

MILTON DAYRELL LUCAS FILHO

**ESTUDO FITOQUÍMICO DE ESPÉCIES DO GÊNERO**  
*Erythroxylum* **COM POTENCIAL ATIVIDADE**  
**VASODILATADORA E INIBIDORA DA ENZIMA**  
**CONVERSORA DE ANGIOTENSINA**

**Ouro Preto**

**Escola de Farmácia – UFOP**

**2009**

MILTON DAYRELL LUCAS FILHO

**ESTUDO FITOQUÍMICO DE ESPÉCIES DO GÊNERO**  
***Erythroxylum* COM POTENCIAL ATIVIDADE**  
**VASODILATADORA E INIBIDORA DA ENZIMA**  
**CONVERSORA DE ANGIOTENSINA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Ouro Preto, como requisito parcial à obtenção do título de mestre em Ciências Farmacêuticas.

**Orientadora:** Carla Penido Serra, Escola de Farmácia, UFOP

**Co-orientador:** Fernão Castro Braga, Faculdade de Farmácia, UFMG

**Ouro Preto**

**Escola de Farmácia – UFOP**

**2009**

L933e

Lucas Filho, Milton Dayrell.

Estudo fitoquímico de espécies do gênero *Erythroxylum* com potencial atividade vasodilatadora e inibidora da enzima conversora de angiotensina [manuscrito] / Milton Dayrell Lucas Filho. – 2009.

xxi, 118 f.: il. color.,grafs., tabs.

Orientadora: Profa. Dra. Carla Penido Serra.

Co-orientador: Prof. Dr. Fernão Castro Braga.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Ouro Preto. Escola de Farmácia. Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas.

Área de concentração: Fármacos e Medicamentos

1. Eritróxito - Teses. 2. Enzima conversora de angiotensina - Teses.  
3. Hipertensão - Teses. I. Universidade Federal de Ouro Preto. II. Título.

CDU: 615.224

**Linha de Pesquisa:** Química e Farmacologia de Substâncias Bioativas

**Área de concentração:** Fármacos e Medicamentos

**Áreas de conhecimento:**

- 1) Farmacognosia/Fitoquímica
- 2) Química de Produtos Naturais
- 3) Farmacologia

**Locais de realização:**

- 1) Laboratório de Fitoquímica, Departamento de Produtos Farmacêuticos, Faculdade de Farmácia, UFMG.
- 2) Laboratório Farmacologia Experimental, Departamento de Farmácia, Escola de Farmácia, UFOP.

**Órgãos financiadores:**

- Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)
- Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)

## AGRADECIMENTOS

Aos professores Carla Penido Serra e Fernão Castro Braga pela oportunidade de trabalho, apoio e incentivo durante a realização desse trabalho. Vocês são exemplos de competência e sabedoria.

À amiga e companheira de trabalho Cristiana de Souza Bastos.

Ao professor Maurício de Abreu e Silva por ter cedido seu laboratório e equipamentos durante a fase inicial do trabalho.

Ao professor João Renato e Luciana Kamino pela coleta e identificação das espécies.

Ao professor Steyner Côrtes pela realização dos ensaios de atividade vasodilatadora.

Ao professor José Dias pela obtenção dos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ .

À Dra Vany Ferraz pela realização do ensaio em cromatografia gasosa.

A todos os meus professores de graduação que tanto contribuíram para minha formação acadêmica. Em especial às professoras Dênia Antunes, Jacqueline de Souza, Andrea Grabe e Neila Barcelos pelas incontáveis caronas.

À minha mãe pelo amor e incentivo incondicionais.

Aos meus inesquecíveis amigos do laboratório de Fitoquímica: Patrícia, Raquel Isidório, Priscilla, Celinho, Eliana, Cristiane, Fabíola, Ana Bárbara, Suzan, Leandro, Jussara, Thaís, Soninha, Thalisson, Ritinha, Glauber, Priscila, Fabiana, Mariana, pelas valiosas contribuições, pela amizade e por me proporcionarem momentos de muita diversão. Sem vocês eu não teria conseguido.

Aos amigos Antônio, Tanare, Cíntia e Wendell por terem me ouvido nos momentos em que tudo parecia impossível.

Aos amigos do laboratório de Farmacologia Experimental.

A meus colegas de mestrado e companheiros de luta, em especial à Betânia, por ter compartilhado cada momento dessa dissertação.

A todos aqueles que contribuíram para que esse trabalho pudesse ser realizado.

**Muito Obrigado a todos vocês!**

## RESUMO

O gênero *Erythroxylum* (Erythroxylaceae) compreende espécies de porte arbustivo ou arbóreo, distribuídas em regiões tropicais e subtropicais da América do Sul, África, Sudeste Asiático e Austrália. O Brasil é considerado um dos centros de diversidade e endemismo de *Erythroxylum* e um total de 114 espécies ocorrem no país, dentre as 187 espécies descritas na América tropical. A atividade inibidora da enzima conversora de angiotensina (ECA) foi relatada para as folhas das espécies *E. suberosum*, *E. tortuosum* e *E. gonocladum* em um trabalho recente de nosso grupo. O presente trabalho teve por objetivo avaliar a potencial atividade anti-hipertensiva dessas espécies utilizando modelos *in vitro* e isolar os constituintes majoritários das frações ativas. Os extratos de folhas das três espécies foram preparados por percolação exaustiva com etanol a 96% e apresentaram atividade vasodilatadora, dependente de óxido nítrico, em anéis de aorta de ratos pré-contraídos com fenilefrina, com valores de  $CI_{50}$  de  $0,96 \pm 0,30$ ;  $0,48 \pm 0,12$  e  $0,45 \pm 0,20$   $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente para *E. suberosum*, *E. tortuosum* e *E. gonocladum*. Esses resultados indicam que a vasodilatação induzida pelos extratos é promovida pelo aumento da biodisponibilidade de NO. O extrato etanólico de *E. gonocladum* foi fracionado empregando técnicas cromatográficas (coluna de sílica gel, RP-HPLC preparativo) e/ou partição entre solventes imiscíveis, resultando no isolamento de três sólidos denominados PptEG-produto, HexEG 3C e HexEG 9A. A elucidação estrutural foi feita a partir de dados espectrais (RMN de  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$  mono e bidimensionais, UV, IV e Dicroísmo Circular), além de análises por cromatografia em fase gasosa, e permitiram identificar os constituintes como sendo diidroquercetina-3-O- $\alpha$ -ramnosídeo (astilbina),  $\beta$ -sitosterol e uma mistura de ácidos graxos (ácidos palmítico, esteárico e linolênico). A astilbina não apresentou atividade vasodilatadora em ensaio *in vitro* com anel de aorta de ratos pré-contraídos com fenilefrina; porém, induziu significativa inibição da ECA *in vitro*, com  $CI_{50}$  de  $1,2 \pm 0,7$   $\mu\text{g/mL}$ . Esse resultado demonstra a potencial atividade anti-hipertensiva de *E. gonocladum*, via inibição da ECA, e indica a astilbina como uma das substâncias bioativas da espécie.

## ABSTRACT

The genus *Erythroxylum* (Erythroxylaceae) encompasses shrub and tree species distributed in tropical and subtropical regions of South America, Africa, Southeast Asia and Australia. Brazil is considered to be one of the centers of diversity and endemism of *Erythroxylum* and 114 out of 187 species described in tropical America occur in the country. A recent work of our group described the angiotensin-converting enzyme (ACE) inhibitory activity for the leaf extracts of *E. suberosum*, *E. tortuosum* and *E. gonocladum*. The goal of the present study was to evaluate the potential anti-hypertensive activity of these species using *in vitro* models and to isolate the main constituents of active fractions. Extracts from the leaves of each species were prepared by exhaustive percolation with ethanol 96%. They showed significant NO-dependent vasodilator effect in rat aortic rings pre-contract with phenylephrine, with  $IC_{50}$  values of  $0.96 \pm 0.30$ ;  $0.48 \pm 0.12$  and  $0.45 \pm 0.20$   $\mu\text{g/ml}$ , respectively for *E. suberosum*, *E. tortuosum* and *E. gonocladum*. These results suggest that the vasodilatation induced by the extracts is promoted by increasing NO bioavailability. The extract of *E. gonocladum* was subjected to fractionation by chromatography (silica gel column, preparative RP-HPLC) and/or partition between immiscible solvents, resulting in the isolation of three solids named PptEG-produto, HexEG 3C and HexEG 9A. Structure elucidation was accomplished by spectral data (mono and bidimensional  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR, UV, IR and Circular Dicroism) and GC analysis, which allowed identifying the solids as dihydroquercetin-3-*O*- $\alpha$ -ramnoside (astilbin),  $\beta$ -sitosterol and a fatty acids mixture (palmitic, stearic and linolenic acids). Astilbin presented no vasodilator effect on rat aortic ring pre-contracted with phenylephrine, but induced significant *in vitro* ACE inhibition ( $IC_{50} = 1.2 \pm 0.7$   $\mu\text{g/ml}$ ). This result demonstrates the potential anti-hypertensive activity of *E. gonocladum* extract as ACE inhibitor and points out astilbin as one of the bioactive compounds of the specie.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** (A) Visão clássica do sistema renina-angiotensina. ECA = enzima conversora de angiotensina; Ang I = angiotensina I; Ang II = angiotensina II; AT1 = receptor de angiotensina tipo 1. (B) Recentes descobertas do sistema renina-angiotensina. Ang III = angiotensina III; Ang IV = angiotensina IV; ECA-2 = isoforma 2 da enzima conversora de angiotensina; Ang 1-9 = angiotensina 1-9; Ang 1-7 = angiotensina 1-7; AMPA = aminopeptidase A; AMPM = aminopeptidase M; MAS = receptor oncogênico MAS para angiotensina 1-7; AT2 = receptor de angiotensina tipo 2; IRAP = aminopeptidase regulada por insulina (BURREL et al., 2004; FYHRQUIST; SAIJONMAA, 2008). ---  
-----11
- Figura 2.** (A) Interação do captopril com o sítio ativo da ECA. O átomo de enxofre terminal se liga ao íon zinco presente no sítio ativo da enzima e a inativa. S<sub>1</sub>, S<sub>1</sub>' e S<sub>2</sub>' representam subsítios (ou bolsas) de interação presentes no sítio ativo da enzima (PEARLMAN; SMITH, 1998). (B) Estrutura de um flavonóide demonstrando o possível mecanismo de interação com o átomo de zinco no sítio ativo da enzima, o que explicaria a atividade inibidora da ECA observada para diversos flavonóides (ELBL; WAGNER, 1991). -----14
- Figura 3.** Espécies do gênero *Erythroxylum* selecionadas para estudo. -----20
- Figura 4.** Fluxograma do fracionamento preliminar dos extratos etanólicos de *Erythroxylum* por partição entre solventes imiscíveis. -----33
- Figura 5.** Curva concentração-resposta para os extratos de espécies de *Erythroxylum* em anéis de aorta de rato pré-contraídos com fenilefrina. Cada ponto representa a média ± EPM de 4 replicatas. (A) *E. suberosum*, (B) *E. tortuosum* e (C) *E. gonocladum*. -----59
- Figura 6.** CI<sub>50</sub> da vasorelaxação induzida em anéis de aorta de rato pré-contraídos com fenilefrina dos extratos etanólicos de *E. suberosum* (EES), *E. tortuosum* (EET) e *E. gonocladum* (EEG). -----59
- Figura 7.** Perfis cromatográficos obtidos por RP-HPLC para os extratos etanólicos de espécies de *Erythroxylum* e espectros no UV obtidos *on line* para os picos majoritários de cada extrato (T<sub>R</sub>, tempo de retenção). (A) *E. suberosum*, (B) *E. tortuosum* e (C) *E. gonocladum*. Condições cromatográficas descritas na Parte Experimental, item 2.7. -----60
- Figura 8.** Cromatogramas obtidos por CCD de sílica gel para os extratos etanólicos de *Erythroxylum*. Eluente: acetato de etila / ácido fórmico / ácido acético / água (80:9:9:22). Revelador para heterosídeos flavônicos: NP/ PEG. Ru = rutina (substância de referência); Es = *E. suberosum*; Et = *E. tortuosum*; Eg = *E. gonocladum*. (A) visível e (B) UV<sub>365</sub> nm. -----61
- Figura 9.** Perfis cromatográficos obtidos por RP-HPLC para as frações resultantes da partição do extrato etanólico de *E. suberosum* entre solventes imiscíveis. (A) Ppt1-ES (precipitado 1), (B) Ppt2-ES (precipitado 2), (C) Hex-ES (fração *n*-hexânica), (D) DCM-ES (fração diclorometânica), (E) EM-ES (emulsão), (F) AC-ES (fração em acetato de etila), (G) AQ-ES (fração hidroalcoólica). As setas indicam a presença do constituinte majoritário (T<sub>R</sub> = 12,7 min) na fração. Condições cromatográficas: vide parte experimental, item 2.7. -----64
- Figura 10.** Perfis cromatográficos obtidos por RP-HPLC para as frações resultantes da partição do extrato etanólico de *E. tortuosum*: (A) Hex-ET (fração *n*-hexânica), (B) DCM-ET (fração diclorometânica), (C) EM-ET (emulsão), (D) AC-ET (fração em acetato de etila), (E) AQ-ET (fração hidroalcoólica). As setas indicam a presença do constituinte majoritário na fração (T<sub>R</sub> = 12,6 min). Condições cromatográficas: vide parte experimental, item 2.7. -----65



**Figura 11.** Perfis cromatográficos obtidos por RP-HPLC para as frações resultantes da partição do extrato etanólico de *E. gonocladum*: (A) Ppt-EG (precipitado), (B) Hex-EG (fração *n*-hexânica), (C) DCM-EG (fração diclorometânica), (D) AC-EG (fração em acetato de etila), (E) AQ-EG (fração hidroalcoólica). As setas indicam a presença do constituinte majoritário na fração. Condições cromatográficas: vide parte experimental, item 2.7. -----65

**Figura 12.** Fundamento químico do ensaio colorimétrico *in vitro* de inibição da ECA. Hip-Gly-Gly (hipuril-glicil-glicina) = substrato; TNP-Gly-Gly (2,4,6-trinitrofenol-glicil-glicina) = produto. Detecção em 415 nm (SERRA et al., 2005). -----66

**Figura 13.** Atividade inibidora da ECA *in vitro* para as frações resultantes da partição do extrato etanólico de *E. suberosum*: Hex-ES (fração *n*-hexânica), DCM-ES (fração diclorometânica), AC-ES (fração em acetato de etila), AQ-ES (fração hidroalcoólica), Ppt1-ES (precipitado 1), Ppt2-ES (precipitado 2), EM-ES (emulsão). -----68

**Figura 14.** Atividade inibidora da ECA *in vitro* para as frações resultantes da partição do extrato etanólico de *E. tortuosum*: Hex-ET (fração *n*-hexânica), DCM-ET (fração diclorometânica), AC-ET (fração em acetato de etila), AQ-ET (fração hidroalcoólica), EM-ET (emulsão). -----68

**Figura 15.** Atividade inibidora da ECA *in vitro* para as frações resultantes da partição do extrato etanólico de *E. gonocladum*: Hex-EG (fração *n*-hexânica), DCM-EG (fração diclorometânica), AC-EG (fração em acetato de etila), AQ-EG (fração hidroalcoólica), Ppt-EG (precipitado). -----69

**Figura 16.** Refracionamento da fração Ppt-EG de *E. gonocladum* e isolamento da substância Ppt-EG-produto. (...) representam as frações que foram omitidas para simplificação do fluxograma. Condições experimentais descritas na Parte Experimental, item 2.8.1. -----70

**Figura 17.** Perfis cromatográficos obtido por RP-HPLC e espectro no UV obtido *on line* para (A) fração PptEG e (B) substância isolada (PptEG-produto). Condições cromatográficas descritas na Parte Experimental, item 2.7. -----71

**Figura 18.** Refracionamento da fração *n*-hexânica (Hex-EG) de *E. gonocladum* e isolamento das substâncias HexEG 9A e HexEG 3C. (...) representam as frações que foram omitidas para simplificação do fluxograma. Condições experimentais: Parte Experimental, item 2.8.2. -----71

**Figura 19.** Perfis cromatográficos obtidos por RP-HPLC e espectros no UV obtidos *on line* para (A) fração *n*-hexânica (HexEG), (B) HexEG 3C (pico 1) e (C) HexEG 9A (pico 3). Condições cromatográficas descritas na Parte Experimental, item 2.7. -----72

**Figura 20.** Espectro no infravermelho obtido para PptEG-produto. -----74

**Figura 21.** Espectro no ultravioleta de PptEG-produto (1,0 mg em 100 mL MeOH). -----75

**Figura 22.** Estrutura proposta a partir dos dados espectrais de UV. -----76

**Figura 23.** Cromatograma obtido para produto da micro-hidrólise de PptEG-produto em placa de sílica gel. Eluente: clorofórmio/ metanol/ água (70:30:4). Revelador: anisaldeído. Ram = ramnose, Fuc = fucose; PptEG-produto hidrolisado foi aplicado em duplicata. -----77

**Figura 24.** Numeração dos átomos de carbono de PptEG-produto adotada na discussão dos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$ . -----77

**Figura 25.** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  obtido para PptEG-produto (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD} + \text{D}_2\text{O}$ ). -----78

<b>Figura 26.</b> Expansão do espectro de RMN de $^1\text{H}$ obtido para PptEG-produto (400 MHz, $\text{CD}_3\text{OD} + \text{D}_2\text{O}$ ). -----	79
<b>Figura 27.</b> Mapa de contornos COSY obtido para PptEG-produto (400 MHz, $\text{CD}_3\text{OD} + \text{D}_2\text{O}$ ). -----	81
<b>Figura 28.</b> Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ e subespectro DEPT-135 obtidos para PptEG-produto (100 MHz, $\text{CD}_3\text{OD} + \text{D}_2\text{O}$ ). -----	82
<b>Figura 29.</b> Mapa de contornos HSQC obtido para PptEG-produto. -----	83
<b>Figura 30.</b> Mapa de contornos HSQC-TOCSY obtido para PptEG-produto. -----	83
<b>Figura 31.</b> Mapa de contornos HMBC obtido para PptEG-produto. -----	84
<b>Figura 32.</b> (A) Estrutura química da diidroquercetina-3- <i>O</i> - $\alpha$ -ramnosídeo. (B) Representação da estereoquímica relativa em programa <i>ACD-Labs 4.0</i> , demonstrando o acoplamento <i>trans</i> -diaxial entre H-2 e H-3 (indicado pelas setas vermelhas). -----	87
<b>Figura 33.</b> Espectro de dicroísmo circular obtido para a substância PptEG-produto (dados obtidos em MeOH, a 25°C, na concentração de 0,125 mg/mL). -----	88
<b>Figura 34.</b> Perfil em CCD de sílica gel para a substância HexEG 9A isolada da fração <i>n</i> -hexânica de <i>E. gonocladum</i> em coluna de sílica gel. Eluente: <i>n</i> -hexano/ diclorometano (9:1). (A) revelador para triterpenos e esteróides (Lieberman-burchard), (B) revelador geral (anisaldeído). -----	89
<b>Figura 35.</b> Espectro de RMN de $^1\text{H}$ obtido para HexEG 9A (400 MHz, $\text{CDCl}_3$ ). -----	90
<b>Figura 36.</b> Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ obtido para HexEG 9A (100 MHz, $\text{CDCl}_3$ ). -----	91
<b>Figura 37.</b> Expansão do espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ obtido para HexEG 9A (100 MHz, $\text{CDCl}_3$ ). -----	91
<b>Figura 38.</b> Subespectro DEPT-135 obtido para HexEG 9A (100 MHz, $\text{CDCl}_3$ ). -----	92
<b>Figura 39.</b> Expansão do subespectro DEPT-135 obtido para HexEG 9A (100 MHz, $\text{CDCl}_3$ ). -----	92
<b>Figura 40.</b> Cromatograma obtido por CG-FID para HexEG 9A. <b>Pico 1</b> = ácido palmítico, <b>Pico 2</b> = ácido esteárico, <b>Pico 3</b> = ácido linolênico, <b>Pico 4</b> = não identificado. Condições cromatográficas descritas no item 2.9.5, Parte Experimental. -----	93
<b>Figura 41.</b> Perfil em CCD de sílica gel obtido para a substância HexEG 3C, isolada da fração <i>n</i> -hexânica de <i>E. gonocladum</i> . Eluente: <i>n</i> -hexano/ acetato de etila (9:1). Revelador: anisaldeído. B-sit = $\beta$ -sitosterol, Ac. Bet = ácido betulínico. -----	94
<b>Figura 42.</b> Numeração para os átomos de carbono de HexEG 3C adotada na discussão dos espectros de RMN de $^1\text{H}$ e de $^{13}\text{C}$ . -----	95
<b>Figura 43.</b> Espectro de RMN de $^1\text{H}$ obtido para HexEG 3C (400 MHz, $\text{CDCl}_3$ ). -----	96
<b>Figura 44.</b> Expansão do Espectro de RMN de $^1\text{H}$ obtido para HexEG 3C (400 MHz, $\text{CDCl}_3$ ). -----	97
<b>Figura 45.</b> Expansão do Espectro de RMN de $^1\text{H}$ obtido para HexEG 3C (400 MHz, $\text{CDCl}_3$ ). -----	97
<b>Figura 46.</b> Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ obtido para HexEG 3C (100 MHz, $\text{CDCl}_3$ ). -----	98
<b>Figura 47.</b> Subespectro DEPT-135 obtido para HexEG 3C (100 MHz, $\text{CDCl}_3$ ). -----	98

**Figura 48.** Atividade inibidora da ECA da astilbina (10  $\mu\text{mol/L}$ ), em diferentes tempos de incubação com a enzima. Cada barra representa a média  $\pm$  EPM de 6 replicatas. Captopril (10  $\mu\text{mol/L}$ ) foi empregado como controle positivo (tempo de incubação = 60 min). \*\*\* Significativamente distintos ( $p < 0,001$ ), comparados com o controle negativo (salina). Letras diferentes nas barras indicam diferenças estatisticamente significativas entre as médias, segundo teste de comparação de médias Newman-Keuls ( $p < 0,05$ ). -----102

**Figura 49.** Curva concentração-resposta do efeito inibidor da ECA induzido pela astilbina. Cada barra representa a média  $\pm$  EPM de 3 replicatas. A astilbina foi incubada por 15 min e o captopril foi incubado por 60 min. \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$  para valores significativamente distintos, quando comparados os efeitos das diferentes concentrações de astilbina com o controle negativo (salina). Letras diferentes nas barras indicam diferenças estatisticamente significativas entre as médias, segundo teste de comparação de médias Newman-Keuls ( $p < 0,05$ ). -----102

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Dados da coleta das espécies do gênero <i>Erythroxylum</i> selecionadas para o estudo. -----	28
<b>Tabela 2.</b> Rendimento dos extratos etanólicos brutos das espécies de <i>Erythroxylum</i> .-----	28
<b>Tabela 3.</b> Frações de <i>E. suberosum</i> obtidas da partição entre solventes imiscíveis. -----	34
<b>Tabela 4.</b> Frações de <i>E. tortuosum</i> obtidas da partição entre solventes imiscíveis. -----	35
<b>Tabela 5.</b> Frações de <i>E. gonocladum</i> obtidas da partição entre solventes imiscíveis. -----	35
<b>Tabela 6.</b> Gradiente de eluição empregado na obtenção de perfis cromatográficos por RP-HPLC. ---	36
<b>Tabela 7.</b> Frações de <i>E. gonocladum</i> (20,0 g) obtidas da partição entre solventes imiscíveis. -----	37
<b>Tabela 8.</b> Refracionamento de PptEG (3,0 g) em coluna de sílica gel. -----	38
<b>Tabela 9.</b> Refracionamento de PptEG 34-39A (700,0 mg) em coluna de sílica gel. -----	39
<b>Tabela 10.</b> Refracionamento da fração PptEG 14-18B (225,0 mg) em RP-HPLC preparativo. -----	39
<b>Tabela 11.</b> Refracionamento da fração PptEG 4C (92,0 mg) em RP-HPLC preparativo. -----	40
<b>Tabela 12.</b> Refracionamento da fração PptEG 2D (22,0 mg) em RP-HPLC preparativo. -----	40
<b>Tabela 13.</b> Refracionamento da fração HexEG (2,08 g) em coluna de sílica gel. -----	41
<b>Tabela 14.</b> Refracionamento de HexEG 17-24A (43,5 mg) em coluna de sílica gel. -----	43
<b>Tabela 15.</b> Refracionamento de HexEG 41-64B (31,8 mg) em coluna de sílica gel. -----	44
<b>Tabela 16.</b> Avaliação qualitativa de metabólitos secundários em espécies de <i>Erythroxylum</i> por CCD de sílica gel. -----	62
<b>Tabela 17.</b> Atribuição dos sinais do espectro de RMN de $^1\text{H}$ para PptEG-produto e comparação com dados da literatura para a astilbina. -----	80
<b>Tabela 18.</b> Correlações heteronucleares carbono-hidrogênio observadas no mapa de contornos HSQC para PptEG-produto. -----	84
<b>Tabela 19.</b> Correlações heteronucleares $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ de longa distância observadas no mapa de contornos HMBC ( $^{2,3,4}J_{\text{C-H}}$ ) obtido para PpEG-produto. -----	85
<b>Tabela 20.</b> Atribuição dos sinais do espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ obtido para PptEG-produto e dados da literatura para a astilbina. -----	86
<b>Tabela 21.</b> Dados do espectro de dicroísmo circular obtidos para PptEG-produto. -----	88
<b>Tabela 22.</b> Atribuição dos sinais do espectro de RMN $^1\text{H}$ para HexEG 3C e dados relatados na literatura para o $\beta$ -sitosterol. -----	96
<b>Tabela 23.</b> Atribuição dos sinais do espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ para HexEG 3C e comparação com dados da literatura para o $\beta$ -sitosterol. -----	99

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

AAS	Ácido acetil-salicílico
AMPA	Aminopectidase A
AMPM	Aminopectidase M
Ang I	Angiotensina I
Ang II	Angiotensina II
Ang III	Angiotensina III
Ang IV	Angiotensina IV
Ang 1-7	Angiotensina 1-7
Ang 1-9	Angiotensina 1-9
AT1	Receptor de angiotensina tipo 1
AT2	Receptor de angiotensina tipo 2
AT4	Receptor de angiotensina tipo 4
AT1-7	Receptor de angiotensina tipo 1-7
AVC	Acidente vascular cerebral
°C	Graus Celsius
CCD	Cromatografia em camada delgada
CCR	Curva concentração resposta
CCS	Cromatografia em coluna de sílica
CG	Cromatografia gasosa
CI <sub>50</sub>	Concentração inibitória 50%
cm	Centímetros
COSY	<i>Correlation Spectroscopy</i>
d.i.	Diâmetro interno
$\delta$	Deslocamento químico
DAG	Diacilglicerol
DCM	Diclorometano
DEPT	<i>Distortionless enhancement by polarization transfer</i>
DMSO-d <sub>6</sub>	Dimetilsulfóxido deuterado
D <sub>2</sub> O	Água deuterada
ECA	Enzima conversora de angiotensina

ECA-2	Enzima conversora de angiotensina tipo 2
EDHF	Fator hiperpolatizante derivado do endotélio
EDRF	Fator de relaxamento derivado de endotélio
eNOS	Óxido nítrico sintase endotelial
EM	Espectrometria de massas
EtOAc	Acetato de etila
g	Gramas
GMPc	Monofosfato de guanosina cíclico
GTP	Trifosfato de guanosina
HA	Hipertensão arterial
Hex	<i>n</i> -Hexano
HMBC	<i>Heteronuclear correlation through multiple quantum coherence</i>
HPLC	High Performance Liquid Chromatography (cromatografia líquida de alta eficiência)
HSQC	<i>Heteronuclear single bond coherence</i>
Hex	Hexano
Hz	Hertz
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
ICC	Insuficiência cardíaca congestiva
IP <sub>3</sub>	Inositol trifosfato
IRAP	Aminopectidase regulada por insulina
IV	Infravermelho
<i>J</i>	Constante de acoplamento escalar
$\lambda$	Comprimento de onda
$\lambda_{\text{max}}$	Comprimento de onda máximo
L	Litros
L-NAME	Metil éster de N- $\omega$ -nítro-L-arginina
MeOH	Metanol
mg	Miligramas
MAS	Receptor oncogênico MAS para angiotensina
MHz	Megahertz
min	Minutos
mL	Mililitros

mm	Milímetros
mmHG	Milímetros de mercúrio
µg	Microgramas
µL	Microlitros
nm	Nanômetros
NO	Óxido nítrico
NOS	Óxido nítrico sintase
nNOS	Óxido nítrico sintase neuronal
NP	Reagente para produtos naturais
OMS	Organização Mundial de Saúde
PA	Pressão arterial
PEG	Polietilenoglicol
PGI <sub>2</sub>	Prostaciclina
p/v	Peso por volume
ppm	Unidade de deslocamento químico
Rf	Fator de retenção
RMN <sup>13</sup> C	Ressonância magnética nuclear de carbono 13
RMN <sup>1</sup> H	Ressonância magnética nuclear de hidrogênio
ROS	Espécies reativas de oxigênio
RP	Fase reversa
rpm	Rotações por minuto
SRA	Sistema renina-angiotensina
SUS	Sistema Único de Saúde
TMS	Tetrametilsilano
TNBS	Ácido trinitro-benzenosulfônico
T <sub>R</sub>	Tempo de retenção
UV	Ultravioleta
v/v	Volume por volume

## LISTA DE ESTRUTURAS QUÍMICAS

		<b>Página</b>
1	Ácido salicílico -----	02
2	Ácido acetilsalicílico (AAS) -----	02
3	Morfina -----	02
4	Vimblastina -----	03
5	Vincristina -----	03
6	Paclitaxel -----	03
7	Reserpina -----	04
8	Captopril -----	14
9	Tripeptídeo Phe-Ala-Pro -----	14
10	Vitexina -----	15
11	Isovitexina -----	15
12	(+) Catequina -----	15
13	Isoquercetina -----	15
14	Orientina -----	15
15	Isoorientina -----	15
16	(-) Epicatequina -----	16
17	Quercetina-3-O- $\alpha$ -(6-cafeoilglicosil- $\beta$ -1,2-ramnosídeo) -----	16
18	Quercetina-3-O- $\alpha$ -(6-p-cumarilglicosil- $\beta$ -1,2-ramnosídeo) --	16
19	Isoramnetina-3- $\beta$ -glicopiranosídeo -----	16
20	Quercetina-3- $\beta$ -glicopiranosídeo -----	16
21	Canferol-3- $\alpha$ -arabinopiranosídeo -----	16
22	Apigenina -----	16
23	Canferol-3-O- $\alpha$ -arabinopiranosídeo -----	16
24	Canferol-3-O- $\beta$ -galactopiranosídeo -----	16
25	Quercetina-3-O- $\alpha$ -arabinopiranosídeo -----	16
26	Luteolina-7-O- $\beta$ -glicopiranosídeo -----	16
27	Proantocianidina B2 -----	17
28	Proantocianidina C1 -----	17
29	Cafeato de etila -----	17
30	Ácido rosmarínico -----	17
31	Rosmarinato de metila -----	17



32	Sulfóxido $\gamma$ -L-glutamil-(+)-S-alil-L-cisteína -----	18
33	Tripeptídeo Gly-Pro-Pro -----	18
34	Tripeptídeo Gly-Glu-Pro -----	18
35	Florofucofuroecol -----	19
36	Diecol -----	19
37	Ecol -----	19
38	Taxifolina -----	22
39	Fisetina -----	22
40	Luteolina -----	22
41	Eridictiol -----	22
42	Canferol -----	22
43	Quercetina -----	22
44	Ombuína -----	22
45	(+) Catequina 3-O-alfa-L-ramnosídeo -----	22
46	$\beta$ -amirina -----	23
47	Lupeol -----	23
48	$\beta$ -sitosterol -----	23
49	Palmitato/estearato de eritrodíol -----	23
50	Palmitato do ácido oleanólico -----	23
51	Palmitato de $\beta$ -amirina -----	23
52	Palmitato de 3 $\beta$ -hidroxi-11-oxo-olean-12-enila -----	23
53	Palmitato de 3 $\beta$ ,11 $\beta$ -diidroxi-olean-12-enila -----	23
54	Palmitato de 3 $\beta$ ,28-diidroxi-olean-12-enila (eritrodíol) -----	23
55	Palmitato de 3 $\beta$ -hidroxi-11,12-epoxi-olean-14-enila --	23
56	Astilbina -----	73
57	Neoastilbina -----	73
58	Isoastilbina -----	73
59	Neoisostilbina -----	73
60	Fucose -----	77
61	Ramnose -----	77
62	Ácido palmítico -----	93
63	Ácido esteárico -----	93
64	Ácido linolênico -----	93

## SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS -----	VIII
LISTA DE TABELAS -----	XII
LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS -----	XIII
LISTA DE ESTRUTURAS QUÍMICAS -----	XVI

### CAPÍTULO 1: INTRODUÇÃO

1.1 HISTÓRICO DO USO DE PRODUTOS NATURAIS -----	02
1.2 OBJETIVOS -----	05
1.2.1 Objetivo geral -----	05
1.2.2 Objetivos específicos -----	05
1.3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA -----	06
1.3.1 Hipertensão arterial e seu impacto para a saúde coletiva -----	06
1.3.2 Tratamento farmacológico da hipertensão arterial -----	07
1.3.3 Sistemas fisiológicos de controle da pressão arterial -----	07
1.3.3.1 Sistema renina angiotensina (SRA) -----	08
1.3.3.2 Via do óxido nítrico -----	11
1.3.4 Produtos naturais com atividade inibidora de ECA -----	13
1.3.5 O gênero <i>Erythroxyllum</i> -----	19

### CAPÍTULO 2: PARTE EXPERIMENTAL

2.1 EQUIPAMENTOS, REAGENTES E MATERIAIS DE CONSUMO -----	25
2.1.1 Equipamentos -----	25
2.1.2 Reagentes e materiais de consumo -----	26
2.2 MATERIAL VEGETAL -----	27
2.3 OBTENÇÃO DOS EXTRATOS ETANÓLICOS -----	28
2.4 REVELADORES PARA CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA -----	29
2.4.1 Anisaldeído sulfúrico -----	29
2.4.2 Reagente de dragendorff -----	29
2.4.3 Reagente para produtos naturais (NP/PEG) -----	29
2.4.4 Hidróxido de potássio 5% -----	29
2.4.5 Reagente de Liebermann-Burchard -----	29

2.4.6 Cloreto férrico 2% -----	30
2.4.7 Ferrocianeto de potássio 1% -----	30
2.4.8 Reagente de Kedde -----	30
2.4.9 Ácido sulfúrico a 50% -----	30
2.5 ANÁLISE FITOQUÍMICA DOS EXTRATOS -----	30
2.5.1 Caracterização de taninos e polifenóis -----	30
2.5.2 Caracterização de heterosídeos flavônicos -----	31
2.5.3 Caracterização de agliconas flavônicas -----	31
2.5.4 Caracterização de heterosídeos antraquinônicos -----	31
2.5.5 Caracterização de agliconas antraquinônicas -----	31
2.5.6 Caracterização de triterpenos e esteróides -----	32
2.5.7 Caracterização de cumarinas -----	32
2.5.8 Caracterização de saponinas -----	32
2.5.9 Caracterização de heterosídeos cardiotônicos -----	32
2.5.10 Caracterização de alcalóides -----	32
2.5.11 Caracterização de proantocianidinas -----	33
2.6 FRACIONAMENTO PRELIMINAR DOS EXTRATOS -----	33
2.7 OBTENÇÃO DOS PERFIS CROMATOGRÁFICOS POR RP-HPLC -----	35
2.7.1 Preparo das amostras -----	35
2.7.2 Condições cromatográficas -----	36
2.8 FRACIONAMENTO DO EXTRATO ETANÓLICO DE <i>E. gonocladum</i> -----	36
2.8.1 Refracionamento de Ppt-EG -----	37
2.8.2 Refracionamento de Hex-EG -----	41
2.8.2.1 Refracionamento de HexEG 17-24A -----	43
2.8.3 Refracionamento de AC-EG -----	44
2.9 ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL DAS SUBSTÂNCIAS ISOLADAS -----	44
2.9.1 Espectroscopia no ultravioleta para elucidação estrutural de flavonóides -----	44
2.9.1.1 Aditivos empregados no ensaio -----	44
2.9.1.2 Obtenção dos espectros em UV -----	45
2.9.2 Ressonância Magnética Nuclear (RMN) -----	46
2.9.3 Infravermelho (IV) -----	46
2.9.4 Micro-hidrólise em placa cromatográfica de sílica gel -----	46
2.9.5 Análise por cromatografia gasosa (CG) -----	47
2.9.6 Dicroísmo circular -----	47

2.10 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE INIBIDORA DA ECA POR ENSAIO COLORIMÉTRICO -----	48
2.10.1 Soluções utilizadas no ensaio -----	48
2.10.1.1 Tampão fosfato pH 8,3 (50 mmol/L) -----	48
2.10.1.2 Solução de hipuril-glicil-glicina (Hip-gly-gly) (100 mmol/L) -----	48
2.10.1.3 Solução de ácido picrilsulfônico (TNBS) (69,24 mmol/L) -----	48
2.10.1.4 Tampão HEPES-NaCl pH 8,15 -----	48
2.10.1.5 Solução de captopril (64 mmol/L) -----	48
2.10.1.6 Tampão HEPES-NaCl pH 8,0 -----	49
2.10.1.7 Solução de ácido sulfúrico (0,33 mol/L) -----	49
2.10.1.8 Tampão fosfato para reação de acoplamento pH 8,5 (100 mmol/L) -	49
2.10.1.9 Solução de tungstato de sódio (100g/L) -----	49
2.10.1.10 Solução de pulmão de coelho (200 mg/mL) -----	49
2.10.1.11 Solução de pulmão de coelho (100 mg/mL) -----	50
2.10.1.12 Solução de plasma de rato -----	50
2.10.2 Protocolo do ensaio de inibição da ECA utilizando pulmão de coelho como fonte da enzima -----	50
2.10.3 Protocolo do ensaio de inibição da ECA utilizando soro de rato como fonte da enzima -----	51
2.11 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE VASODILATADORA EM PREPARAÇÕES ISOLADAS DE AORTA DE RATOS -----	52
2.11.1 Soluções utilizadas no ensaio -----	52
2.11.1.1 Solução de Krebs-Henseleit -----	52
2.11.1.2 Solução de fenilefrina -----	53
2.11.1.3 Solução de acetilcolina -----	53
2.11.1.4 Solução de metil éster N ω nitro- <i>L</i> -arginina (L-NAME) -----	53
2.11.1.5 Solução das amostras -----	53
2.11.2 Animais de experimentação -----	53
2.11.3 Montagem da preparação isolada de anéis de aorta de rato -----	53
2.11.4 Protocolo experimental para avaliar o efeito dos extratos sobre a contração máxima induzida por fenilefrina -----	54
2.11.5 Protocolo experimental para avaliar o efeito dos extratos sobre a contração Máxima induzida por fenilefrina, na presença de <i>L</i> -NAME -----	54

**CAPÍTULO 3: RESULTADOS E DISCUSSÃO**

3.1 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-HIPERTENSIVA DOS EXTRATOS -----	57
3.1.1 Avaliação da atividade vasodilatadora em anéis de aorta de ratos -----	57
3.2 PERFIS CROMATOGRÁFICOS DOS EXTRATOS ETANÓLICOS EM RP-HPLC-----	59
3.3 PERFIS CROMATOGRÁFICOS DOS EXTRATOS ETANÓLICOS EM CCD DE SÍLICA GEL -----	61
3.4 FRACIONAMENTO PRELIMINAR DOS EXTRATOS -----	63
3.5 PERFIS CROMATOGRÁFICOS DAS FRAÇÕES POR RP-HPLC -----	63
3.5.1 <i>E. suberosum</i> -----	63
3.5.2 <i>E. tortuosum</i> -----	63
3.5.3 <i>E. gonocladum</i> -----	64
3.6 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE INIBIDORA DA ECA DAS FRAÇÕES -----	66
3.6.1 Atividade inibidora da ECA das frações de <i>E. suberosum</i> -----	67
3.6.2 Atividade inibidora da ECA das frações de <i>E. tortuosum</i> -----	67
3.6.3 Atividade inibidora da ECA das frações de <i>E. gonocladum</i> -----	67
3.7 FRACIONAMENTO DO EXTRATO ETANÓLICO DE <i>E. gonocladum</i> -----	69
3.7.1 Fracionamento de Ppt-EG -----	69
3.7.2 Fracionamento de Hex-EG -----	71
3.7.3 Fracionamento de AC-EG -----	72
3.8 ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL DAS SUBSTÂNCIAS ISOLADAS -----	73
3.8.1 Elucidação estrutural de PptEG-produto -----	73
3.8.2 Elucidação estrutural de HexEG 9A -----	89
3.8.3 Elucidação estrutural de HexEG 3C -----	94
3.9 AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES BIOLÓGICAS DA ASTILBINA -----	100
3.9.1 Avaliação do efeito vasodilatador em preparações de anel de aorta de rato pré-contraídas com fenilefrina -----	100
3.9.2 Avaliação da atividade inibidora da ECA utilizando ensaio colorimétrico ----	101

**CAPÍTULO 4: CONCLUSÕES**

CONCLUSÕES -----	105
------------------	-----

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS -----	107
----------------------------------	-----

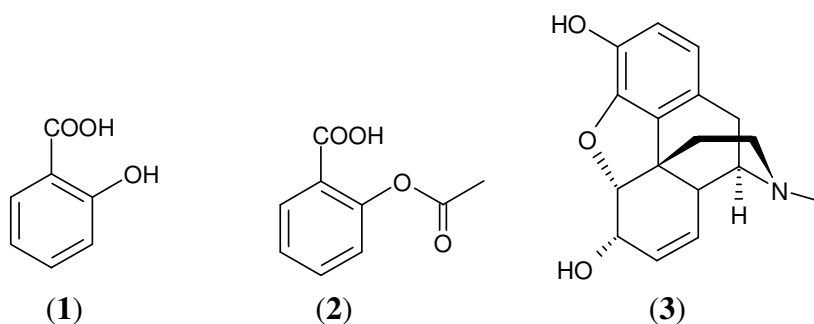
## **1 INTRODUÇÃO**

## 1.1 HISTÓRICO DO USO DE PRODUTOS NATURAIS

A natureza sempre despertou no homem um fascínio encantador, não só pelos recursos oferecidos para sua alimentação e sobrevivência, mas por ser sua principal fonte de inspiração e aprendizado. A busca incessante pela compreensão das leis naturais e o desafio de transpor barreiras à sua sobrevivência, como as doenças, levaram o homem ao seu atual estágio de desenvolvimento científico (VIEGAS; BOLZANI; BARREIRO, 2006).

A história do desenvolvimento das civilizações contempla diversos exemplos da utilização de plantas com finalidades terapêuticas, merecendo destaque as civilizações egípcia, greco-romana e chinesa. O conhecimento do potencial terapêutico das plantas por grupos primitivos foi fundamental para a descoberta de substâncias bioativas ao longo da evolução humana. A convivência e o aprendizado com diferentes grupos étnicos trouxeram valiosas contribuições para a pesquisa com produtos naturais e o desenvolvimento de medicamentos utilizados na terapêutica atual (HALBERSTEIN, 2005; VIEGAS; BOLZANI; BARREIRO, 2006).

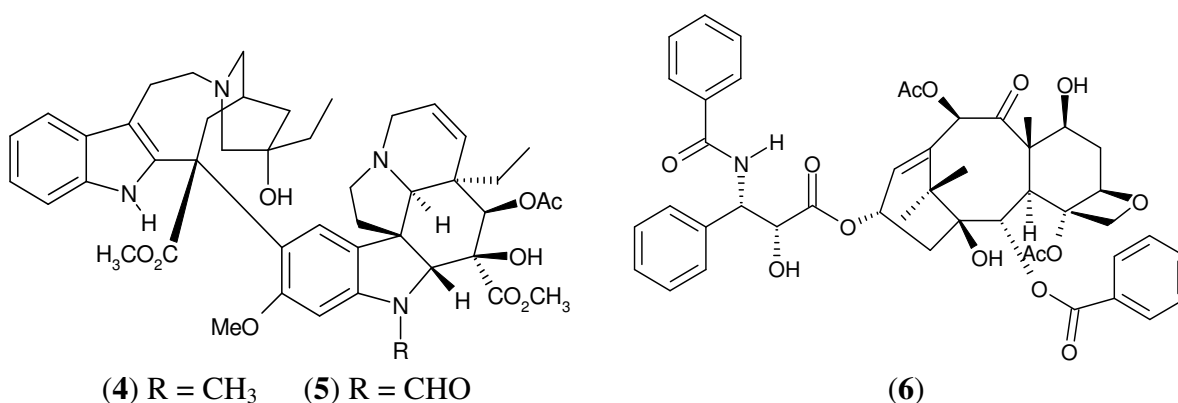
A descoberta dos salicilatos de *Salix alba* L., em 1757, foi um marco importante para o desenvolvimento dos fármacos a partir de produtos naturais. Nesse contexto, merece destaque o isolamento do ácido salicílico (**1**) que, anos mais tarde, originaria o fármaco sintético ácido acetilsalicílico – AAS (**2**), um analgésico que mesmo após 110 anos de sua descoberta ainda é alvo de pesquisas pela indústria farmacêutica (PIERPOINT, 1994; YUNES; PEDROSA; CECHINEL-FILHO, 2001).



O isolamento da morfina (**3**), constituinte majoritário do ópio, em 1806, por Friedrich Wilhelm Sertürner, constitui outro exemplo histórico de estudos com metabólitos secundários de plantas. O ópio é obtido de *Papaver somniferum* L. e conhecido há séculos por suas propriedades hipnoanalgésicas. Sua utilização remonta à época dos sumérios (4.000 a.C.) e há relatos na mitologia grega atribuindo ao ópio o simbolismo de Morfeu, o Deus do sono. (HARTMANN, 2007).

As pesquisas com produtos naturais, a despeito do sucesso histórico, declinaram nas últimas décadas, o que pode ser atribuído ao desenvolvimento da química combinatorial, à introdução de técnicas de triagem molecular em alta velocidade, aos avanços na biologia molecular e às incertezas acerca do uso de biomateriais geradas após a Convenção sobre a Biodiversidade, denominada de RIO/92 (KOEHN; CARTER, 2005).

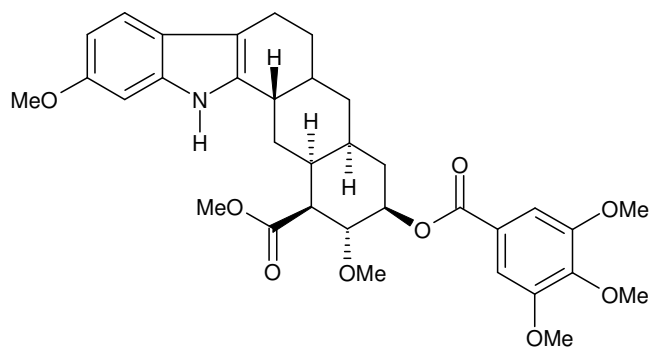
No entanto, nos últimos anos têm-se observado uma redescoberta dos produtos naturais de plantas pela indústria farmacêutica, especialmente daqueles com estruturas moleculares complexas, dificilmente obtidas por processos sintéticos, e que resultaram no desenvolvimento de novos fármacos. Como exemplos, destacam-se fármacos utilizados na quimioterapia do câncer como vimblastina (**4**) e vincristina (**5**), obtidas de *Catharanthus roseus* L., e paclitaxel (**6**), extraído das cascas de *Taxus brevifolia* Nutt. (PINTO et al., 2002; OBERLIES; KROLL, 2004).



