.
89. Kosuge, T.; Ishida, H.; *Chemical Pharmaceutical Bulletin (Tokyo)* **1985b**, *33*, 1503.
90. Francischetti, B.; Monteiro, R.; Mauricio, B.; Guimarães, J. A.; *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1997**, *235*, 259.
91. Newman, D. J.; Craig, G. M.; *J. Nat. Prod.* **2007**, *70*, 461.