A relevância das substâncias naturais para a indústria farmacêutica fica evidente ao se constatar que os produtos naturais, substâncias derivadas e produtos sintéticos baseados em farmacóforos naturais foram responsáveis por cerca de 50% dos novos fármacos lançados no mercado entre 2000 e 2006. Na classe dos anti-hipertensivos, dos 77 fármacos desenvolvidos nos últimos 25 anos, cerca de 50 estão diretamente relacionados aos produtos naturais e somente 27 têm origem totalmente sintética (NEWMAN; CRAGG, 2007).

Dentre os anti-hipertensivos originários de produtos naturais, destacam-se a reserpina (**7**), um alcalóide indólico obtido de *Rauwolfia serpentina* (L.) Benth. Ex. Kurz, e o extrato padronizado de *Crataegus oxyacantha* L., cujas folhas e flores constituem drogas vegetais com atividade vasodilatadora periférica e coronariana, contribuindo para a melhora do fluxo sanguíneo (LY, 2005).





(7)

Dados da Organização Mundial de Saúde (OMS) revelam que o uso de plantas medicinais ainda é a principal estratégia para os cuidados primários de saúde de 65-80% da população mundial, sobretudo nos países em desenvolvimento, pela dificuldade de acesso às terapias com fármacos sintéticos, decorrente dos custos elevados. Por outro lado, em países da Europa e América do Norte, por questões culturais, cerca de 50% da população utilizam a medicina complementar ou alternativa, incluindo as plantas medicinais (CALIXTO, 2005).

Apesar da extensa utilização das plantas medicinais, um número relativamente pequeno de espécies foi cientificamente avaliado visando assegurar sua qualidade, eficácia e segurança. Estima-se que das 400.000 espécies mundiais de plantas superiores somente 10% foram objeto de algum estudo químico, número ainda menor quando se consideram as espécies submetidas a ensaios biológicos ou farmacológicos (BASSO et al., 2005). O número limitado de pesquisas científicas com plantas de uso popular aliado à crescente introdução de espécies exógenas e destruição de ecossistemas vegetais evidencia a necessidade de estudos nessa área. A realização de estudos etnobotânicos, fitoquímicos e farmacológicos com espécies nativas é o único mecanismo capaz de impedir a perda do conhecimento tradicional das plantas medicinais (BRANDÃO et al., 2008).

Um dos ecossistemas brasileiros mais afetados pela atividade humana é o cerrado. Estima-se que 57% de seus 204 milhões de hectares tenham sido completamente destruídos pela agricultura e pecuária extensivas, e que as áreas remanescentes estejam bastante alteradas (CONSERVATION, 2008; MARRIS, 2005). Nesse contexto, plantas endêmicas do cerrado brasileiro, como diversas espécies do gênero *Erythroxylum*, representam um campo ainda pouco explorado para a pesquisa científica na busca por novos compostos bioativos.

## 1.2 OBJETIVOS

### 1.2.1 Objetivo geral

Avaliar a potencial atividade anti-hipertensiva de três espécies do gênero *Erythroxylum* [*E. suberosum* A. St.-Hil., *E. tortuosum* Mart. e *E. gonocladum* (Mart.) O. E. Schulz] utilizando modelos *in vitro* e realizar o fracionamento preliminar dos extratos visando selecionar uma das espécies para estudo fitoquímico.

### 1.2.2 Objetivos específicos

- A) Avaliar a atividade vasodilatadora do extrato etanólico bruto das espécies *E. gonocladum*, *E. suberosum* e *E. tortuosum*, utilizando ensaio em anel de aorta de ratos;
- B) Realizar a prospecção fitoquímica dos extratos etanólicos brutos das espécies;
- C) Realizar o fracionamento preliminar dos extratos avaliados em A por partição entre solventes imiscíveis;
- D) Avaliar a atividade inibidora da enzima conversora de angiotensina (ECA) das frações obtidas em C, utilizando ensaio colorimétrico *in vitro*;
- E) Selecionar uma das espécies para estudo fitoquímico visando ao isolamento dos constituintes majoritários das frações ativas;
- F) Elucidar a estrutura química das substâncias isoladas e avaliar sua potencial atividade anti-hipertensiva, utilizando ensaios *in vitro*.

## 1.3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 1.3.1 Hipertensão arterial e seu impacto para a saúde coletiva

A hipertensão arterial (HA) é uma patologia caracterizada pela elevação crônica da pressão arterial (PA), considerando-se valores de PA sistólica  $\geq 140$  mmHg e/ou PA diastólica  $\geq 90$  mmHg (JOINT, 2003).

A HA está associada a alterações estruturais e funcionais complexas em vários órgãos-alvo e desempenha papel importante na etiologia de doenças cerebrovasculares, doença isquêmica do miocárdio e insuficiência cardíaca e renal, sendo considerada um dos principais fatores de risco de morbimortalidade cardiovascular (JOINT, 2003).

Estima-se que a prevalência da HA no Brasil seja de 35% na população acima dos 40 anos, o que representa, segundo cálculos do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), 17 milhões de portadores da doença. Desses, 75% recorrem ao Sistema Único de Saúde (SUS) para receber atendimento, o que reflete o impacto socioeconômico dessa patologia (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2008).

Há registros de que no Brasil, em 2005, tenham ocorrido 1.180.184 internações por doenças cardiovasculares, com custo total de R\$ 1.323.775.008,28 aos cofres públicos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006). Dados da Sociedade Brasileira de Cardiologia (2007) revelam que aproximadamente 27,4% dos óbitos nacionais são decorrentes de doenças cardiovasculares. A HA, se considerada isoladamente, é responsável por 40% das mortes por acidente vascular cerebral (AVC), principal causa de morte em todas as regiões do país, e 25% daquelas por doença coronariana.

Na tentativa de atenuar o problema, o Ministério da Saúde implantou o Programa Nacional de Atenção a Hipertensão Arterial e *Diabetes Mellitus*, um conjunto de ações de promoção à saúde, prevenção, diagnóstico e tratamento dos agravos. Seu objetivo é reduzir o número de internações, a procura por pronto atendimentos, os gastos com o tratamento de complicações, aposentadorias precoces e mortalidade cardiovascular com consequente melhoria da qualidade de vida dos portadores (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2008).

### 1.3.2 Tratamento farmacológico da hipertensão arterial

O principal objetivo do tratamento medicamentoso da HA é a redução da morbidade e da mortalidade cardiovasculares, mediante redução da PA para valores inferiores a 140 mmHg de pressão sistólica e 90 mmHg de pressão diastólica (SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA, 2007).

Diversos agentes terapêuticos encontram-se disponíveis, destacando-se os diuréticos,  $\beta$ -bloqueadores, antagonistas dos canais de cálcio, antagonistas dos receptores de angiotensina II, inibidores da ECA, entre outros. Muitos pacientes, no entanto, não apresentam controle adequado de seus níveis pressóricos. Nesse sentido, as opções farmacológicas para o tratamento da HA ainda são consideradas inadequadas, uma vez que existe uma grande demanda para seu controle efetivo (JOINT, 2003; WHO, 2003).

Estima-se que mais de 2/3 dos pacientes hipertensos não respondem à monoterapia, o que torna necessária a associação de 2 ou até 3 fármacos para a obtenção do efeito desejado. Por muitos anos, a associação mais comumente utilizada foi de agentes  $\beta$ -bloqueadores e diuréticos (JOINT, 2003). Estudos recentes, no entanto, têm demonstrado que essa associação provoca alterações metabólicas importantes e reduz a proteção endógena do organismo quando comparada a outros fármacos, como os inibidores da ECA (JANDELEIT-DAHM; COOPER, 2006). Substâncias que atuam no sistema renina-angiotensina (SRA) têm sido objeto de diversos estudos, sendo consideradas efetivas e, por isso, recomendadas para a administração crônica no tratamento da HA (FUCHS, 2009; KOLASINSKA-MALKOWSKA et al., 2008).

### 1.3.3 Sistemas fisiológicos de controle da pressão arterial

A PA pode ser controlada essencialmente por dois mecanismos: regulação neural, que é feita primariamente pelo sistema nervoso autônomo (associado aos barorreceptores e quimiorreceptores) (DOUMAS; PAPADEMETRIOU, 2009; MINISI; QUINN; JEONG, 2009) e regulação humoral, realizada por substâncias liberadas por diferentes tipos celulares, como as células justaglomerulares e as células endoteliais (MONCADA; PALMER; HIGGS, 1991; PANDEY et al., 2009).

A via neural de controle da PA, também conhecida como barorreflexo, é o mecanismo mais rápido de controle hemodinâmico. O aumento na PA ativa as terminações nervosas sensitivas (barorreceptores), localizadas principalmente no arco aórtico e seios carotídeos,

permitindo a transmissão de sinais ao SNC. Uma alça de *feedback* negativo é ativada, transmitindo sinais de volta a periferia, via sistema nervoso autônomo (SNA), causando, de forma reflexa, uma rápida redução na PA para níveis pressóricos normais (GUYENET, 2006; SHARMA, 1992).

O controle a longo prazo da PA é realizado por mecanismos de regulação humoral, onde a participação de diversas substâncias vasoativas, entre elas os constituintes do sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA) e substâncias derivadas do endotélio, como o óxido nítrico (NO), são de extrema importância na manutenção de níveis pressóricos aceitáveis. Alterações nesses mecanismos podem resultar em elevação patológica dos níveis pressóricos, propiciando a instalação de um quadro de HA (CAREY; PADIA, 2008; SHARMA, 1992).

### **1.3.3.1 Sistema renina angiotensina (SRA)**

O SRA compreende uma cascata hormonal coordenada que atua no controle direto das funções cardiovascular, renal e adrenal. Esse sistema promove o balanço hemodinâmico e eletrolítico, e constitui um dos principais mecanismos de controle da PA (AKIYOSHI et al., 1993; PANDEY et al., 2009).

Os componentes do SRA são expressos em diversos tecidos (coração, cérebro, rins, glândulas adrenais, vasos sanguíneos e órgãos reprodutores), o que permite distinguir um SRA “local” e um “circulante”. Também é sugerida a existência do SRA “intracelular” cujos componentes não seriam secretados e exerceriam suas ações no interior das células (DIETZE; HENRIKSEN, 2008; KUMAR; SINGH; BAKER, 2007).

A visão clássica do funcionamento do SRA “circulante” revela que a renina, produzida pelas células do aparelho justaglomerular renal, atua sobre o angiotensinogênio hepático originando o decapeptídeo inativo angiotensina I (Ang I). A Ang I, pela ação da ECA presente no endotélio dos vasos pulmonares, sofre clivagem da ligação histidil-leucina, originando o octapeptídeo ativo angiotensina II (Ang II) (Figura 1A). A Ang II é um potente vasoconstritor direto e sua ligação a receptores da musculatura lisa vascular ativa a proteína G com conseqüente ativação de fosfolipase C e formação de inositol-trifosfato (IP<sub>3</sub>) e diacilglicerol (DAG), que induzem o aumento da concentração intracelular de Ca<sup>+2</sup> e ativam a proteína quinase C, promovendo vasoconstrição e elevação da PA (BURREL et al., 2004; ERDOS, 1976; JOHNSON, L.R., 2003).

Vários estudos revelaram a existência de vias alternativas para a formação da Ang II em nível tecidual. A primeira descrição de uma dessas vias foi feita por Boucher et al. (1974) ao demonstrar que a tonina, obtida da glândula salivar de ratos, era capaz de clivar a Ang I a Ang II. Estudos posteriores demonstraram a existência de outras proteases com capacidade para formar Ang II, como a tripsina (ARAKAWA et al., 1976), calicreína (ARAKAWA; MARUTA, 1980), catepsina G (TONNESEN et al., 1982), quimiotripsina (WINTROUB et al., 1984) e quimase (URATA et al., 1990).

O papel da Ang II no desenvolvimento e progressão da doença cardiovascular e renal não é atribuído apenas aos seus efeitos hemodinâmicos. A Ang II medeia a lesão tecidual pela promoção de fatores de crescimento, citocinas inflamatórias e fibrose intersticial (PANDEY et al., 2009). O balanço das interações entre a Ang II e o NO determina a ocorrência de lesão ou proteção de órgãos-alvo (RAIJ, 2005). Persson et al. (2000) demonstraram que o NO atua como inibidor endógeno da ECA, provavelmente por se ligar ao íon zinco presente no sítio ativo da enzima.

Sabe-se que existem diversos subtipos de receptores para as angiotensinas; contudo, somente os receptores AT1 e AT2 são bem caracterizados. Esses receptores possuem distribuição e sinalização distintas e levam a diferentes efeitos da Ang II. Os receptores AT1 estão localizados na membrana plasmática das células da musculatura lisa vascular, glândulas adrenais, miocárdicas e cerebrais, e estão envolvidos com a mediação da vasoconstrição, controle da sede, estimulação da liberação de aldosterona e vasopressina, e crescimento da musculatura vascular lisa (STECKELINGS; RETTIG; UNGER, 2007; WERNER et al., 2008). Os receptores AT2 estão presentes na medula adrenal, útero, ovário, endotélio vascular e em algumas áreas do cérebro, e estão envolvidos na mediação da vasodilatação, liberação de NO, redução da reabsorção renal de sódio, inibição da proliferação celular e crescimento miocítico (FYHRQUIST; SAIJONMAA, 2008). É importante ressaltar que a resposta à Ang II é bifásica na maior parte dos leitos vasculares, pois ocorre uma discreta vasodilatação desencadeada pela ativação dos receptores AT2 presentes nas células endoteliais, seguida de potente vasoconstrição pela ativação dos receptores AT1 presentes nas células vasculares lisas (WERNER et al., 2008; PERAZELLA; SETARO, 2003; ZAGO; ZANESCO, 2006).

A ECA é uma enzima chave no funcionamento do SRA. Estruturalmente é classificada como uma dipeptidil-carboxipeptidase com dois domínios homólogos, cada um com um sítio catalítico e uma região específica para ligação do  $Zn^{2+}$ . Encontra-se ligada à membrana da célula endotelial vascular através de sua porção C-terminal hidrofóbica e tem seus sítios

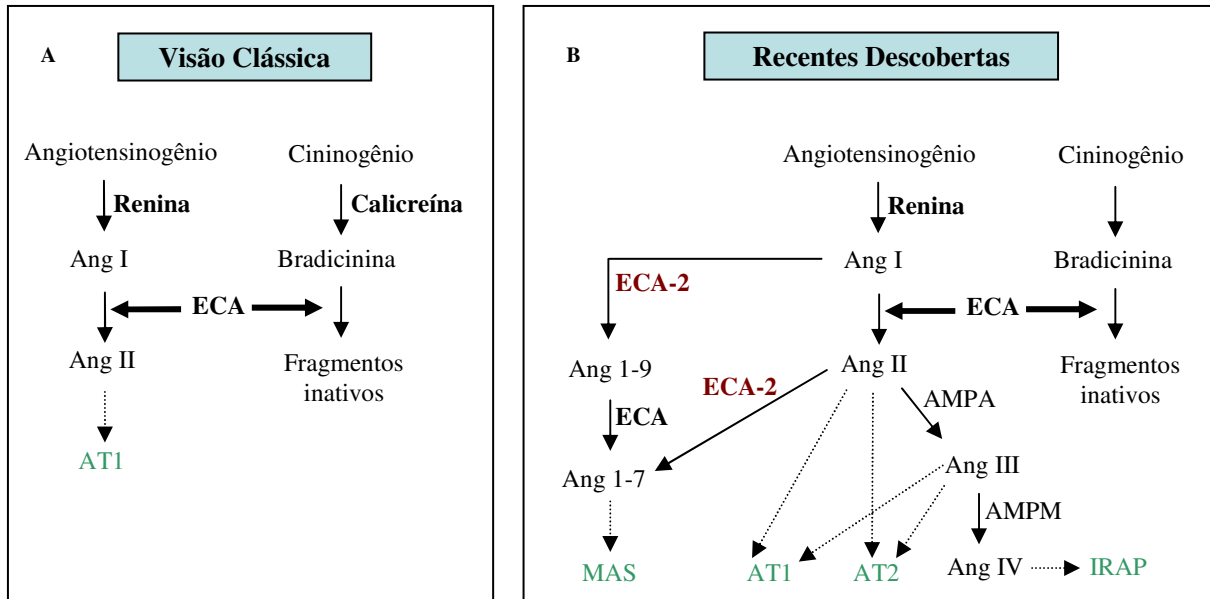
ativos orientados para dentro do lúmen (PERSSON et al., 2000). Mediante clivagem proteolítica, a enzima perde seu apoio C-terminal e torna-se solúvel no sangue, contribuindo para o aumento da PA (BINGHAM et al., 2006; COATES, 2003; LIMA et al., 2007).

Além de promover a formação da Ang II, a ECA é responsável pela degradação da bradicinina, uma molécula que induz relaxamento endotélio-dependente (Figura 1A). O efeito cardioprotetor e vasorelaxante induzido pela bradicinina é decorrente de sua interação com receptores do tipo B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub> (DUKA et al., 2008) e subsequente produção endotelial de NO e prostanóides derivados da COX (KOJIMA et al., 2009).

Recentes descobertas da isoforma ECA-2 e de outros peptídeos ativos no SRA ampliaram a visão sobre a importância desse sistema no controle da PA. A ECA-2 é uma carboxipeptidase formada por 805 aminoácidos e apresenta grande homologia com a ECA. Possui apenas um sítio catalítico na porção N-terminal e uma região hidrofóbica na porção C-terminal que serve para ligá-la à parede da membrana (JANDELEIT-DAHM; COOPER, 2006).

A ECA-2 catalisa a clivagem da Ang I em Ang 1-9, que por sua vez é clivada pela ECA e origina a Ang 1-7. A Ang II também pode ser diretamente clivada pela ECA-2 originando a Ang 1-7, um peptídeo que se liga a receptores do tipo MAS e exerce ação vasodilatadora. As angiotensinas Ang III e Ang IV são heptapeptídeos formados pela ação de aminopeptidases e também exercem efeito contrário ao da Ang II (Figura 1B) (BURRELL et al., 2004; VARAGIC et al., 2008).

A Ang III exerce sua ação mediante interação com os receptores AT1 e AT2, enquanto a Ang IV se liga a receptores de aminopeptidase regulados por insulina (receptores IRAP) e suas ações incluem vasodilatação renal, hipertrofia e ativação dos fatores de inibição plaquetária (PAI-1) e de necrose tumoral. Alguns estudos sugerem que a Ang IV exerça importante função na cognição, no metabolismo renal e nas lesões cardiovasculares. A interação entre Ang 1-7, Ang III, Ang IV, bradicinina, prostaciclina e NO apontam para a existência de um complexo sistema de contra-balanço à ação vasoconstritora promovida pela Ang II (FYHRQUIST; SAIJONMAA, 2008; SAVOIA; SCHIFFRIN, 2006).



**Figura 1.** (A) Visão clássica do sistema renina-angiotensina. ECA = enzima conversora de angiotensina; Ang I = angiotensina I; Ang II = angiotensina II; AT1 = receptor de angiotensina tipo 1. (B) Recentes descobertas do sistema renina-angiotensina. Ang III = angiotensina III; Ang IV = angiotensina IV; ECA-2 = isoforma 2 da enzima conversora de angiotensina; Ang 1-9 = angiotensina 1-9; Ang 1-7 = angiotensina 1-7; AMPA = aminopeptidase A; AMPM = aminopeptidase M; MAS = receptor oncogênico MAS para angiotensina 1-7; AT2 = receptor de angiotensina tipo 2; IRAP = aminopeptidase regulada por insulina (BURREL et al., 2004; FYHRQUIST; SAIJONMAA, 2008).

### 1.3.3.2 Via do óxido nítrico

As células endoteliais desempenham um papel relevante no controle do tônus vascular. Regulam a vasomotricidade, a permeabilidade vascular, o metabolismo de substâncias endógenas e exógenas e a atividade plaquetária e leucocitária (MONCADA; PALMER; HIGGS, 1991; RUBIO; MORALES-SEGURA, 2004).

Os primeiros estudos relatando a importância do endotélio no controle da PA foram realizados por Furchgott e Zawadzki (1980), demonstrando que a vasodilatação induzida pela acetilcolina era dependente da presença de um endotélio íntegro e que as células endoteliais liberavam um fator de relaxamento denominado fator de relaxamento derivado do endotélio (EDRF), mais tarde identificado como sendo o NO.

As células endoteliais sintetizam substâncias vasoativas, classificadas como fatores relaxantes do endotélio [NO, prostaciclina (PGI<sub>2</sub>) e fator hiperpolarizante derivado do endotélio (EDHF)] e como fatores contráteis derivados do endotélio (endotelina e tromboxano). O NO constitui peça chave no controle da dinâmica vascular ao atuar como potente vasodilatador e inibidor da agregação plaquetária. Exerce função protetora na HA, na aterosclerose, na doença arterial coronariana e nas doenças tromboembólicas, doenças



relacionadas a alterações na função endotelial e, conseqüentemente, menor produção e/ou biodisponibilidade de NO (COHEN; VANHOUTTE, 1995; MONCADA; PALMER; HIGGS, 1991; MONCADA, 2006).

A produção de NO decorre da ativação da óxido nítrico sintase (NOS). São descritas duas isoformas para a NOS: a constitutiva e a induzível. A isoforma constitutiva é originalmente encontrada no endotélio (eNOS) e nos neurônios (nNOS). A isoforma induzível é expressa em uma grande variedade de células incluindo macrófagos, linfócitos, neutrófilos, eosinófilos, células de Kupffer, hepatócitos e células epiteliais (MONCADA; HIGGS, 2006; MONCADA, 1997). A atividade das NOS é regulada por diversas modificações pós-translacionais, incluindo interações proteína-proteína, fosforilação e localização subcelular (FLEMING; BUSSE, 2003).

A isoforma constitutiva da NOS é ativada devido à elevação de íons  $\text{Ca}^{+2}$  nas células endoteliais em resposta a estímulos físicos ou estimulação de diferentes mediadores neuro-humorais, entre eles a acetilcolina, a bradicinina e o ATP. O estímulo físico pode ser caracterizado como a força que o sangue exerce sobre a parede das artérias, denominada estresse de cisalhamento. Os mecanorreceptores presentes nas células endoteliais ativam diretamente as proteínas G, os canais iônicos e enzimas do grupo das proteínas quinases e fosfatases. Essa ativação desencadeia uma cascata enzimática com participação dos íons  $\text{Ca}^{+2}$  e promove a vasodilatação propriamente dita. A NOS também pode ser ativada por meio da interação agonista-receptor, com formação de  $\text{IP}_3$  e conseqüente elevação dos níveis de  $\text{Ca}^{+2}$  intracelulares, formando o complexo cálcio-calmodulina. Esse complexo ativa a enzima eNOS que irá atuar na L-arginina, formando o NO (FLEMING; BUSSE, 2003; MONCADA; PALMER; HIGGS, 1991; MONCADA, 1997).

A isoforma induzível é ativada a partir de estímulos patológicos, como, por exemplo, lipopolissacarídeos bacterianos, citocinas (interleucina-1, endotoxinas e fator de necrose tumoral) e é independente de íons  $\text{Ca}^{+2}$  (MONCADA, 1997, 2006; ZAGO; ZANESCO, 2006).

Uma vez liberado, o NO difunde-se rapidamente das células endoteliais para a musculatura lisa do vaso sanguíneo. Na célula muscular lisa, o NO promove a ativação da enzima catalítica guanilato ciclase solúvel, formando o monofosfato de guanosina cíclico (GMPc) a partir da quebra do trifosfato de guanosina (GTP). A formação do GMPc ativa a bomba de  $\text{Ca}^{+2}$  da célula muscular lisa, diminuindo a concentração de  $\text{Ca}^{+2}$  intracelular e reduzindo o tônus vascular. A vasodilatação induzida pela via NO/GMPc pode ocorrer por

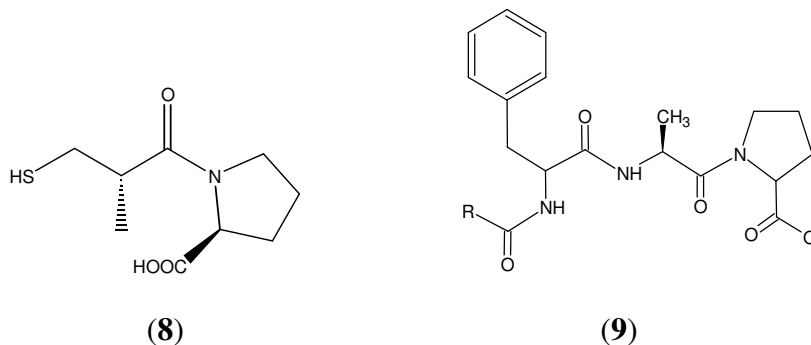
meio de outros mecanismos como a inibição da geração de  $IP_3$  na musculatura lisa, desfosforilação da cadeia leve de miosina, inibição do influxo de  $Ca^{+2}$ , ativação de proteínas quinases, estimulação da  $Ca^{+2}$ -ATPase de membrana e abertura de canais de  $K^+$ . A formação do GMPc também inibe a agregação plaquetária e aumenta a excreção renal de sódio/água, o que contribui para a diminuição do volume sanguíneo circulante (MONCADA, 1997, 2006; ZAGO; ZANESCO, 2006).

Espécies reativas de oxigênio (ROS) estão entre os principais responsáveis pelo surgimento da disfunção endotelial. ROS são produzidas por uma série de sistemas enzimáticos, podendo desempenhar tanto papéis fisiológicos quanto patofisiológicos. Quando quantidades excessivas de ROS são produzidas, superando a capacidade dos sistemas antioxidantes endógenos, tem-se um estado denominado de estresse oxidativo, o qual está associado ao surgimento de diversas doenças cardiovasculares. A vasodilatação dependente de endotélio é reduzida na presença de quantidades excessivas de ROS devido à diminuição da bioatividade do NO na parede vascular. As ROS, principalmente o radical superóxido, reagem com o NO promovendo sua inativação e formando radicais ainda mais tóxicos. Além disso, ROS parecem promover a contração das células musculares lisas vasculares (CAI; HARRISON, 2000).

### **1.3.4 Produtos naturais com atividade inibidora da ECA**

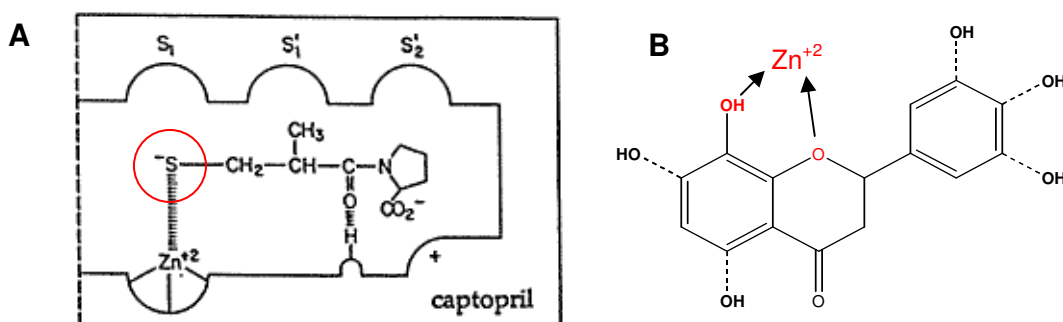
McNeill e Jurgens (2006) relataram diversos mecanismos pelos quais os produtos naturais exercem sua atividade vasodilatadora, destacando-se as interações com o sistema do NO e/ou ROS, o sistema dos eicosanóides, os canais de  $K^+$  e os canais de  $Ca^{+2}$ . Elbl e Wagner (1991) demonstraram que a inibição da ECA constitui-se em outro mecanismo importante de atuação dos produtos naturais. Tais relatos corroboram a utilização de testes de atividade vasodilatadora e de inibição de ECA para o estudo de espécies vegetais com potencial atividade anti-hipertensiva.

O primeiro fármaco inibidor da ECA comercialmente disponível para o tratamento da HA foi o captopril (**8**), desenvolvido a partir do tripeptídeo Phe-Ala-Pro (**9**) isolado do veneno da serpente brasileira *Bothrops jararaca* (FERREIRA, 1965).



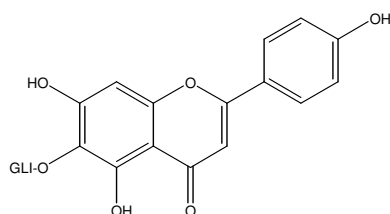
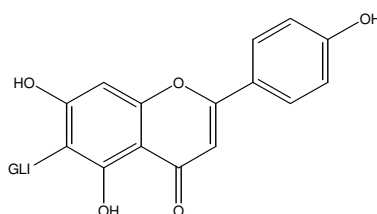
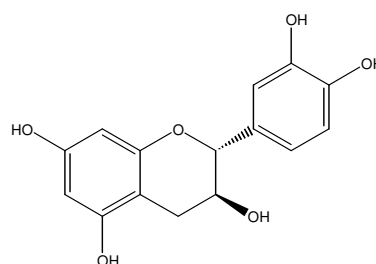
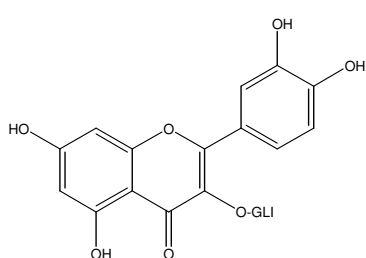
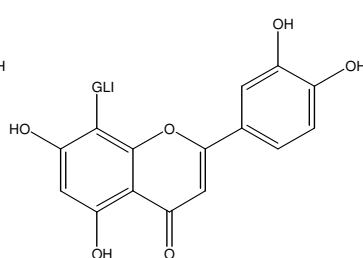
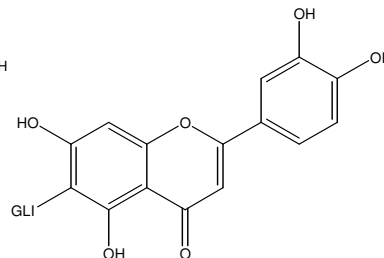
A atividade inibidora da ECA já foi relatada para produtos naturais das classes dos flavonóides, proantocianidinas (LACAILLE-DUBOIS et al., 2001), taninos hidrolisáveis (UENO et al., 1988), fenilpropanos (YAMADAKI; SHIMOYAMA, 1993) e ácidos graxos (MOROTA et al., 1987), entre outros. Em levantamento realizado por Barbosa-Filho et al. (2006) foram encontrados trabalhos sobre a avaliação da atividade inibidora da ECA para 158 substâncias isoladas de fontes naturais, das quais 108 (68%) foram ativas. As classes de metabólitos com maior número de moléculas ativas foram: flavonóides (29 substâncias), peptídeos/derivados protéicos (27), alcalóides (14), iridóides (6) e sesquiterpenos (5).

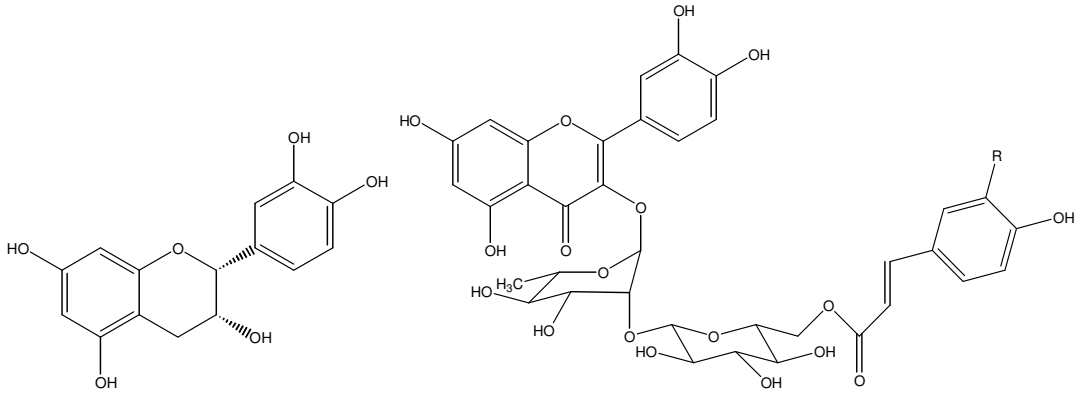
Elbl e Wagner (1991) postularam que a atividade inibidora da ECA de flavonóides seria resultante da formação de complexos entre o oxigênio heterocíclico e/ou grupo hidroxila da estrutura flavonoídica e o átomo de zinco no centro ativo da enzima. Esse mecanismo seria similar ao mecanismo de ação proposto para o captopril, em que o átomo de enxofre terminal se liga ao átomo de  $Zn^{+2}$  presente no sítio ativo da enzima, tornando-a inativa (Figura 2) (BREW, 2003; CUSHMAN; ONDETTI, 1998).



**Figura 2.** (A) Interação do captopril com o sítio ativo da ECA. O átomo de enxofre terminal se liga ao íon zinco presente no sítio ativo da enzima e a inativa.  $S_1$ ,  $S_1'$  e  $S_2'$  representam subsítios (ou bolsas) de interação presentes no sítio ativo da enzima (PEARLMAN; SMITH, 1998). (B) Estrutura de um flavonóide demonstrando o possível mecanismo de interação com o átomo de zinco no sítio ativo da enzima, o que explicaria a atividade inibidora da ECA observada para diversos flavonóides (ELBL; WAGNER, 1991).

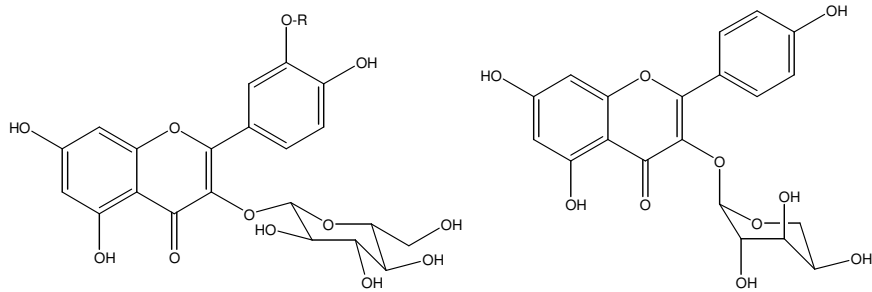
Diversos flavonóides com atividade inibidora da ECA *in vitro*, ensaiados na concentração de 0,33 mg/mL, encontram-se relatados na literatura, incluindo vitexina (**10**) (LACAILLE-DUBOIS et al., 2001; OKAMOT; YOSHIZAWA, 1994), isovitexina (**11**) (ARISAWA et al., 1989; LACAILLE-DUBOIS et al., 2001), (+) catequina (**12**) (INOKUCHI et al., 1986; LACAILLE-DUBOIS et al., 2001), isoquercetina (**13**) (KAMEDA et al., 1987; LACAILLE-DUBOIS et al., 2001), orientina (**14**, % inibição =  $20 \pm 2\%$ ), isoorientina (**15**, % inibição =  $48 \pm 1\%$ ), (-) epicatequina (**16**, % inibição =  $34 \pm 1\%$ ) (LACAILLE-DUBOIS et al., 2001), quercetina-3-*O*- $\alpha$ -(6-*cafeoil*glicosil- $\beta$ -1,2-ramnosídeo) (**17**,  $CI_{50} = 158,9 \pm 11,1 \mu M$ ), quercetina-3-*O*- $\alpha$ -(6-*p-cumaril*-glicosil- $\beta$ -1,2-ramnosídeo) (**18**,  $CI_{50} = 351,6 \pm 3,9 \mu M$ ), isoramnetina-3- $\beta$ -glicopiranosídeo (**19**,  $CI_{50} = 408,9 \pm 4,6 \mu M$ ), quercetina-3- $\beta$ -glicopiranosídeo (**20**,  $CI_{50} = 708,8 \pm 23,1 \mu M$ ), canferol-3-*O*- $\alpha$ -arabinopiranosídeo (**21**,  $CI_{50} = 392,8 \pm 13,4 \mu M$ ) (OH et al., 2004), apigenina (**22**,  $CI_{50} = 280 \pm 3,2 \mu M$ ), luteolina (**40**,  $CI_{50} = 290 \pm 2,9 \mu M$ ), canferol-3-*O*- $\alpha$ -arabinopiranosídeo (**23**,  $CI_{50} = 320 \pm 34,1 \mu M$ ), canferol-3-*O*- $\beta$ -galactopiranosídeo (**24**,  $CI_{50} = 260 \pm 3,0 \mu M$ ), quercetina-3-*O*- $\alpha$ -arabinopiranosídeo (**25**,  $CI_{50} = 310 \pm 2,2 \mu M$ ) e luteolina-7-*O*- $\beta$ -glicopiranosídeo (**26**,  $CI_{50} = 280 \pm 3,4 \mu M$ ) (LOIZZO et al., 2007).

**(10)****(11)****(12)****(13)****(14)****(15)**

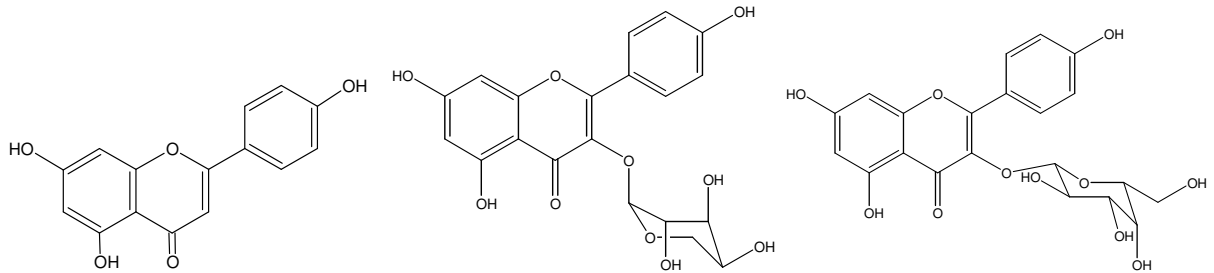


(16)

(17) R = OH (18) R = H

(19) R = CH<sub>3</sub> (20) R = H

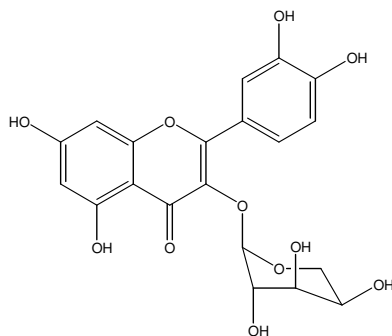
(21)



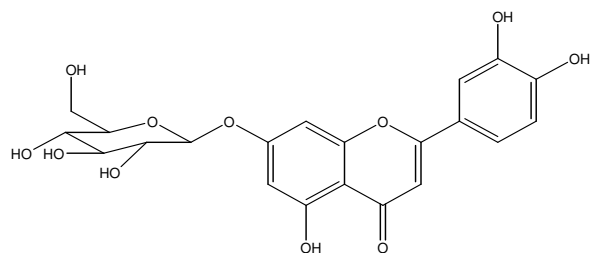
(22)

(23)

(24)

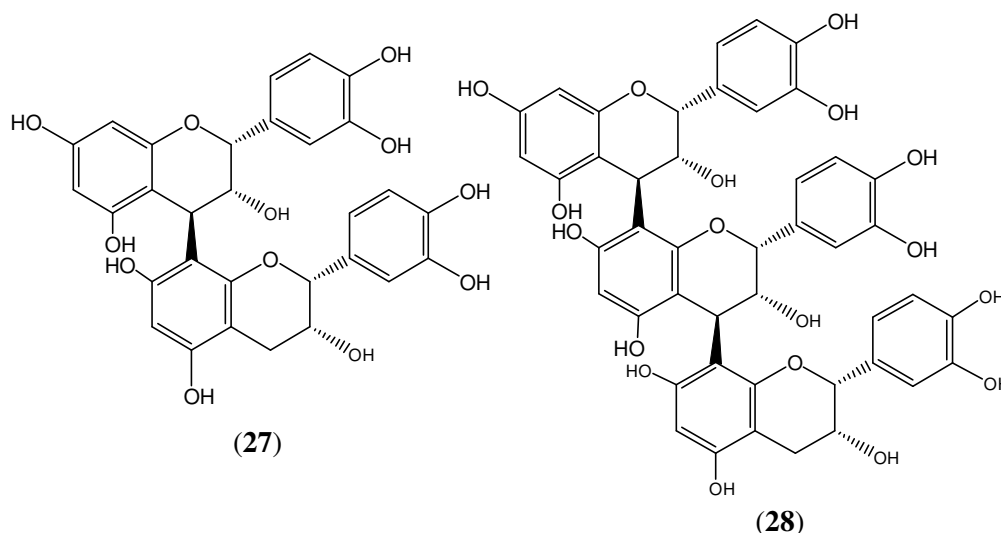


(25)

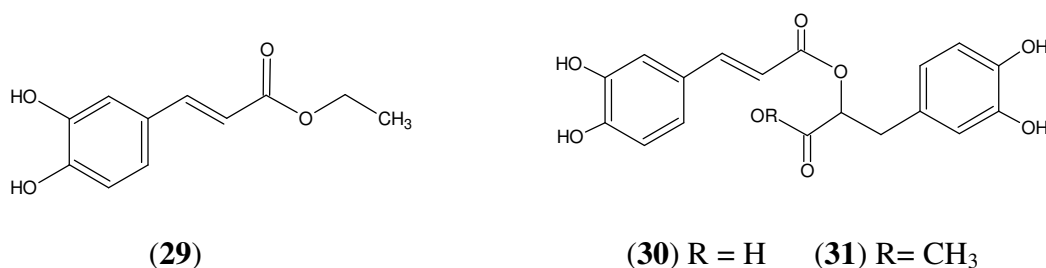


(26)

O fracionamento do extrato metanólico de folhas de *Musanga cecropioides* biomonitorado pelo ensaio *in vitro* de inibição da ECA resultou no isolamento das proantocianidinas B<sub>2</sub> (**27**, 25,0 ± 5,0% de inibição da ECA) e C<sub>1</sub> (**28**, 45,0 ± 2,0%), sendo as substâncias avaliadas na concentração de 0,33 mg/mL (LACAILLE-DUBOIS et al., 2001). Actis-Goretta et al. (2003, 2006) investigaram a atividade inibidora da ECA de diversas proantocianidinas e observaram incremento da atividade com o aumento do grau de polimerização das proantocianidinas, tendo sido avaliadas epicatequina (**16**, CI<sub>50</sub> = 1781 ± 381 μM), seu dímero (CI<sub>50</sub> = 267 ± 24 μM), trímero (CI<sub>50</sub> = 126 ± 11 μM), tetrâmero (CI<sub>50</sub> = 12 ± 1 μM), pentâmero (CI<sub>50</sub> = 25 ± 3 μM) e hexâmero (CI<sub>50</sub> = 10 ± 1 μM), além da catequina (**12**, CI<sub>50</sub> = 1593 ± 443 μM).

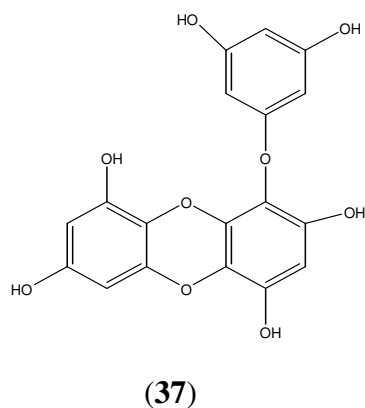
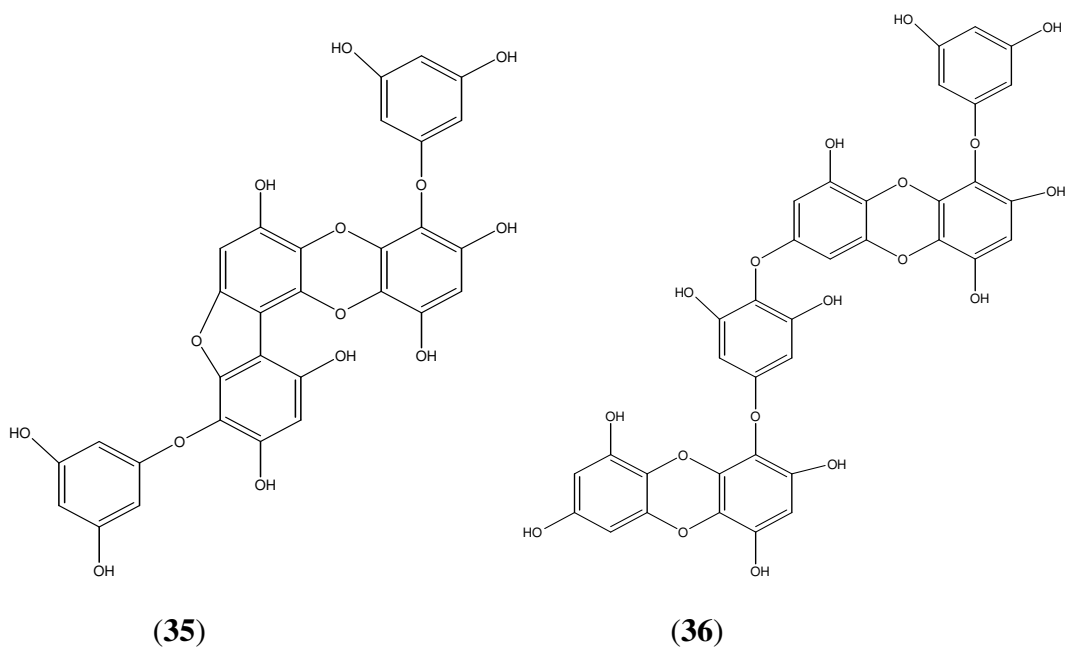


Diversas outras classes de produtos naturais já foram descritas com atividade inibidora da ECA. Li et al. (2008) demonstraram atividade inibidora da ECA *in vitro*, na concentração de 10 μg/mL, para o cafeato de etila (**29**, % IECA = 32,5%), ácido rosmarínico (**30**, % IECA = 55,2%) e rosmarinato de metila (**31**, % IECA = 39,5%) isolados do extrato etanólico de *Rabdosia coetsa* (Labiatae).



Peptídeos constituem outra classe de produtos naturais com atividade inibidora da ECA promissora, tais como o sulfóxido de γ-L-glutamil-(+)-S-alil-L-cisteína (**32**, % IECA =





Os resultados obtidos em diversos estudos sugerem que extratos com atividade inibidora da ECA frequentemente apresentam efeito vasodilatador em ensaios com preparações isoladas de anel de aorta. Alguns exemplos descritos na literatura incluem *Hancornia speciosa* (SERRA et al., 2005; FERREIRA et al., 2007), *Cecropia glaziovii* (LACAILLE-DUBOIS et al., 2001; SERRA et al., 2005) e *Crataegus oxyacantha* (LACAILLE-DUBOIS et al., 2001; KIM et al., 2000).

### 1.3.5 O gênero *Erythroxylum*

A família Erythroxylaceae é composta por duas espécies do gênero *Aneulophus*, cerca de 230-250 espécies do gênero *Erythroxylum*, seis espécies do gênero *Nectaropetalum* e duas espécies do gênero *Pinacopodium* (HEGNAUER, 1981).



As espécies de *Erythroxylum* são arbustivas ou arbóreas de porte pequeno ou médio e encontram-se distribuídas em regiões tropicais e subtropicais da América do Sul, África, Sudeste Asiático e Austrália (PLOWMAN; HENSOLD, 2004).

Dados de Plowman e Hensold (2004) apontam o Brasil como um dos principais centros de diversidade e endemismo de *Erythroxylum*. No país são encontradas cerca de 114 das 187 espécies descritas na América tropical, das quais, 74 possuem distribuição restrita. Diversas espécies são endêmicas no estado de Minas Gerais, dentre elas, as espécies selecionadas para estudo no presente trabalho: *E. suberosum*, *E. tortuosum* e *E. gonocladum* (PLOWMAN; HENSOLD, 2004) (Figura 3).



*Erythroxylum suberosum* A. St-Hil  
Fonte: SILVA JUNIOR (2005)



*Erythroxylum tortuosum* Mart.  
Fonte: SILVA JUNIOR (2005)



*Erythroxylum gonocladum* (Mart.) O. E. Schulz

**Figura 3.** Espécies do gênero *Erythroxylum* selecionadas para estudo

Apesar da ampla distribuição geográfica, poucas espécies de *Erythroxylum* utilizadas na medicina popular foram investigadas (BOHN et al., 1988). Os estudos realizados no gênero concentraram-se nas espécies produtoras de cocaína, sobretudo *E. coca* e *E. novogranatense* (BIERI et al., 2006; EVANS, 1981).

Espécies de *Erythroxylum* são popularmente utilizadas como antiinflamatório, antibacteriano, diurético, tônico com propriedades estimulantes e para o tratamento de disfunções hepáticas, renais, vesiculares, doenças venéreas e respiratórias (pneumonia, tuberculose e bronquite asmática) (GONZÁLEZ-GUEVARA et al., 2006; CANO; VOLPATO, 2004).

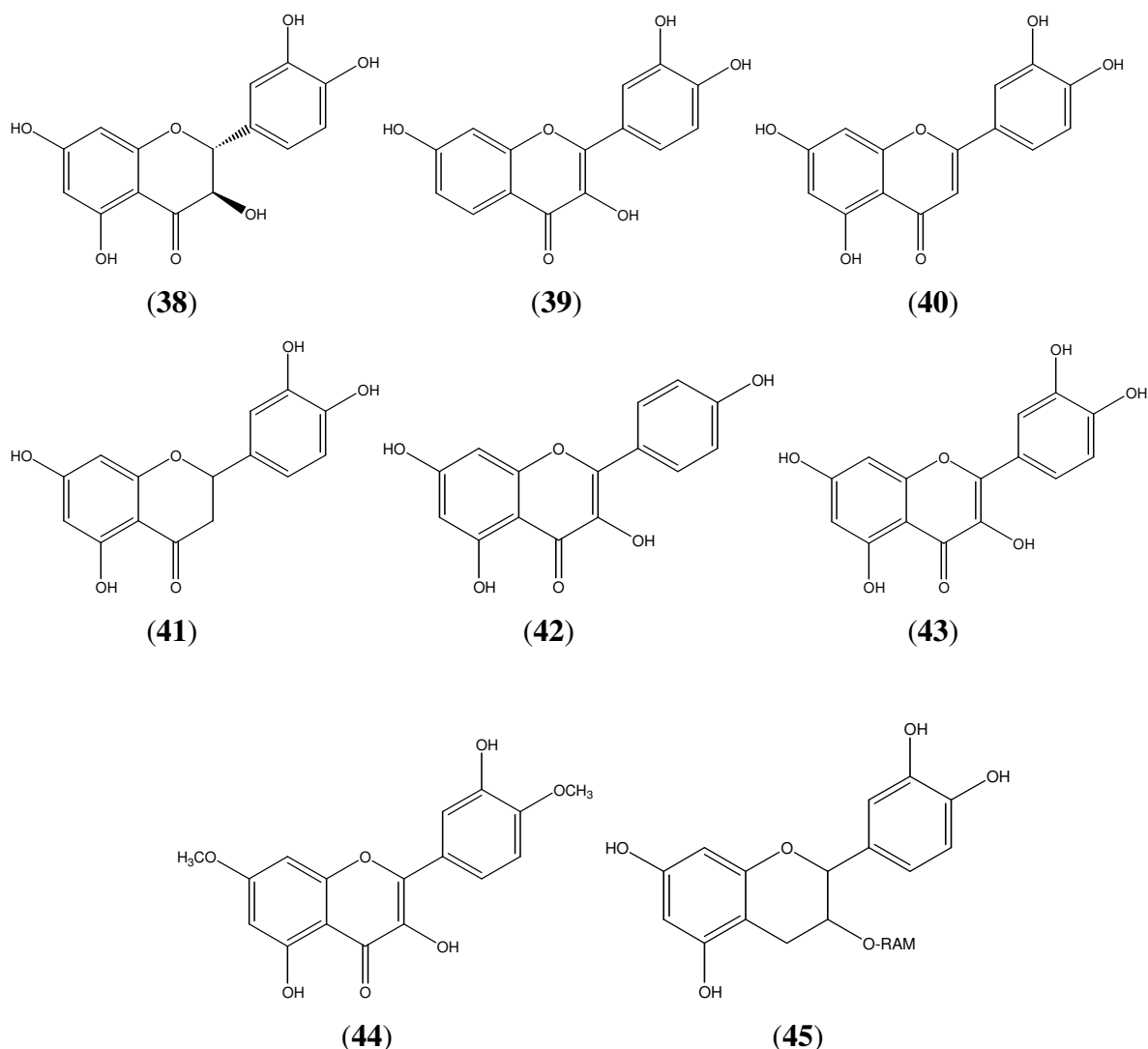
Os resultados da triagem de espécies vegetais ocorrentes em Minas Gerais, realizada por nosso grupo de pesquisa (SERRA, 2004), demonstraram atividade inibidora da ECA para três espécies de *Erythroxylum*, com percentuais de inibição da ordem de  $39,7 \pm 15,7\%$  para *E. gonocladum* (partes aéreas),  $58,6 \pm 1,1\%$  para *E. suberosum* (folhas) e  $30,7 \pm 1,7\%$  para *E. tortuosum* (folhas), utilizando-se ensaio colorimétrico, *in vitro*, na concentração de 0,10 mg/mL. Quando avaliadas em ensaio de inibição da ECA por método em HPLC, na concentração de 0,33 mg/mL, as três espécies apresentaram percentuais de inibição da ordem de 80%. Essas espécies brasileiras foram selecionadas por critério quimiosistemático por serem pertencentes aos mesmos gêneros e/ou famílias de espécies utilizadas como anti-hipertensivas e/ou diuréticas citadas na literatura (SERRA, 2004).

No levantamento bibliográfico realizado, além do trabalho de Serra (2004), não foram encontrados relatos sobre a química e atividades biológicas das espécies selecionadas para o presente trabalho [*E. suberosum* A. St.-Hil., *E. tortuosum* Mart. e *E. gonocladum* (Mart.) O. E. Schulz].

A química do gênero *Erythroxylum* é caracterizada pela presença alcalóides tropânicos e seus derivados (CHIN et al., 2006; GRIFFIN; LIN, 2000), além de flavonóides (CHÁVEZ et al., 1996; JOHNSON et al., 2003). Também foi descrita a ocorrência de diterpenos (ANSELL et al., 1993; SANTOS et al., 2005), taninos (BONEFELD et al., 1986) e triterpenos com esqueleto oleanano e lupano (CHÁVEZ et al., 1996)

Diversos flavonóides já foram isolados de espécies de *Erythroxylum*, sendo mais comuns flavonóis (HEGNAUER, 1981), que se apresentam como 3-*O*-monoglicosídeos de glicose, galactose, arabinose, xilose e ramnose, bem como 3-*O*-diglicosídeos com várias combinações desses açúcares. Embora tenham sido isolados monoglicosídeos de taxifolina (**38**), fisetina (**39**), luteolina (**40**) e eridictiol (**41**) em folhas de coca cultivada, as principais agliconas encontradas no gênero são canferol (**42**), quercetina (**43**) e ombuína (**44**)

(GONZÁLEZ-GUEVARA et al., 2006). Canferol, quercetina e seus derivados 3-*O*-glicosídeos podem ser considerados marcadores quimiotaxonômicos do gênero (INIGO; POMILIO, 1985).



Estudos fitoquímicos realizados com *E. coca* var. *ipadu* (coca amazonense) e *E. australe* F. Muell resultaram no isolamento de diversos *O*-glicosídeos: sete derivados de taxifolina (38), três da quercetina (43), três do eridictiol (41) e três do canferol (42) (JOHNSON et al., 2002, 2003, 2004). A (+) catequina 3-*O*- $\alpha$ -L-ramnopiranosídeo (45) foi isolada da espécie *E. novogranatense* e a presença de proantocianidinas diméricas dos tipos B<sub>1</sub> e B<sub>3</sub> foi demonstrada (BONEFELD et al., 1986). Estudo de Bohn et al. (1988) revelou a ocorrência de derivados 3-*O*-glicosilados de canferol (42) e quercetina (43) na espécie *E. suberosum* A. St.-Hil.

Terpenos e esteróides também são classes frequentemente descritas no gênero *Erythroxylum*. Barreiros et al. (2005) relataram a ocorrência de  $\beta$ -amirina (46), lupeol (47),  $\beta$ -



## **2 PARTE EXPERIMENTAL**

## 2.1 EQUIPAMENTOS, REAGENTES E MATERIAIS DE CONSUMO

### 2.1.1 Equipamentos

- Balança analítica Mettler Toledo, modelo AB204.
- Balança analítica Mettler Toledo, modelo AT201.
- Balança semi-analítica Micronal, modelo B160.
- Banho de ultra-som Thornton, modelo T14.
- Banho de ultra-som Unique, modelo USC 1400.
- Banho maria Fanem, modelo 120/4.
- Bomba de vácuo Fabbe.
- Centrífuga Excelsa Fanem, modelo 205N.
- Coletor de frações Pharmacia, modelo FRAC-100.
- Cromatógrafo líquido de alta eficiência Shimadzu, composto de sistema de controle de bomba modelo SCL-8 A, detector UV-VIS modelo SPD-6AV, bombas modelo LC-8 A e integrador modelo C-R4A.
- Cromatógrafo líquido de alta eficiência Waters<sup>®</sup>, equipado com injetor automático modelo 2695, detector de arranjo de diodos (DAD) modelo 2996, bomba modelo L-6200A e integrador modelo C-R4A.
- Espectrofotômetro Perkin Elmer, modelo Lambda 20.
- Espectrofotômetro Perkin Elmer Precisely, FT-IR.
- Estufa ventilada Fanem.
- Evaporador rotatório Büchi, modelo B-480.
- Geladeira e freezer Bosch.
- Leitor de Elisa Bio-rad, modelo 550.
- Microcentrífuga Cientec, modelo 14000D.
- Micropipetas automáticas monocanal ajustáveis de 5-20 e 20-200 µL, Brand.
- Micropipetas automáticas multicanal de 1-10 µL e monocanal de 200-1000 µL, Eppendorf.
- Moinho de facas Marconi.
- Potenciômetro Marconi, modelo PA200.
- Sistema de filtração de água Milli-Q, Milli-q plus MILIPORE, modelo 1-800.
- Soprador serigráfico Starnel, modelo HL 500.
- Transdutores isométricos Fort10<sup>®</sup> com amplificador TBM4<sup>®</sup> e sistema de aquisição de dados computadorizado CVMS<sup>®</sup>.

### 2.1.2 Reagentes e materiais de consumo

- Acetato de etila P.A., Quimex.
- Acetato de sódio Crist. P.A., Merck.
- Acetilcolina, Sigma.
- Acetona, Sigma.
- Acetonitrila, grau HPLC, Merck.
- Ácido 3,5-dinitrobenzóico, Riedel-de-Haen.
- Ácido acético glacial P.A., Merck.
- Ácido Bórico, P.A., Reagen.
- Ácido clorídrico P.A. Merck
- Ácido (+)-10-canforsulfônico, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA.
- Ácido fórmico P.A., Sigma.
- Ácido picrilsulfônico (TNBS), Sigma.
- Ácido sulfúrico P.A., Quimex.
- Álcool etílico 96° GL, Quimex.
- Anidrido acético, P.A., Reagen.
- Anisaldeído, Merck.
- Bicarbonato de sódio, Vetec.
- Captopril, Calbiochem.
- Carbonato de bismuto, Reagen.
- Cloreto de alumínio P.A., Riedel.
- Cloreto de cálcio diidratado, LabSynth.
- Cloreto de potássio, Vetec.
- Cloreto de sódio, Sigma.
- Cloreto férrico, Ecibra.
- Clorofórmio P.A., Quimex.
- Coluna para HPLC LiChrospher<sup>®</sup> 100, RP-18, com partículas de 5 µm, LiChor-CART<sup>®</sup>, 125 × 4 mm d.i., Merck.
- Coluna semi-preparativa para HPLC Zorbax SB C-18, 250 × 9,4 mm, 5 µm, Agilent.
- Cromatofolhas de sílica gel 60 G em alumínio, Merck.
- d-Glicose anidra, LabSynth.
- Diclorometano P.A., Quimex.
- Difetilboriloxietilamina (NP), Sigma.
- Etanol absoluto P.A., Quimex.

- Fenilefrina, Sigma.
- Ferrocianeto de potássio P.A., Reagen.
- Fosfato de potássio monobásico anidro, Merck.
- HEPES, Sigma.
- Hidróxido de amônio P.A., Merck.
- Hidróxido de potássio, Synth.
- Hidróxido de sódio P.A., Merck.
- Hipuril-glicil-glicina, Merck.
- Indometacina, Calbiochem.
- Iodeto de sódio, Vetec.
- Metanol, grau HPLC, Merck.
- Metanol, P.A., Quimex.
- Metanol, Mallinckrodt, Baker Inc., Phillipsburg, USA.
- Metil éster N $\omega$ -Nitro-L-Arginina (L-NAME), Sigma.
- *n*-Hexano, Quimex.
- Placa de 96 poços, Brand.
- Polietilenoglicol 4000, Merck.
- Pulmão de coelho em pó desidratado por acetona, Continental Produtos Biológicos.
- Sílica gel 60 (0,063-0,200 mm), Merck.
- Sílica gel 60 G para CCD, Merck.
- Sílica gel para coluna (70-230 mesh), Merck.
- Sulfato de magnésio, LabSynth.
- Sulfato de sódio anidro, Merck.
- Tubo de plástico tipo safe-lock, Eppendorf.
- Tungstato de sódio, Sigma.
- Vials de vidro para HPLC com tampas e septos de silicone e politetrafluoretino, Merck.

## 2.2 MATERIAL VEGETAL

O material vegetal foi coletado e identificado pelo Prof. Dr. João Renato Stehmann do Departamento de Botânica, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais. As exsiccatas foram depositadas no herbário BHCB/UFMG (Tabela 1).



**Tabela 1.** Dados da coleta das espécies do gênero *Erythroxylum* selecionadas para o estudo

<b>Espécie parte coletada</b>	<b>Local da coleta</b>	<b>Data</b>	<b>N° da Exsicata (BHCB)</b>
<i>E. suberosum</i> A. St-Hill folhas	Parque da Aeronáutica e Condomínio Vivendas, Lagoa Santa, MG.	10/09/07	111.068
<i>E. tortuosum</i> Mart. folhas	Parque da Aeronáutica, Lagoa Santa, MG.	10/09/07	111.065
<i>E. gonocladum</i> (Mart.) O. E. Schulz partes aéreas	Serra da Piedade, Caeté, MG.	11/07/07	118.812

As folhas e partes aéreas foram lavadas em água corrente e deixadas em estufa ventilada, a 40°C, por quatro dias. Após completa secagem, o material foi pulverizado em moinho de facas e pesado.

### 2.3 OBTENÇÃO DOS EXTRATOS ETANÓLICOS

O material vegetal seco e triturado foi submetido a percolação exaustiva com etanol a 96% e concentrado em evaporador rotatório a 40°C, sob pressão reduzida, até resíduo. O extrato seco foi mantido em dessecador, sob vácuo, até completa eliminação do solvente.

O rendimento extrativo foi calculado pela razão da massa do extrato etanólico seco pela massa do material vegetal coletada (Tabela 2).

**Tabela 2.** Rendimento dos extratos etanólicos brutos das espécies de *Erythroxylum*

<b>Espécie</b>	<b>Material vegetal coletado (g)</b>	<b>Massa do extrato (g)</b>	<b>Rendimento extrativo (%)</b>
<i>E. suberosum</i>	740,00	137,32	18,56
<i>E. tortuosum</i>	694,00	189,01	27,23
<i>E. gonocladum</i>	264,50	62,50	23,63

## **2.4 REVELADORES PARA CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA**

### **2.4.1 Anisaldeído sulfúrico (WAGNER et al., 1984)**

Misturaram-se, nessa ordem e sob resfriamento, 0,5 mL de anisaldeído com 10,0 mL de ácido acético glacial, seguido de 85,0 mL de metanol e 5,0 mL de ácido sulfúrico concentrado (98% p/v). O reagente tem estabilidade limitada e foi armazenado em geladeira (a 4°C).

### **2.4.2 Reagente de dragendorff (WAGNER et al., 1984)**

Uma mistura de 2,6 g de carbonato de bismuto, 7,0 g de iodeto de sódio e 25,0 mL de ácido acético glacial foi aquecida até fervura por alguns minutos. O sistema foi deixado em repouso por uma noite e, após precipitação, filtrado para remoção do acetato de sódio. Para o preparo da solução estoque misturaram-se 20,0 mL do filtrado de coloração avermelhada com 80,0 mL de acetato de etila. O revelador para uso em cromatografia em camada delgada (CCD) foi obtido misturando-se 2,0 mL da solução estoque com 5,0 mL de ácido acético glacial e 12,0 mL de acetato de etila. A solução foi armazenada em geladeira (a 4°C).

### **2.4.3 Reagente para produtos naturais (NP/PEG) (WAGNER et al., 1984)**

Para o preparo da solução de produtos naturais a 2% dissolveram-se 0,2 g de difenilboriloxietilamina (NP) em 10,0 mL de metanol. Essa solução foi armazenada a 4°C até o momento de uso. A solução de polietilenoglicol 5% foi preparada pela dissolução de 0,5 g de polietilenoglicol 4000 (PEG-4000) em 10,0 mL de etanol e armazenada à temperatura ambiente. A placa cromatográfica foi borrifada com solução metanólica a 2% de difenilboriloxietilamina, seguido de solução etanólica a 5% de polietilenoglicol 4000.

### **2.4.4 Hidróxido de potássio 5% (WAGNER et al., 1984)**

A solução foi preparada dissolvendo-se 0,5 g de hidróxido de potássio em 10,0 mL de metanol e armazenada em geladeira, a 4°C.

### **2.4.5 Reagente de Liebermann-Burchard (WAGNER et al., 1984)**

Foram adicionados, cuidadosamente e em banho de gelo, 5,0 mL de anidrido acético e 5,0 mL de ácido sulfúrico concentrado (98% p/v) a 50,0 mL de etanol absoluto. O reagente é bastante instável e foi preparado no momento do uso.

#### **2.4.6 Cloreto férrico 2% (WAGNER et al., 1984)**

A solução de cloreto férrico foi preparada dissolvendo-se 0,2 g de cloreto férrico em 10,0 mL de água. O material foi armazenado a 4°C, em geladeira.

#### **2.4.7 Ferrocianeto de potássio 1% (WAGNER et al., 1984)**

A solução de ferrocianeto de potássio foi preparada dissolvendo-se 0,1 g de ferrocianeto de potássio em 10,0 mL de água e armazenada a 4°C.

#### **2.4.8 Reagente de Kedde (WAGNER et al., 1984)**

Foram misturados 5,0 mL de uma solução etanólica a 3% de ácido-3,5-dinitrobenzóico recém-preparado a 5,0 mL de uma solução de NaOH 2,0 mol/L. O material é bastante instável e foi preparado no momento do uso.

#### **2.4.9 Ácido sulfúrico a 50% (WAGNER et al., 1984)**

A solução de ácido sulfúrico a 50% (v/v) foi preparada pela adição de 5,0 mL de ácido sulfúrico concentrado (98% p/v) a 5,0 mL de metanol, em banho de gelo, e armazenada a 4°C.

### **2.5 ANÁLISE FITOQUÍMICA DOS EXTRATOS**

A presença das principais classes de compostos secundários nos extratos etanólicos brutos das três espécies de *Erythroxylum* foi avaliada qualitativamente por CCD, utilizando-se os reveladores anteriormente citados e placas de sílica gel 60 G Merck como adsorvente, segundo metodologia descrita por Farnsworth (1966), Marine-Bettolo et al. (1981) e Wagner et al. (1984).

#### **2.5.1 Caracterização de taninos e polifenóis**

Empregou-se como fase móvel uma mistura de acetato de etila: ácido fórmico: ácido acético: água (100:11:11:27). A placa foi analisada sob luz visível, após revelação com mistura 1:1 das soluções aquosas de ferrocianeto de potássio 1% e cloreto férrico 2%. O aparecimento de manchas de coloração castanho-avermelhada, violeta, verde, negro-azulada ou azul (visível) foi o parâmetro observado para caracterizar a presença de taninos e polifenóis.

### 2.5.2 Caracterização de heterosídeos flavônicos

A eluição foi feita com acetato de etila: ácido fórmico: ácido acético: água (80:9:9:22). Após revelação com reagente NP/PEG e aquecimento a 100°C por 5 minutos, a placa foi analisada sob luz visível e UV  $\lambda_{366}$  nm. O aparecimento de manchas de coloração amarela (visível) e fluorescência amarelo-esverdeada ou alaranjada (UV  $\lambda_{366}$  nm) foi o parâmetro utilizado para caracterizar a presença de heterosídeos flavônicos.

### 2.5.3 Caracterização de agliconas flavônicas

A mistura de solventes empregada para a eluição foi tolueno: acetona: clorofórmio: ácido acético (40:25:35:25). Após revelação com reagente de produtos naturais (NP/PEG) e aquecimento a 100°C por 5 minutos, a placa foi observada sob luz visível e luz UV  $\lambda_{366}$  nm. O aparecimento de manchas de coloração amarela (visível) e fluorescência amarelo-esverdeada ou alaranjada (UV  $\lambda_{366}$  nm) foi o parâmetro utilizado para caracterizar a presença de agliconas flavônicas.

### 2.5.4 Caracterização de heterosídeos antraquinônicos

A mistura de solventes empregada para a eluição foi acetato de etila: ácido fórmico: ácido acético: água (80:9:9:22). Após revelação com hidróxido de potássio a 5% em MeOH e aquecimento a 100°C por 5 minutos, a placa foi analisada sob luz visível e luz UV  $\lambda_{366}$  nm. O aparecimento de manchas de coloração laranja a vermelho (visível) e fluorescência laranja a vermelho (UV  $\lambda_{366}$  nm) para as antraquinonas, e de manchas de cor amarela (visível) e fluorescência laranja a vermelho (UV  $\lambda_{366}$  nm) para antronas e antróis foram os parâmetros utilizados para caracterizar a presença de heterosídeos antraquinônicos.

### 2.5.5 Caracterização de agliconas antraquinônicas

A fase móvel empregada foi tolueno: acetona: clorofórmio (25:10:10). Após revelação com hidróxido de potássio a 5% em MeOH e aquecimento a 100°C por 5 minutos, a placa foi observada sob luz UV  $\lambda_{366}$  nm. O aparecimento de manchas de coloração laranja a vermelho (visível) e fluorescência laranja a vermelho (UV  $\lambda_{366}$  nm) para as antraquinonas, e de manchas de cor amarela (visível) e fluorescência laranja a vermelho (UV  $\lambda_{366}$  nm) para antronas e antróis foram os parâmetros utilizados para caracterizar a presença de agliconas antraquinônicas.

### **2.5.6 Caracterização de triterpenos e esteróides**

A fase móvel utilizada foi hexano: acetato de etila (80:20). Após revelação com reagente de Liebermann-Burchard e aquecimento a 100°C, por 10 minutos, a placa foi observada sob luz visível e luz UV  $\lambda_{366}$  nm. O aparecimento de manchas roxas ou róseas (visível) foi o parâmetro utilizado para verificar a presença de triterpenos. O aparecimento de manchas azul-esverdeadas ou róseo-azuladas (visível) foi o parâmetro utilizado para verificar a presença de esteróides. As placas também foram avaliadas quanto à fluorescência amarelada (UV  $\lambda_{366}$  nm) comum a triterpenos e esteróides.

### **2.5.7 Caracterização de cumarinas**

A fase móvel utilizada foi tolueno: éter etílico: ácido acético (30:30:30). Após revelação com solução metanólica de hidróxido de potássio a 5% e aquecimento a 100°C por 5 minutos, a placa foi observada sob luz UV  $\lambda_{366}$  nm. O aparecimento de manchas com fluorescência verde azulada ou azul (UV  $\lambda_{366}$  nm) foi o parâmetro utilizado para caracterizar a presença de cumarinas, ressaltando-se que a cumarina não substituída apresenta fluorescência amarelo-esverdeada.

### **2.5.8 Caracterização de saponinas**

A fase móvel utilizada foi clorofórmio: metanol: água (64:50:10). Após revelação com anisaldeído sulfúrico e aquecimento a 100°C por 5 minutos, a placa foi observada sob luz visível. O aparecimento de manchas de coloração azul ou azul-violeta e zonas amareladas (visível) foi o parâmetro utilizado como indicativo da presença de saponinas.

### **2.5.9 Caracterização de heterosídeos cardiotônicos**

A mistura de solventes utilizada para eluição foi acetato de etila: metanol: água (84:11:8). Após revelação com reagente de Kedde, a placa foi analisada sob luz visível. A presença de manchas de coloração rósea ou azul-violácea (visível) foi o parâmetro utilizado como indicativo da presença de heterosídeos cardiotônicos do tipo cardenolídeos. Ressalta-se que bufadienolídeos não reagem e substâncias com anel lactônico são interferentes comumente observados.

### **2.5.10 Caracterização de alcalóides**

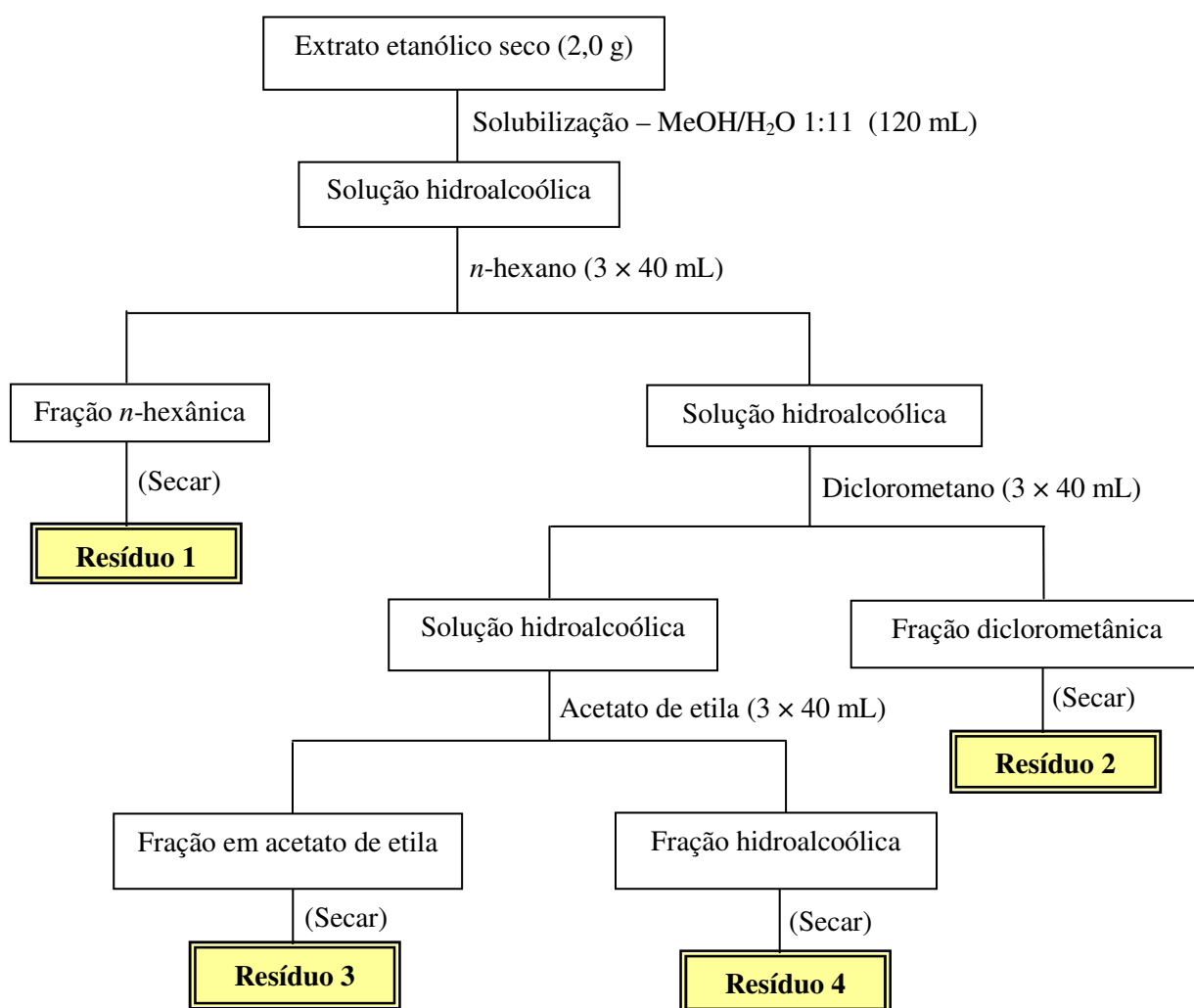
A fase móvel utilizada foi acetato de etila: metanol: água (40:10:20). Após revelação com reagente de Dragendorff, a placa foi observada sob luz visível. O aparecimento de

manchas de coloração marrom ou alaranjada (visível) foi o parâmetro utilizado como indicativo da presença de alcalóides.

### 2.5.11 Caracterização de proantocianidinas

A mistura de solventes utilizada para eluição foi acetato de etila: ácido fórmico: ácido acético: água (100:11:11:27). Após revelação com solução metanólica de ácido sulfúrico a 50% e aquecimento a 100°C, por 5 minutos, a placa foi observada sob luz visível. A presença de proantocianidinas foi caracterizada pelo aparecimento de manchas de coloração negra ou avermelhada (visível).

## 2.6 FRACIONAMENTO PRELIMINAR DOS EXTRATOS



**Figura 4.** Fluxograma do fracionamento preliminar dos extratos etanólicos de *Erythroxylum* por partição entre solventes imiscíveis.

Os extratos etanólicos brutos das três espécies em estudo foram submetidos a fracionamento preliminar mediante partição líquido-líquido. Cerca de 2,0 g de cada extrato foram solubilizados separadamente em solução água:MeOH (11:1) e submetidos a partição sequencial entre solventes imiscíveis, empregando-se *n*-hexano, diclorometano e acetato de etila (Figura 4).

O fracionamento por partição resultou na obtenção de quatro frações principais (*n*-hexânica, diclorometânica, fração em acetato de etila e fração aquosa ou hidroalcoólica). Nos casos em que houve a formação de precipitados ou emulsões estáveis à centrifugação, esse material foi separado e passou a constituir outra fração.

As massas das frações obtidas para cada extrato e os rendimentos correspondentes estão listados nas Tabelas 3, 4 e 5, respectivamente para *E. suberosum*, *E. tortuosum* e *E. gonocladum*.

**Tabela 3.** Frações de *E. suberosum* obtidas da partição entre solventes imiscíveis

<b>Fração</b>	<b>Sigla</b>	<b>Massa (mg)</b>	<b>Rendimento (%)</b>
Precipitado 1	Ppt1-ES <sup>1</sup>	285,20	14,26
Precipitado 2	Ppt2-ES <sup>2</sup>	514,80	25,74
Fração <i>n</i> -hexânica	Hex-ES	43,70	2,19
Fração diclorometânica	DCM-ES	5,50	0,28
Emulsão	EM-ES <sup>3</sup>	43,80	2,19
Fração em acetato de etila	AC-ES	68,90	3,45
Fração hidroalcoólica	AQ-ES	917,80	45,89
<b>Total</b>	<b>-</b>	<b>1.879,70 mg</b>	<b>94,00 %</b>

<sup>1</sup> Precipitado formado durante a partição entre água/metanol (11:1) e *n*-hexano. Caracterizado por cristais escuros e que sofreram decantação no funil de separação.

<sup>2</sup> Precipitado formado durante a partição entre água/metanol (11:1) e *n*-hexano. Caracterizado por partículas esverdeadas que se localizavam na interface entre os dois solventes.

<sup>3</sup> Emulsão estável formada durante a partição entre água/metanol (11:1) e diclorometano. Coloração esbranquiçada e com aspecto esponjoso.

**Tabela 4.** Frações de *E. tortuosum* obtidas da partição entre solventes imiscíveis

<b>Fração</b>	<b>Sigla</b>	<b>Massa (mg)</b>	<b>Rendimento (%)</b>
Fração <i>n</i> -hexânica	Hex-ET	102,40	5,12
Fração diclorometânica	DCM-ET	65,20	3,26
Emulsão	EM-ET <sup>1</sup>	123,40	6,17
Fração em acetato de etila	AC-ET	417,00	20,85
Fração hidroalcoólica	AQ-ET	1.210,20	60,51
<b>Total</b>	<b>-</b>	<b>1.918,20 mg</b>	<b>95,91 %</b>

<sup>1</sup> Emulsão estável formada durante a partição entre água/metanol (11:1) e diclorometano. Coloração esverdeada e com aspecto esponjoso.

**Tabela 5.** Frações de *E. gonocladum* obtidas da partição entre solventes imiscíveis

<b>Fração</b>	<b>Sigla</b>	<b>Massa (mg)</b>	<b>Rendimento (%)</b>
Precipitado	Ppt-EG <sup>1</sup>	848,70	42,44
Fração <i>n</i> -hexânica	Hex-EG	212,90	10,65
Fração diclorometânica	DCM-EG	4,60	0,23
Fração em acetato de etila	AC-EG	118,90	5,95
Fração hidroalcoólica	AQ-EG	694,90	34,75
<b>Total</b>	<b>-</b>	<b>1.880,00 mg</b>	<b>94,02 %</b>

<sup>1</sup> Precipitado formado durante a partição entre água/metanol (11:1) e *n*-hexano. Caracterizado por partículas amarelo-esverdeadas que se localizavam na interface entre os dois solventes.

## 2.7 OBTENÇÃO DOS PERFIS CROMATOGRÁFICOS POR RP-HPLC

A caracterização dos extratos etanólicos foi feita através de perfis cromatográficos obtidos por RP-HPLC analítico.

### 2.7.1 Preparo das amostras

As amostras foram pesadas diretamente em frascos do tipo *safe lock* e solubilizadas em acetonitrila ou metanol grau HPLC. Foram empregadas concentrações de 10 mg/mL para os extratos, 5 mg/mL para as frações e 1 mg/mL para as substâncias isoladas. Todas as amostras foram solubilizadas com auxílio de banho de ultra-som, durante 15 minutos e, em seguida, centrifugadas a 10.000 rpm, por 10 minutos.



Os cromatogramas foram obtidos a partir dos sobrenadantes resultantes, dos quais 10  $\mu$ L foram injetados de forma automática em equipamento de RP-HPLC Waters®.

### 2.7.2 Condições cromatográficas

Para a obtenção dos perfis cromatográficos empregou-se coluna LiChrospher 100 RP-18 (5  $\mu$ m, 250  $\times$  4 mm, d. i.), detecção no UV  $\lambda$  210 nm, fluxo de 1 mL/min e temperatura de 40°C. A eluição foi feita em gradiente linear de acetonitrila: água (Tabela 6). Manteve-se um intervalo de 15 minutos entre cada injeção para reequilibrar a coluna. Foram empregados solventes grau HPLC e água destilada, filtrada em sistema Milli-Q.

**Tabela 6.** Gradiente de eluição empregado na obtenção de perfis cromatográficos por RP-HPLC

Tempo (minutos)	Água (%)	Acetonitrila (%)
0	95	5
60	5	95
65	5	95
70	95	5

### 2.8 FRACIONAMENTO DO EXTRATO ETANÓLICO DE *E. gonocladum*

Visando à obtenção de frações com maior massa, 20,0 g do extrato bruto de *E. gonocladum* foram novamente submetidas a partição entre solventes imiscíveis, conforme metodologia descrita no item 2.6.

As frações obtidas tiveram seu perfil cromatográfico analisado por RP-HPLC a fim de averiguar a reprodutibilidade do método. O resultado revelou que as frações obtidas no fracionamento desses 20,0 g reproduziram o perfil cromatográfico das frações obtidas no fracionamento preliminar de 2,0 g do extrato etanólico. Contudo, observou-se uma pequena variação nos rendimentos, quando comparado ao fracionamento preliminar (Tabela 7).

**Tabela 7.** Frações de *E. gonocladum* (20,0 g) obtidas da partição entre solventes imiscíveis

<b>Fração</b>	<b>Sigla</b>	<b>Massa (g)</b>	<b>Rendimento (%)</b>
Precipitado	Ppt-EG <sup>1</sup>	7,70	38,50
Fração <i>n</i> -hexânica	Hex-EG	2,08	10,38
Fração diclorometânica	DCM-EG	0,08	0,40
Fração em acetato de etila	AC-EG	0,87	4,33
Fração hidroalcoólica	AQ-EG	8,26	41,30
<b>Total</b>	<b>-</b>	<b>18,99 g</b>	<b>94,91 %</b>

<sup>1</sup> Precipitado formado durante a partição entre água/metanol (11:1) e *n*-hexano. Caracterizado por partículas amarelo-esverdeadas que se localizavam na interface entre os dois solventes.

As frações selecionadas para purificação de seus constituintes majoritários foram Ppt-EG, Hex-EG e AC-EG. Essas frações foram ativas no ensaio de inibição da ECA e apresentaram massa suficiente para purificação. As frações DCM-EG e AQ-EG não foram refractionadas.

Foram empregadas técnicas cromatográficas diversas como, por exemplo, partição entre solventes imiscíveis, cromatografia em colunas abertas de sílica gel e sephadex LH-20, cromatografia líquida de alta eficiência de fase reversa (RP-HPLC) em escala preparativa, CCD em escala preparativa, cromatografia em contracorrente de alta velocidade, dentre outras. Algumas dessas técnicas não geraram avanço em termos de purificação e, por esse motivo, não foram aqui detalhadas.

### 2.8.1 Refracionamento de Ppt-EG

Uma porção de 3,0 g de Ppt-EG foi aplicada a uma coluna de vidro preenchida com sílica gel 60 (0,063-0,200 mm/ 70-230 mesh; dimensões da coluna empacotada: 40,0 × 2,0 cm d.i.). Procedeu-se a eluição com solventes de polaridade crescente [*n*-hexano (Hex), diclorometano (DCM), acetato de etila (EtOAc), metanol (MeOH) e água] e as frações resultantes foram avaliadas por CCD, sendo reunidas a partir de semelhanças em seus perfis cromatográficos. As frações foram agrupadas em 19 grupos (Tabela 8).

**Tabela 8.** Refracionamento de PptEG (3,0 g) em coluna de sílica gel

<b>Fração</b>	<b>Eluente</b>	<b>Volume (L)</b>	<b>Massa (mg)</b>	<b>Rendimento (%)</b>
PptEG 1 A	Hex	0,30	2,00	0,07
PptEG 2 A	DCM	0,30	23,00	0,77
PptEG 3-6 A	DCM	1,20	160,10	5,34
PptEG 7-11 A	DCM:EtOAc (9:1)	1,50	53,30	1,78
PptEG 12-18 A	DCM:EtOAc (8:2)	2,10	13,60	0,45
PptEG 19-21 A	DCM:EtOAc (6:4)	0,90	6,30	0,21
PptEG 22-27 A	DCM:EtOAc (4:6)	1,80	15,80	0,53
PptEG 28-31A	DCM:EtOAc (2:8)	1,20	8,50	0,28
PptEG 32-33A	DCM:EtOAc (1:9)	0,60	118,20	3,94
PptEG 34-39A	EtOAc	1,80	700,00	23,33
PptEG 40-46A	EtOAc:MeOH (9:1)	2,10	800,00	26,67
PptEG 47-51A	EtOAc:MeOH (8:2)	1,50	134,80	4,49
PptEG 52-60A	EtOAc:MeOH (8:2)	2,70	119,40	3,98
PptEG 61-65A	EtOAc:MeOH (6:4)	1,50	103,70	3,46
PptEG 66A	EtOAc:MeOH (4:6)	0,30	38,20	1,27
PptEG 67-71A	EtOAc:MeOH (4:6)	1,50	56,20	1,87
PptEG 72-76A	EtOAc:MeOH (2:8)	1,50	51,50	1,72
PptEG 77-79A	MeOH	0,90	36,50	1,22
PptEG 80A	Água	0,30	337,50	11,25
<b>Total</b>	<b>-</b>	<b>24,00</b>	<b>2.778,60</b>	<b>92,62 %</b>

A fração PptEG 34-39A (700,0 mg) apresentou-se como um sólido amorfo e esbranquiçado. Sua análise por CCD de sílica gel mostrou a presença da substância majoritária observada no perfil cromatográfico do extrato etanólico da espécie. Assim, a fração PptEG 34-39A foi refraçada por cromatografia flash em coluna de sílica gel 60 (0,040-0,063 mm/ 230-400 mesh; dimensões da coluna empacotada: 25,0 × 2,5 cm d.i.). Procedeu-se a eluição com solventes de polaridade crescente [*n*-hexano (Hex), diclorometano (DCM), acetato de etila (EtOAc) e metanol (MeOH)] e as 48 frações resultantes foram avaliadas por CCD, sendo reunidas a partir de semelhanças em seus perfis cromatográficos. As frações foram agrupadas em 9 grupos (Tabela 9).

**Tabela 9.** Refracionamento de PptEG 34-39A (700,0 mg) em coluna de sílica gel

<b>Fração</b>	<b>Eluente</b>	<b>Volume (L)</b>	<b>Massa (mg)</b>	<b>Rendimento (%)</b>
PptEG 1-13B	Hex a DCM:EtOAc (4:6)	3,90	27,00	3,86
PptEG 14-18B	DCM:EtOAc (3:7)	1,50	225,00	32,14
PptEG 19-26B	DCM:EtOAc (1:9)	2,40	159,10	22,73
PptEG 27B	EtOAc	0,30	59,00	8,43
PptEG 28-30B	EtOAc:MeOH (9:1)	0,90	43,30	6,18
PptEG 31B	EtOAc:MeOH (8:2)	0,30	33,50	4,79
PptEG 32-39B	EtOAc:MeOH (6:4)	2,40	40,00	5,71
PptEG 40-45B	EtOAc:MeOH (2:8)	1,80	36,00	5,14
PptEG 46-48B	MeOH	0,90	41,10	5,87
<b>Total</b>	<b>-</b>	<b>14,40</b>	<b>664,00</b>	<b>94,86 %</b>

A fração PptEG 14-18B (225,0 mg) foi submetida a purificação por RP-HPLC preparativo. O material foi fracionado em porções de 20,0 mg e dissolvido em 1,0 mL de MeOH: água (60:40). A solução resultante foi centrifugada a 10.000 rpm por 10 minutos e, então, injetada manualmente em sistema de RP-HPLC. Empregou-se coluna Agilent Zorbax SB-C18 em cromatógrafo líquido de alta eficiência (RP-HPLC) Shimadzu em escala preparativa. Foram utilizadas, como fases móveis, uma solução aquosa de MeOH a 10% e, num segundo momento, MeOH 100%, com fluxo de 1mL/min e detecção no UV  $\lambda$  210 nm.

A eluição com solução metanólica a 10% gerou as 3 primeiras frações. A análise por CCD revelou que, nessas condições, a substância de interesse não havia sido deslocada da coluna cromatográfica. A coluna foi, então, lavada com metanol 100% a fim de deslocar todo o material retido. Foram obtidas mais 4 frações, totalizando 7 frações (Tabela 10).

**Tabela 10.** Refracionamento da fração PptEG 14-18B (225,0 mg) em RP-HPLC preparativo

<b>Fração</b>	<b>Eluente</b>	<b>Volume (mL)</b>	<b>Massa (mg)</b>	<b>Rendimento (%)</b>
PptEG 1C	Metanol:água (1:9)	20,00	3,00	1,33
PptEG 2C	Metanol:água (1:9)	20,00	1,00	0,44
PptEG 3C	Metanol:água (1:9)	20,00	1,00	0,44
PptEG 4C	MeOH	20,00	92,00	40,90
PptEG 5C	MeOH	20,00	20,00	8,90
PptEG 6C	MeOH	20,00	23,00	10,22
PptEG 7C	MeOH	20,00	27,00	12,00
<b>Total</b>	<b>-</b>	<b>14,40</b>	<b>167,00</b>	<b>74,22 %</b>

As frações resultantes dessa etapa foram analisadas por CCD. A fração PptEG 4C (92,0 mg) apresentou duas manchas principais, sendo uma delas a substância majoritária observada no extrato. O material foi reaplicado no RP-HPLC preparativo Shimadzu empregando-se, como eluente, solução MeOH: água (6:4) e detecção no UV  $\lambda$  250 nm. Dessa etapa, obtiveram-se duas frações PptEG 1D e PptEG 2D (Tabela 11).

**Tabela 11.** Refracionamento da fração PptEG 4C (92,0 mg) em RP-HPLC preparativo

<b>Fração</b>	<b>Eluente</b>	<b>Volume (mL)</b>	<b>Massa (mg)</b>	<b>Rendimento (%)</b>
PptEG 1D	Metanol:água (6:4)	20,00	38,00	41,30
PptEG 2D	Metanol:água (6:4)	20,00	22,00	23,91
<b>Total</b>	<b>-</b>	<b>14,40</b>	<b>60,00</b>	<b>65,22 %</b>

A análise dessas frações por CCD revelou que a fração PptEG 2D (22,0 mg de um sólido com coloração levemente amarelada) apresentava mancha única e  $R_f$  coincidente com o da substância majoritária observada no extrato etanólico. O perfil cromatográfico obtido em RP-HPLC Waters<sup>®</sup>, no entanto, revelou que a substância não estava totalmente pura. A fração PptEG 2D foi submetida, novamente, a purificação por RP-HPLC preparativo. Utilizou-se como eluente uma solução metanólica a 50%, fluxo de 1 mL/min e detecção no UV  $\lambda$  250 nm, resultando em 5 frações (Tabela 12).

**Tabela 12.** Refracionamento da fração PptEG 2D (22,0 mg) em RP-HPLC preparativo

<b>Fração</b>	<b>Eluente</b>	<b>Volume (mL)</b>	<b>Massa (mg)</b>	<b>Rendimento (%)</b>
PptEG 1E	Metanol:água (1:1)	20,00	1,00	4,55
PptEG 2E	Metanol:água (1:1)	20,00	2,00	9,10
PptEG 3E	Metanol:água (1:1)	20,00	14,00	63,64
PptEG 4E	Metanol:água (1:1)	20,00	3,00	13,63
PptEG 5E	Metanol:água (1:1)	20,00	1,00	4,55
<b>Total</b>	<b>-</b>	<b>14,40</b>	<b>21,00</b>	<b>95,45 %</b>

A análise por CCD revelou que a substância de interesse havia se concentrado na fração PptEG 3E (14,0 mg). O sólido branco oriundo da raspagem dos frascos utilizados para coleta foi denominado PptEG-produto (11,0 mg) e encaminhado para análise espectrométrica.

### 2.8.2 Refracionamento de Hex-EG

A análise por CCD da fração *n*-hexânica (Hex-EG, 2,08 g) obtida do fracionamento de *E. gonocladum* (item 2.8) revelou a presença de duas manchas principais, sendo selecionada para purificação. Essa fração foi aplicada em uma coluna de vidro preenchida com sílica gel 60 (0,063-0,200 mm/ 70-230 mesh; dimensões da coluna empacotada: 40,0 × 2,0 cm d.i.). Procedeu-se a eluição com solventes de polaridade crescente [*n*-hexano (Hex), diclorometano (DCM), acetato de etila (EtOAc), metanol (MeOH) e água] e as frações resultantes foram avaliadas por CCD, sendo reunidas a partir de semelhanças em seus perfis cromatográficos. As frações foram agrupadas em 46 grupos (Tabela 13).

**Tabela 13.** Refracionamento da fração HexEG (2,08 g) em coluna de sílica gel

<b>Fração</b>	<b>Eluente</b>	<b>Volume (L)</b>	<b>Massa (mg)</b>	<b>Rendimento (%)</b>
HexEG 1A	Hex	0,20	47,20	2,27
HexEG 2A	Hex:DCM (9,9:0,1)	0,20	6,80	0,33
HexEG 3A	Hex:DCM (9,9:0,1)	0,20	5,00	0,24
HexEG 4A	Hex:DCM (9,9:0,1)	0,20	4,50	0,21
HexEG 5A	Hex:DCM (9,9:0,1)	0,20	3,10	0,15
HexEG 6A	Hex:DCM (9,9:0,1)	0,20	3,30	0,16
HexEG 7A	Hex:DCM (9,75:0,25)	0,50	3,60	0,17
HexEG 8A	Hex:DCM (9,5:0,5)	0,50	18,60	0,90
HexEG 9A	Hex:DCM (9:1)	0,50	132,70	6,40
HexEG 10A	Hex:DCM (8,5:1,5)	0,20	149,70	7,21
HexEG 11A	Hex:DCM (8,5:1,5)	0,20	25,30	1,22
HexEG 12A	Hex:DCM (8,5:1,5)	0,30	177,30	8,54
HexEG 13A	Hex:DCM (8:2)	0,20	319,40	15,39
HexEG 14A	Hex:DCM (8:2)	0,20	68,90	3,32
HexEG 15A	Hex:DCM (8:2)	0,40	48,70	2,35
HexEG 16A	Hex:DCM (8:2)	0,20	8,70	0,42
HexEG 17-24A	Hex:DCM (6:4)	1,60	43,50	2,10
HexEG 25A	Hex:DCM (6:4)	0,40	27,20	1,31
HexEG 26-30A	Hex:DCM (5:5)	1,00	14,80	0,71
HexEG 31A	Hex:DCM (4:6)	0,20	44,50	2,14
HexEG 32-38A	Hex:DCM (3:7)	1,40	55,80	2,69

**Continua**

(continuação) Tabela 13. Refracionamento da fração HexEG (2,08 g) em coluna de sílica gel

Fração	Eluente	Volume (L)	Massa (mg)	Rendimento (%)
HexEG 39A	Hex:DCM (3:7)	0,20	18,00	0,87
HexEG 40A	Hex:DCM (3:7)	0,20	10,80	0,52
HexEG 41-42A	Hex:DCM (3:7)	0,40	8,10	0,39
HexEG 43-44A	Hex:DCM (1,5:8,5)	0,40	22,60	1,09
HexEG 45-47A	DCM	0,60	16,80	0,81
HexEG 48A	DCM:EtOAc (9,5:0,5)	0,20	41,40	2,00
HexEG 49A	DCM:EtOAc (9,5:0,5)	0,20	13,10	0,63
HexEG 50-51A	DCM:EtOAc (9,5:0,5)	0,40	21,40	1,03
HexEG 52A	DCM:EtOAc (7,5:2,5)	0,20	42,80	2,06
HexEG 53A	DCM:EtOAc (7,5:2,5)	0,20	38,60	1,86
HexEG 54A	DCM:EtOAc (7,5:2,5)	0,20	7,50	0,36
HexEG 55A	DCM:EtOAc (7,5:2,5)	0,20	9,50	0,45
HexEG 56A	DCM:EtOAc (5:5)	0,20	33,40	1,61
HexEG 57A	DCM:EtOAc (5:5)	0,20	10,80	0,52
HexEG 58A	DCM:EtOAc (5:5)	0,20	12,00	0,58
HexEG 59A	DCM:EtOAc (5:5)	0,20	10,90	0,53
HexEG 60A	DCM:EtOAc (2,5:7,5)	0,20	10,40	0,50
HexEG 61A	DCM:EtOAc (2,5:7,5)	0,20	9,90	0,47
HexEG 62A	EtOAc	0,20	9,10	0,43
HexEG 63A	EtOAc	0,20	10,50	0,51
HexEG 64A	EtOAc:MeOH (5:5)	0,30	74,30	3,58
HexEG 65A	EtOAc:MeOH (5:5)	0,30	147,80	7,12
HexEG 66A	MeOH	0,20	25,90	1,25
HexEG 67A	MeOH	0,20	33,40	1,61
HexEG 68A	Água	0,20	7,70	0,37
<b>Total</b>	-	<b>15,20</b>	<b>1.855,30</b>	<b>89,40 %</b>

A análise por CCD utilizando como fase móvel *n*-hexano/diclorometano (9:1), anisaldeído e reagente de Liebermann-Burchard como reveladores, indicou a presença de uma mancha única na fração HexEG 9A (132,7 mg), sugerindo uma substância pura. O sólido foi submetido à análise espectroscópica, visando a sua elucidação estrutural.

### 2.8.2.1 Refracionamento de HexEG 17-24A

A fração HexEG 17-24A (43,5 mg) mostrou-se enriquecida na outra mancha majoritária observada no perfil cromatográficos por CCD da fração *n*-hexânica de *E. gonocladum*. O material foi refractionado em coluna de sílica gel 60 (0,063-0,200 mm/ 70-230 mesh; dimensões da coluna empacotada: 16,0 × 1,0 cm d.i.). Procedeu-se à eluição com solventes de polaridade crescente [*n*-hexano (Hex), diclorometano (DCM), acetato de etila (EtOAc) e metanol (MeOH)]. Após análise por CCD de sílica gel, as frações foram reunidas de acordo com suas semelhanças e originaram 15 grupos (Tabela 14).

**Tabela 14.** Refracionamento de HexEG 17-24A (43,5 mg) em coluna de sílica gel

Fração	Eluente	Volume (L)	Massa (mg)	Rendimento (%)
HexEG 1-5B	Hex:DCM (9,5:0,5)	0,10	1,20	2,76
HexEG 6-7B	Hex:DCM (9:1)	0,04	1,20	2,76
HexEG 8-24B	Hex:DCM (7,5:2,5)	0,34	0,60	1,38
HexEG 25-32B	Hex:DCM (7:3)	0,16	1,50	3,45
HexEG 33-40B	Hex:DCM (6,5:3,5)	0,16	1,30	2,99
HexEG 41-64B	Hex:DCM (3:7)	0,48	31,80	73,10
HexEG 65-70B	Hex:DCM (1:9)	0,12	0,10	0,23
HexEG 71-77B	DCM:EtOAc (8:2)	0,14	1,90	4,37
HexEG 78-81B	DCM:EtOAc (8:2)	0,08	1,00	2,30
HexEG 82B	DCM:EtOAc (5:5)	0,02	0,10	0,23
HexEG 83B	DCM:EtOAc (5:5)	0,02	0,30	0,69
HexEG 84B	DCM:EtOAc (5:5)	0,02	0,20	0,46
HexEG 85B	MeOH	0,02	0,10	0,23
HexEG 86B	MeOH	0,02	0,10	0,23
HexEG 87B	MeOH	0,02	0,20	0,46
<b>Total</b>	-	<b>1,74</b>	<b>41,60</b>	<b>95,63 %</b>

A fração HexEG 41-64B (31,8 mg) concentrava a substância de interesse. O material foi refractionado por cromatografia flash em coluna de sílica gel 60 (0,040-0,063 mm/ 230-400 mesh; dimensões da coluna empacotada: 10,0 × 1,0 cm d.i.). A eluição foi efetuada sob pressão positiva, com solventes de polaridade crescente [*n*-hexano (Hex), diclorometano (DCM), acetato de etila (EtOAc) e metanol (MeOH)], originando 7 grupos após reunião segundo perfis por CCD de sílica gel (Tabela 15).



**Tabela 15.** Refracionamento de HexEG 41-64B (31,8 mg) em coluna de sílica gel

<b>Fração</b>	<b>Eluente</b>	<b>Volume (L)</b>	<b>Massa (mg)</b>	<b>Rendimento (%)</b>
HexEG 1C	Hex	0,20	1,00	3,14
HexEG 2C	Hex:DCM (7:3)	0,20	4,00	12,58
HexEG 3C	Hex:DCM (6:4)	0,20	10,00	31,45
HexEG 4C	Hex:DCM (5:5)	0,20	1,00	3,14
HexEG 5C	Hex:DCM (4:6)	0,20	4,30	13,52
HexEG 6C	EtOAc	0,20	2,30	7,23
HexEG 7C	MeOH	0,20	3,00	9,43
<b>Total</b>	-	<b>1,40</b>	<b>25,60</b>	<b>80,50 %</b>

A análise por CCD da fração HexEG 3C (10,0 mg), utilizando-se *n*-hexano/ acetato de etila (9:1) como eluente e anisalaldeído como revelador, indicou a presença de uma mancha única. O material apresentou-se como um sólido branco e foi submetido a análise espectroscópica para elucidação estrutural.

### 2.8.3 Refracionamento de AC-EG

A fração em acetato de etila (0,87 g) obtida do fracionamento do extrato bruto (item 2.8) foi refraçada empregando-se diferentes procedimentos cromatográficos, incluindo coluna de sílica gel, coluna de Sephadex LH 20 e RP-HPLC em escala preparativa. O fracionamento contínuo gerou frações complexas e com massas pequenas, o que inviabilizou o isolamento dos constituintes.

## 2.9 ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL DAS SUBSTÂNCIAS ISOLADAS

### 2.9.1 Espectroscopia no ultravioleta para elucidação estrutural de flavonóides

#### 2.9.1.1 Aditivos empregados no ensaio (MABRY et al., 1970)

- a) Solução de metóxido de sódio a 2,5% (p/v): dissolveram-se 2,5 g de hidróxido de sódio em 100,0 mL de metanol, sob resfriamento. O material foi armazenado a 20 °C.
- b) Solução de cloreto de alumínio 5% (p/v): dissolveram-se 5,0 g de cloreto de alumínio em 100,0 mL de metanol, sob resfriamento. Armazenou-se a 20°C.

- c) Solução de ácido clorídrico a 50% (v/v): 50,0 mL de ácido clorídrico foram misturados com 100,0 mL de água destilada. O material foi armazenado a 20°C.
- d) Solução saturada de ácido bórico: saturou-se, à temperatura ambiente, 100,0 mL de metanol com ácido bórico. Armazenou-se a 20°C.

### **2.9.1.2 Obtenção dos espectros em UV**

Para a obtenção dos espectros no ultravioleta utilizou-se espectrofotômetro Perkin Elmer Lambda 20, equipado com impressora HP870Cxi. Os espectros foram obtidos à temperatura de 25°C, em cubetas de quartzo com caminho ótico de 1 cm e abertura de fenda de 2 mm. A varredura foi efetuada entre 200 e 500 nm, empregando MeOH, grau HPLC, como branco.

As amostras foram solubilizadas em MeOH grau HPLC, na concentração de 1% p/v, constituindo a solução estoque (MABRY et al., 1970). Os espectros foram obtidos como descrito a seguir.

#### **A. Espectro em metanol**

O espectro em metanol foi obtido a partir da varredura de 2-3 mL da solução estoque.

#### **B. Espectro em presença de metóxido de sódio**

Obeve-se o espectro imediatamente após a adição de três gotas de solução de metóxido de sódio a 2,5% à amostra na leitura em A. Após 5 minutos, efetuou-se nova varredura para detectar possível decomposição da amostra. No mesmo sistema, adicionaram-se algumas gotas de solução de HCl a 50% à mistura e a leitura foi feita imediatamente. Ao final a solução foi descartada.

#### **C. Espectro em presença de cloreto de alumínio**

O espectro foi obtido imediatamente após a adição de seis gotas de solução de cloreto de alumínio a 5% a 2-3 mL da solução estoque.

#### **D. Espectro em presença de cloreto de alumínio e ácido clorídrico**

Efetuoou-se a varredura imediatamente após a adição de três gotas de solução de ácido clorídrico a 50% v/v à solução preparada em C. A solução da cubeta foi descartada após a leitura.

### **E. Espectro em presença de acetato de sódio**

Adicionou-se, com agitação, excesso de acetato de sódio anidro pulverizado a 2-3 mL de solução estoque, até formar-se uma camada de aproximadamente 2 mm de acetato de sódio no fundo da cubeta. Foram realizadas duas varreduras: a primeira após 2 minutos da adição e a segunda após 5-10 minutos. Esta última foi efetuada para verificar eventual decomposição da amostra.

### **F. Espectro em presença de acetato de sódio e ácido bórico**

Adicionaram-se cinco gotas de solução saturada de ácido bórico à solução preparada em E, efetuando-se a varredura na seqüência. Ao final, a solução da cubeta foi descartada.

### **2.9.2 Ressonância Magnética Nuclear (RMN)**

Os espectros de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  foram obtidos pelo Prof. José Dias de Souza Filho, Departamento de Química, ICEX, UFMG, em equipamento Bruker Avance DRX400 (400 MHz), a 25°C. Utilizou-se tetrametilsilano (TMS) como referência interna, para ambos os núcleos. As amostras foram solubilizadas em solvente adequado (metanol deuterado-  $\text{CD}_3\text{OD}$ , para as amostras de maior polaridade e clorofórmio deuterado-  $\text{CDCl}_3$ , para as amostras de menor polaridade).

### **2.9.3 Infravermelho (IV)**

Os espectros no IV foram obtidos pela Técnica Raquel Isidório, Laboratório de Química Farmacêutica, FAFAR, UFMG, em espectrofotômetro Perkin Elmer Precisely, Fourier Transform (FT-IR) Spectrometer – Spectrum one.

### **2.9.4 Micro-hidrólise em placa cromatográfica de sílica gel**

A substância PptEg-produto foi submetida a micro-hidrólise em placa cromatográfica de sílica gel. O método consistiu em se dissolver uma alíquota da amostra a ser hidrolisada em metanol e aplicar em placa de CCD com o auxílio de um capilar. A placa foi, então, colocada em uma cuba saturada com vapor de ácido clorídrico concentrado e, após uma hora, retirada da cuba e deixada por 2 horas na capela de exaustão. Em seguida, a placa foi colocada em estufa a 80°C e, após ativação, os padrões dos açúcares (ramnose e fucose) foram aplicados. Utilizou-se como eluente clorofórmio: metanol: água (70:30:4) e anisaldeído como revelador (WAGNER et al., 1984).

### 2.9.5 Análise por cromatografia gasosa (CG)

A substância HexEG 9A foi submetida à análise por CG, realizada pela Dra. Vany Ferraz, Laboratório de Cromatografia, Departamento de Química, Universidade Federal de Minas Gerais. As análises foram realizadas em sistema de Cromatografia Gasosa de Alta Resolução Varian, Modelo CP-3380, empregando coluna DB-Wax (30 m × 0,25 mm d.i.; J & W Scientific), temperatura da coluna: 100°C - 1 minuto, 7°C/ minuto até 240°C; temperatura do injetor: 260°C; Split 1/100; detector FID a 260°C; volume de injeção 1 µL.

Procedeu-se à metilação da amostra a fim de tornar os componentes volatilizáveis para análise por CG. Para a metilação, 100,0 µL de uma solução metanólica de BF<sub>3</sub> (14% p/v) foram adicionados a um tubo *safe lock* contendo 1,0 mg de amostra. O tubo foi fechado e mantido em banho-maria a 80°C por 10 minutos. Em seguida, uma alíquota foi retirada (2,0µL) e injetada no cromatógrafo, utilizando-se nitrogênio como gás de arraste. Uma mistura de ácidos graxos livres de referência (PADRÃO SUPELCO37) foi injetada nas mesmas condições, para comparação dos tempos de retenção e identificação dos constituintes da amostra.

### 2.9.6 Dicroísmo circular

A configuração absoluta de PptEG-produto foi estabelecida a partir do espectro de dicroísmo circular. Os experimentos foram realizados pelo Dr. Thiago Rennó dos Mares-Guia, Departamento de Bioquímica, Instituto de Química, Universidade de São Paulo. Os espectros foram obtidos em espectropolarímetro JASCO J-715 (*Jasco Inc., Easton, USA*), equipado com controlador de temperatura do tipo Peltier. O instrumento foi calibrado utilizando-se ácido (+)-10-canforsulfônico (CHEN; YANG, 1977).

Os espectros foram registrados no intervalo entre  $\lambda$  220-400 nm, a 25°C, utilizando células com caminho ótico de 0,1 cm. PptEG-produto foi dissolvido em MeOH até a concentração final de 0,125 mg/mL. A solução foi agitada e incubada à temperatura ambiente por 10 min antes da obtenção de cada espectro. Os espectros representam a média de 8 varreduras efetuadas na velocidade de 10 nm/min, com largura de banda de  $\lambda$  0,5-1 nm e tempo constante de 2 segundos. Após subtração do branco e suavização, os dados do dicroísmo circular foram expressos em unidades de dicroísmo circular molar. O *software* Spectra Manager (Jasco) foi usado para processamento e análise dos dados.

## **2.10 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE INIBIDORA DA ECA POR ENSAIO COLORIMÉTRICO**

### **2.10.1 Soluções utilizadas no ensaio**

#### **2.10.1.1 Tampão fosfato pH 8,3 (50 mmol/L)**

A solução de tampão fosfato pH 8,3, utilizada para solubilizar o pulmão de coelho, foi preparada pesando-se 170,1 mg de fosfato de potássio anidro, que foram transferidos para um balão volumétrico de 25,0 mL. Após completa solubilização em 20,0 mL de água ultra purificada, o pH foi ajustado para 8,3 com solução de NaOH a 10% e o volume completado para 25,0 mL.

#### **2.10.1.2 Solução de hipuril-glicil-glicina (Hip-gly-gly) (100 mmol/L)**

Uma porção de 146,65 mg de hip-gly-gly foi transferida para um balão volumétrico de 5,0 mL e solubilizada com 1,25 mL de  $\text{NH}_4\text{OH}$  0,2 M. Após completa solubilização, o volume foi completado para 5,0 mL com água ultra purificada e a solução armazenada a  $-20^\circ\text{C}$  até o momento do uso.

#### **2.10.1.3 Solução de ácido picrilsulfônico (TNBS) (69,24 mmol/L)**

Para o preparo da solução, 2030  $\mu\text{L}$  de TNBS foram pipetados e transferidos para um balão volumétrico de 5,0 mL. O volume foi completado com água ultra purificada e a solução armazenada a  $-20^\circ\text{C}$  até o momento do uso.

#### **2.10.1.4 Tampão HEPES-NaCl pH 8,15**

A um balão de 25,0 mL foram adicionados 297,5 mg de HEPES (50 mmol/L), 438,75 mg de NaCl (300 mmol/L) e 1420,0 mg de  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  (400 mmol/L). Após completa dissolução em 20,0 mL de água ultra purificada (e, caso necessário, com adição de 50,0  $\mu\text{L}$  de solução saturada de NaOH), o pH da solução foi ajustado para 8,15 com solução de NaOH a 10%, sendo o volume completado com água ultra purificada. A solução foi armazenada a  $-20^\circ\text{C}$ .

#### **2.10.1.5 Solução de captopril (64 mmol/L)**

Pesaram-se 69,54 mg de captopril que foram transferidos para um balão volumétrico de 5,0 mL. O volume foi completado com água ultra purificada e a solução armazenada a  $-20^\circ\text{C}$ .

A solução de captopril 10  $\mu\text{mol/L}$  foi preparada por diluição seriada da solução estoque (64  $\text{mmol/L}$ ) no momento do uso.

#### **2.10.1.6 Tampão HEPES-NaCl pH 8,0**

Para a solubilização da ECA foi utilizada uma solução tamponada composta por 1.192,0 mg de HEPES (50  $\text{mmol/L}$ ) e 1.752,0 mg de NaCl (300  $\text{mmol/L}$ ) dissolvidos em cerca de 80,0 mL de água ultra purificada. O pH foi ajustado para 8,0 com NaOH 10% e o volume completado com água ultra purificada para 100,0 mL. A solução foi armazenada a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

#### **2.10.1.7 Solução de ácido sulfúrico (0,33 mol/L)**

Uma solução a 0,33  $\text{mol/L}$  de ácido sulfúrico foi preparada adicionando-se 1,79 mL de ácido sulfúrico concentrado (98% p/v) a um balão volumétrico de 100,0 mL, completando-se o volume com água ultra purificada. A solução foi armazenada à temperatura ambiente, em frasco âmbar.

#### **2.10.1.8 Tampão fosfato para reação de acoplamento pH 8,5 (100 mmol/L)**

A um balão volumétrico de 25,0 mL foram adicionados 340,2 mg de fosfato de potássio anidro. Após completa solubilização em 20,0 mL de água ultra purificada, o pH da solução foi ajustado para 8,5 com solução de NaOH a 10%. O volume foi então completado para 25,0 mL.

#### **2.10.1.9 Solução de tungstato de sódio (100g/L)**

A solução de tungstato de sódio foi preparada pela adição de 1,0 g de tungstato de sódio a um balão volumétrico de 10,0 mL seguido de completa dissolução com água ultra purificada.

#### **2.10.1.10 Solução de pulmão de coelho (200 mg/mL)**

Uma porção de 1,0 mg de pó de pulmão de coelho foi solubilizada em 5,0 mL de solução tampão fosfato pH 8,3 (50  $\text{mmol/L}$ ), em um tubo de centrífuga. A mistura foi centrifugada a 10.000 rpm por 40 min. Formam-se três camadas (tecido esponjoso, solução avermelhada e resíduo). Com o auxílio de uma micropipeta, retirou-se a camada líquida de coloração avermelhada, que foi transferida para tubo *safe lock* e novamente centrifugada a 2.000 rpm por 10 min. Essa solução estoque foi armazenada a  $4^{\circ}\text{C}$ , por até três meses.

#### **2.10.1.11 Solução de pulmão de coelho (100 mg/mL)**

A solução estoque de pulmão de coelho a 200 mg/mL foi submetida à diluição no momento do ensaio. Para tanto, 500,0 µL de tampão fosfato pH 8,3 foram adicionados a 500,0 µL da solução estoque de pulmão de coelho. A solução foi armazenada a 5°C até o momento do uso.

#### **2.10.1.12 Solução de plasma de rato**

Os animais foram sacrificados por decaptação e o sangue coletado e centrifugado a 5000 rpm por 10 minutos. O soro resultante foi separado e armazenado a 4°C até o momento do uso.

### **2.10.2 Protocolo do ensaio de inibição da ECA utilizando pulmão de coelho como fonte da enzima**

A amostra a ser analisada foi preparada pela dissolução de 1,1 mg do material em 1,0 mL de solução MeOH : HEPES pH 8,0 (1:4). O material foi solubilizado com auxílio de banho de ultra-som por 15 minutos e centrifugado a 2.000 rpm por 10 min. O sobrenadante foi coletado e utilizado no ensaio.

Adicionaram-se 10,0 µL de solução de pulmão de coelho (100 mg/mL) a um poço de placa de microtitulação com fundo em V, contendo 10,0 µL de solução da amostra (1,1 mg/mL) a ser ensaiada. O controle negativo foi preparado substituindo-se a solução da amostra por volume equivalente de solução de tampão fosfato pH 8,3, enquanto para o controle positivo utilizou-se solução de captopril (64 mmol/L). A mistura foi homogeneizada e pré-incubada a 37°C, por 15 min. A reação enzimática foi iniciada pela adição de 60,0 µL de solução tampão HEPES pH 8,15, seguida de 30,0 µL de solução do substrato hipuril-glicil-glicina (100 mmol/L). Após homogeneização, a mistura foi incubada a 37 °C, por 45 min. A reação foi interrompida pela adição de 100,0 µL de solução de tungstato de sódio (100 g/mL) e 100,0 µL de solução de ácido sulfúrico (0,33 mol/L).

Após deposição do precipitado, uma alíquota de 62,0 µL do sobrenadante foi transferida para um poço de outra placa de microtitulação com fundo em V, contendo 200,0 µL de água destilada, homogeneizando a mistura. Uma alíquota do sobrenadante (75,0 µL) foi transferida para um poço de placa de microtitulação de fundo chato, contendo 100,0 µL de solução de tampão fosfato pH 8,5 (100 mmol/L). Adicionaram-se, então, 5,0 µL de TNBS (60 mmol/L). A microplaca foi mantida em repouso, em ausência de luz, à temperatura ambiente, por 20

min. Em seguida, a absorbância foi determinada em leitor de microplacas a 415 nm, contra um branco preparado de maneira idêntica, exceto pela adição dos agentes de desproteíntização (soluções de tungstato de sódio e de ácido sulfúrico) anteriormente à adição da solução de pulmão de coelho. As amostras foram preparadas em triplicata. A concentração final da amostra no ensaio foi de 0,10 mg/mL, considerando-se o volume total adicionado até a inativação da enzima.

Para o cálculo da porcentagem de inibição no ensaio colorimétrico utilizou-se a equação:

$$\% \text{ de inibição} = 100 - [(A_I \times 100\%) / A_C]$$

em que:  $A_I$  = absorbância da solução na presença do inibidor;

$A_C$  = absorbância da solução do controle negativo.

### **2.10.3 Protocolo do ensaio de inibição da ECA utilizando soro de rato como fonte da enzima**

A amostra a ser ensaiada foi preparada na concentração de 10 mmol/L. O material foi solubilizado em água com auxílio de banho de ultra-som e centrifugado a 2.000 rpm por 10 min. O sobrenadante foi coletado e utilizado no ensaio.

Adicionaram-se 25,0  $\mu$ L de soro sanguíneo de rato a um poço de placa de microtitulação contendo 5,0  $\mu$ L de solução da amostra (10,0 mmol/L). O soro foi deixado em contato com a amostra por diferentes intervalos de tempo: 15, 30 e 60 min. O controle positivo foi preparado substituindo-se a solução da amostra por volume equivalente de solução de captopril na concentração de 10,0  $\mu$ mol/L e em intervalo de tempo de 60 min, enquanto para o branco foram utilizados 25,0  $\mu$ L de solução HEPES pH 8,15 e 5,0  $\mu$ L de DMSO.

A reação enzimática foi iniciada pela adição de 20,0  $\mu$ L de solução tampão HEPES pH 8,15, seguida de 10,0  $\mu$ L de solução do substrato Hip-Gly-Gly (concentração final de 27,27 mmol/L). Após a homogeneização, a mistura foi incubada a 37°C, por 45 min. A reação foi interrompida pela adição de 33,0  $\mu$ L de solução de tungstato de sódio 100 g/L e 33,0  $\mu$ L de solução de ácido sulfúrico 0,33 mol/L, seguido de homogeneização. A placa foi deixada em repouso por 5 a 10 min e, em seguida, adicionaram-se 33,0  $\mu$ L da solução tampão fosfato pH 8,5 (100 mmol/L) e 1,0  $\mu$ L de TNBS (69,24 mmol/L). A microplaca foi mantida em repouso, na ausência de luz, à temperatura ambiente, por 20 min. Em seguida, a absorbância foi determinada em leitor de microplacas a 415 nm.



Para o cálculo da porcentagem de inibição no ensaio colorimétrico utilizou-se a equação:

$$\% \text{ de inibição} = 100 - [(A_1 \times 100\%) / A_c]$$

em que:  $A_1$  = absorvância da solução na presença do inibidor;

$A_c$  = absorvância da solução do controle negativo.

A  $CI_{50}$ , concentração da amostra que produziu 50% de inibição da ECA, foi determinada através de regressão linear das curvas concentração-resposta obtidas nos experimentos, utilizando-se programa Prism GraphPad 4.0 (*GraphPad Software Inc., USA*). As análises estatísticas foram realizadas com teste *one way* ANOVA e pós-teste Newman Keuls.

## **2.11 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE VASODILATADORA EM PREPARAÇÕES ISOLADAS DE AORTA DE RATOS**

Os ensaios foram realizados pela equipe do Professor Steyner de França Côrtes, Departamento de Farmacologia, Instituto de Ciências Biológicas da UFMG.

### **2.11.1 Soluções utilizadas no ensaio**

#### **2.11.1.1 Solução de Krebs-Henseleit**

Foram solubilizados em água destilada, sob agitação constante, 7,89 g de cloreto de sódio (135,0 mmol/L), 370,0 mg de cloreto de potássio (5,0 mmol/L), 160,0 mg de fosfato de potássio anidro (1,17 mmol/L), 340,0 mg de sulfato de magnésio heptaidratado (1,4 mmol/L), 1,68 g de bicarbonato de sódio (20,0 mmol/L), 1,98 g de d-glicose anidra (11,0 mmol/L) e 370,0 mg de cloreto de cálcio diidratado (2,5 mmol/L), sendo o volume completado para 1 L em balão volumétrico. As concentrações finais na solução estão listadas entre parênteses. Essa solução foi preparada no dia da realização do ensaio.

#### **2.11.1.2 Solução de fenilefrina**

Uma solução estoque de fenilefrina, na concentração de 10,0 mmol/L, foi preparada em água destilada. Diluições seriadas dessa solução resultaram na concentração de 0,10  $\mu\text{mol/L}$ , sendo essa solução mantida em banho de gelo até o momento do uso.

#### **2.11.1.3 Solução de acetilcolina**

Uma solução estoque de acetilcolina, na concentração de 100,0 mmol/L, foi preparada em água destilada. Diluições seriadas dessa solução resultaram na concentração 1,0  $\mu\text{mol/L}$ , sendo essa mantida em banho de gelo até o momento do uso.

#### **2.11.1.4 Solução de metil éster N- $\omega$ -nitro-L-arginina (L-NAME)**

A solução de L-NAME, na concentração de 100,0  $\mu\text{mol/L}$ , foi preparada em água destilada e mantida em banho de gelo até o momento do uso.

#### **2.11.1.5 Solução das amostras**

As amostras a serem testadas foram solubilizadas em água destilada, com auxílio de cremofor, quando necessário, e sonicadas por 10 minutos. Uma solução estoque do extrato foi preparada na concentração de 10,0  $\mu\text{g/mL}$  e, por diluição seriada, obtiveram-se soluções nas concentrações de 0,1; 0,3; 1,0; 3,0 e 10,0  $\mu\text{g/mL}$ .

### **2.11.2 Animais de experimentação**

Foram utilizados ratos Wistar, machos, pesando entre 180,0 e 200,0 g fornecidos pelo Centro de Bioterismo (CeBio) do Instituto de Ciências Biológicas (ICB), mantidos no biotério do Departamento de Farmacologia do ICB/UFMG.

### **2.11.3 Montagem da preparação isolada de anéis de aorta de rato**

Os animais de experimentação foram sacrificados por decapitação e a aorta torácica cuidadosamente dissecada e colocada em solução de Krebs-Henseleit a 4°C. Os tecidos adiposo e conectivo foram totalmente removidos. Anéis de 4-5 mm de comprimento foram cortados e fixados em cubas de órgãos isolados contendo 10 mL de solução de Krebs-Henseleit, mantida à temperatura de 37 °C e aerada com carbogênio (mistura de O<sub>2</sub> e CO<sub>2</sub> na

proporção de 95:5 v/v). Os anéis de aorta foram mantidos sob tensão de 1 grama-força por um período de estabilização de 60 min, antes de se realizar os protocolos experimentais. Durante esse período, o meio de incubação foi trocado a cada 15 min.

Após o período de estabilização, os anéis foram pré-contraídos com solução de fenilefrina (0,10  $\mu\text{mol/L}$ ) para verificar a resposta contrátil da preparação. A presença de endotélio funcional, nos anéis pré-contraídos com fenilefrina, foi certificada pela adição de acetilcolina (1,0  $\mu\text{mol/L}$ ). Antes do início dos protocolos experimentais, o meio de incubação das preparações que apresentaram no mínimo 70 % de endotélio funcional foi trocado a cada 15 min, durante 30 min, para o retorno à linha de base.

As respostas dos anéis de aorta frente a diferentes tratamentos foram registradas por transdutores isométricos (Fort10) conectados a um amplificador (TBM4) e a um sistema de aquisição computadorizada de dados (CVMS; *World Precision, Inc.; EUA*).

#### **2.11.4 Protocolo experimental para avaliar o efeito dos extratos sobre a contração máxima induzida por fenilefrina**

A avaliação do efeito produzido pelos extratos sobre a contração máxima induzida por fenilefrina foi realizada através de uma curva concentração-resposta (CCR) obtida pela adição de concentrações cumulativas de cada extrato em anéis de aorta pré-contraídos com fenilefrina (0,10  $\mu\text{mol/L}$ ), após estabilização da resposta contrátil. As concentrações finais dos extratos na cuba de ensaio foram 0,1; 0,3; 1,0; 3,0 e 10,0  $\mu\text{g/mL}$ . Os dados foram apresentados como média  $\pm$  EPM, com  $n = 4$  e correspondem às porcentagens de relaxamento, em relação à contração máxima induzida por fenilefrina.

A concentração do extrato que produziu redução de 50% na contração máxima induzida pela fenilefrina ( $CI_{50}$ ) foi determinada a partir de análise de regressão não linear da CCR obtida, empregando-se o programa Prism Graph Pad 4.0 (*Graph Pad Software, Inc., EUA*).

#### **2.11.5 Protocolo experimental para avaliar o efeito dos extratos sobre a contração máxima induzida por fenilefrina, na presença de L-NAME**

Para verificar a participação de produtos derivados do endotélio no relaxamento produzido pelos extratos vegetais em estudo, foi construída uma CCR obtida pela adição de concentrações cumulativas de cada extrato em anéis de aorta pré-contraídos com solução de

fenilefrina (0,10  $\mu\text{g/ml}$ ), na presença de *L*-NAME (100  $\mu\text{mol/L}$ ), adicionado à cuba de ensaio 15 min antes da fenilefrina. Os extratos foram adicionados após estabilização da resposta contrátil máxima induzida por fenilefrina e as concentrações finais na cuba de ensaio foram 0,1; 0,3; 1,0; 3,0 e 10,0  $\mu\text{g/mL}$ .

Os dados foram apresentados como média  $\pm$  EPM, com  $n = 4$  e correspondem às porcentagens de relaxamento, em relação à contração máxima induzida por fenilefrina.

### **3 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### 3.1 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-HIPERTENSIVA DOS EXTRATOS

O ensaio *in vitro* de inibição da ECA é um modelo adequado para a triagem de extratos vegetais e posterior fracionamento biomonitorado, visando à obtenção de substâncias com potencial atividade anti-hipertensiva. Estudo anterior de nosso grupo de pesquisa (SERRA, 2004) demonstrou atividade inibidora da ECA, *in vitro*, de aproximadamente 59,0% para *E. suberosum* (folhas), 31,0% para *E. tortuosum* (folhas) e 40,0% para *E. gonocladum* (partes aéreas), utilizando ensaio colorimétrico, na concentração de 0,10 mg/mL.

Extratos com atividade inibidora da ECA frequentemente apresentam efeito vasodilatador em ensaios com preparações isoladas de anéis de aorta. Lacaille-Dubois et al. (2001) demonstraram atividade inibidora da ECA para as proantocianidinas B<sub>2</sub> (**27**; 25,0 ± 5,0% de inibição da ECA) e C<sub>1</sub> (**28**; 45,0 ± 2,0%), na concentração de 0,33 mg/mL, isoladas de *Crataegus oxyacantha*. Kim et al. (2000) avaliaram o efeito no tônus vascular de uma fração de *Crataegus* enriquecida em proantocianidinas e observaram efeito vasodilatador endotélio-dependente e relaxamento superior a 70%. Braga et al. (2000) demonstraram atividade inibidora da ECA de 50%, na concentração de 0,10 mg/mL, para as folhas de *Mansoa hirsuta*. O extrato etanólico dessa espécie apresentou atividade vasodilatadora endotélio-dependente com CI<sub>50</sub> de 5,1 ± 0,2 µM (CAMPANA et al., 2009). Serra et al. (2005) demonstraram atividade inibidora da ECA de 45,7%, na concentração de 0,10 mg/mL, para a espécie *Hancornia speciosa*. Ferreira et al. (2007) avaliaram esse extrato quanto ao seu efeito vasodilatador e demonstraram atividade com CI<sub>50</sub> = 10,8 ± 4,0 µg/mL.

Com base nesses dados, decidiu-se avaliar a atividade vasodilatadora das espécies de *Erythroxylum* selecionadas para estudo no presente trabalho, utilizando modelo *ex vivo*.

#### 3.1.1 Avaliação da atividade vasodilatadora em anéis de aorta de ratos

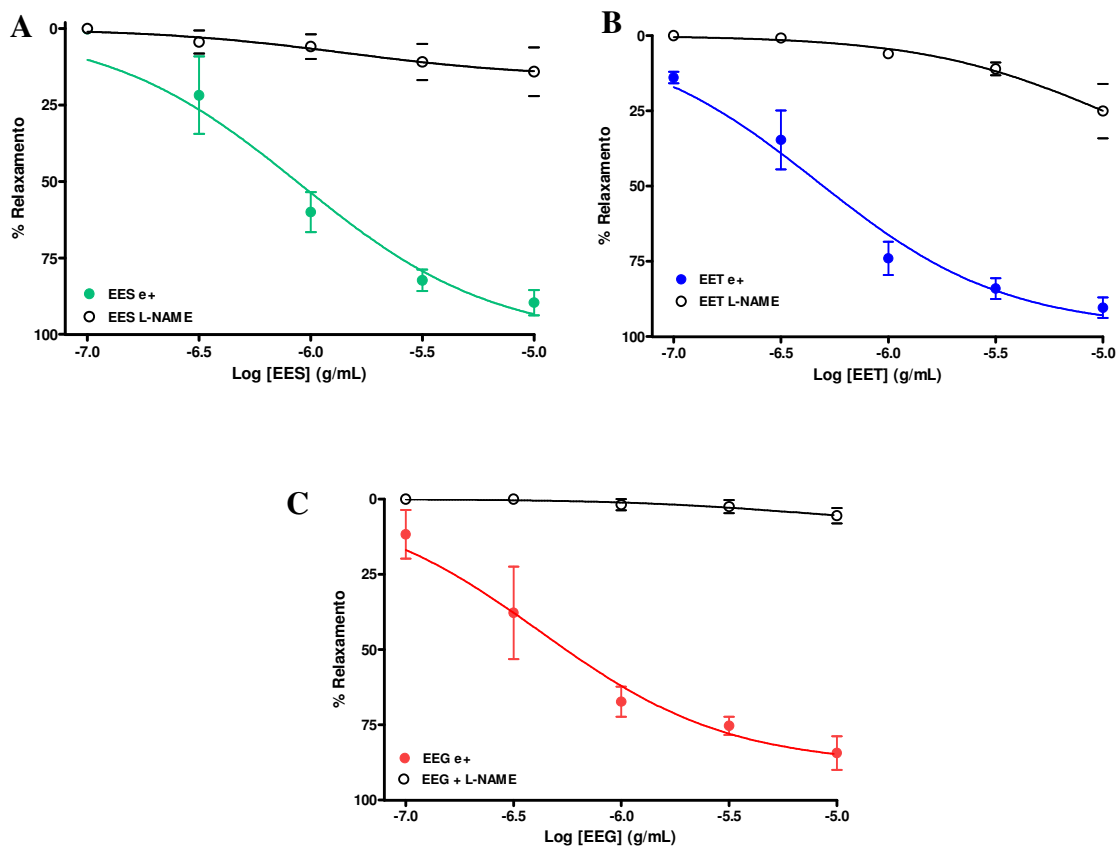
Os extratos etanólicos brutos das três espécies de *Erythroxylum* foram avaliados quanto à sua atividade vasodilatadora em modelo de anel de aorta de ratos (item 2.11, Parte Experimental). O efeito vasodilatador foi avaliado através de curva concentração resposta (CCR) em anéis de aorta pré-contraídos com fenilefrina, após estabilização da contração máxima induzida (Figura 5). Os extratos em estudo induziram relaxamento concentração-dependente em anéis de aorta com endotélio funcional, com CI<sub>50</sub> de 0,96 ± 0,30 µg/mL para *E. suberosum*, 0,48 ± 0,12 µg/mL para *E. tortuosum* e 0,45 ± 0,20 µg/mL para *E. gonocladum* (Figura 6).

Trabalhos recentes, utilizando modelos experimentais semelhantes, demonstraram atividades vasodilatadoras similares às observadas no presente trabalho, o que permite

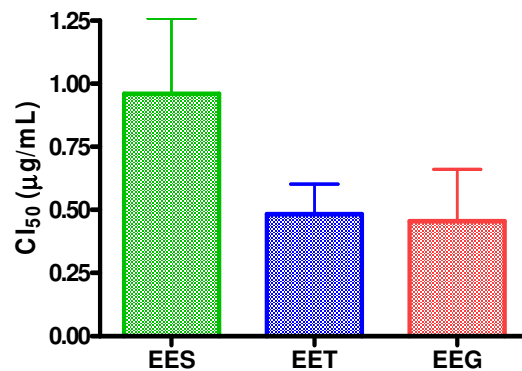
classificar as espécies em estudo como promissoras para o isolamento de substâncias com potencial anti-hipertensivo. Foi relatada atividade dependente de NO e de outros mecanismos do extrato aquoso das folhas de *Psidium guajava* (Mirtaceae) ( $CI_{50} = 0,69 \pm 0,04 \mu\text{g/mL}$ ) em ensaio com anéis de aorta pré-contraídos com noradrenalina (CHIWORORO; OJEWOLE, 2008) e atividade vasorelaxante NO-dependente dos extratos etanólicos das folhas de *Mansoa hirsuta* D.C. (Bignoniaceae) ( $CI_{50} = 8,5 \pm 0,6 \mu\text{g/mL}$ ) (CAMPANA et al., 2009) e *Crataegus oxyacantha* L. (Rosaceae) ( $CI_{50} = 15,1 \pm 0,6 \mu\text{g/mL}$ ), em ensaios com anéis de aorta pré-contraídos com fenilefrina (BRIXIUS et al., 2006).

O endotélio desempenha um papel importante na modulação do tônus vascular através da síntese de substâncias vasoativas que podem induzir relaxamento (prostaciclina e NO) ou constrição dos vasos sanguíneos. Essas substâncias atuam em equilíbrio para permitir um funcionamento adequado da dinâmica vascular (MONCADA; PALMER; HIGGS, 1991). Para avaliar a participação do NO no efeito vasodilatador induzido pelos extratos, anéis de aorta foram incubados com *L*-NAME. O NO produzido no endotélio tem função vasodilatadora fisiológica e exerce importantes funções na homeostase vascular em órgãos como rins, cérebro e sistema bronco-pulmonar (RUBIO; MORALES-SEGURA, 2004).

O relaxamento concentração-dependente induzido pelos extratos de *E. suberosum* (Figura 5A) e *E. gonocladum* (Figura 5C) em anéis de aorta pré-contraídos com fenilefrina, foi totalmente abolido na presença de *L*-NAME. Esse resultado sugere que a atividade vasorelaxante observada para essas espécies possa estar associada ao aumento da síntese de NO pelas células endoteliais. A vasodilatação induzida pela adição do extrato de *E. tortuosum* foi fortemente inibida na presença de *L*-NAME (Figura 5B). O pequeno efeito vasodilatador residual sugere que o relaxamento concentração-dependente observado para essa espécie não está associado somente à atividade do NO; é provável que outros mecanismos estejam envolvidos, contribuindo para o efeito vasodilatador observado.



**Figura 5.** Curva concentração-resposta para os extratos de espécies de *Erythroxyllum* em anéis de aorta de rato pré-contraídos com fenilefrina. Cada ponto representa a média  $\pm$  EPM de 4 replicatas. (A) *E. suberosum*, (B) *E. tortuosum* e (C) *E. gonocladum*



**Figura 6.** CI<sub>50</sub> da vasorelaxação induzida em anéis de aorta de rato pré-contraídos com fenilefrina dos extratos etanólicos de *E. suberosum* (EES), *E. tortuosum* (EET) e *E. gonocladum* (EEG).

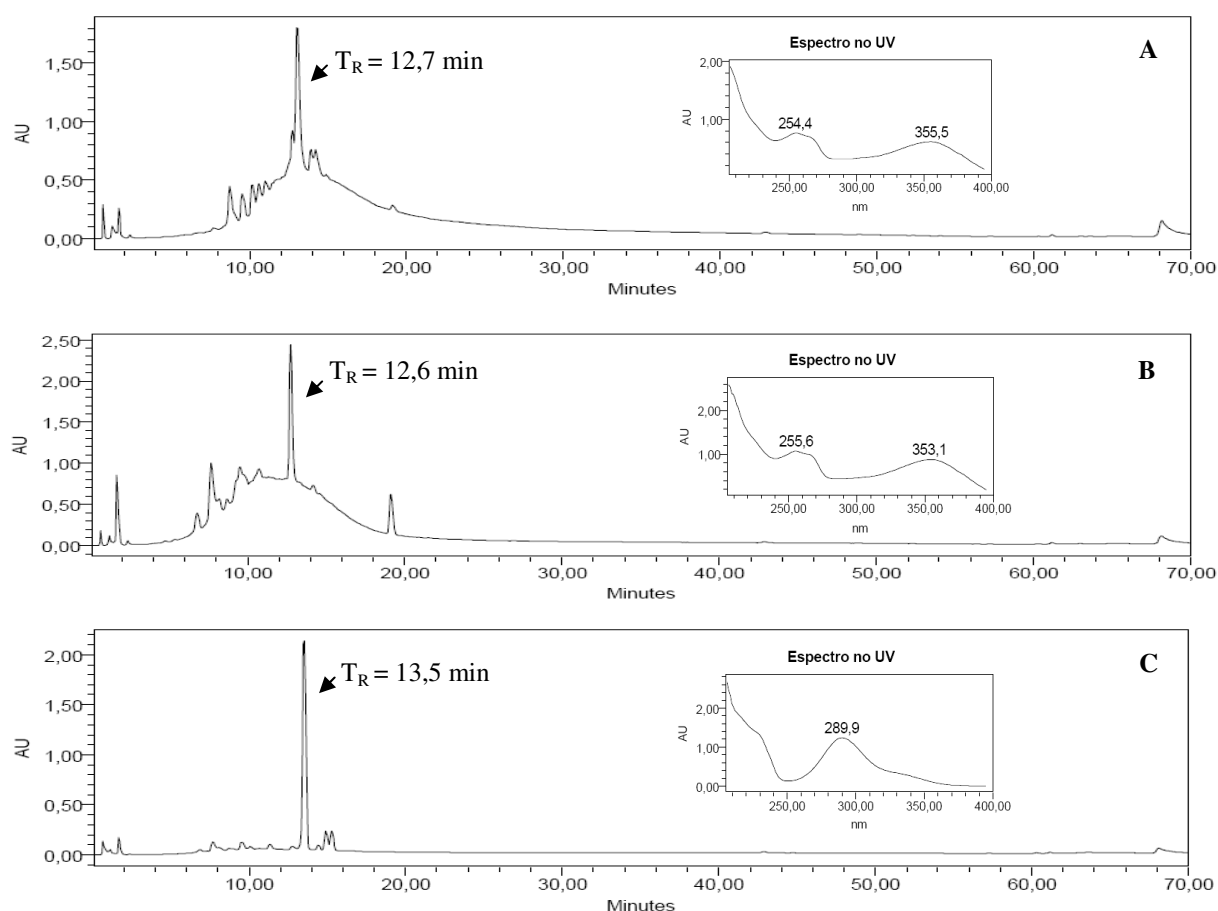
### 3.2 PERFIS CROMATOGRÁFICOS DOS EXTRATOS ETANÓLICOS EM RP-HPLC

Os perfis cromatográficos dos extratos etanólicos brutos das espécies de *Erythroxyllum* em estudo forneceram informações relevantes sobre sua composição, sobretudo a polaridade



de seus constituintes. Estes perfis constituem a impressão digital (*chemical fingerprint*) das espécies, servindo como material de referência para o caso de coletas futuras, possibilitando identificar variações qualitativas na composição das plantas.

A análise dos perfis cromatográficos obtidos por RP-HPLC (Figura 7) revelou o predomínio de substâncias de polaridade média a alta para as três espécies avaliadas, com a maioria dos picos eluídos com tempo de retenção ( $T_R$ ) inferior a 20 minutos.



**Figura 7.** Perfis cromatográficos obtidos por RP-HPLC para os extratos etanólicos de espécies de *Erythroxylum* e espectros no UV obtidos *on line* para os picos majoritários de cada extrato ( $T_R$ , tempo de retenção). (A) *E. suberosum*, (B) *E. tortuosum* e (C) *E. gonocladum*. Condições cromatográficas descritas na Parte Experimental, item 2.7.

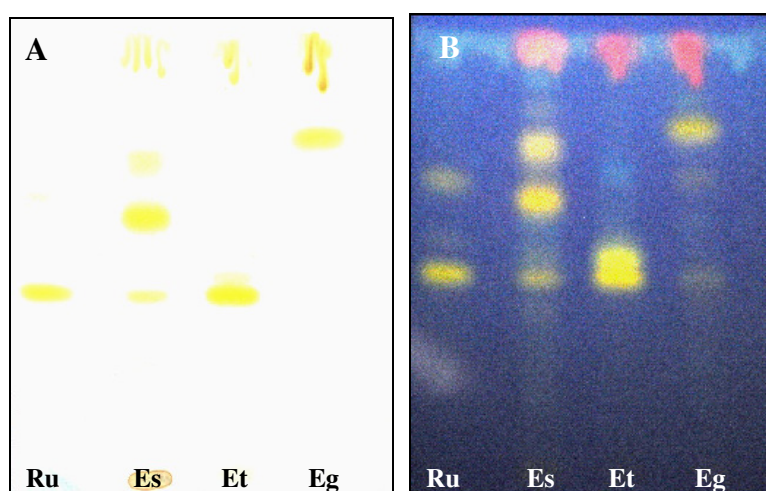
As semelhanças nos máximos de absorção dos espectros no UV obtidos *on line* para os picos majoritários de *E. suberosum* ( $\lambda_{max}$  254,4 nm e 355,5 nm) e *E. tortuosum* ( $\lambda_{max}$  255,6 nm e 353,1 nm), bem como os tempos de retenção desses picos ( $T_R = 12,7$  e 12,6 minutos, respectivamente) sugerem tratar-se da mesma substância nos dois extratos. A presença de duas bandas com  $\lambda_{max}$  em torno de 250,0 nm e 350,0 nm é característica de flavonóides, provavelmente flavonóis ou flavonas (DAY; WILLIAMSON, 2001; RIJKE et al., 2006).

O perfil de *E. gonocladum* apresentou pico majoritário com  $T_R = 13,5$  minutos e espectro no UV com  $\lambda_{max}$  289,9 nm. Segundo Justesen et al. (1998) e Mabry et al. (1970), espectros de UV com  $\lambda_{max}$  na região de 290,0 nm são comuns para algumas classes de flavonóides, sobretudo diidroflavonóis e flavanonas.

Esses resultados apontaram flavonóides como possíveis constituintes majoritários das três espécies avaliadas. Johnson et al. (2002) demonstraram que alguns flavonóides, como a quercetina (43) e o canferol (42), são tão frequentes que podem ser considerados marcadores quimiotaxonômicos para o gênero *Erythroxylum*.

### 3.3 PERFIS CROMATOGRÁFICOS DOS EXTRATOS ETANÓLICOS EM CCD DE SÍLICA GEL

Foram obtidos perfis cromatográficos em CCD de sílica gel para os extratos etanólicos brutos das três espécies de *Erythroxylum*, utilizando-se reveladores específicos para as principais classes de metabólitos secundários. Foi avaliada a presença de taninos e polifenóis, agliconas/heterosídeos flavônicos, agliconas/heterosídeos antraquinônicos, triterpenos e esteróides, cumarinas, saponinas, heterosídeos cardiotônicos, alcalóides e proantocianidinas. A título de exemplo, a Figuras 8 reproduz os cromatogramas obtidos para a pesquisa de heterosídeos flavônicos.



**Figura 8.** Cromatogramas obtidos por CCD de sílica gel para os extratos etanólicos de *Erythroxylum*. Eluente: acetato de etila / ácido fórmico / ácido acético / água (80:9:9:22). Revelador para heterosídeos flavônicos: NP/ PEG. Ru = rutina (substância de referência); Es = *E. suberosum*; Et = *E. tortuosum*; Eg = *E. gonocladum*. (A) visível e (B) UV  $\lambda_{365}$  nm.

Os perfis cromatográficos em CCD de sílica gel revelaram a presença de uma grande variedade de classes de metabólitos secundários nos extratos etanólicos das três espécies em estudo. Entre as classes avaliadas, apenas heterosídeos antraquinônicos e cumarinas não foram detectados (Tabela 16).

Esses resultados corroboram os dados da literatura que indicam a ocorrência frequente de flavonóides e alcalóides em espécies de *Erythroxylum*, bem como alguns relatos da presença de triterpenos, esteróides e taninos. González-Guevara et al. (2004) realizaram a prospecção fitoquímica de quatro espécies do gênero *Erythroxylum* (*E. confusum* Britt., *E. areolatum* L.; *E. havanense* Jacq. e *E. alaternifolium* A. Rich., var. *alaternifolium*) e demonstraram a presença de triterpenos e esteróides, taninos e polifenóis, lactonas, cumarinas e açúcares reduzidos. Alcalóides, quinonas, saponinas e glicosídeos cardíacos foram identificados em pequenas proporções. Lipídeos, óleos essenciais e carotenóides não foram detectados. As aminas foram identificadas somente em *E. havanense*. Os flavonóides foram detectados em altos níveis nas espécies *E. areolatum* e *E. confusum* e em concentração muito baixa nas outras duas espécies.

**Tabela 16.** Avaliação qualitativa de metabólitos secundários em espécies de *Erythroxylum* por CCD de sílica gel

Classe de metabólitos	<i>E. suberosum</i>	<i>E. tortuosum</i>	<i>E. gonocladum</i>
Taninos e polifenóis	+	+	+
Heterosídeos flavônicos	+	+	+
Agliconas flavônicas	+	+	+
Heterosídeos antraquinônicos	-	-	-
Agliconas antraquinônicas	+	+	+
Triterpenos e esteróides	+	+	+
Cumarinas	-	-	-
Saponinas	+	+	+
Heterosídeos cardiotônicos	+	+	+
Alcalóides	+	+	+
Proantocianidinas	+	+	+

+ Presença no extrato etanólico

- Ausência no extrato etanólico

### 3.4 FRACIONAMENTO PRELIMINAR DOS EXTRATOS

Os extratos etanólicos brutos das três espécies de *Erythroxylum* foram submetidos a partição entre solventes imiscíveis (*n*-hexano, diclorometano, acetato de etila e água/MeOH) a fim de se obter frações para avaliação no ensaio *in vitro* de inibição da ECA e selecionar uma das espécies para estudo fitoquímico (item 2.6, Parte Experimental).

Foram obtidas sete frações para *E. suberosum*. A fração aquosa apresentou massa correspondente a cerca de 46% do total do extrato, demonstrando o predomínio de substâncias de elevada polaridade. Para *E. tortuosum* foram obtidas cinco frações, também com o predomínio de compostos polares, e a fração aquosa correspondeu a aproximadamente 60% da massa do extrato. A partição do extrato de *E. gonocladum* originou cinco frações. Ao contrário das outras duas espécies, não se observou grande predomínio de substâncias na fração aquosa, que correspondeu a 35% da massa total do extrato. Durante a partição entre a suspensão do extrato em água/metanol (11:1) e *n*-hexano formou-se um precipitado entre as duas fases (Ppt-EG), com massa correspondente a aproximadamente 42% do extrato.

### 3.5 PERFIS CROMATOGRÁFICOS DAS FRAÇÕES POR RP-HPLC

As frações resultantes da partição dos extratos entre solventes imiscíveis foram analisadas por RP-HPLC, nas mesmas condições que os extratos brutos (item 2.7, Parte Experimental). A obtenção desses perfis teve como objetivo avaliar a complexidade e a polaridade dos constituintes presentes, visando selecionar uma espécie e suas frações para posterior purificação.

#### 3.5.1 *E. suberosum*

A análise dos perfis cromatográficos das frações de *E. suberosum* revelou grau de complexidade e polaridade dos constituintes variáveis. O pico majoritário observado no extrato etanólico ( $T_R = 12,7$  min) pôde ser observado, em maior ou menor proporção, em todas as frações, com exceção da fração *n*-hexânica (Hex-ES) (Figura 9). Esse comportamento pode ser atribuído à elevada concentração desse constituinte no extrato.

#### 3.5.2 *E. tortuosum*

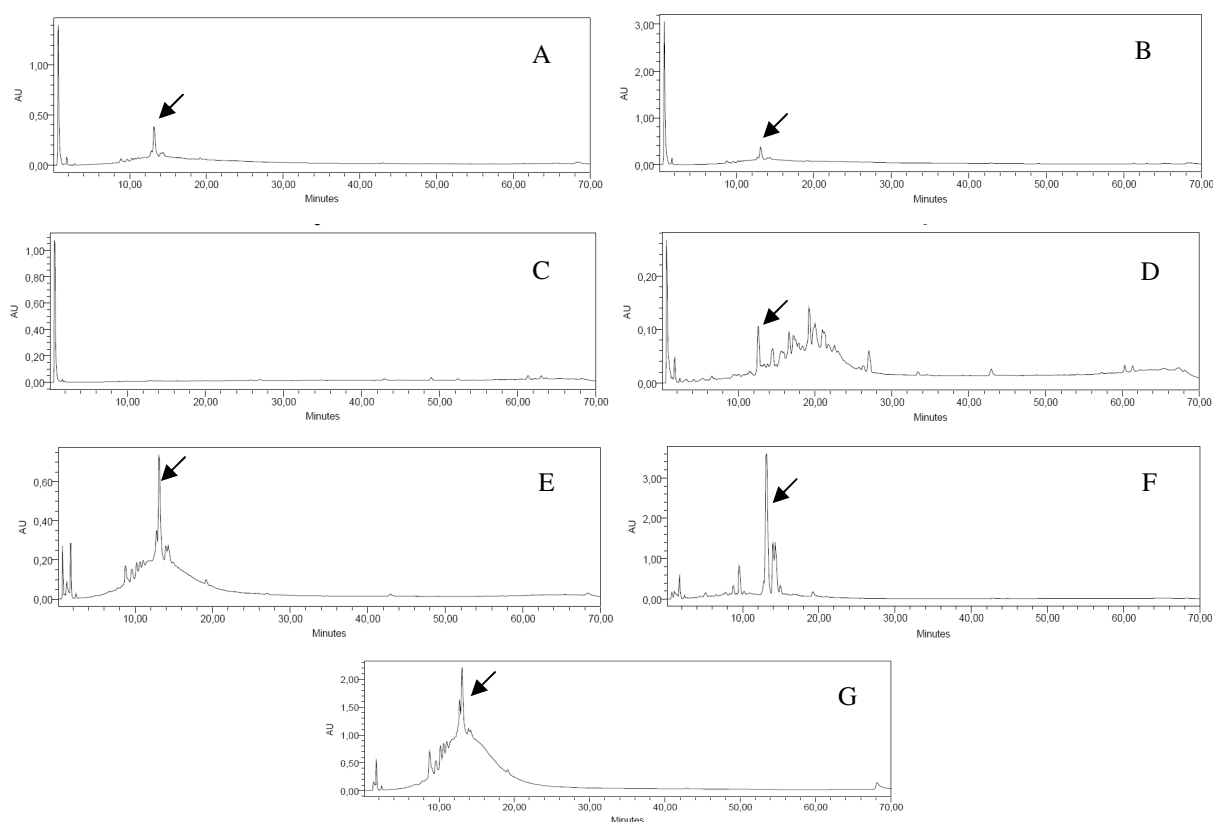
De maneira semelhante a *E. suberosum*, observou-se a presença do pico majoritário ( $T_R = 12,6$  minutos) do extrato etanólico de *E. tortuosum* em todas as frações, em proporções variáveis (Figura 10). A análise dos perfis indicou frações com pequena complexidade, como

Hex-ET (A) e EM-ET (C) e outras com maior complexidade [DCM-ET (B), AC-ET (D) e AQ-ET (E)], além da grande variedade de polaridade entre os diferentes constituintes.

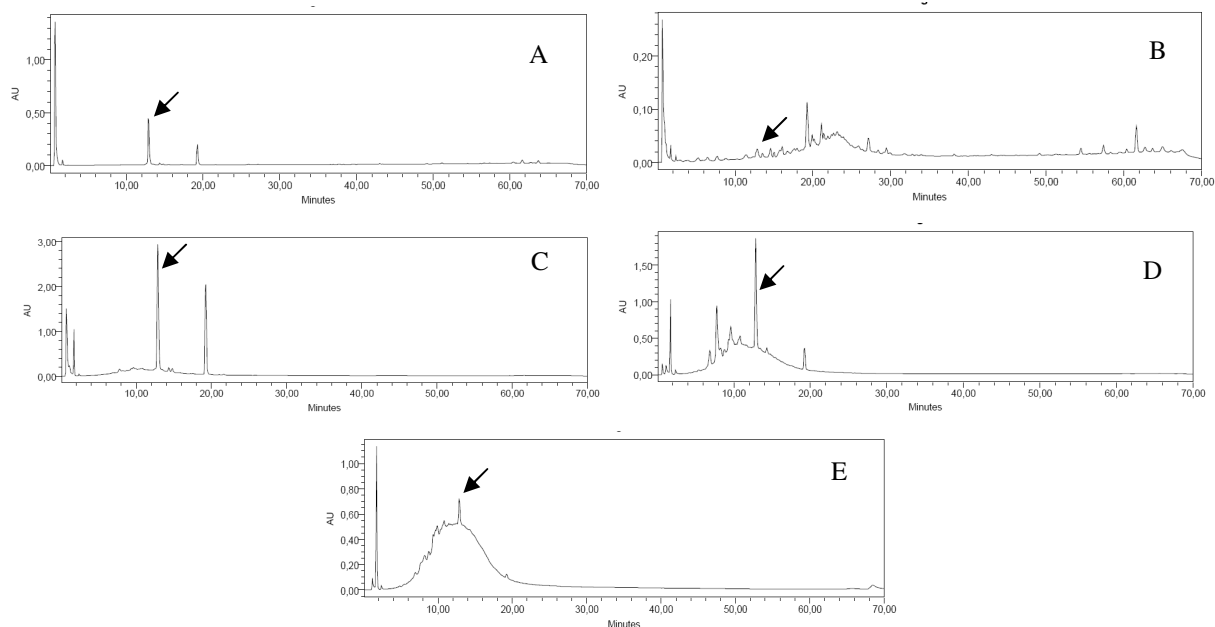
### 3.5.3 *E. gonocladum*

Os perfis cromatográficos das frações provenientes da partição do extrato etanólico de *E. gonocladum* entre solventes imiscíveis estão representados na figura 11.

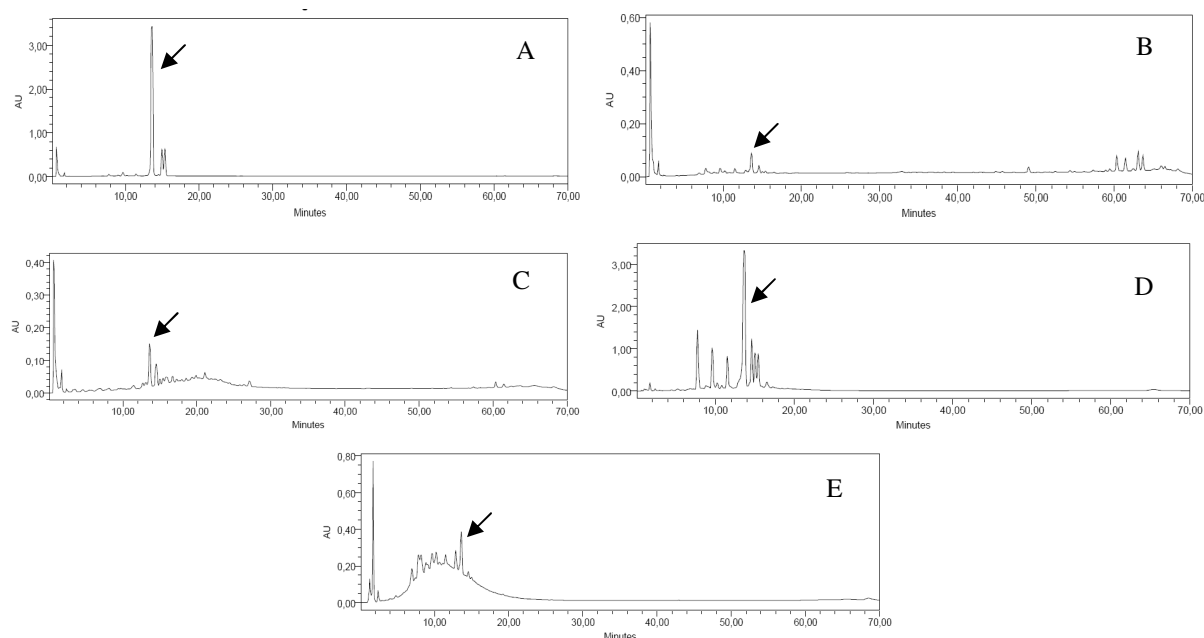
O pico majoritário observado no extrato etanólico dessa espécie ( $T_R = 13,5$  minutos) também se mostrou presente em todas as frações, em proporções variadas. A fração Ppt-EG, responsável por 42% da massa total do extrato etanólico, apresentou um pico majoritário. A análise da atividade inibidora da ECA dessa fração revelou atividade de  $46,6 \pm 5,2\%$ . Essa atividade, aliada à disponibilidade de massa e complexidade relativamente baixa orientaram a seleção desta fração para isolamento do constituinte majoritário.



**Figura 9.** Perfis cromatográficos obtidos por RP-HPLC para as frações resultantes da partição do extrato etanólico de *E. suberosum* entre solventes imiscíveis. (A) Ppt1-ES (precipitado 1), (B) Ppt2-ES (precipitado 2), (C) Hex-ES (fração *n*-hexânica), (D) DCM-ES (fração diclorometânica), (E) EM-ES (emulsão), (F) AC-ES (fração em acetato de etila), (G) AQ-ES (fração hidroalcoólica). As setas indicam a presença do constituinte majoritário ( $T_R = 12,7$  min) na fração. Condições cromatográficas: vide parte experimental, item 2.7.



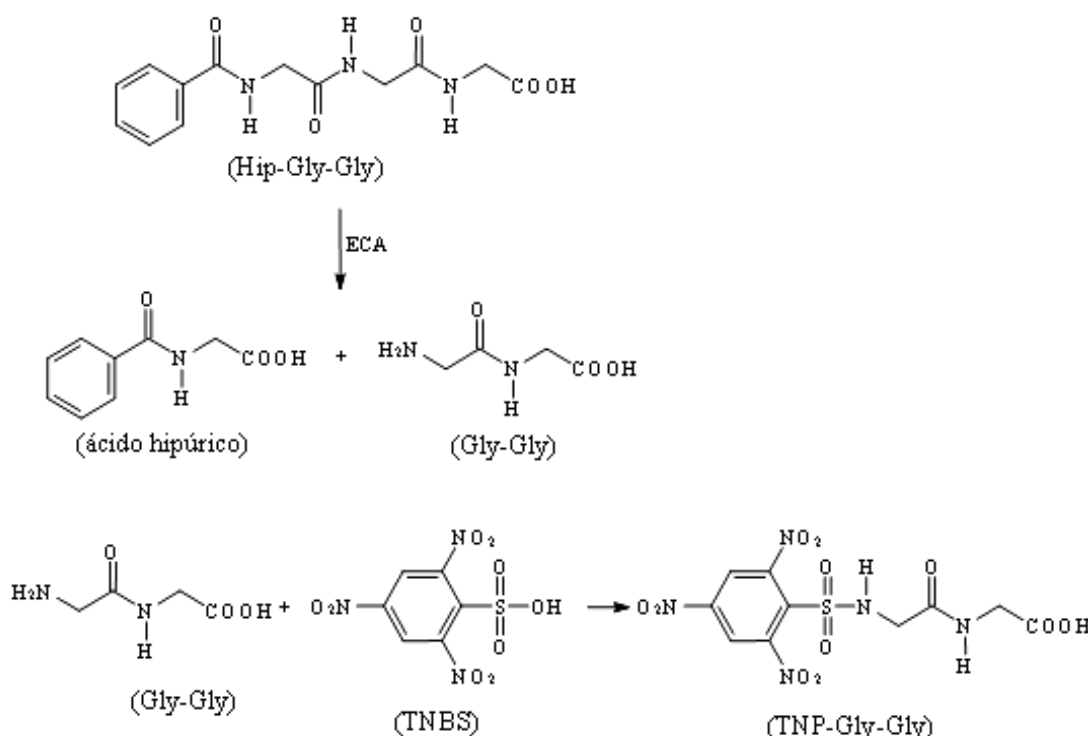
**Figura 10.** Perfis cromatográficos obtidos por RP-HPLC para as frações resultantes da partição do extrato etanólico de *E. tortuosum*: (A) Hex-ET (fração *n*-hexânica), (B) DCM-ET (fração diclorometânica), (C) EM-ET (emulsão), (D) AC-ET (fração em acetato de etila), (E) AQ-ET (fração hidroalcoólica). As setas indicam a presença do constituinte majoritário na fração ( $T_R = 12,6$  min). Condições cromatográficas: vide parte experimental, item 2.7.



**Figura 11.** Perfis cromatográficos obtidos por RP-HPLC para as frações resultantes da partição do extrato etanólico de *E. gonocladum*: (A) Ppt-EG (precipitado), (B) Hex-EG (fração *n*-hexânica), (C) DCM-EG (fração diclorometânica), (D) AC-EG (fração em acetato de etila), (E) AQ-EG (fração hidroalcoólica). As setas indicam a presença do constituinte majoritário na fração. Condições cromatográficas: vide parte experimental, item 2.7.

### 3.6 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE INIBIDORA DA ECA DAS FRAÇÕES

A atividade inibidora da ECA foi avaliada por ensaio colorimétrico *in vitro*, para todas as frações oriundas da partição líquido-líquido do extrato etanólico das três espécies. O ensaio de inibição da ECA utilizado baseia-se na clivagem do substrato hipuril-glicil-glicina pela ECA e subsequente reação com ácido trinitrobenzeno-sulfônico, com formação de 2,4,6-trinitrofenil-glicil-glicina, cuja absorvância é determinada em  $\lambda$  415 nm, em leitor de microplacas (item 2.10.2, Parte Experimental). A fonte de enzima utilizada foi o pulmão de coelho desidratado por acetona (Figura 12).



**Figura 12.** Fundamento químico do ensaio colorimétrico *in vitro* de inibição da ECA. Hip-Gly-Gly (hipuril-glicil-glicina) = substrato; TNP-Gly-Gly (2,4,6-trinitrofenol-glicil-glicina) = produto. Detecção em  $\lambda$  415 nm (SERRA et al., 2005).

Segundo Elbl e Wagner (1991), frações com atividade inibidora da ECA  $\geq 50\%$  no ensaio *in vitro* por HPLC, avaliadas na concentração de 0,33 mg/mL, são promissoras para o isolamento de substâncias com potencial atividade anti-hipertensiva. Este critério foi adotado no presente trabalho, apesar de se utilizar concentração mais baixa para ensaio das amostras (0,10 mg/mL). A espécie que apresentou frações com maior atividade inibidora da ECA foi selecionada para refraçãoamento.

### 3.6.1 Atividade inibidora da ECA das frações de *E. suberosum*

O ensaio de inibição da ECA revelou que, das sete frações obtidas da partição do extrato etanólico de *E. suberosum*, apenas duas apresentaram atividade  $\geq 50\%$ . Foi observada atividade de  $65,3 \pm 7,5\%$  para Ppt1-ES e  $61,4 \pm 5,0\%$  para Ppt2-ES (Figura 13).

### 3.6.2 Atividade inibidora da ECA das frações de *E. tortuosum*

O ensaio de inibição da ECA revelou que, das cinco frações obtidas da partição do extrato etanólico de *E. tortuosum*, apenas a fração diclorometânica apresentou atividade  $\geq 50\%$ , tendo sido observado uma inibição de  $21,1 \pm 32,1\%$  (Figura 14).

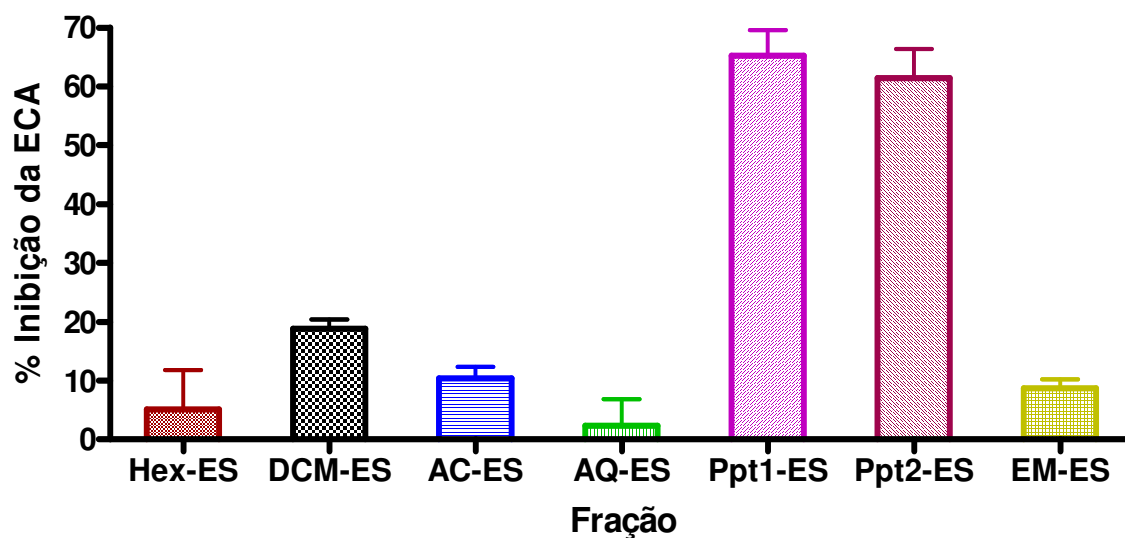
### 3.6.3 Atividade inibidora da ECA das frações de *E. gonocladum*

Os resultados obtidos no ensaio de inibição da ECA demonstraram que todas as frações de *E. gonocladum* são ativas, algumas com percentuais de inibição superiores a 70%, caso da fração *n*-hexânica (Hex-EG,  $76,7 \pm 6,8\%$ ) e da fração aquosa (AQ-EG,  $76,0 \pm 5,3\%$ ). Esses resultados, aliados à ausência de estudos para a espécie, indicaram-na como uma fonte promissora de substâncias com potencial anti-hipertensivo e, portanto, essa espécie foi selecionada para refraçãoamento visando isolar os constituintes bioativos e/ou majoritários (Figura 15).

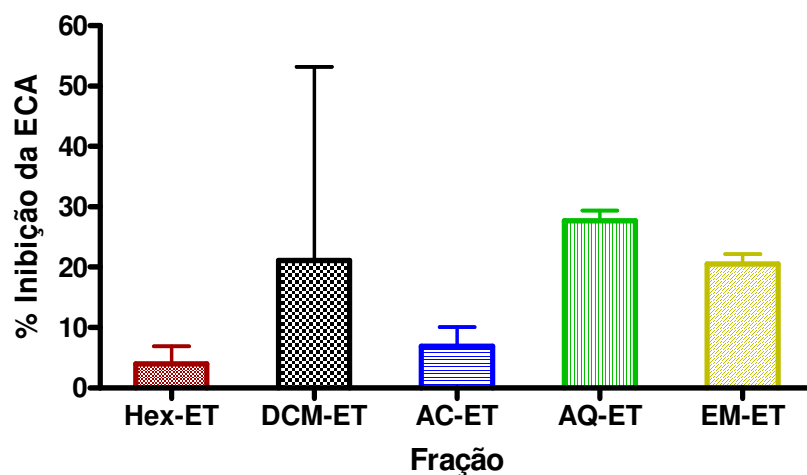
A fração diclorometânica (DCM-EG) não foi selecionada para refraçãoamento em virtude de ter sido obtida com baixo rendimento (0,23%), além de apresentar relativa complexidade (Figura 11). A fração aquosa (AQ-EG) também não foi selecionada para estudo fitoquímico em razão da dificuldade técnica de se trabalhar com frações de alta polaridade. Apesar de ter sido uma das frações mais ativas e da grande massa disponível, frações de elevada polaridade requerem métodos cromatográficos especiais para purificação, tais como cromatografia por exclusão de tamanho e cromatografia de fase reversa em C-18, dentre outras (HANAI, 2003).

Tendo em vista a atividade inibitória da ECA observada para frações de menor polaridade, que apresentam maior facilidade técnica para isolamento dos constituintes, essas foram selecionadas para posterior purificação, a saber as frações *n*-hexânica (Hex-EG), em acetato de etila (AC-EG) e o precipitado formado quando da partição com água/MeOH e *n*-hexano (Ppt-EG).

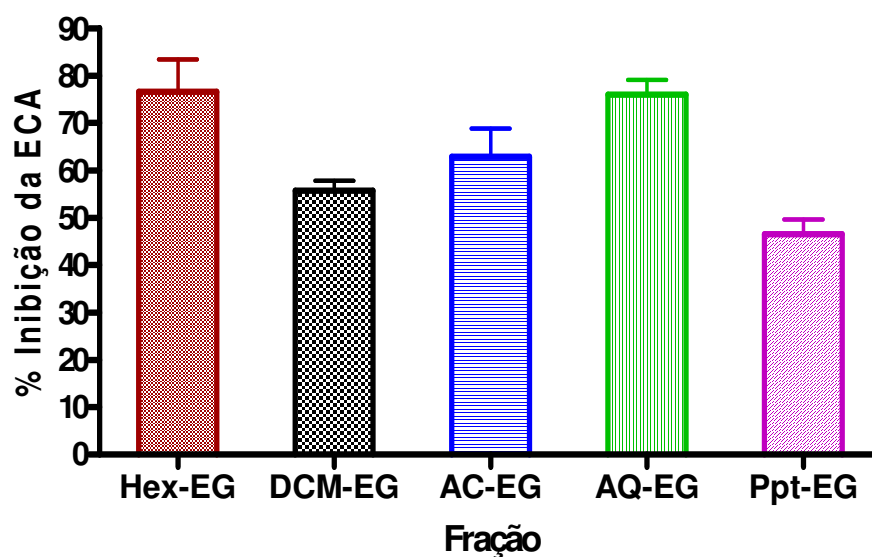




**Figura 13.** Atividade inibidora da ECA *in vitro*, na concentração de 0,10 mg/mL, para as frações resultantes da partição do extrato etanólico de *E. suberosum*: Hex-ES (fração *n*-hexânica), DCM-ES (fração diclorometânica), AC-ES (fração em acetato de etila), AQ-ES (fração hidroalcoólica), Ppt1-ES (precipitado 1), Ppt2-ES (precipitado 2), EM-ES (emulsão).



**Figura 14.** Atividade inibidora da ECA *in vitro*, na concentração de 0,10 mg/mL, para as frações resultantes da partição do extrato etanólico de *E. tortuosum*: Hex-ET (fração *n*-hexânica), DCM-ET (fração diclorometânica), AC-ET (fração em acetato de etila), AQ-ET (fração hidroalcoólica), EM-ET (emulsão).



**Figura 15.** Atividade inibidora da ECA *in vitro*, na concentração de 0,10 mg/mL, para as frações resultantes da partição do extrato etanólico de *E. gonocladum*: Hex-EG (fração *n*-hexânica), DCM-EG (fração diclorometânica), AC-EG (fração em acetato de etila), AQ-EG (fração hidroalcoólica), Ppt-EG (precipitado).

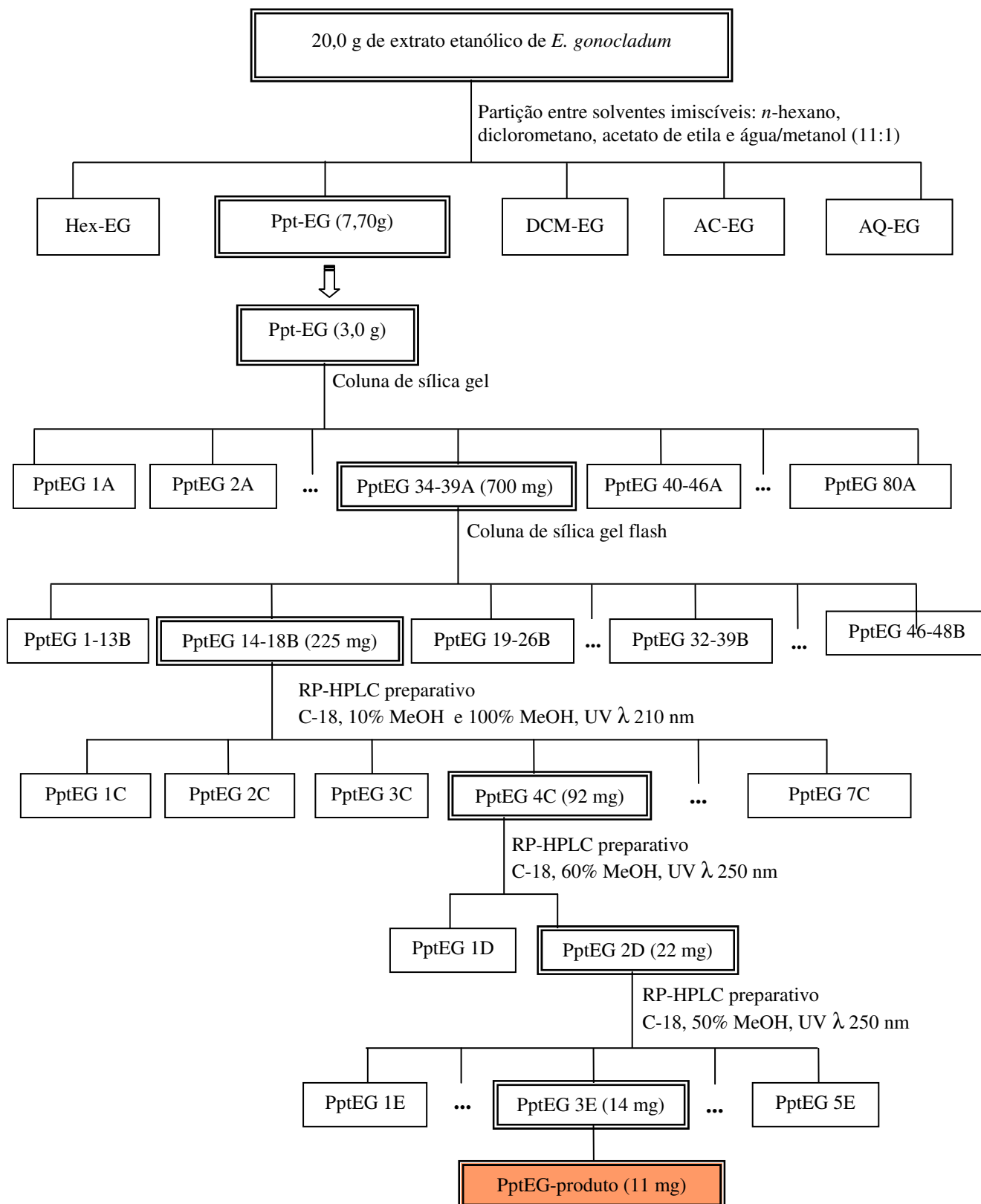
### 3.7 FRACIONAMENTO DO EXTRATO ETANÓLICO DE *E. gonocladum*

Uma porção de 20 g do extrato etanólico de *E. gonocladum* foi refractionada por partição entre solventes imiscíveis e as frações HexEG, AC-EG e Ppt-EG resultantes foram trabalhadas para purificação de seus constituintes, utilizando-se técnicas de cromatografia em coluna de sílica gel e RP-HPLC preparativo (item 2.8, Parte experimental).

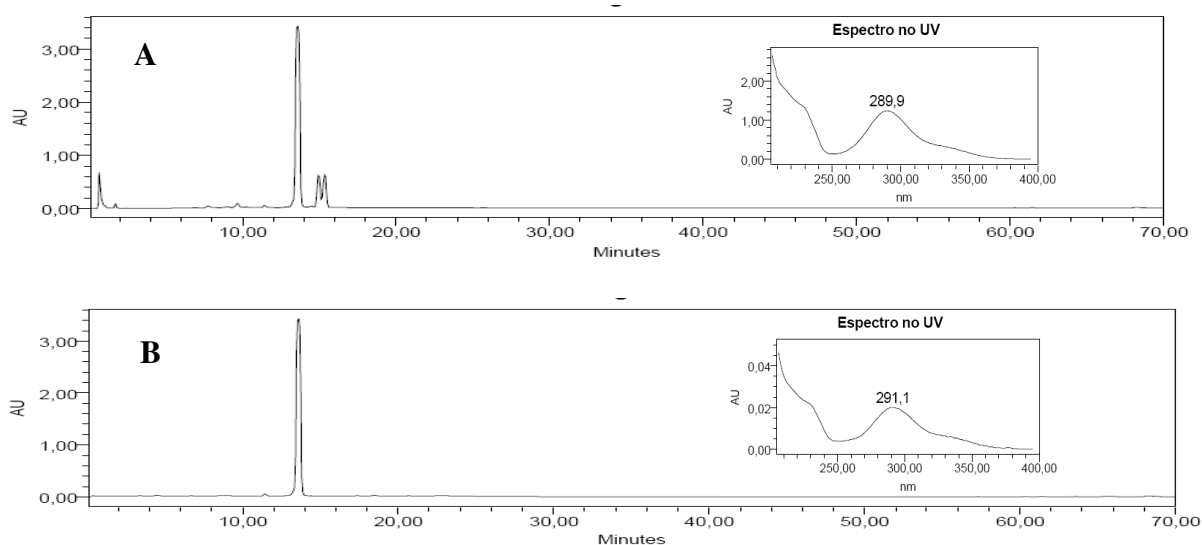
#### 3.7.1 Fracionamento de Ppt-EG

A fração Ppt-EG, com atividade inibidora da ECA de  $46,6 \pm 5,2\%$ , foi refractionada utilizando-se os procedimentos sumariados no fluxograma da figura 16.

A substância majoritária dessa fração, denominada PptEG-produto, foi isolada e apresentou  $T_R = 13,5$  min e espectro de UV com  $\lambda_{max}$  291,1 nm (Figura 17). Sua elucidação estrutural está decrita no item 3.8.1.



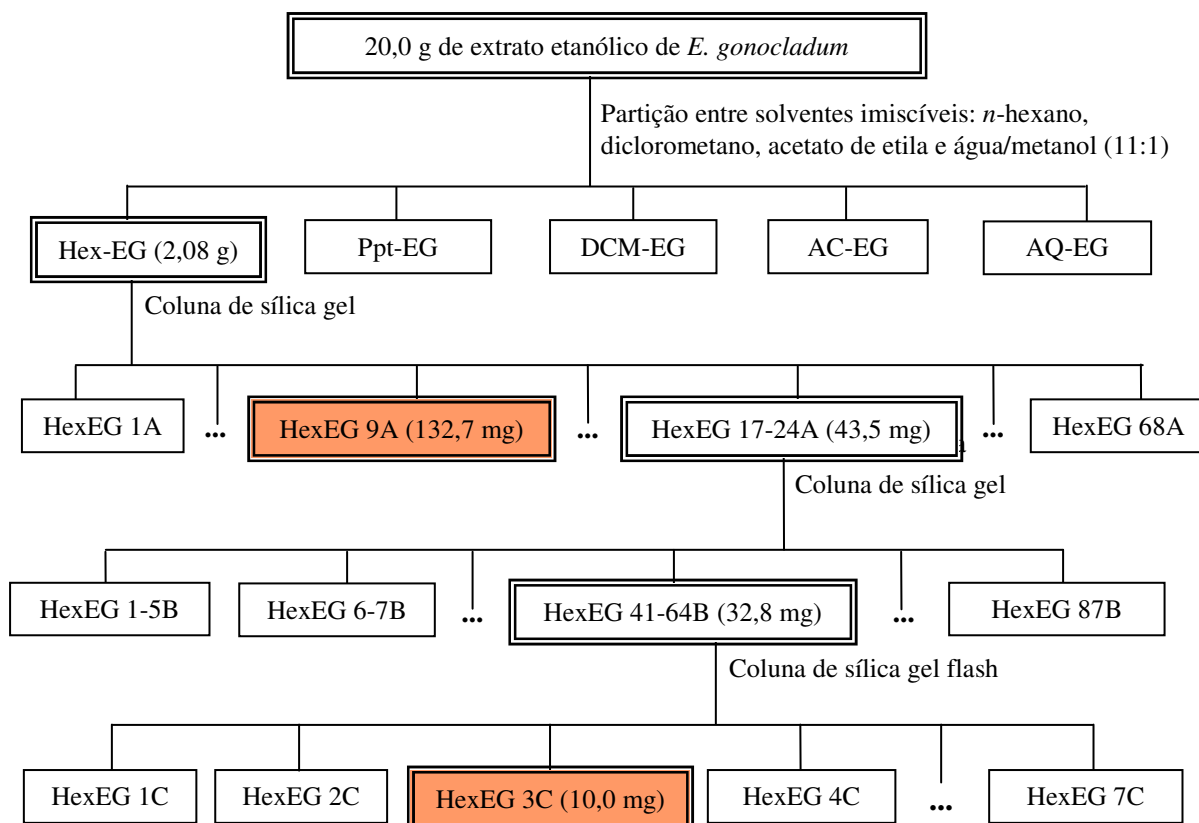
**Figura 16.** Refracionamento da fração Ppt-EG de *E. gonocladum* e isolamento da substância Ppt-EG-produto. (...) representam as frações que foram omitidas para simplificação do fluxograma. Condições experimentais descritas na Parte Experimental, item 2.8.1.



**Figura 17.** Perfis cromatográficos obtido por RP-HPLC e espectro no UV obtido *on line* para (A) fração PptEG e (B) substância isolada (PptEG-produto). Condições cromatográficas descritas na Parte Experimental, item 2.7.

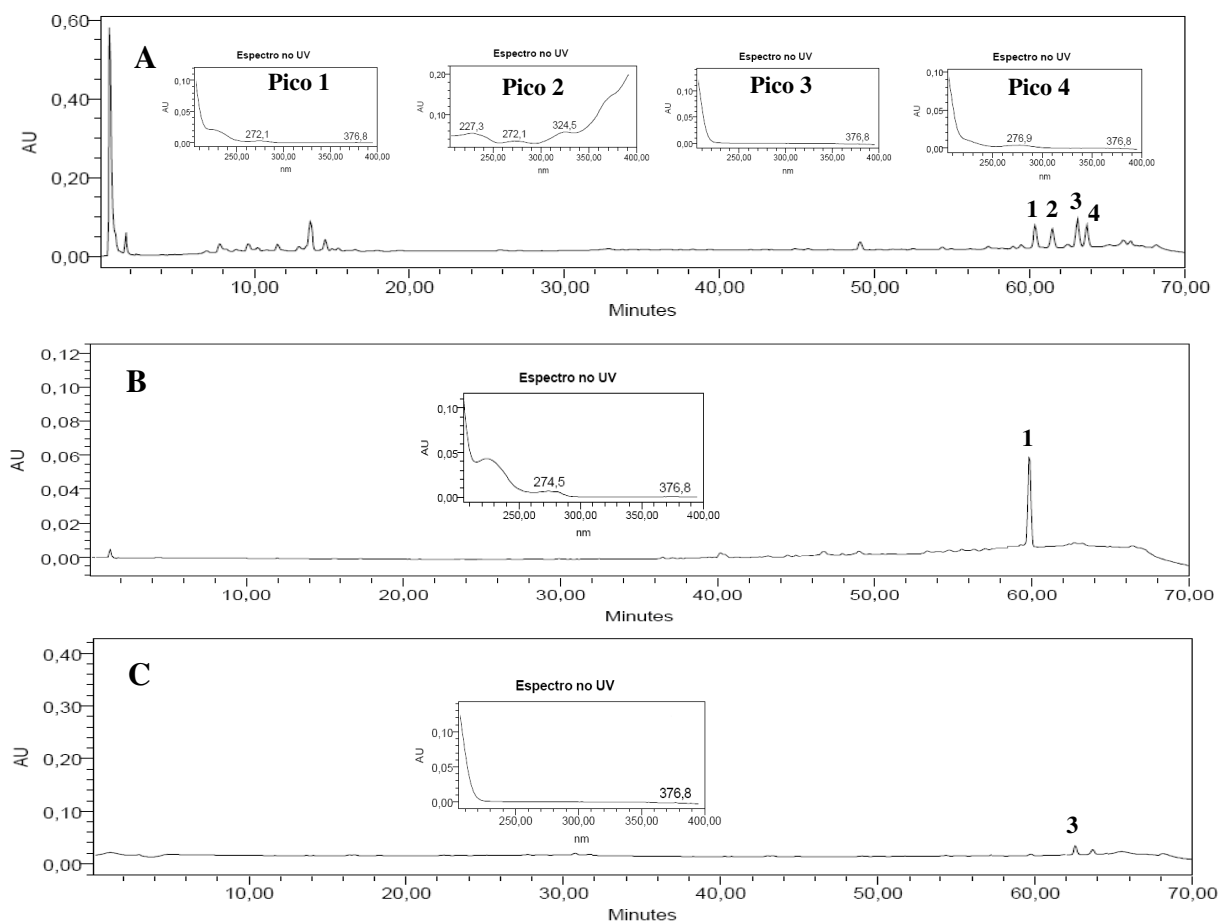
### 3.7.2 Fracionamento de Hex-EG

A fração *n*-hexânica (Hex-EG), com atividade inibidora da ECA de  $76,7 \pm 6,8\%$ , foi refracionada conforme fluxograma na figura 18.



**Figura 18.** Refracionamento da fração *n*-hexânica (Hex-EG) de *E. gonocladum* e isolamento das substâncias HexEG 9A e HexEG 3C. (...) representam as frações que foram omitidas para simplificação do fluxograma. Condições experimentais: Parte Experimental, item 2.8.2.

O perfil cromatográfico de Hex-EG, obtido por RP-HPLC, revelou a presença de quatro picos principais de pequena intensidade, com tempos de retenção de 60,3 (1), 61,4 (2), 63,0 (3) e 63,6 (4) min. As substâncias referentes aos picos 3 e 1 foram isoladas e denominadas, respectivamente, HexEG 9A e HexEG 3C (Figura 19). Sua elucidação estrutural está descrita, respectivamente, nos itens 3.8.2 e 3.8.3 .



**Figura 19.** Perfis cromatográficos obtidos por RP-HPLC e espectros no UV obtidos *on line* para (A) fração *n*-hexânica (HexEG), (B) HexEG 3C (pico 1) e (C) HexEG 9A (pico 3). Condições cromatográficas descritas na Parte Experimental, item 2.7.

### 3.7.3 Fracionamento de AC-EG

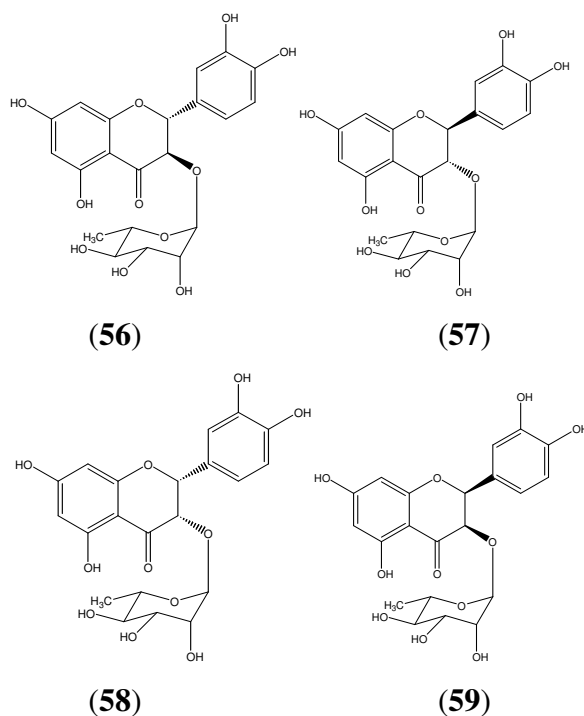
Foram realizados diversos procedimentos cromatográficos (cromatografia em coluna de sílica gel e exclusão molecular, cromatografia em contracorrente de alta velocidade e RP-HPLC preparativo) para o refractionamento da fração em acetato de etila (AC-EG, 0,87 g). Apesar das diversas tentativas, as frações resultantes apresentaram-se complexas e com massas insuficientes para viabilizar o posterior isolamento dos constituintes majoritários.

### 3.8 ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL DAS SUBSTÂNCIAS ISOLADAS

#### 3.8.1 Elucidação estrutural de PptEG-produto

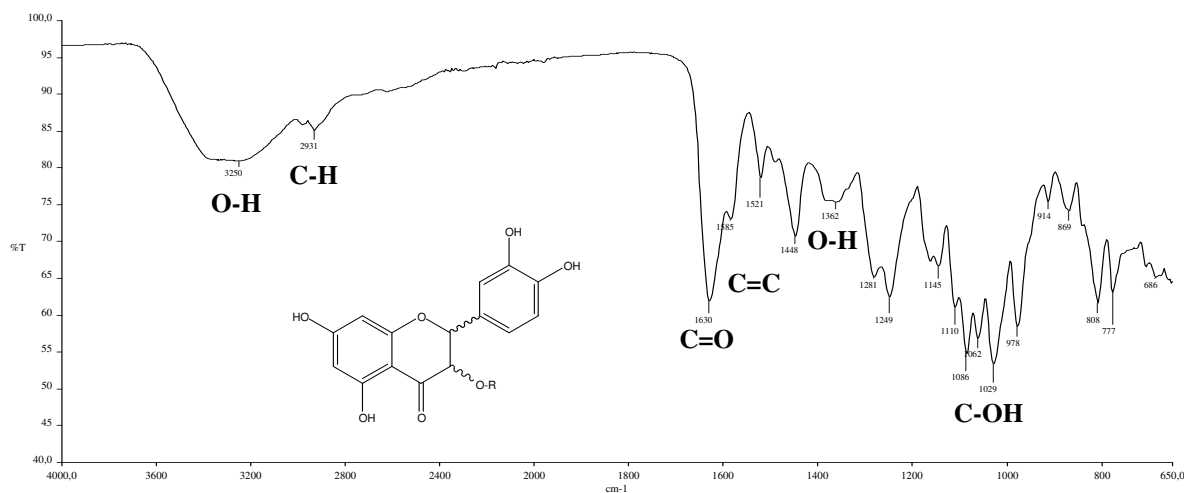
PptEG-produto foi isolado da fração Ppt-EG de *E. gonocladum* por CCS e purificado por RP-HPLC preparativo (item 2.8.1, Parte Experimental). Apresentou-se como um sólido de coloração levemente amarelada.

Na avaliação por CCD de sílica gel, PptEG-produto reagiu positivamente com  $\text{AlCl}_3$  e NP/PEG, reveladores utilizados na identificação de flavonóides. Essa indicação foi reforçada pelo perfil de absorção no UV obtido *on line* com  $\lambda_{\text{max}}$  291,1 nm, compatível com algumas classes de flavonóides, sobretudo flavanonas e diidroflavonóis (BOHN, 1998; RIJKE et al., 2006). Chen et al. (2007) relataram  $\lambda_{\text{max}}$  entre 290,6 nm e 291,3 nm para os diidroflavonóis taxifolina (diidroquercetina) (**38**), astilbina (**56**), neoastilbina (**57**), isoastilbina (**58**) e neoisoastilbina (**59**).



O espectro no IV de PptEG-produto (Figura 20) evidenciou a presença de banda larga centrada em  $3250\text{ cm}^{-1}$ , característica de deformação axial de O-H, banda em  $1362\text{ cm}^{-1}$  atribuída a deformação angular de O-H e bandas na região de  $1062\text{-}1029\text{ cm}^{-1}$  típicas de deformação axial de ligação C-OH, as quais confirmaram a presença de hidroxilas na substância. A banda em  $1630\text{ cm}^{-1}$  foi atribuída a deformação axial de carbonila. A banda em  $2931\text{ cm}^{-1}$  foi atribuída à deformação axial de C-H. O caráter aromático de PptEG-produto foi

evidenciado pela presença de bandas de intensidade média atribuídas à deformação axial C=C em 1585, 1521 e 1448  $\text{cm}^{-1}$  (SILVERSTEIN et al., 2000).

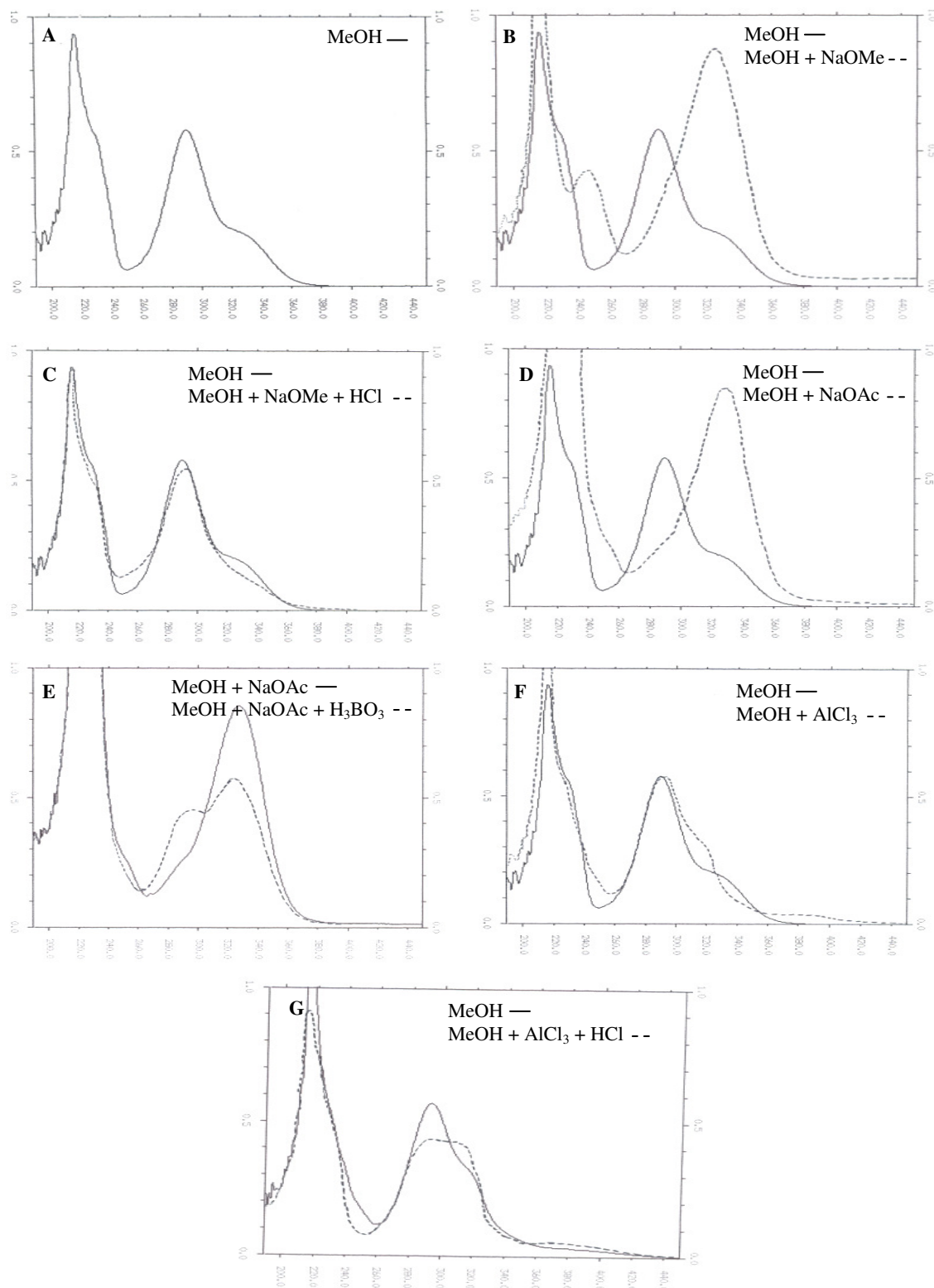


**Figura 20.** Espectro no infravermelho obtido para PptEG-produto.

O espectro no UV obtido a partir da solução metanólica de PptEG-produto confirmou tratar-se de um flavonóide (Figura 21 A). Foi observada uma banda principal com máximo de absorção em  $\lambda_{\text{max}}$  290 nm e um ombro em  $\lambda_{\text{max}} \sim 330$  nm. A análise do espectro indica a banda com  $\lambda_{\text{max}}$  290 nm como referente ao cromóforo benzoíla (banda II) e a banda em  $\lambda_{\text{max}}$  330 nm correspondente ao cromóforo referente à banda I. Os máximos de absorção observados ( $\lambda_{\text{max}}$  290 e 330 nm) são compatíveis com dados da literatura para flavanonas e diidroflavonóis, cujos valores de  $\lambda_{\text{max}}$  são 270-295 nm para a banda II e 300-330 nm para a banda I (BOHN, 1998; BRUNETON, 1999; MABRY et al., 1970), o que sugeriu saturação entre C-2 e C-3.

A fim de obter informações adicionais sobre a estrutura de PptEG-produto, foram registrados espectros na presença de reagentes de deslocamento. O espectro obtido em meio alcalino forte (NaOMe) confirmou a natureza fenólica de PptEG-produto, indicado pelo deslocamento batocrômico dos máximos de absorção (Figura 21 B). O espectro obtido após 5 minutos da adição da base reproduziu o espectro anterior, demonstrando estabilidade da molécula em meio alcalino forte. A acidificação do meio com HCl regenerou a curva (Figura 21 C). Em conjunto, esses dados sugerem a ausência de sistema *orto*- ou *para*-diidroxila na molécula. O deslocamento batocrômico das bandas do espectro após a adição de meio alcalino fraco (NaOAc) indicou a presença de hidroxilas fenólicas de caráter ácido acentuado na molécula, o que, em se tratando de diidroflavonóis e flavanonas, corresponde à hidroxila em C-7 (anel A) (Figura 21 D). Após adição de  $\text{H}_3\text{BO}_3$  (Figura 21 E) não se observou

deslocamento batocrômico da Banda II (anel A), o que indica ausência de sistemas *orto*-diidroxí nesse anel. Segundo Mabry et al. (1970), a detecção de sistemas *orto*-diidroxí no anel



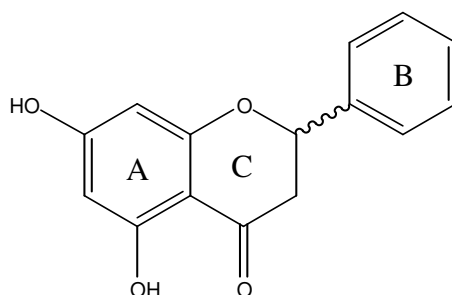
**Figura 21.** Espectro no ultravioleta de PptEG-produto (1,0 mg em 100 mL MeOH).



B não é possível com NaOAc/H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> em flavanonas e diidroflavonóis, uma vez que o cromóforo em substâncias desses grupos tem conjugação reduzida e baixa absorvidade em função da saturação entre C2-C3.

Observou-se discreto deslocamento batocrômico da Banda II (anel A) em presença de AlCl<sub>3</sub> (Figura 21 F) e não regeneração da curva em MeOH após adição de HCl (Figura 22 G), o que sugere a presença de hidroxila quelatogênica em C<sub>5</sub>. Devido à pequena intensidade da Banda I, não foi possível tirar conclusões quanto à presença ou ausência de sistema *ortho*-diidroxila no anel B.

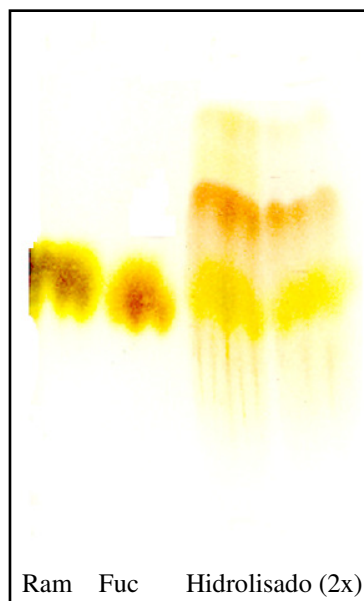
Os dados de UV permitiram propor a estrutura de um flavonóide com saturação entre C-2 e C-3, hidroxilado em C-5 e C-7, e nenhuma conclusão foi obtida para o padrão de substituição do anel B, devido à pequena intensidade da banda correspondente (Figura 22).



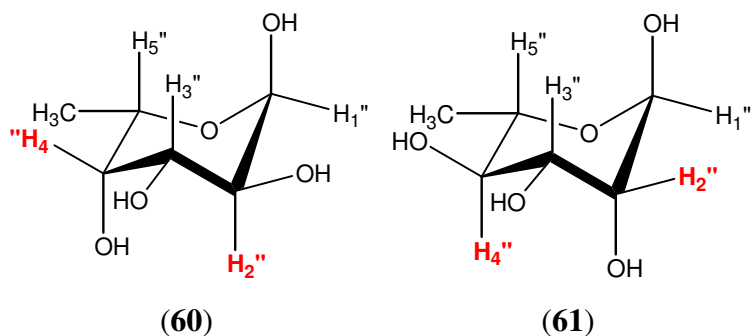
**Figura 22.** Estrutura proposta a partir dos dados espectrais de UV

O valor de R<sub>f</sub> (R<sub>f</sub> = 0,7) obtido para PptEG-produto em CCD de sílica gel, utilizando acetato de etila/ ácido fórmico/ ácido acético/ água (80:9:9:22) como eluente, e NP/PEG como revelador, sugeriu tratar-se de um glicosídeo. A fim de identificar os açúcares constituintes, realizou-se micro-hidrólise ácida de PptEG-produto em placa de sílica gel (item 2.9.4, Parte Experimental), um método bastante empregado no trabalho com glicosídeos flavônicos (STALIKAS, 2007).

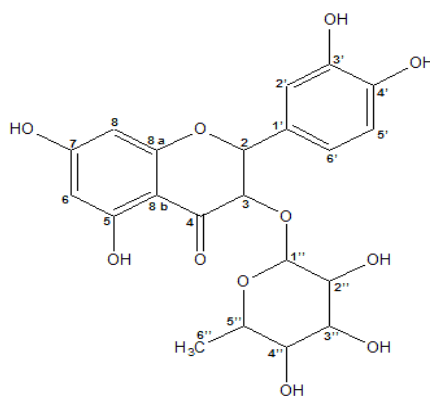
O cromatograma obtido para o produto da hidrólise (Figura 23) indicou uma mancha com valor de R<sub>f</sub> = 0,5, coincidente com as substâncias de referência fucose (**60**) e ramnose (**61**), sugerindo a presença de um deles ou de ambos os diastereoisômeros em PptEG-produto. Nas condições cromatográficas empregadas não foi possível diferenciar os dois açúcares.



**Figura 23.** Cromatograma obtido para produto da micro-hidrólise de PptEg-produto em placa de sílica gel. Eluente: clorofórmio/ metanol/ água (70:30:4). Revelador: anisaldeído. Ram = ramnose, Fuc = fucose; PptEG-produto hidrolisado foi aplicado em duplicata.

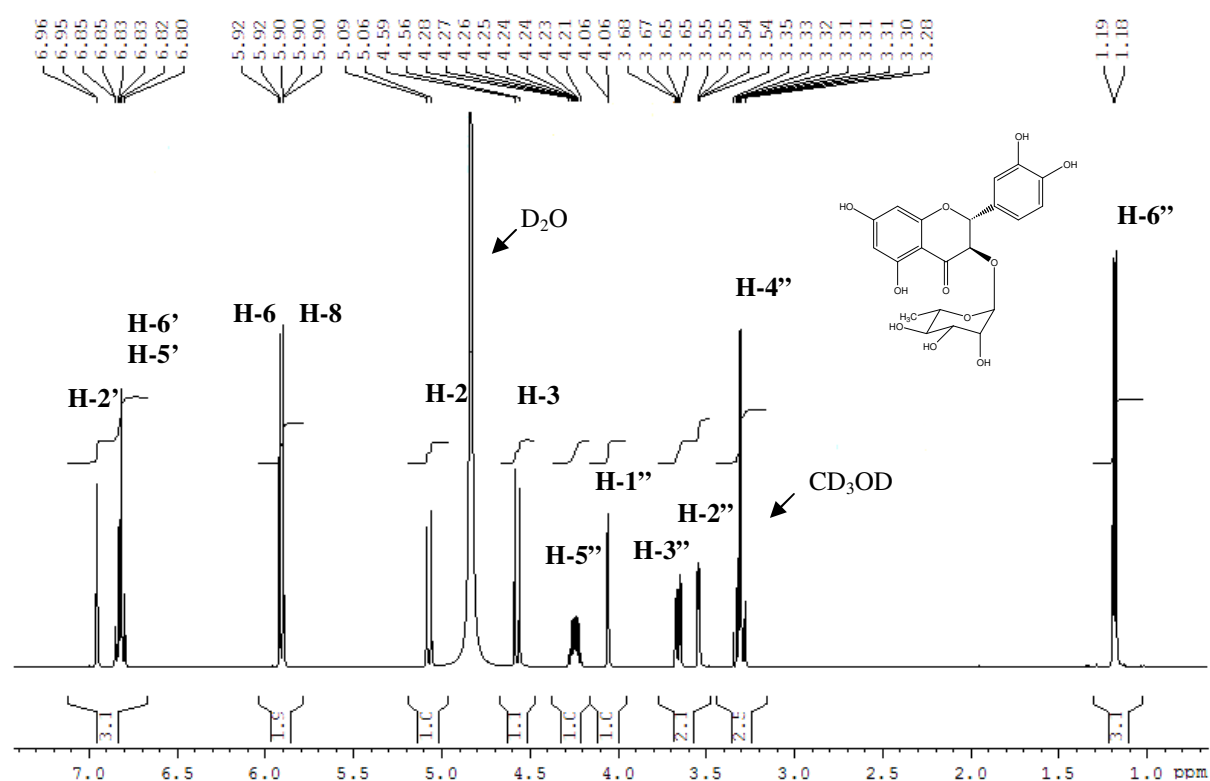


A numeração dos átomos de PptEG-produto adotada para a discussão dos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$  encontra-se representada na Figura 24.

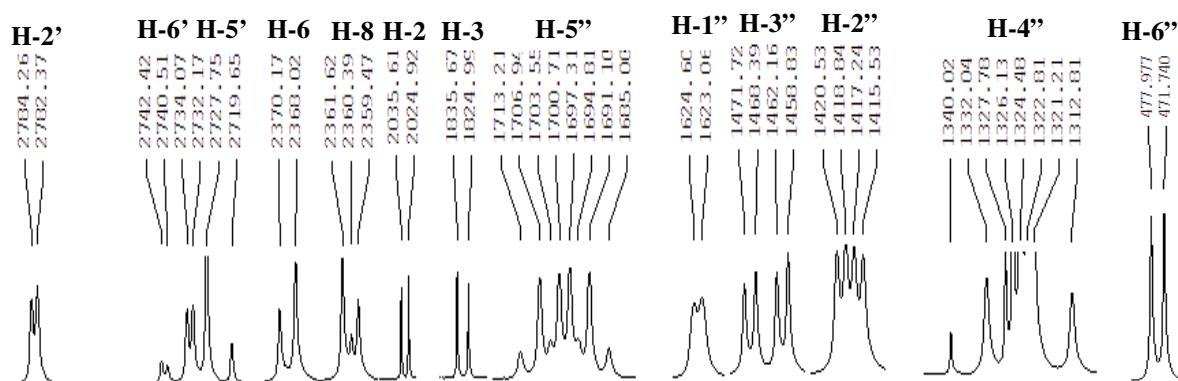


**Figura 24.** Numeração dos átomos de carbono de PptEG-produto adotada na discussão dos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$ .

A atribuição dos sinais do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD} + \text{D}_2\text{O}$ ) (Figuras 25 e 26) obtido para PptEG-produto foi feita por comparação com os dados relatados por Guo et al. (2007) para o diidroflavonol astilbina (**56**) (3-*O*- $\alpha$ -ramnosídeo de taxifolina ou diidroquercetina-3-*O*- $\alpha$ -ramnosídeo). O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de PptEG-produto apresentou seis dupletos, com integral para 1H cada, centrados em  $\delta$  4,58 ppm ( $J = 10,7$  Hz; H-3),  $\delta$  5,08 ppm ( $J = 10,7$  Hz; H-2),  $\delta$  5,90 ppm ( $J = 2,2$  Hz; H-8),  $\delta$  5,92 ppm ( $J = 2,2$  Hz; H-6),  $\delta$  6,81 ppm ( $J = 8,3$  Hz; H-5') e  $\delta$  6,95 ppm ( $J = 1,9$  Hz; H-2'). Também foi observado um duplo duplete centrado em 6,84 ppm ( $J = 8,3$  e 1,9 Hz, 1H) atribuído a H-6' (Tabela 17).



**Figura 25.** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  obtido para PptEG-produto (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD} + \text{D}_2\text{O}$ ).



**Figura 26.** Expansão do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  obtido para PptEG-produto (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD} + \text{D}_2\text{O}$ ).

A presença de sinais na região de  $\delta$  3,28 a 4,28 ppm, característicos de açúcares, confirmou tratar-se de um flavonóide glicosilado. O duplete em  $\delta$  4,06 ppm ( $J = 1,5$  Hz) foi atribuído a hidrogênio anomérico. Segundo Gaffield, Waiss e Tominaga (1975), constantes de acoplamento na ordem de 0,1 a 1,5 Hz para o hidrogênio anomérico são características de glicosídeos com configuração  $\alpha$ , o que permitiu caracterizar o PptEG-produto como um  $\alpha$ -glicosídeo. O duplete centrado em  $\delta$  1,18 ppm ( $J = 6,2$  Hz), com integral de 3H, foi atribuído a grupo metila de desoxi-açúcar (ramnose ou fucose). A análise estrutural da fucose (**60**) e da ramnose (**61**) revelou que, na ramnose, a constante de acoplamento entre H-2'' e H-3'' teria um valor pequeno (0 a 5,0 Hz), característico do acoplamento axial-equatorial entre esses átomos, sendo valor típico entre 2-3Hz. Na fucose, devido ao acoplamento *trans*-diaxial entre esses hidrogênios, essa constante de acoplamento apresentaria valor superior, entre 8-10,0 Hz (SILVERSTEIN et al., 2000). O valor observado foi  $J = 3,3$  Hz, o que confirmou ser a ramnose o monossacarídeo ligado à estrutura do flavonóide (Tabela 17).

Os sinais em  $\delta$  4,80 ppm e  $\delta$  3,30 ppm (parcialmente sobreposto a outro sinal) são oriundos dos solventes utilizados no experimento,  $\text{D}_2\text{O}$  e  $\text{CD}_3\text{OD}$ , respectivamente.

**Tabela 17.** Atribuição dos sinais do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  para PptEG-produto e comparação com dados da literatura para a astilbina

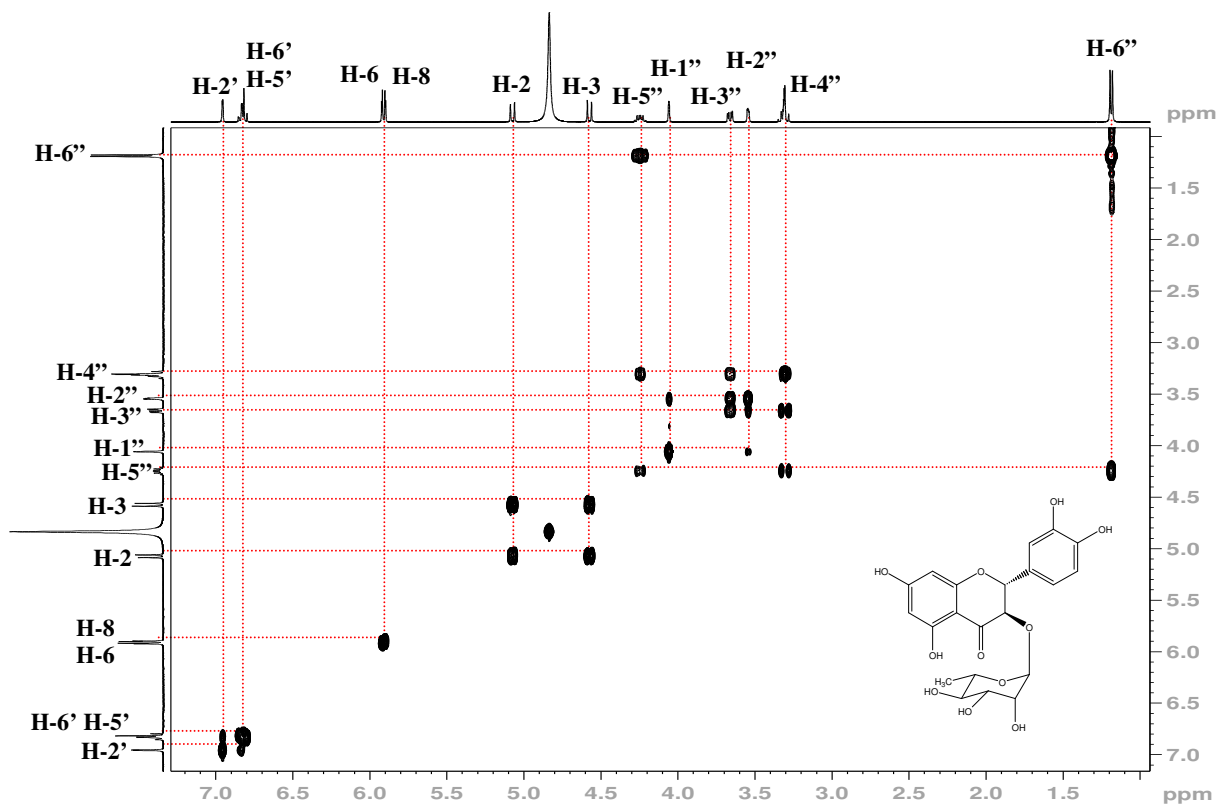
Hidrogênio	Astilbina <sup>a</sup>			PptEG-produto <sup>b</sup>		
	$\delta$ (ppm)	Mult	<i>J</i> (Hz)	$\delta$ (ppm)	Mult	<i>J</i> (Hz)
<b>H-2</b>	5,06	d	10,0	5,08	d	10,7
<b>H-3</b>	4,57	d	10,0	4,58	d	10,7
<b>H-6</b>	5,89	d	2,1	5,92	d	2,2
<b>H-8</b>	5,91	d	2,1	5,90	d	2,2
<b>H-2'</b>	6,95	d	1,8	6,95	d	1,9
<b>H-5'</b>	6,80	d	8,2	6,81	d	8,3
<b>H 6'</b>	6,84	dd	8,2; 1,8	6,84	dd	8,3; 1,9
<b>H-1''</b>	4,04	sl	-	4,06	d	1,5
<b>H-2''</b>	3,53	dl	3,3	3,54	dd	3,3; 1,5
<b>H-3''</b>	3,64	dd	9,6; 3,3	3,67	dd	9,6; 3,3
<b>H-4''</b>	3,32	t	9,6	3,31	m	-
<b>H-5''</b>	4,26	m	-	4,25	m	-
<b>CH<sub>3</sub>-6''</b>	1,18	d	6,2	1,18	d	6,2

Mult = multiplicidade (sl = simpleto largo, d = duplete, dl = duplete largo, dd = duplo duplete, t = tripleto, m = multiplete).

<sup>a</sup> Dados obtidos por GUO et al. (2007), em CD<sub>3</sub>OD (300 MHz).

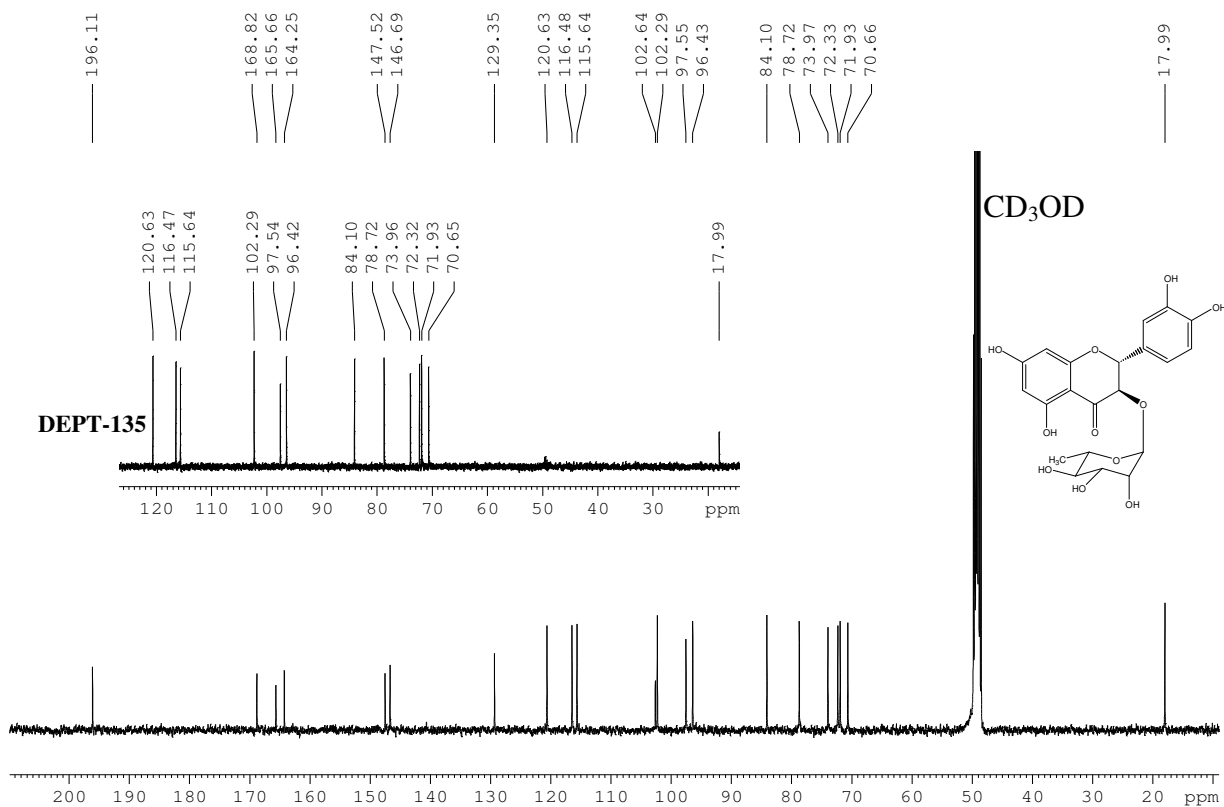
<sup>b</sup> Dados obtidos no presente trabalho, em CD<sub>3</sub>OD + D<sub>2</sub>O (400 MHz).

A atribuição dos sinais de  $^1\text{H}$  para PptEG-produto foi confirmada pela análise do espectro bidimensional de correlação homonuclear COSY ( $^1\text{H}$ — $^1\text{H}$ ) (Figura 27). O mapa de contornos COSY evidenciou os acoplamentos entre H-3 ( $\delta$  4,58 ppm) e H-2 ( $\delta$  5,08 ppm), bem como possibilitou estabelecer a conectividade entre todos os hidrogênios do resíduo de ramnose.



**Figura 27.** Mapa de contornos COSY obtido para PptEG-produto (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD} + \text{D}_2\text{O}$ ).

O espectro desacoplado de RMN de  $^{13}\text{C}$  obtido para PptEG-produto (100 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD} + \text{D}_2\text{O}$ ) apresentou sinais correspondentes a 21 átomos de carbono, confirmando tratar-se de um flavonóide monoglicosilado. A multiplicidade dos sinais foi atribuída pelo subespectro DEPT-135 e indicou ausência de carbonos metilênicos ( $\text{CH}_2$ ), presença de 8 carbonos não hidrogenados (C), 1 carbono metílico ( $\text{CH}_3$ ) e 12 carbonos metínicos (CH). O sinal em  $\delta$  196,11 ppm foi atribuído ao carbono carbonílico (Figura 28).



**Figura 28.** Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  e subspectro DEPT-135 obtidos para PptEG-produto (100 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD} + \text{D}_2\text{O}$ ).

A análise do mapa de contornos obtido pelo experimento HSQC ( $^{13}\text{C}$ — $^1\text{H}$ ) (Figura 29) evidenciou a correlação entre os sinais de C-3 ( $\delta$  78,72 ppm), C-2 ( $\delta$  84,10 ppm), C-6 ( $\delta$  97,55 ppm) e C-8 ( $\delta$  96,43 ppm) com os sinais de  $^1\text{H}$  em  $\delta$  4,58;  $\delta$  5,08;  $\delta$  5,92 e  $\delta$  5,90 ppm, respectivamente. Também foi observada correlação entre os sinais de C-5' ( $\delta$  116,48 ppm), C-6' ( $\delta$  120,63 ppm) e C-2' ( $\delta$  115,64 ppm) com os sinais de  $^1\text{H}$  em  $\delta$  6,81;  $\delta$  6,84 e  $\delta$  6,95 ppm, respectivamente. Os sinais referentes aos carbonos da ramnose também foram identificados pelo mapa de contornos HSQC. O hidrogênio anomérico H-1'' ( $\delta$  4,06 ppm) apresentou correlação com o carbono em  $\delta$  102,29 ppm.

O mapa de contornos obtido pelo experimento de correlação heteronuclear HSQC-TOCSY (Figura 30) confirmou as atribuições anteriores ao revelar os acoplamentos C-H vicinais e geminais ( $^1J_{\text{C-H}}$ ).

Em conjunto, esses dados possibilitaram a atribuição inequívoca dos sinais de carbono hidrogenados. As demais correlações observadas encontram-se listadas na Tabela 18.

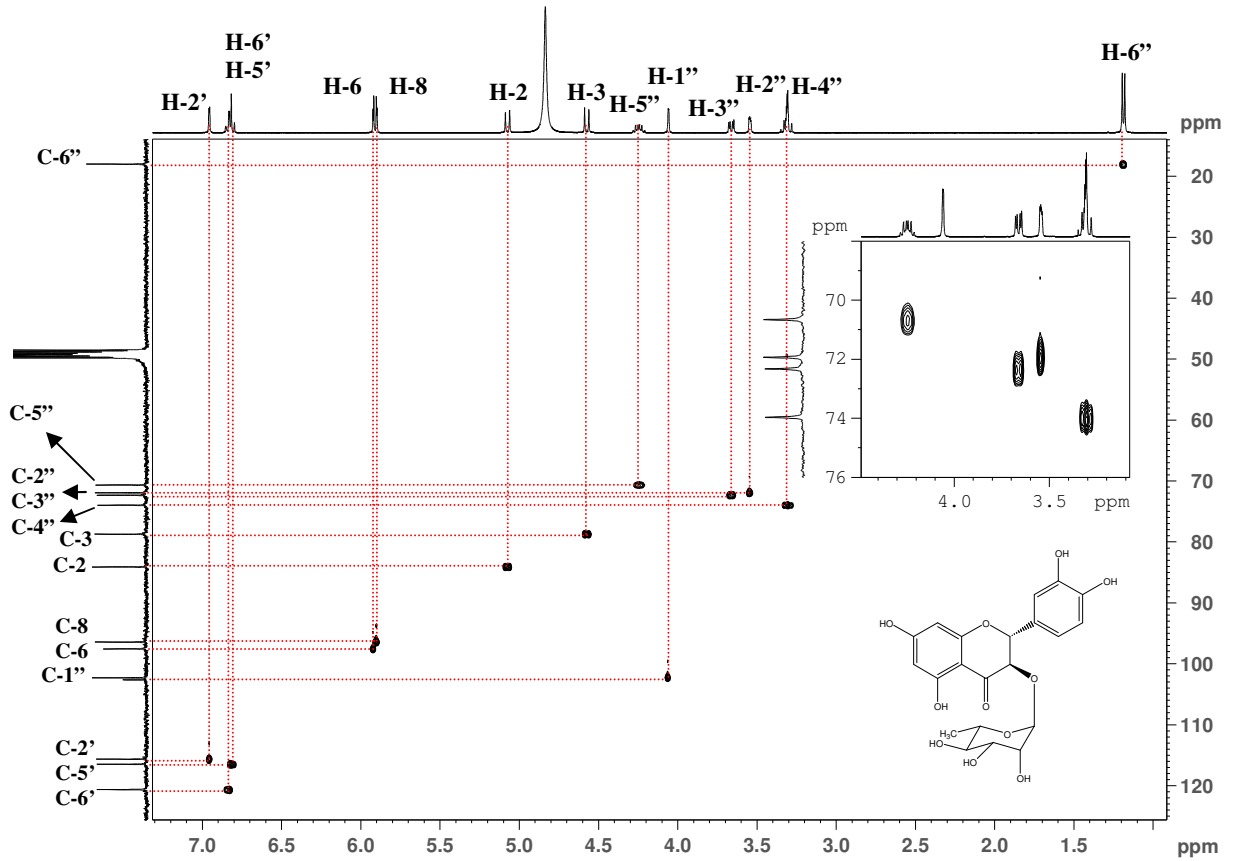


Figura 29. Mapa de contornos HSQC obtido para PptEG-produto.

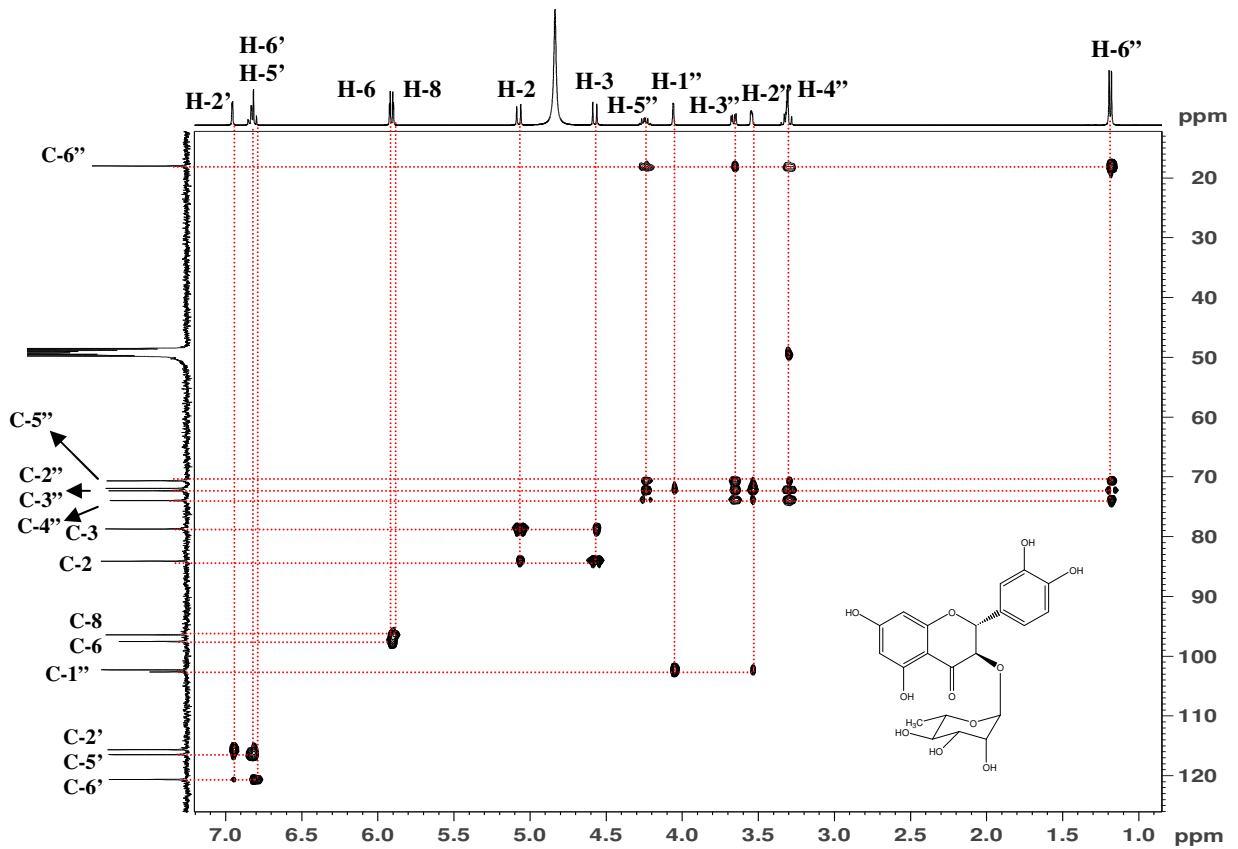


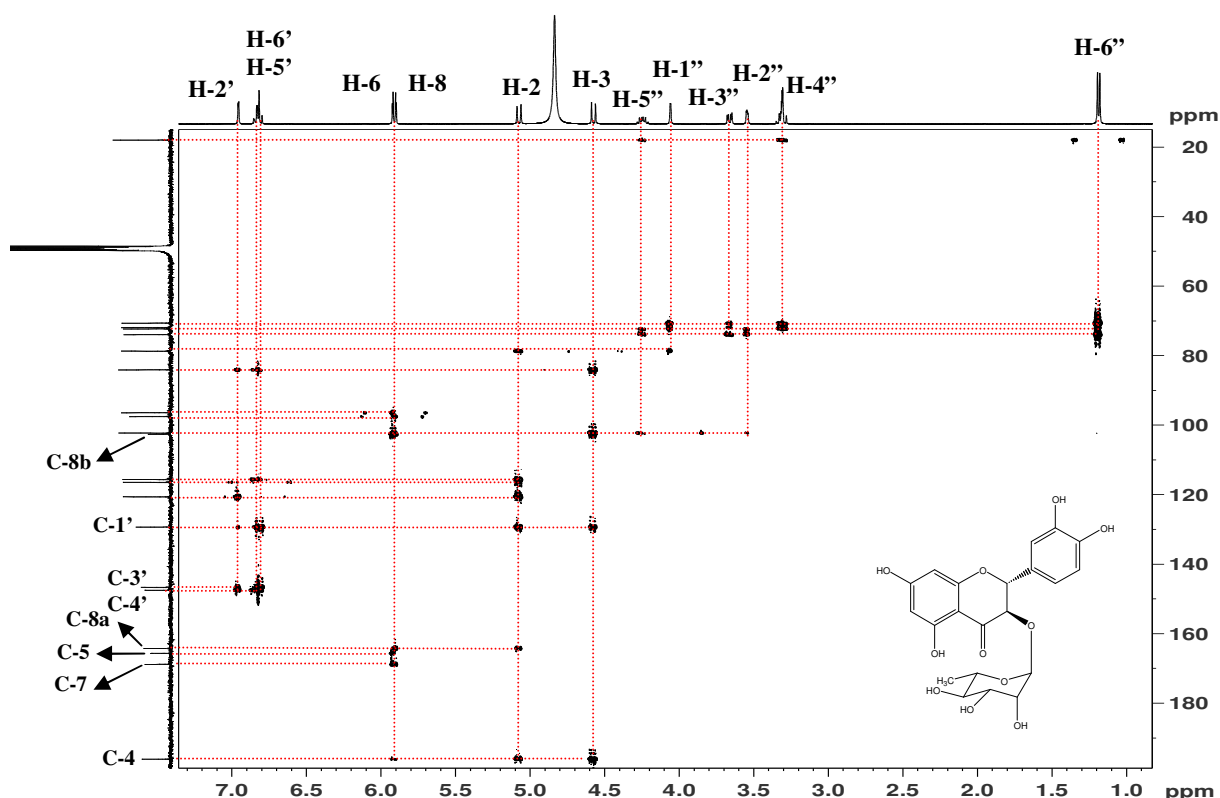
Figura 30. Mapa de contornos HSQC-TOCSY obtido para PptEG-produto.



**Tabela 18.** Correlações heteronucleares carbono-hidrogênio observadas no mapa de contornos HSQC para PptEG-produto

C/H	$\delta^1\text{H}$ (ppm)	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm)	C/H	$\delta^1\text{H}$ (ppm)	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm)
2	5,08	84,10	1''	4,06	102,29
3	4,58	78,72	2''	3,54	71,93
6	5,92	97,55	3''	3,67	72,33
8	5,90	96,43	4''	3,31	73,97
2'	6,95	115,64	5''	4,25	70,66
5'	6,81	116,48	6''	1,18	17,99
6'	6,84	120,63	-	-	-

O mapa de contornos obtido pelo experimento HMBC (Figura 31) forneceu os acoplamentos  $^{2,3,4}J_{\text{C-H}}$  e dessa forma permitiu atribuir os sinais dos carbonos não hidrogenados.



**Figura 31.** Mapa de contornos HMBC obtido para PptEG-produto.

Os sinais em  $\delta$  196,11;  $\delta$  168,82;  $\delta$  165,66;  $\delta$  164,25 e  $\delta$  102,64 ppm foram atribuídos, respectivamente, aos carbonos C-4, C-7, C-5, C-8a e C-8b, a partir das correlações descritas na Tabela 19. Os sinais em  $\delta$  147,52;  $\delta$  146,69 e  $\delta$  129,35 foram atribuídos a C-4', C-3' e C-

1', respectivamente. A correlação observada entre C-3 ( $\delta$  78,72 ppm) e o hidrogênio anomérico da ramnose (H-1'') confirmou a posição de ligação do monossacarídeo ramnose à genina (Tabela 19).

**Tabela 19.** Correlações heteronucleares  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  de longa distância observadas no mapa de contornos HMBC ( $^{2,3,4}J_{\text{C-H}}$ ) obtido para PpEG-produto

C	$\delta$ $^{13}\text{C}$ (ppm)	Hidrogênios com correlação
2	84,10	H-3; H-2'; H-5'; H-6'
3	78,72	H-2; H-1''
4	196,11	H-2; H-3; H-6; H-8
5	165,66	H-6
6	97,55	H-8
7	168,82	H-6; H-8
8	96,43	H-6
8a	164,25	H-2; H-8
8b	102,64	H-3; H-8
1'	129,35	H-2; H-3; H-2'; H-5'; H-6'
2'	115,64	H-2; H-5'; H-6'
3'	146,69	H-2'; H-5'; H-6'
4'	147,52	H-2'; H-5'; H-6'
5'	116,48	H-2; H-6'
6'	120,63	H-2; H-2'; H-5'
1''	102,29	H-3; H-2''; H-5''
2''	71,93	H-1''; H-3''; H-4''
3''	72,33	H-1''; H-2''; H-4''; H-5''; H-6''
4''	73,97	H-2''; H-3''; H-5''; H-6''
5''	70,66	H-1''; H-3''; H-4''; H-6''
6''	17,99	H-4''; H-5''

Uma vez realizada a atribuição completa dos sinais de RMN de  $^{13}\text{C}$  para PptEG-produto, os valores de deslocamento químico obtidos foram comparados com dados da literatura para a astilbina (**56**) e apresentaram grande similaridade (Tabela 20).

**Tabela 20.** Atribuição dos sinais do espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  obtido para PptEG-produto e dados da literatura para a astilbina

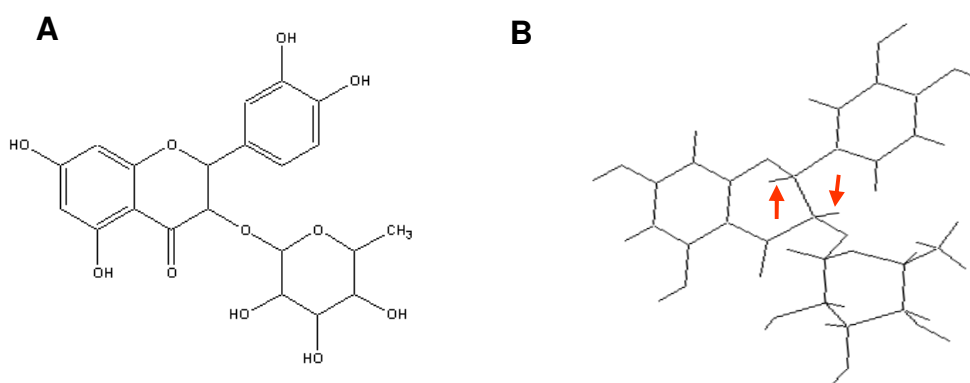
C	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm) Astilbina <sup>a</sup>	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm) PptEG-produto <sup>b</sup>	C	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm) Astilbina <sup>a</sup>	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm) PptEG-produto <sup>b</sup>
2	84,8	84,10	3'	147,3	146,69
3	79,4	78,72	4'	148,1	147,52
4	196,7	196,11	5'	116,3	116,48
5	166,3	165,66	6'	121,3	120,63
6	98,2	97,55	1''	102,9	102,29
7	169,7	168,82	2''	72,6	71,93
8	97,2	96,43	3''	72,9	72,33
8a	164,9	164,25	4''	74,6	73,97
8b	103,2	102,64	5''	71,3	70,66
1'	130,0	129,35	6''	18,6	17,99
2'	117,1	115,64	-	-	-

<sup>a</sup> Dados relatados por GUO et al. (2007), em  $\text{CD}_3\text{OD}$  (100 MHz)

<sup>b</sup> Dados obtidos no presente trabalho, em  $\text{CD}_3\text{OD} + \text{D}_2\text{O}$  (100 MHz)

Os dados espectrais obtidos no presente trabalho e sua comparação com os dados da literatura permitiram concluir que a substância PptEG-produto é a diidroquercetina-3-*O*- $\alpha$ -ramnosídeo (ou taxifolina-3-*O*- $\alpha$ -ramnosídeo). Essa molécula possui dois centros quirais (C-2 e C-3), o que determina a existência de quatro diastereoisômeros denominados de astilbina (**56**), neoastilbina (**57**), isoastilbina (**58**) e neoisoastilbina (**59**).

A constante de acoplamento escalar de 10,7 Hz observada para  $^1J_{\text{H}_2\text{-H}_3}$  (Tabela 17) tem valor característico de acoplamento *trans*-diaxial, no qual os hidrogênios se localizam em planos espaciais distintos da molécula, com ângulo de 180° entre eles (SILVERSTEIN et al., 2000) (Figura 32 B). Dados da literatura para os isômeros da diidroquercetina-3-*O*- $\alpha$ -ramnosídeo indicam constantes de acoplamento escalar entre H-2 e H-3 da ordem de 9,5 a 10,6 Hz para os isômeros *trans* [astilbina (2*R*,3*R*) e neoastilbina (2*S*,3*S*)] e da ordem de 2,0 a 2,5 Hz para os isômeros *cis* [isoastilbina (2*R*,3*S*) e neoisoastilbina (2*S*,3*R*)] (DU; LI; JERZ, 2005; GAFFIELD; WAISS; TOMINAGA, 1975; TATSIS et al., 2007). Com base nesses dados, o valor encontrado no presente trabalho ( $J = 10,7$  Hz) possibilitou definir a estereoquímica relativa entre H-2 e H-3 de PptEG-produto como *trans*, indicando tratar-se da astilbina (**56**) ou da neoastilbina (**57**).



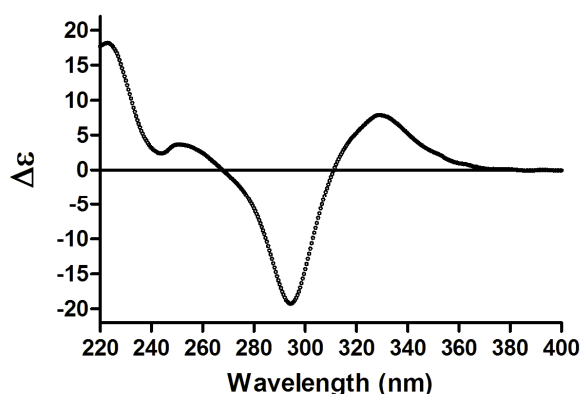
**Figura 32.** (A) Estrutura química da diidroquercetina-3-*O*- $\alpha$ -ramnosídeo. (B) Representação da estereoquímica relativa em programa *ACD-Labs 4.0*, demonstrando o acoplamento *trans*-diaxial entre H-2 e H-3 (indicado pelas setas vermelhas).

A estereoquímica absoluta da molécula foi definida a partir da análise do espectro de dicroísmo circular (DC). A luz plano polarizada é composta pela luz polarizada circular orientada para a direita (LPC<sub>d</sub>) e pela luz polarizada circular orientada para a esquerda (LPC<sub>e</sub>). Quando um meio opticamente ativo é atravessado pela luz plano polarizada, na faixa do comprimento de onda em que seu cromóforo absorve, a luz é desviada em um ângulo ( $\alpha$ ) e a parte da molécula opticamente ativa absorve LPC<sub>d</sub> e LPC<sub>e</sub> de forma diferencial. A luz resultante é elipticamente polarizada e o meio exibe DC. Se  $\epsilon_d$  e  $\epsilon_e$  são os coeficientes de extinção molar para LPC<sub>d</sub> e LPC<sub>e</sub>, respectivamente, a absorção dicróica diferencial ( $\Delta\epsilon = \epsilon_d - \epsilon_e$ ) é a medida da intensidade do DC. A elipsidade molecular  $[\theta]$  está relacionada com  $\Delta\epsilon$  por pela equação:  $[\theta] = 3300 \Delta\epsilon$  (VELLUZ et al., 1965).

Para substâncias da classe dos diidroflavonóis, sabe-se que o efeito Cotton resultante da transição  $n \rightarrow \pi^*$  pode ser usado de maneira satisfatória para estabelecer a configuração absoluta de C-2. Um efeito Cotton positivo para bandas de absorção na faixa de comprimentos de onda elevados (320-340 nm) indica a configuração *2R*, ao passo que o efeito negativo indica a configuração *2S* (SLADE; FERREIRA; MARAIS, 2005; GAFFIELD; WAISS; TOMINAGA, 1975). O espectro de PptEG-produto, registrado na região de  $\lambda$  220-400 nm (Figura 33; Tabela 21), revelou efeito Cotton positivo ( $\Delta\epsilon = + 7,88$ ) em  $\lambda$  329 nm, o que permite definir a estereoquímica absoluta de C-2 como *R* e, portanto, identificar PptEG-produto como astilbina (**56**).

Diversos derivados glicosilados de taxifolina (dihidroquercetina) já foram relatados nas espécies *Erythroxylum rufum*, *E. ulei* (BOHN et al., 1981), *E. coca* var. *ipadu* e *E.*

*novogranatense* var. *truxillense* (JOHNSON et al., 1998) indicando que essa aglicona têm ocorrência comum no gênero. Entretanto, não foram encontrados relatos da presença de astilbina nesse gênero, sendo esta a primeira descrição.



**Figura 33.** Espectro de dicroísmo circular obtido para a substância PptEG-produto (dados obtidos em MeOH, a 25°C, na concentração de 0,125 mg/mL).

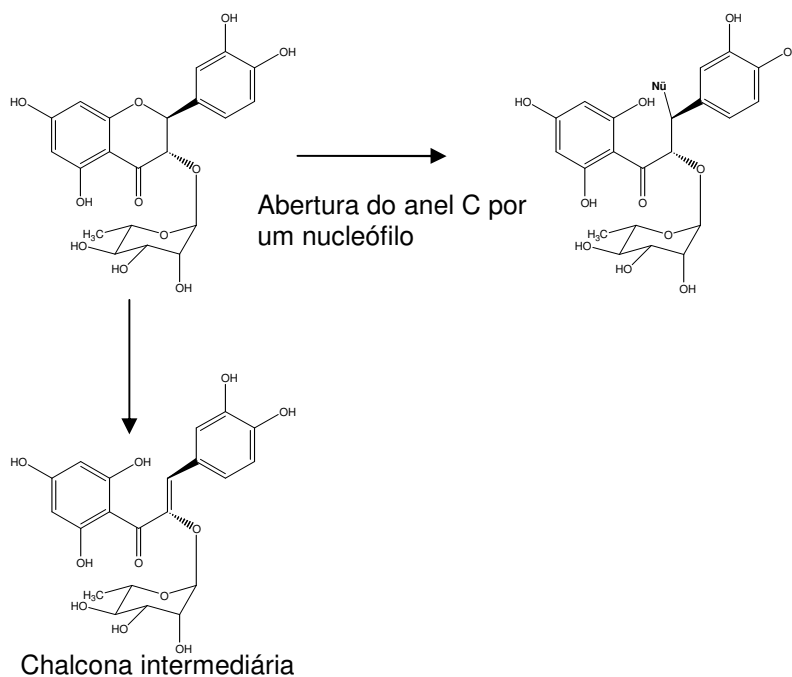
**Tabela 21.** Dados do espectro de dicroísmo circular obtidos para PptEG-produto

$\lambda$ (nm)	$\Delta\epsilon$
383	0
329	7,88
311	0
294	- 19,26
267,5	0
251	3,66
243,5	2,39
223	18,2

Durante a obtenção dos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$  observou-se degradação da diidroquercetina-3-*O*- $\alpha$ -ramnosídeo, provavelmente por isomerização. A reação parece ocorrer mais facilmente sob temperatura ambiente elevada e em solução de metanol/água. Após algumas horas em metanol/água, o pó, obtido da secagem da solução, inicialmente levemente amarelado, assumia forte coloração amarela, indicativo de reação. Por esse motivo, recomenda-se não deixar o material em solução por períodos prolongados.

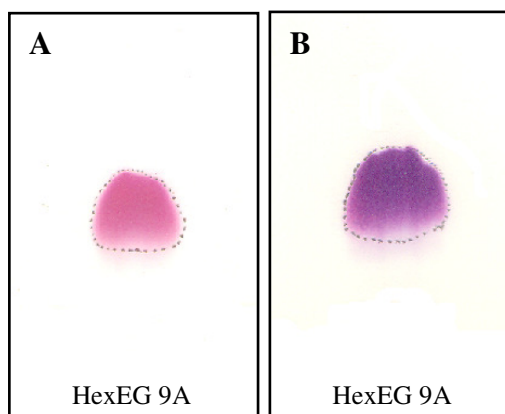
Du, Li e Jerz (2005) relataram a isomerização da astilbina a isoastilbina após extração a quente ou evaporação a vácuo. Gaffield, Waiss e Tominaga (1975) demonstraram a

interconversão entre os quatro diastereoisômeros da astilbina em três condições: piridina/D<sub>2</sub>O, acetato de sódio etanólico e D<sub>2</sub>O sob refluxo. Os dados apontam para mecanismos de isomerização diferentes, dependendo da condição do meio, sendo sugerida a formação de uma chalcona intermediária ou abertura do anel C da estrutura flavonoídica por um nucleófilo.



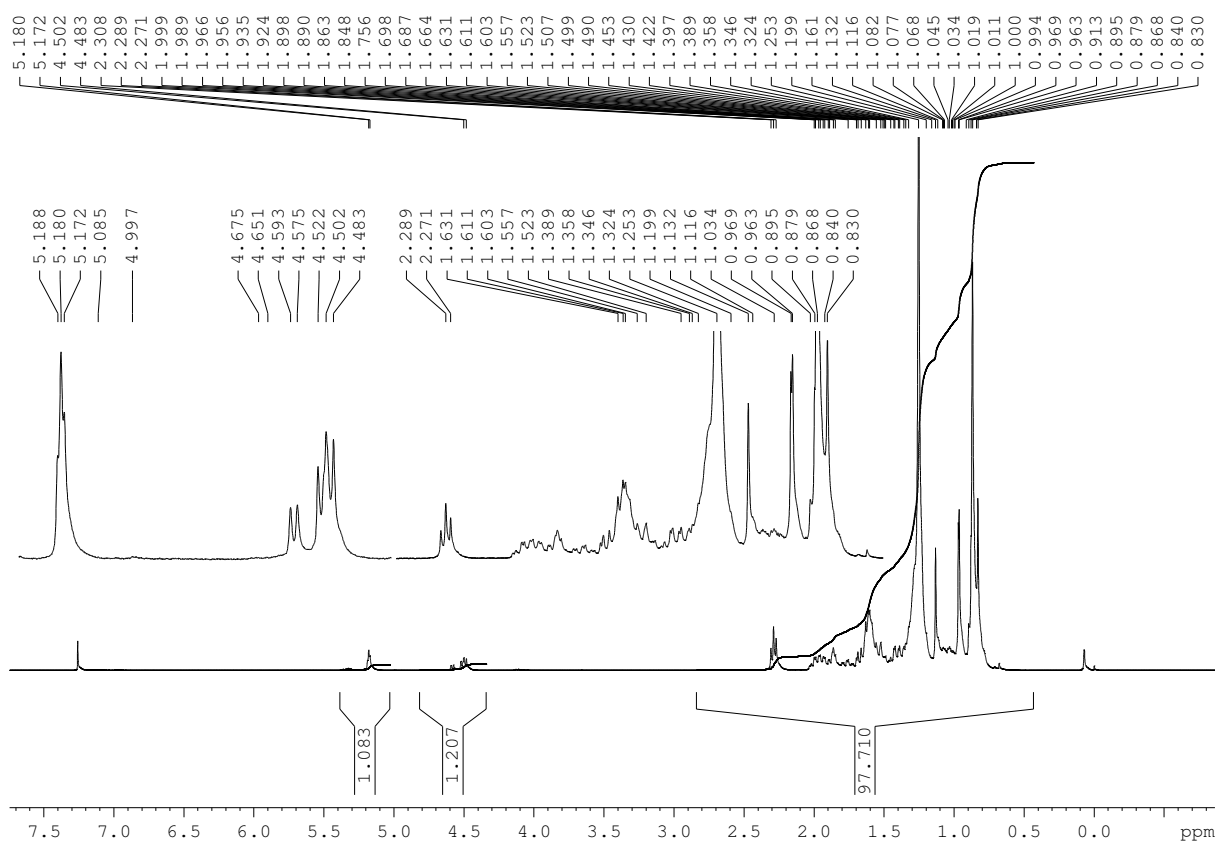
### 3.8.2 Elucidação estrutural de HexEG 9A

HexEG 9A, isolado da fração Hex-EG de *E. gonocladum* por CCS (item 2.8.2, Parte Experimental), apresentou-se como um sólido amorfo de coloração branca. Sua análise por CCD de sílica gel indicou reação positiva para o reagente de Liebermann-burchard (reagente utilizado na identificação de terpenos e esteróides) e com anisaldeído (revelador geral) (Figura 34).



**Figura 34.** Perfil em CCD de sílica gel para a substância HexEG 9A isolada da fração *n*-hexânica de *E. gonocladum* em coluna de sílica gel. Eluente: *n*-hexano/ diclorometano (9:1). (A) revelador para triterpenos e esteróides (Lieberman-burchard), (B) revelador geral (anisaldeído).

O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) obtido para HexEG 9A revelou alta complexidade e diversos sinais sobrepostos na região entre  $\delta$  0,83 a 2,29 ppm, bem como ausência de sinais na região de hidrogênios aromáticos, sugerindo substância alifática de cadeia longa (Figura 35). O espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) (Figuras 36 e 37) evidenciou número superior a 43 átomos de carbono. Os sinais em  $\delta$  121,9 e 145,4 ppm foram atribuídos a carbonos olefínicos e o sinal em  $\delta$  173,9 ppm, a carbono carbonílico. O subspectro DEPT-135 (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) (Figuras 38 e 39) revelou a presença de vários sinais referentes a grupos metilênicos ( $\text{CH}_2$ ) na região entre  $\delta$  18,0-40,0 ppm. Os sinais em  $\delta$  14,3,  $\delta$  15,8,  $\delta$  17,0 e  $\delta$  17,1 ppm foram atribuídos a grupos metila ( $\text{CH}_3$ ). A análise dos dados espectrais de RMN de  $^{13}\text{C}$  e de  $^1\text{H}$  aliados à polaridade do eluente utilizado para dessorção dessa substância da coluna cromatográfica (mistura 9:1 de Hex/DCM) sugeriram tratar-se de composto alifático de cadeia longa, provavelmente um ácido graxo.



**Figura 35.** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  obtido para HexEG 9A (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).

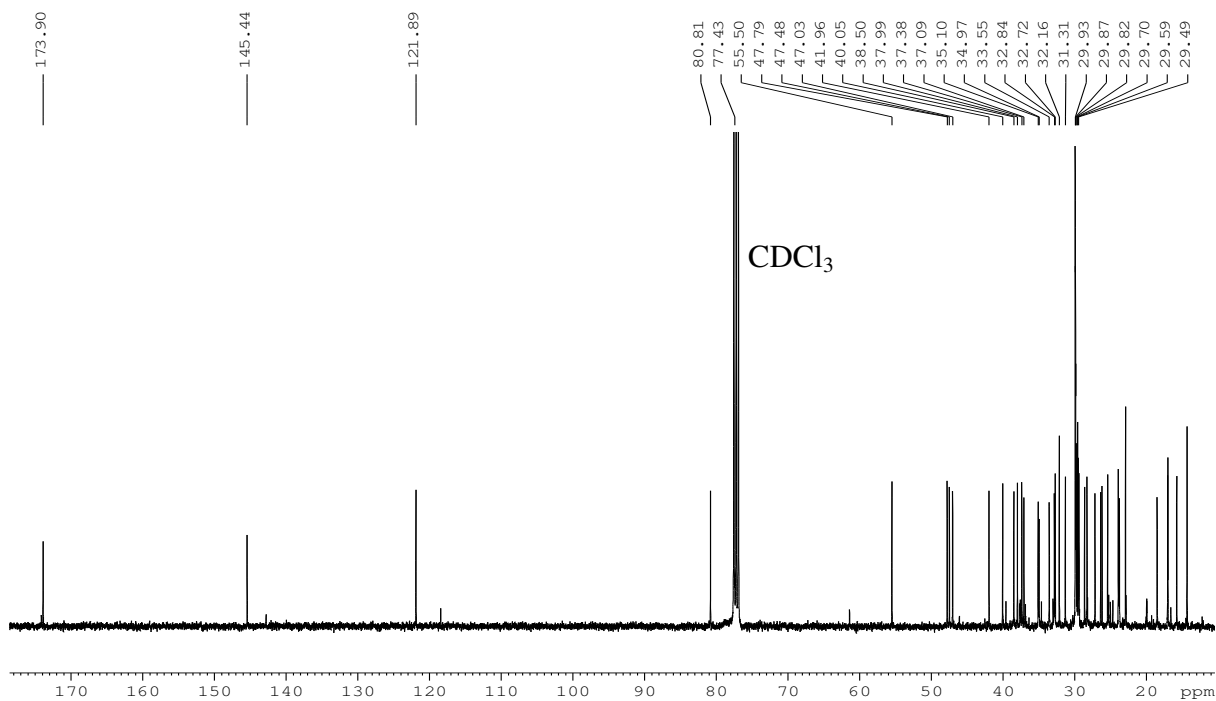


Figura 36. Espectro de RMN de <sup>13</sup>C obtido para HexEG 9A (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>).

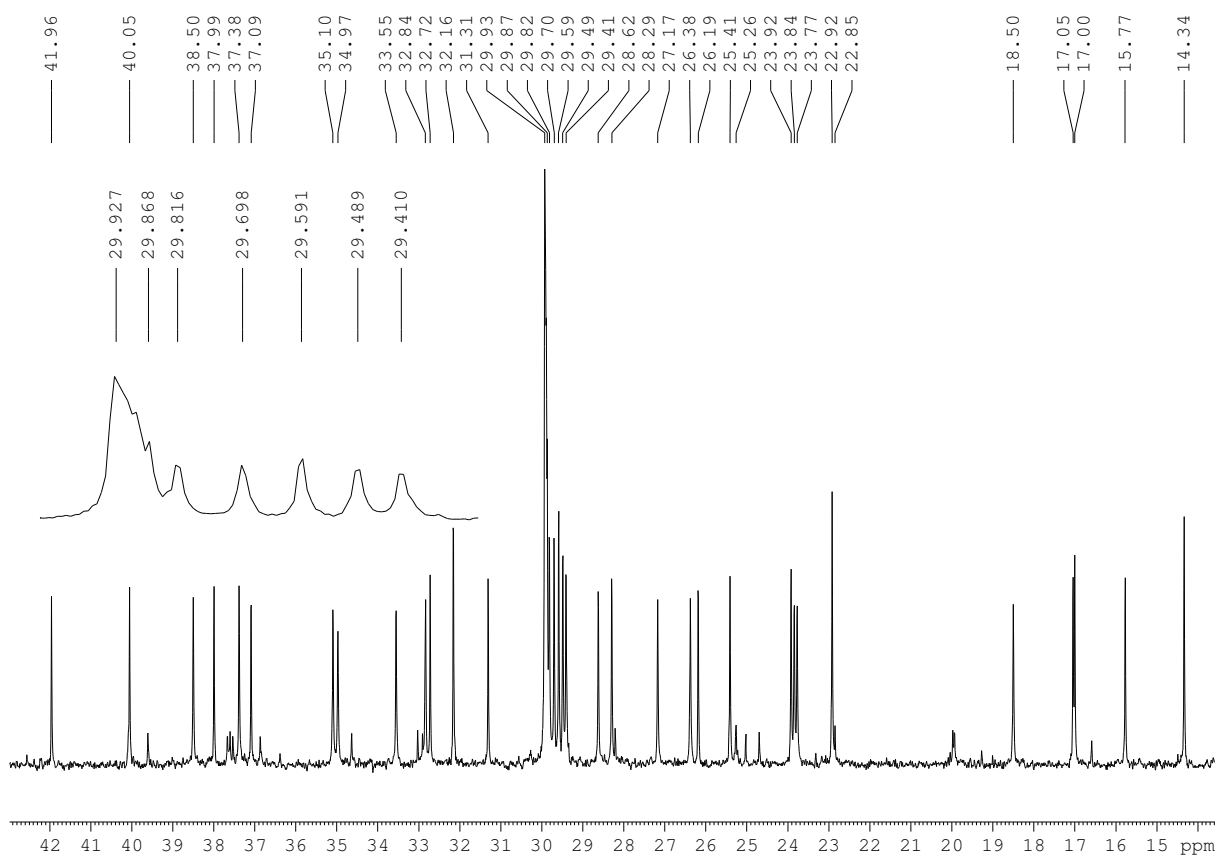
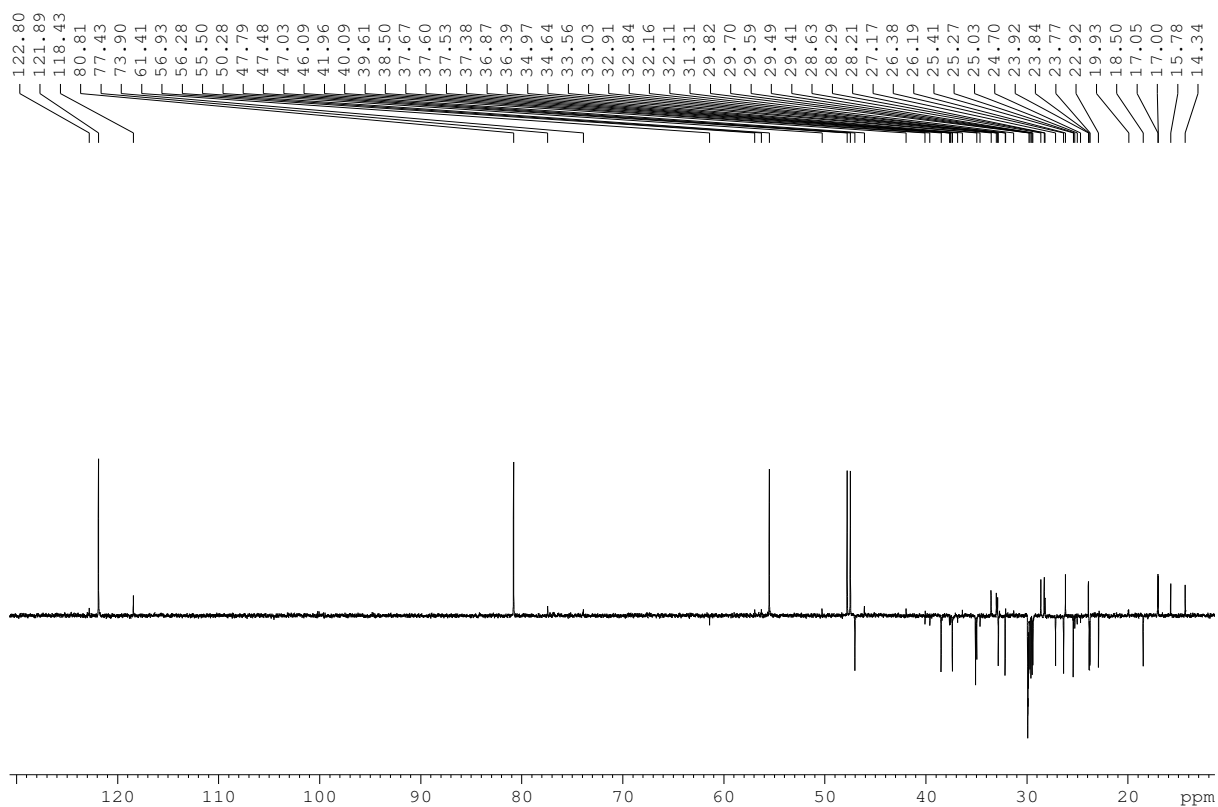
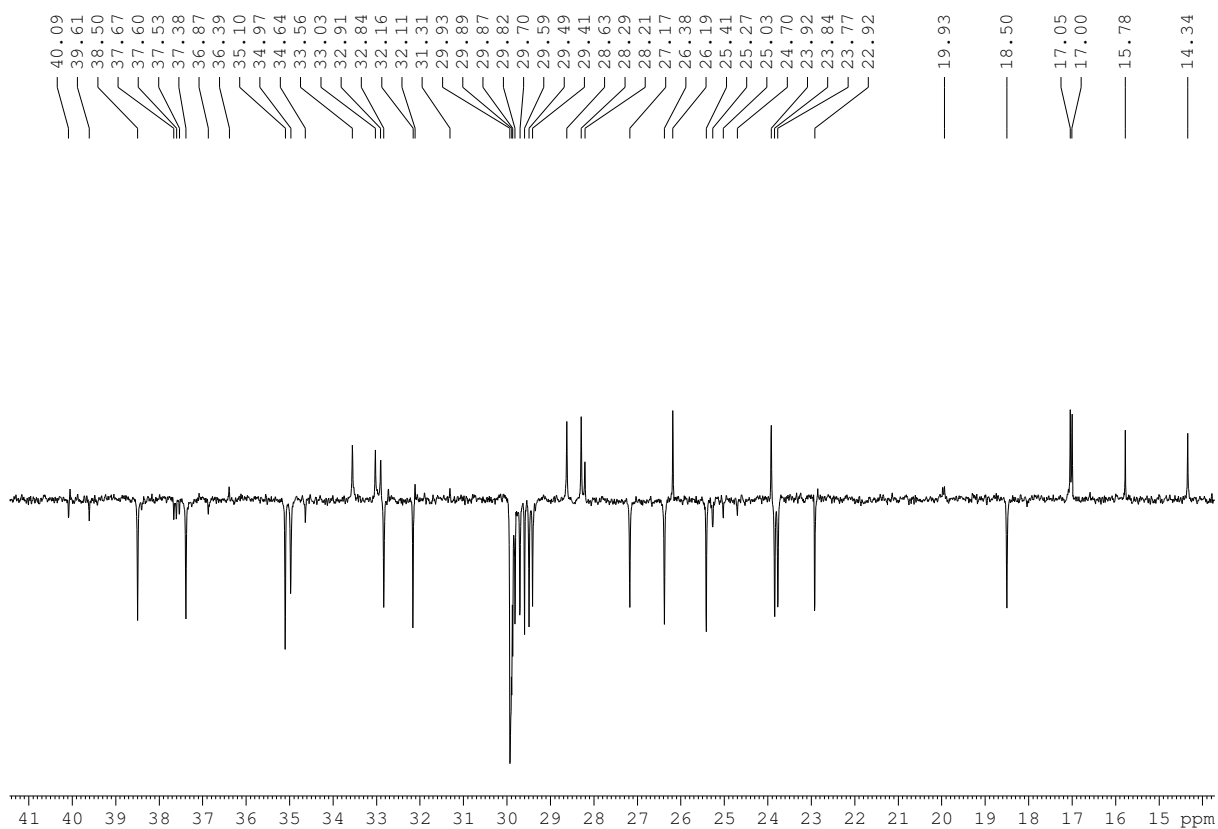


Figura 37. Expansão do espectro de RMN de <sup>13</sup>C obtido para HexEG 9A (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>).



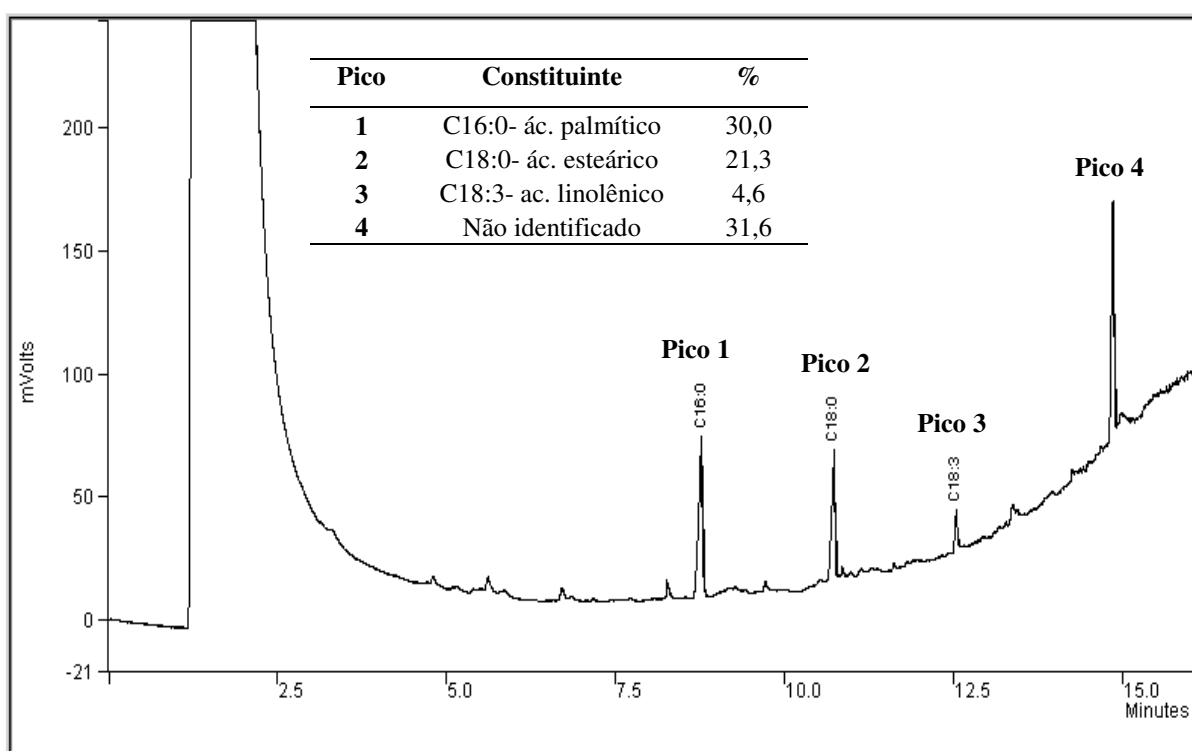
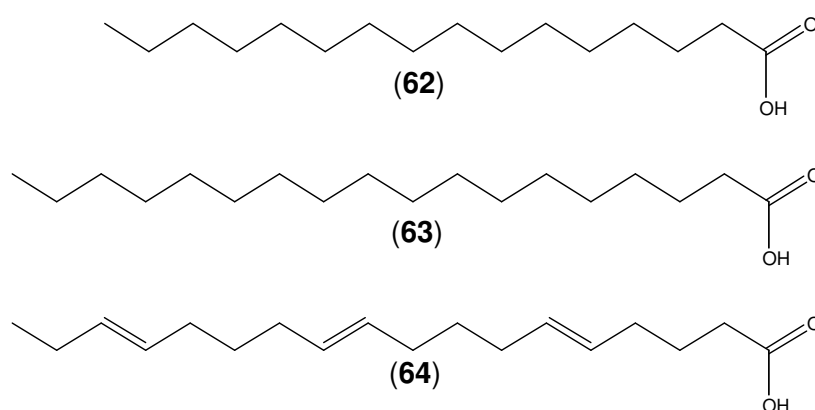


**Figura 38.** Subespectro DEPT-135 obtido para HexEG 9A (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).



**Figura 39.** Expansão do subespectro DEPT-135 obtido para HexEG 9A (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).

A fim de confirmar a natureza graxa de HexEG 9A, uma amostra do sólido foi analisada por cromatografia gasosa (CG) com detector FID (*Flame Ionization Detector* – detector por ionização em chama) e os picos foram identificados por comparação com o  $T_R$  de ácidos graxos de referência, injetados nas mesmas condições (item 2.9.5, Parte Experimental). O cromatograma obtido indicou que a fração HexEG 9A é constituída por uma mistura de ácidos graxos, sendo 30,0% de ácido palmítico (**62**), 21,3 % de ácido esteárico (**63**), 4,6% de ácido linolênico (**64**), 31,6% de uma substância não identificada e 12,5% de outros picos minoritários não identificados (Figura 40).



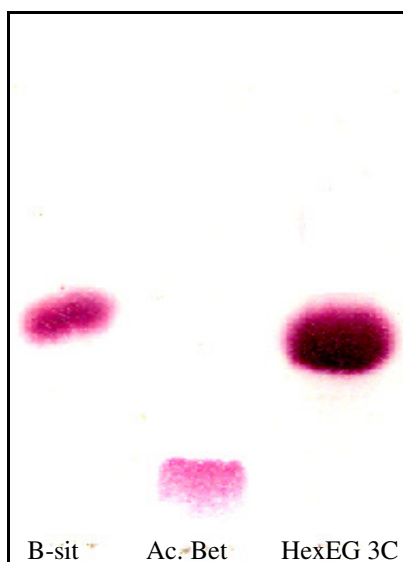
**Figura 40.** Cromatograma obtido por CG-FID para HexEG 9A. **Pico 1** = ácido palmítico, **Pico 2** = ácido esteárico, **Pico 3** = ácido linolênico, **Pico 4** = não identificado. Condições cromatográficas descritas no item 2.9.5, Parte Experimental.

Os sinais no espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  em  $\delta$  173,9, 145,4, 121,9, 80,8 e 55,5 ppm sugerem a presença de um triterpeno com esqueleto urs-12-eno esterificado em C-3 (MENDES et al., 1999) na fração HexEG 9A. No entanto, devido à sobreposição dos sinais, não foi possível confirmar essa hipótese.

Não foram encontrados relatos sobre a ocorrência desses ácidos graxos livres em espécies do gênero *Erythroxylum*. No entanto, Barreiros et al. (2002, 2005) e Chávez et al. (1996) purificaram estearatos e palmitatos de diversos esteróides e terpenos nas espécies *E. nummularia*, *E. passerinum* e *E. leal*, sugerindo que a ocorrência desses ácidos graxos seja comum no gênero.

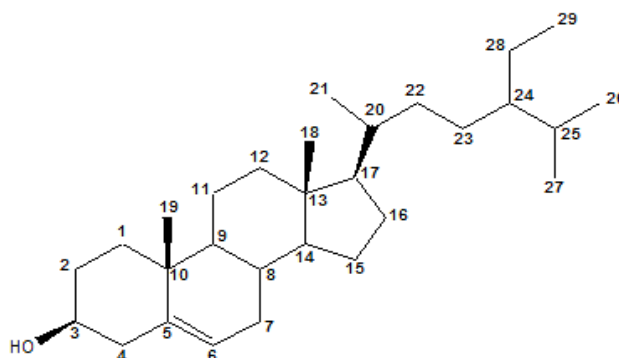
### 3.8.3 Elucidação estrutural de HexEG 3C

HexEG 3C foi isolado da fração Hex-EG de *E. gonocladum* por CCS (item 2.8.2.1, Parte experimental) e apresentou-se como um sólido amorfo de coloração branca. Seu perfil por CCD de sílica gel, utilizando-se como revelador anisaldeído, indicou mancha única de coloração rósea e com mesmo valor de  $R_f$  do  $\beta$ -sitosterol (**48**), sugerindo que HexEG 3C pudesse ser esse esteróide (Figura 41).



**Figura 41.** Perfil em CCD de sílica gel obtido para a substância HexEG 3C, isolada da fração *n*-hexânica de *E. gonocladum*. Eluente: *n*-hexano/ acetato de etila (9:1). Revelador: anisaldeído. B-sit =  $\beta$ -sitosterol, Ac. Bet = ácido betulínico.

A numeração dos átomos adotada durante a discussão dos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$  está representada na Figura 42.



**Figura 42.** Numeração para os átomos de carbono de HexEG 3C adotada na discussão dos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$ .

O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de HexEG 3C (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) (Figuras 43, 44 e 45) revelou vários sinais na região de  $\delta$  0,68 a 2,31 ppm, e ausência de sinais na região de aromáticos ( $\delta$  6,0 a 9,0 ppm), indicando sua natureza alifática.

Os sinais dos espectros foram atribuídos com base nos dados relatados anteriormente para o  $\beta$ -sitosterol (**48**) (CARVALHO et al., 1998; FORGO; KÖVÉR, 2004; HUNG; YEN, 2001). Assim, o duplete centrado em  $\delta$  5,35 ppm (1H,  $J = 5,2$  Hz) foi atribuído ao hidrogênio olefínico H-6 e o multiplete centrado em  $\delta$  3,51 ppm, com integral de 1H, foi atribuído a H-3. Os simpletos centrados em  $\delta$  0,68 e  $\delta$  1,01 ppm foram atribuídos, respectivamente, aos grupos metilas ligados aos carbonos não hidrogenados C-18 e C-19, enquanto os dupletos centrados em  $\delta$  0,81 ppm ( $J = 6,8$  Hz;  $\text{CH}_3$ -26),  $\delta$  0,84 ppm ( $J = 7,2$  Hz;  $\text{CH}_3$ -27) e  $\delta$  0,92 ppm ( $J = 6,4$  Hz;  $\text{CH}_3$ -21) foram atribuídos aos grupos metila ligados aos carbonos metínicos.

Os valores de deslocamento químico do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  obtido para HexEG 3C foram semelhantes aos dados relatados por Hung e Yen (2001) para o  $\beta$ -sitosterol (**48**) (Tabela 22).

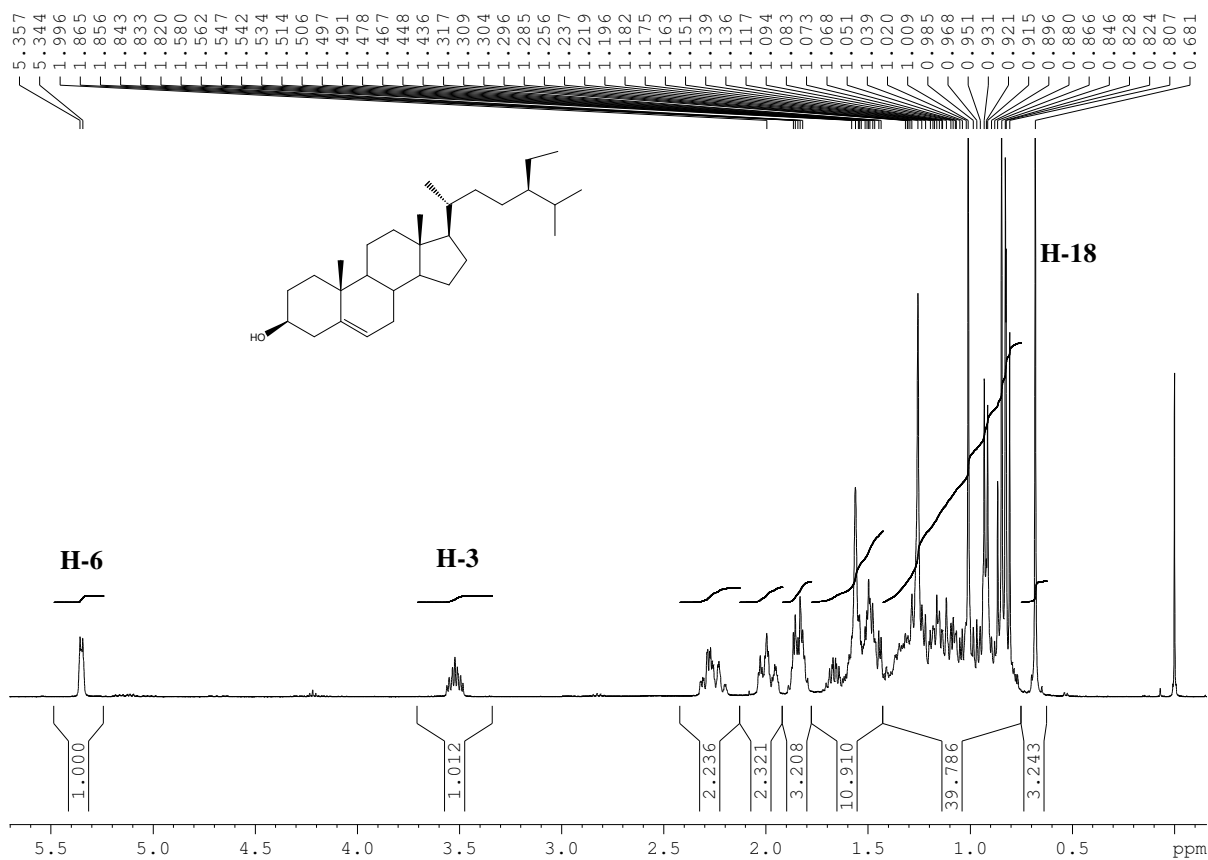
**Tabela 22.** Atribuição dos sinais do espectro de RMN  $^1\text{H}$  para HexEG 3C e dados relatados na literatura para o  $\beta$ -sitosterol

Hidrogênio	$\beta$ -sitosterol <sup>a</sup>			HexEG 3C <sup>b</sup>		
	$\delta$ (ppm)	Mult	$J$ (Hz)	$\delta$ (ppm)	Mult	$J$ (Hz)
<b>H-3</b>	3,52	m	-	3,51	m	-
<b>H-6</b>	5,35	d	5,4	5,35	d	5,2
<b>CH<sub>3</sub>-18</b>	0,68	s	-	0,68	s	-
<b>CH<sub>3</sub>-19</b>	1,01	s	-	1,01	s	-
<b>CH<sub>3</sub>-21</b>	0,92	d	6,4	0,92	d	6,4
<b>CH<sub>3</sub>-26</b>	0,83	d	6,8	0,81	d	6,8
<b>CH<sub>3</sub>-27</b>	0,84	d	6,4	0,84	d	7,2
<b>CH<sub>3</sub>-29</b>	0,82	t	6,6	0,85	t	8,0

Mult = multiplicidade (s = simples, d = duplo, t = triplo, m = múltiplo).

<sup>a</sup> Dados obtidos por HUNG; YEN (2001), em  $\text{CDCl}_3$  (75 MHz)

<sup>b</sup> Dados obtidos no presente trabalho, em  $\text{CDCl}_3$  (400 MHz)



**Figura 43.** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  obtido para HexEG 3C (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).

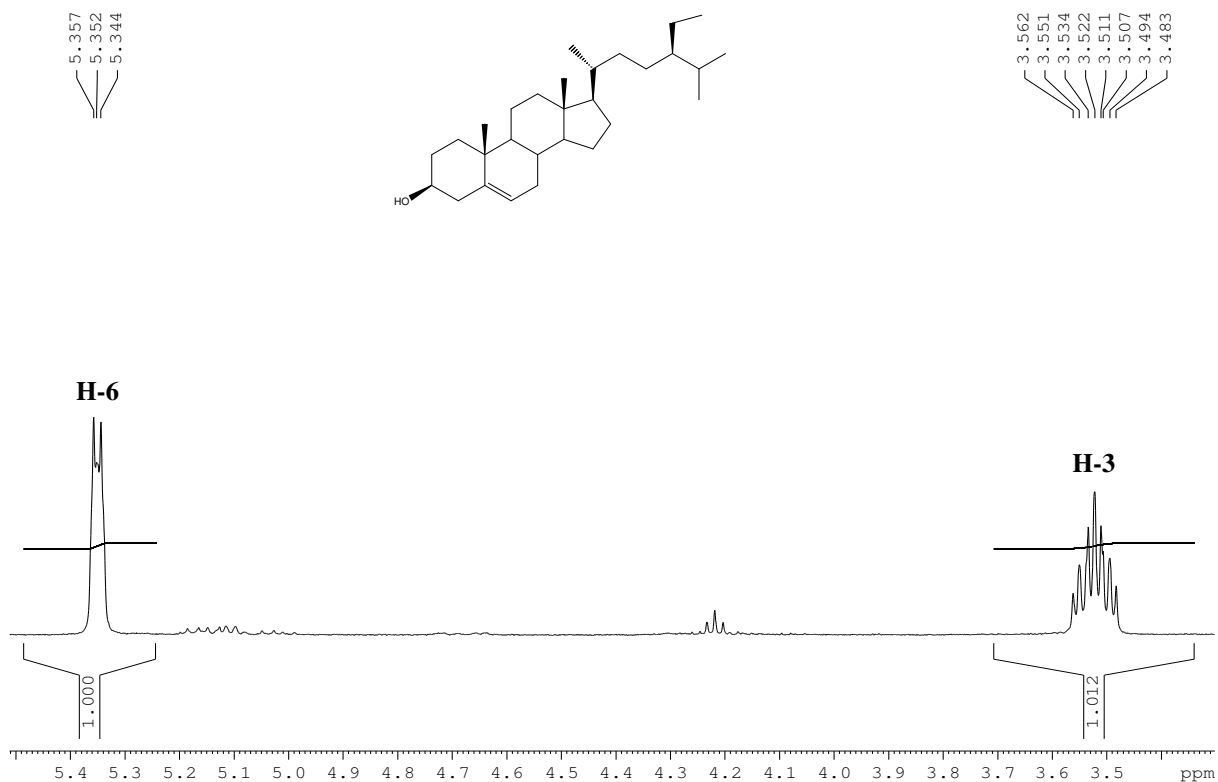


Figura 44. Expansão do Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  obtido para HexEG 3C (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).

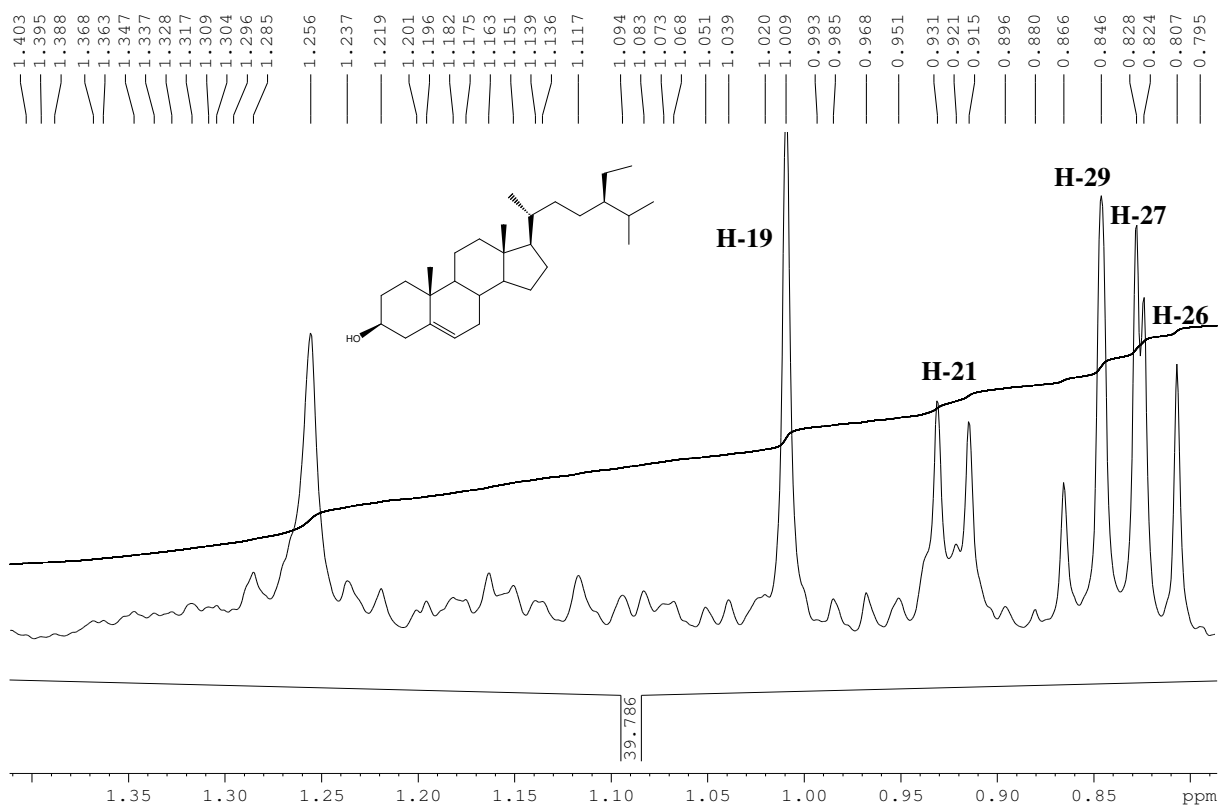
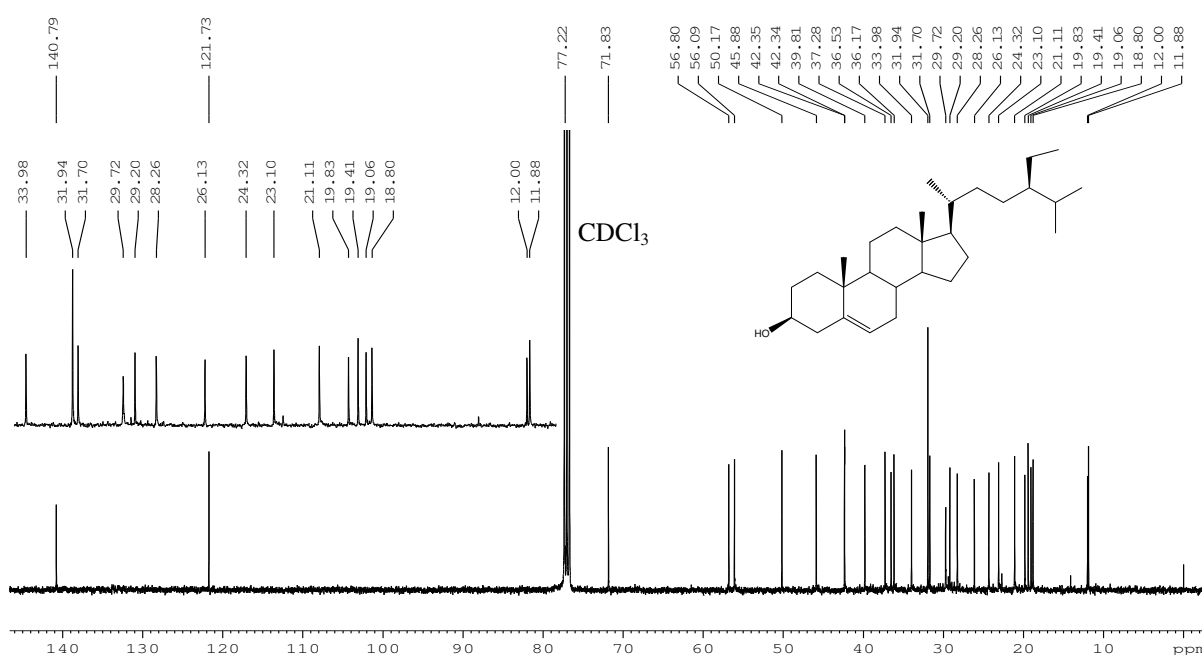
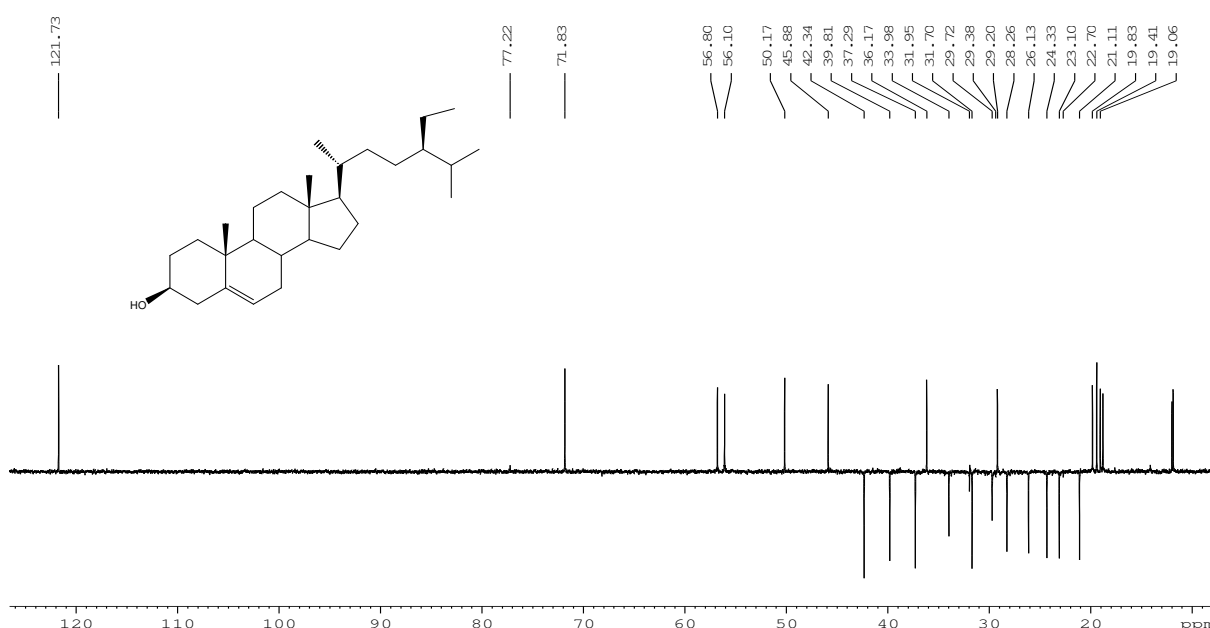


Figura 45. Expansão do Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  obtido para HexEG 3C (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).

O espectro desacoplado de RMN de  $^{13}\text{C}$  obtido para HexEG 3C (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) (Figura 46) apresentou sinais correspondentes a 29 átomos de carbono, confirmando sua natureza esteroidal. A atribuição dos sinais do espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  foi feita com base na análise do subspectro DEPT-135 e por comparação com dados da literatura relatados para o  $\beta$ -sitosterol. Os sinais em  $\delta$  140,79 ppm e  $\delta$  121,73 ppm confirmaram a presença de carbonos olefínicos, sendo a multiplicidade desses sinais atribuída pelo subspectro DEPT-135 (Figura 47). O sinal em  $\delta$  71,83 foi atribuído ao carbono carbinólico C-3 (Tabela 23).



**Figura 46.** Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  obtido para HexEG 3C (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).



**Figura 47.** Subspectro DEPT-135 obtido para HexEG 3C (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).

**Tabela 23.** Atribuição dos sinais do espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  para HexEG 3C e comparação com dados da literatura para o  $\beta$ -sitosterol

Carbono/ Multiplicidade*		$\beta$ -sitosterol <sup>a</sup>	HexEG 3C <sup>d</sup>	Carbono/ Multiplicidade*		$\beta$ -sitosterol <sup>a</sup>	HexEG 3C <sup>d</sup>
<b>C-1</b>	<b>CH<sub>2</sub></b>	37,25	37,29	<b>C-16</b>	<b>CH<sub>2</sub></b>	28,24	28,26
<b>C-2</b>	<b>CH<sub>2</sub></b>	31,64	29,72	<b>C-17</b>	<b>CH</b>	56,05	56,10
<b>C-3</b>	<b>CH</b>	71,81	71,83	<b>C-18</b>	<b>CH<sub>3</sub></b>	11,87	11,88
<b>C-4</b>	<b>CH<sub>2</sub></b>	42,29	42,34	<b>C-19</b>	<b>CH<sub>3</sub></b>	19,38	19,06
<b>C-5</b>	<b>C</b>	140,73	140,79	<b>C-20</b>	<b>CH</b>	36,16	36,17
<b>C-6</b>	<b>CH</b>	121,72	121,73	<b>C-21</b>	<b>CH<sub>3</sub></b>	18,75 <sup>c</sup>	18,80
<b>C-7</b>	<b>CH<sub>2</sub></b>	31,89	31,95	<b>C-22</b>	<b>CH<sub>2</sub></b>	33,94	33,98
<b>C-8</b>	<b>CH</b>	31,89	31,70	<b>C-23</b>	<b>CH<sub>2</sub></b>	25,99 <sup>c</sup>	26,13
<b>C-9</b>	<b>CH</b>	50,12	50,17	<b>C-24</b>	<b>CH</b>	45,83	45,88
<b>C-10</b>	<b>C</b>	36,40	36,53	<b>C-25</b>	<b>CH</b>	26,03	29,20
<b>C-11</b>	<b>CH<sub>2</sub></b>	21,08	21,11	<b>C-26</b>	<b>CH<sub>3</sub></b>	18,76	19,41
<b>C-12</b>	<b>CH<sub>2</sub></b>	39,78	39,81	<b>C-27</b>	<b>CH<sub>3</sub></b>	19,81	19,83
<b>C-13</b>	<b>C</b>	42,40 <sup>b</sup>	42,35	<b>C-28</b>	<b>CH<sub>2</sub></b>	23,06	23,10
<b>C-14</b>	<b>CH</b>	56,75	56,80	<b>C-29</b>	<b>CH<sub>3</sub></b>	11,99	12,00
<b>C-15</b>	<b>CH<sub>2</sub></b>	24,30	24,33	-	-	-	-

<sup>a</sup> Dados relatados por GOULART et al. (1993), em  $\text{CDCl}_3$  (50,3 MHz).

<sup>b</sup> Dado relatado por MACARI et al. (1990), em  $\text{CDCl}_3$  (20 MHz).

<sup>c</sup> Dado relatado por KONGDUANG et al. (2008), em  $\text{CDCl}_3$  (125 MHz).

\* A multiplicidade foi atribuída pelo subspectro DEPT-135 e por comparação com dados da literatura.

<sup>d</sup> Dados obtidos no presente trabalho, em  $\text{CDCl}_3$  (100 MHz).

Esses resultados permitiram identificar HexEG 3C como sendo  $\beta$ -sitosterol (**48**), um fitosterol amplamente distribuído no reino vegetal, envolvido na estabilização das membranas celulares (KONGDUANG et al., 2008). Esse esteróide já havia sido descrito na espécie *Erythroxyllum nummularia* e *E. passerinum* (BARREIROS et al., 2005; CHÁVEZ et al., 1996), demonstrando que sua ocorrência é comum em espécies desse gênero. Porém, esse é o primeiro relato da ocorrência de  $\beta$ -sitosterol em *E. gonocladum*.



### 3.9 AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES BIOLÓGICAS DA ASTILBINA

Dentre as substâncias obtidas no presente trabalho ( $\beta$ -sitosterol, astilbina e mistura de ácidos graxos) do estudo fitoquímico de *E. gonocladum*, apenas a astilbina foi avaliada quanto à sua potencial atividade anti-hipertensiva. Essa seleção baseou-se em relatos anteriores sobre a atividade inibidora da ECA e vasodilatadora de flavonóides por diversos autores (LACAILLE-DUBOIS et al., 2001; LOIZZO et al., 2006; OH et al., 2004), o que indicou ser a substância promissora.

Nevala, Korpela e Vapaatalo (1998) demonstraram que o  $\beta$ -sitosterol, avaliado nas concentrações de 1 a 100  $\mu$ M, não exerceu efeito vasodilatador em anéis de aorta de ratos pré-contráídos com noradrenalina.

A atividade vasodilatadora de ácidos graxos foi avaliada em diversos estudos. Foram encontrados relatos do efeito vasodilatador prostanóides-dependente do ácido eicosa-pentaenóico (20: 5n-3) (ENGLER et al., 1994) e do ácido duocosaexaenóico (22: 6n-3) (ENGLER; ENGLER, 2000) avaliados na concentração de 1 a 100  $\mu$ M, em ensaio com anel de aorta de ratos pré-contráídos com noradrenalina. Também há relatos de vasodilatação induzida por trilinoleína (glicerol tri-esterificado com ácido linoléico) e ausência de efeito vasodilatador para o ácido linoléico (C18:2), avaliados nas concentrações de 0,1 a 1  $\mu$ M. O efeito vasodilatador da trilinoleína é NO e GMPc-dependente (HONG et al., 1995) e também parece estar associado à atividade antioxidante característica de compostos poli-insaturados (CHAN; TOMLINSON, 2000). Sais de ácidos graxos de cadeia curta, como propionato ( $CI_{50}$  = 0,8  $\mu$ M), butirato ( $CI_{50}$  = 2,0  $\mu$ M) e octanoato ( $CI_{50}$  = 1,9  $\mu$ M) também demonstraram atividade vasodilatadora AMPc-dependente, em ensaios com anéis de artéria caudal de ratos (Nutting et al., 1991).

#### 3.9.1 Avaliação do efeito vasodilatador em preparações de anel de aorta de rato pré-contráídas com fenilefrina

A astilbina, avaliada nas concentrações de 1 a 100  $\mu$ mol/L, não apresentou efeito vasodilatador em ensaio com anel de aorta pré-contráído com fenilefrina (0,10  $\mu$ mol/L). No entanto, Leblais et al. (2008), utilizando artéria intrapulmonar de rato pré-contráída com prostaglandina  $F_{2\alpha}$ , demonstraram atividade vasodilatadora de 30% para uma fração de vinho tinto rica em astilbina, avaliada na concentração de 100  $\mu$ g/mL, o que sugere efeito vasodilatador por inibição da via dos prostanóides. Os prostanóides vasoativos derivados da COX (prostaglandina  $E_2$ , D e  $F_{2\alpha}$ ; prostaciclina e tromboxano  $A_2$ ) são importantes para a regulação do tônus vascular (KANG et al., 2007).

A ausência de efeito vasodilatador da astilbina isolada em nosso trabalho sugere que a atividade do extrato etanólico de *E. gonocladum* ( $CI_{50} = 0,45 \pm 0,20 \mu\text{g/mL}$ ) seja devida a outros constituintes do extrato ou à ocorrência de sinergismo entre eles.

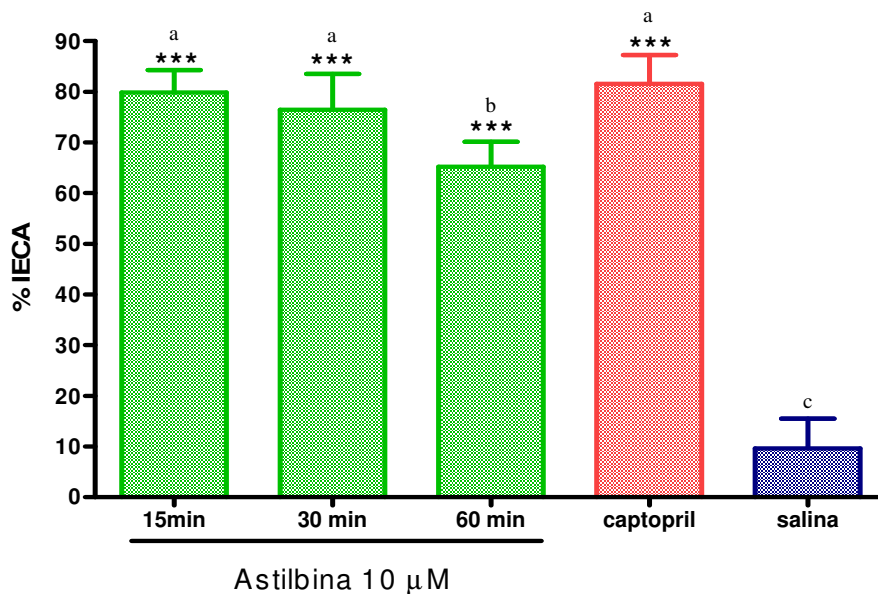
Os dados da literatura apontam diversas outras atividades biológicas para a astilbina: inibição da coenzima-A redutase *in vitro* (CHEN et al., 2001), efeito hepatoprotetor *in vivo* (administrado em ratos, por VO, na dose de 40 mg/kg) (CLOSA et al., 1997), inibição da aldose redutase *in vitro* (HARAGUCHI et al., 1997), atividade antioxidante *in vitro* (HARAGUCHI et al., 1996) e atividade antibacteriana *in vitro* (MOULARI et al., 2006).

### 3.9.2 Avaliação da atividade inibidora da ECA utilizando ensaio colorimétrico

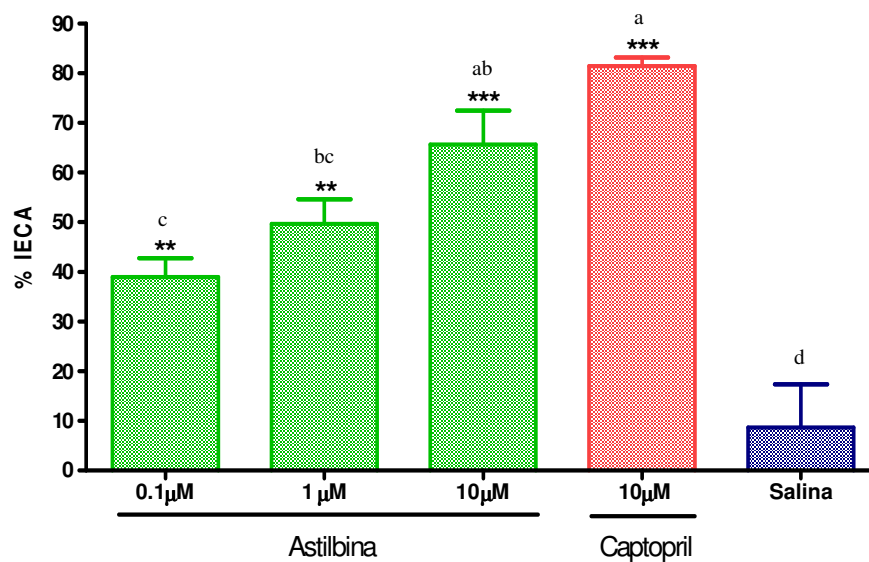
A atividade inibidora da ECA da astilbina foi avaliada em ensaio colorimétrico *in vitro*, utilizando soro sanguíneo de rato como fonte da enzima (item 2.10.3, Parte Experimental). A atividade foi avaliada em intervalos de tempo distintos, a partir da incubação da astilbina com o soro durante 15, 30 e 60 min antes da adição do substrato. O ensaio baseia-se na clivagem do substrato hipuril-glicil-glicina pela ECA e subsequente reação com ácido trinitrobenzeno-sulfônico, com formação de 2,4,6-trinitrofenil-glicil-glicina cuja absorbância é determinada em 415 nm.

A astilbina apresentou atividade inibidora da ECA superior a 65%, em todos os intervalos de tempo avaliados. A análise dos dados demonstrou significância estatística ( $p < 0,001$ ) quando comparado com o controle negativo (solução salina). Não foi observada diferença estatisticamente significativa entre a atividade promovida pela astilbina (10  $\mu\text{mol/L}$ ) nos tempos de incubação de 15 e 30 min e o captopril (10  $\mu\text{mol/L}$ ), no tempo de incubação de 60 min. Esta relação efeito versus tempo sugere que a astilbina alcance rapidamente o sítio ativo da ECA e exerça seu efeito inibidor (Figura 48).

A curva concentração-resposta obtida para a astilbina apresentou  $CI_{50} = 1,2 \pm 0,7 \mu\text{g/mL}$  obtida por regressão linear ( $r^2 = 0,94 \pm 0,05$ ). A comparação entre o  $r^2$  observado e o valor ideal ( $r^2 = 1$ ), utilizando teste *t*-student, não demonstrou diferença estatística ( $p < 0,05$ ), o que sugere que a relação entre a concentração de astilbina e o efeito inibidor da ECA é linear, na faixa de concentrações avaliadas. Não foi observada diferença estatisticamente significativa entre a inibição da ECA promovida pela astilbina (10  $\mu\text{mol/L}$ ) incubada durante 15 min e o captopril (10  $\mu\text{mol/L}$ ) incubado durante 60 min (Figura 49). Os resultados obtidos sugerem que a astilbina é um dos responsáveis pela atividade inibidora da ECA do extrato etanólico de *E. gonocladum*, previamente relatada por Serra (2004).



**Figura 48.** Atividade inibidora da ECA da astilbina (10 µmol/L), em diferentes tempos de incubação com a enzima. Cada barra representa a média ± EPM de 6 replicatas. Captopril (10 µmol/L) foi empregado como controle positivo (tempo de incubação = 60 min). \*\*\* Significativamente distintos ( $p < 0,001$ ), comparados com o controle negativo (salina). Letras diferentes nas barras indicam diferenças estatisticamente significativas entre as médias, segundo teste de comparação de médias Newman-Keuls ( $p < 0,05$ ).



**Figura 49.** Curva concentração-resposta do efeito inibidor da ECA induzido pela astilbina. Cada barra representa a média ± EPM de 3 replicatas. A astilbina foi incubada por 15 min e o captopril foi incubado por 60 min. \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$  para valores significativamente distintos, quando comparados os efeitos das diferentes concentrações de astilbina com o controle negativo (salina). Letras diferentes nas barras indicam diferenças estatisticamente significativas entre as médias, segundo teste de comparação de médias Newman-Keuls ( $p < 0,05$ ).

A atividade inibidora da ECA observada para a astilbina (2*R*, 3*R*-diidroquercetina-3-*O*- $\alpha$ -ramnosídeo) (59,  $CI_{50} = 1,2 \pm 0,7$  µg/mL ou  $2,6 \pm 1,5$  µM) é superior à atividade relatada

para outros derivados da quercetina, como a quercetina-3-*O*- $\alpha$ -(6-cafeoilglicosil- $\beta$ -1,2-ramnosídeo) (**17**,  $CI_{50} = 158,9 \pm 11,1 \mu\text{M}$ ), quercetina-3-*O*- $\alpha$ -(6-*p*-cumaril-glicosil- $\beta$ -1,2-ramnosídeo) (**18**,  $CI_{50} = 351,6 \pm 3,9 \mu\text{M}$ ), quercetina-3-*O*- $\beta$ -glicopiranosídeo (**20**,  $CI_{50} = 708,8 \pm 23,1 \mu\text{M}$ ) (OH et al., 2004) e quercetina-3-*O*- $\alpha$ -arabinopiranosídeo (**25**,  $CI_{50} = 310 \pm 2,2 \mu\text{M}$ ) (LOIZZO et al., 2007). Ao se comparar a atividade inibidora da ECA da astilbina (**59**) com aquela relatada para proantocianidinas, uma classe de produtos naturais com elevada atividade inibidora da ECA, observa-se atividade superior daquela. Actis-Goretta et al. (2003) relataram valores de  $CI_{50}$  de  $267 \pm 24$ ,  $126 \pm 11$ ,  $12 \pm 1$ ,  $25 \pm 3$  e  $10 \pm 1 \mu\text{M}$  para dímero, trímero, tetrâmero, pentâmero e hexâmero de epicatequina, em ensaio *in vitro*.

Esse resultado, aliado ao fato de não ter sido observada diferença significativa entre o efeito inibidor da ECA promovido pela astilbina ( $10 \mu\text{mol/L}$ ) e o efeito do captopril ( $10 \mu\text{mol/L}$ ), indica a astilbina como uma substância promissora quanto à sua atividade anti-hipertensiva, via inibição de ECA.

## **4 CONCLUSÕES**

#### 4 CONCLUSÕES

1. As espécies de *Erythroxylum* avaliadas (*E. suberosum*, *E. tortuosum* e *E. gonocladum*) apresentam potencial atividade anti-hipertensiva, demonstrada pela atividade vasodilatadora dependente de NO em anéis de aorta de ratos normotensos (CI<sub>50</sub> de  $0,96 \pm 0,30$  µg/mL,  $0,48 \pm 0,12$  µg/mL e  $0,45 \pm 0,20$  µg/mL, respectivamente).

2. O estudo químico de *E. gonocladum* resultou no isolamento de astilbina (2*R*, 3*R*-diidroquercetina-3-*O*-α-ramnosídeo) e β-sitosterol, e na identificação de uma mistura de ácidos graxos (ácido palmítico, ácido esteárico e ácido linolênico). A astilbina não apresentou atividade vasodilatadora em anéis de aorta, sugerindo a participação de outras substâncias na atividade observada para o extrato, ou sinergismo entre elas. Por outro lado, a atividade inibidora da ECA *in vitro* (CI<sub>50</sub> =  $1,2 \pm 0,7$  µg/mL) observada para a astilbina (10 µM) não diferiu estatisticamente do captopril (10 µM), sugerindo ser este flavonóide um dos principais responsáveis pela atividade inibidora de ECA de *E. gonocladum*.

## **5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

ACTIS-GORETTA, L. et al. Inhibition of angiotensin converting enzyme (ACE) activity by flavan-3-ols and procyanidins. **FEBS Letters**, v. 555, p. 597-600, 2003.

ACTIS-GORETTA, L.; OTTAVIANI, J.I.; FRAGA, C.G. Inhibition of angiotensin converting enzyme activity by flavanol-rich foods. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, p. 229-234, 2006.

AKIYOSHI, F. et al. Chimeric rennin-angiotensin system demonstrates sustained increase in blood pressure of transgenic mice carrying both human rennin and human angiotensinogen genes. **Journal of Biological Chemistry**, v. 268, n. 16, issue 11, p. 617-621, 1993.

ANSELL, S.M. et al. Diterpenes from the timber of 20 *Erythroxylum* species. **Phytochemistry**, v. 32, n. 4, p. 953-959, 1993.

ARAKAWA, K. et al. A pressor formation by trypsin from rennin-denaturated human plasma protein. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 42, p. 599-602, 1976.

ARAKAWA, K.; MARUTA, H. Ability of kallikrein to generate angiotensin II-like pressor substance and a proposed kinin-angiotensin enzyme system. **Nature**, v. 288, p. 705-706, 1980.

ARISAWA, M. et al. Chemical and pharmaceutical studies on medicinal plants in Paraguay constituents of angiotensin converting enzyme inhibitory fraction from cocu, *Allophyllus edulis* Radlk. **Shoyakugaku Zasshi**, v. 43, p.78-90, 1989.

BARBOSA-FILHO, J.M et al. Natural products inhibitors of the angiotensin converting enzyme (ACE). A review between 1980-2000. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, p. 421-446, 2006.

BARREIROS, M.L. et al. Fatty acid esters of triterpenes from *Erythroxylum passerinum*. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 13, n. 5, p. 669-673, 2002.

BARREIROS, M.L. et al. Flavonoids and triterpenes from leaves of *Erythroxylum nummularia*. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 33, p. 537-540, 2005.

BASSO, L.A. et al. The use of biodiversity as source of new chemical entities against defined molecular targets for treatment of malaria, tuberculosis, and T-cell mediated diseases – A Review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 100, n. 6, p. 575-606, 2005.

BIERI, S. et al. Cocaine distribution in wild *Erythroxylum* species. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 103, p. 439-447, 2006.

BINGHAM, R.J. et al. Structural diversity of angiotensin-converting enzyme. **The Febbs Journal**, v. 273, p. 362-373, 2006.

BOHN, B.A. et al. Flavonoid variation in *Erythroxylum*. **Phytochemistry**, v. 27, n. 3, p. 833-837, 1988.



BOHN, B.A. Introduction to flavonoids. Vol II. **Chemistry and bio-chemistry of organic natural products**. Ed. Harwood Academic Publishers (University of British Columbia): Amsterdam. 1998, 593 pp.

BOHN, B.A. et al. Flavonoids of *Erythroxylum rufum* and *E. ulei*. **Natural Products**, v. 44, n. 6, p. 676-679, 1981.

BONEFELD, M. et al. (+) catechin 3-rhamnoside from *Erythroxylum novogranatense*. **Phytochemistry**, v. 25, n. 5, p. 1205-1207, 1986.

BOUCHER, R.; ASSELIN, J.; GENEST, J. A new enzyme leading to the direct formation of angiotensin II. **Circulation Research**, v. 34, suppl. I, p. 203-212, 1974.

BRAGA, F.C. et al. Screening the Brazilian flora for antihypertensive plant species for *in vitro* angiotensin-I-converting enzyme inhibiting activity. **Phytomedicine**, v. 7, n. 3, p. 245-250, 2000.

BRANDÃO, M.G.L. et al. Brazilian medicinal plants described by 19th century European naturalists and in the official Pharmacopeia. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 120, n. 2, p. 141-148, 2008.

BREW, K. Structure of human ACE gives new insights into inhibitor binding and design. **TRENDS in Pharmacological Sciences**, v. 24, n. 8, p. 391-394, 2003.

BRIXIUS, K. et al. Crataegus special extract WS<sup>®</sup> 1442 induces an endothelium-dependent, NO-mediated vasorelaxation via eNOS-phosphorylation at serine 1177. **Cardiovascular Drugs and Therapy**, v. 20, p. 177-184, 2006.

BRUNETON, J. **Pharmacognosy, Phytochemistry, Medicinal Plants**. 3 rd ed. Paris: Editora Intercept Ltd, 1999.

BURRELL, L.M. et al. ACE2, a new regulator of the renin-angiotensin system. **TRENDS in Endocrinology and Metabolism**, v. 15, n. 4, p.166-169, 2004.

CAI, H; HARRISON, D.G. Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: The role of oxidant stress. **Circulation Research**, v. 87, p. 840-844, 2000.

CALIXTO, J.B. Twenty-five years of research on medicinal plants in Latin America. A personal view. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 100, p. 131-134, 2005.

CAMPANA, P.R.; BRAGA, F.C.; CORTES, S.F. Endothelium-dependent vasorelaxation in rat thoracic aorta by *Mansoa hirsute* D.C. **Phytomedicine**, v. 16, n. 5, p. 456-461, 2009.

CANO, J.H.; VOLPATO, G. Herbal mixtures in the tradicional medicine of Eastern Cuba. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 90, p. 293-316, 2004.

CAREY, R.M.; PADIA, S.H. Angiotensin AT2 receptors: control of renal sodium excretion and blood pressure. **Trends in Endocrinology and Metabolism**, v. 19, n. 3, p. 84-87, 2008.

CARVALHO, M.G. et al. Triterpenos isolados de *Eschweilera longipes* Miers (Lecythidaceae). **Química Nova**, v. 21, n. 6, p. 740-742, 1998.

CHAN, P.; TOMLINSON, B. Antioxidant effects of Chinese traditional medicine: focus on trilinolein isolated from Chinese herb sanchi (*Panax pseudoginseng*). **The Journal of Clinical Pharmacology**, v. 40, p. 457-461, 2000.

CHÁVEZ, J.P. et al. Flavonoids and triterpenes ester derivatives from *Erythroxylum Leal costae*. **Phytochemistry**, v. 41, n. 3, p. 941-943, 1996.

CHEN, G.C.; YANG, J.T. Two-point calibration of circular dichrometer with d-10-camphorsulfonic acid. **Analytical Letters**, v. 10, p. 1195-1207, 1977.

CHEN, L. et al. Simultaneous quantification of five major bioactive flavonoids in *Rhizoma smilacis* Glabrae by high-performance liquid chromatography. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 43, p. 1715-1720, 2007.

CHEN, T.H. et al. The in vitro inhibitory effect of flavonoid astilbin on 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase on Vero cells. **Zhonghua Yi Xue Za Zhi (Taipei)**, v. 64, p. 382-387, 2001.

CHIN, Y.W. et al. Tropane aromatic ester alkaloids from a large-scale re-collection of *Erythroxylum pervillei* stem bark obtained in Madagascar. **Journal of Natural Products**, v. 69, p. 414-417, 2006.

CHIWORORO, W.D.H; OJEWOLE, J.A.O. Biphasic effect of *Psidium guajava* Linn. (Myrtaceae) leaf aqueous extract on rat isolated vascular smooth muscles. **Journal of Smooth Mucle Research**, v. 44, n. 6, p. 217-229, 2008.

CLOSA, D. et al. Prostanoids and free radicals in CCl<sub>4</sub> – induced hepatotoxicity in rats: effects of astilbin. **Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids**, v. 56, p. 331-334, 1997.

COATES, D. The angiotensin converting enzyme (ACE). **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 35, p. 769-773, 2003.

COHEN, R.A.; VANHOUTTE, P.M. Endothelium-dependent hyperpolarization beyond nitric oxide and cyclic GMP. **Circulation**, v. 92, p. 3337-3349, 1995.

CONSERVATION. Conservation International in Washington DC - Cerrado pode sumir até 2030. Disponível em: <<http://www.conservation.org.br/noticias/noticia.php?id=31>>. Acesso em 18/10/08.

CUSHMAN, D.W.; ONDETTI, M.A. Design of angiotensin converting enzyme inhibitors. **Nature Medicine**, v. 5, n. 10, p. 1110-1111, 1998.

DAY. A.J.; WILLIAMSON, G. Biomarkers for exposure to dietary flavonoids: a review of the current evidence for identification of quercetin glycosides in plasma. **British Journal of Nutrition**, v. 86, suppl. 1, p. S105-S110, 2001.

DIETZE, G.J.; HENRIKSEN, E.J. Angiotensin-converting enzyme in skeletal muscle: sentinel of blood pressure control and glucose homeostasis. **Journal of the Renin-angiotensin-aldosterone System**, v. 9, n. 2, p. 75-88, 2008.

DOUMAS, M.; PAPADEMETRIOU, V. Carotid baroreceptor stimulation as a therapeutic target in hypertension and other cardiovascular conditions. **Expert Opinion on Therapeutic Targets**, v. 13, n. 4, p. 413-425, 2009.

DU, Q.; LI, L.; JERZ, G. Purification of astilbin and isoastilbin in the extract of *Smilax glabra* rhizome by high-speed counter-current chromatography. **Journal of Chromatography**, v. 1077, p. 98-101, 2005.

DUKA, A. et al. Angiotensin-converting enzyme inhibition after experimental myocardial infarct: role of the kinin B1 and B2 receptor. **Hypertension**, v. 51, n. 5, p. 1352-1357, 2008.

ELBL, G.; WAGNER, H. A new method for the *in vitro* screening of inhibitors of angiotensin-converting enzyme (ACE), using the chromophore- and fluorophore- labelled substrate dansyltriglycine. **Planta Medica**, v. 57, p. 137-141, 1991.

ENGLER, M.B. et al. Mechanism of vasorelaxation induced by eicosapentaenoic acid (20:5n-3) in WKY rat aorta. **British Journal of Pharmacology**, v. 131, p.1793-1799, 1994.

ENGLER, M.B.; ENGLER, M.M. Docosahexaenoic acid-induced vasorelaxation in hypertensive rats: mechanism of action. **Biological Research for nursing**, v. 2, n. 2, p. 85-95, 2000.

ERDOS, E.G. Conversion of angiotensin I to angiotensin II. **The American Journal of Medicine**, v. 60, n. 6, p. 749-775, 1976.

EVANS, W.C. The comparative phytochemistry of the genus *Erythroxylum*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 3, p. 265-277, 1981.

FARNSWORTH, N.R. Biological and phytochemical screening of plants. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 55, n. 3, p. 225-276, 1966.

FERREIRA, H.C. et al. Endothelium-dependent vasodilation induced by *Hancornia speciosa* in rat superior mesenteric artery. **Phytomedicine**, v. 14, p. 473-478, 2007.

FERREIRA, S.H. A Bradykinin-potentiating factor (BPF) present in the venom of *Bothrops jararaca*. **British Journal of Pharmacology and Chemotherapy**, v. 24, p. 163-169, 1965.

FLEMING, I.; BUSSE, R. Molecular mechanisms involved in the regulation of the endothelial nitric oxide synthase. **American Journal of Physiology**, v. 284, p. R1-R12, 2003.

FORGO, P.; KÖVÉR, K.E. Gradient enhanced selective experiments in the <sup>1</sup>H NMR chemical shift assignment of the skeleton and side-chain resonances of stigmasterol, a phytosterol derivative. **Steroids**, v. 69, p. 43-50, 2004.

FUCHS, F.D. The corporate bias and the molding of prescription practices: the case of hypertension. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 42, p. 224-228, 2009.

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

FYHRQUIST, F.; SAIJONMAA, O. Renin-angiotensin system revisited. **Journal of International Medicine**, v. 264, p. 224-236, 2008.

GAFFIELD, W.; WAISS, A.C.; TOMINAGA, T. Structural relationships and interconversions of isomeric asilbins. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 40, n. 8, p. 1057-1061, 1975.

GONZÁLEZ-GUEVARA, J.L. et al. Phytochemical screening and *in vitro* antiherpetic activity of four *Erythroxylum* species. **Acta Farmacêutica Bonaerense**, v. 23, n. 4, p. 506-509, 2004.

GONZÁLEZ-GUEVARA, J.L. et al. Flavonoid glycosides from Cuban *Erythroxylum* species. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 34, p. 539-542, 2006.

GOULART, M.O.F et al. Fitoconstituintes químicos isolados de *Jatropha elliptica*. Atribuição dos deslocamentos químicos dos átomos de carbono e hidrogênio dos diterpenos jatrolonas a e b. **Química Nova**, v. 16, n. 2, p. 95-100, 1993.

GRIFFIN, W.J.; LIN, G.D. Chemotaxonomy and geographical distribution of tropane alkaloids. **Phytochemistry**, v. 53, p. 623-637, 2000.

GUO, J. et al. Identification of a new metabolite of astilbin, 3'-O-metilastilbin, and its immunosuppressive activity against contact dermatitis. **Clinical Chemistry**, v. 53, n. 3, p. 465-471, 2007.

GUYENET, P.G. The sympathetic control of blood pressure. **Nature Reviews Neurosciences**, v. 7, n. 5, p. 335-346, 2006.

HALBERSTEIN, R.A. Medicinal plants: historical and cross-cultural usage patterns. **Annals of Epidemiology**, v. 15, n. 9, p. 686-699, 2005.

HANAI, T. Separation of polar compounds using carbon columns. **Journal of Chromatography A**, v. 989, n. 2, p. 183-196, 2003.

HARACUCHI, H. et al. Protection against oxidative damage by dihydroflavonols in *Engelhardtia chrysolepsis*. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 60, n. 6, p. 945-948, 1996.

HARAGUCHI, H. et al. Inhibition of aldose reductase and sorbitol accumulation by astilbin and taxifolin dihydroflavonols in *Engelhardtia chrysolepsis*. **Bioscience**, v. 61, n. 4, p. 651-654, 1997.

HARTMANN, T. From waste products to ecochemicals: fifty years research of plant secondary metabolism. **Phytochemistry**, v. 68, p. 2831-2846, 2007.

HEGNAUER, R. Chemotaxonomy of erythroxylaceae (including some ethnobotanical notes on old world species). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 3, p. 279-292, 1981.

HONG, C.Y.; LAI, L.J.; HUANG, Y.T. Endothelium-dependent vasorelaxant effect of trilinolein: mediated by Nitric Oxide and Cyclic GMP. **Lifes Sciences**, v.57, n. 13, p. 1309-1315, 1995.

HUNG, C.; YEN, G. Extraction and identification of antioxidative components of Hsian-tsoa (*Mesona procumbens* Hemsl.). **Lebensm-Wiss U-Technology**, v. 34. p. 306-311, 2001.

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Disponível em <[HTTP://www.ibge.gov.br/estadosat/perfil.php?sigla=mg](http://www.ibge.gov.br/estadosat/perfil.php?sigla=mg)>. Acesso em 18/10/08.

INIGO, R.P.A; POMILIO, A.B. Flavonoids from *Erythroxylum argentinum*. **Phytochemistry**, v. 24, n. 2, p. 347-349, 1985.

INOKUCHI, J.I. et al. Antihypertensive substance in seeds of *Areca catechu* L. **Life Sciences**, v. 38, n. 15, p. 1375-1382, 1986.

JANDELEIT-DAHM, K.; COOPER, M.E. Hypertension and diabetes: role of the rennin-angiotensin system. **Endocrinology Metabolism Clinics of North America**, v. 35, p. 469-490, 2006.

JOHNSON, E.L. et al. Flavonoids as markers for *Erythroxylum* taxa: *E. coca* var. *ipadu* and *E. novogranatense* var. *truxillense*. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 26, p. 743-759, 1998.

JOHNSON, E.L.; SCHMIDT, W.F.; COOPER, D. Flavonoids as chemotaxonomic markers for cultivated Amazonian coca. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 40, p. 89-95, 2002.

JOHNSON, E.L. et al. Kaempferol (rhamnosyl) glucoside, a new flavonol from *Erythroxylum coca* var. *ipadu*. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 31, p. 59-67, 2003.

JOHNSON, E.L.; SCHMIDT, W.F. Flavonoids as a chemotaxonomic markers for *Erythroxylum australe*. **Zeitschrift für Naturforsch**, v. 59, n. 11-12, p. 769-776, 2004.

JOHNSON, L.R. Essential medical physiology. 3 rd Ed. Elsevier Academic Press. 900 p. 2003.

JOINT. National Committee on Detection, Evaluation and Treatment of High Blood Pressure; the 7<sup>th</sup> report. US Department of Health and Human Services, p. 52, 2003.

JUNG, H.A. et al. Angiotensin-converting enzyme I inhibitory activity of phlorotannins from *Ecklonia stolonifera*. **Fisheries Science**, v. 72, p. 1292-1299, 2006.

JUSTESEN, U.; KNUTHSEN, P.; LETH, T. Quantitative analysis of flavonols, flavones, and flavanones in fruits, vegetables and beverages by high-performance liquid chromatography with photo-diode array and mass spectrometric detection. **Journal of Chromatography A**, v. 799, p. 101-110, 1998.

KAMEDA, K. et al. Inhibitory effects of various flavonoids isolated from leaves or *Persimmon* on angiotensin-converting enzyme activity. **Journal of Natural Products**, v. 50, n. 4, p. 680-683, 1987.

KANG, K.B. et al. A role for cyclooxygenase in aging-related changes of b-adrenoreceptor mediated relaxation in rat aorta. **Naunyn-Schmiedeberg's of Pharmacology**, v. 375, n.4, p. 273-281, 2007.

KIM, S.H. et al. Procyanidins in *Crataegus* extract evoke endothelium-dependent vasorelaxation in rat aorta. **Life Sciences**, v. 67, p. 121-131, 2000.

KOEHN, F.E.; CARTER, G.T. The evolving role of natural products in drug discovery. **Nature Reviews Drug Discovery - England**, v. 4, n. 3, p. 206-220, 2005.

KOJIMA, N. et al. Role of cyclooxygenase in vasodilatation of retinal blood vessels induced by bradykinin in Brown Norway rats. **Vascular Pharmacology**, *article in press*. 2009.

KOLASINSKA-MALKOWSKA, K. et al. Review: current possibilities of ACE inhibitor and ARB combination in arterial hypertension and its complications. **Expert Review of Cardiovascular Therapy**, v. 6, n. 5, p. 759-771, 2008.

KONGDUANG, D. et al. Biosynthesis of B-sitosterol and stigmasterol proceeds exclusively via the mevalonate pathway in cell suspension cultures of *Croton stellatopilosus*. **Tetrahedron Letters**, v. 49, p. 4067-4072, 2008.

KUMAR, R.; SINGH, V.P.; BAKER, K.M. The intracellular renin-angiotensin system: a new paradigm. **Trends in Endocrinology and Metabolism**, v. 18, n. 5, p. 208-214, 2007.

LACAILLE-DUBOIS, M.A.; FRANCK, U.; WAGNER, H. Search for potential Angiotensin Converting Enzyme (ACE)-inhibitors from plants. **Phytomedicine**, v. 8, n. 1, p. 47-52, 2001.

LEBLAIS, V. et al. Relaxation induced by red wine polyphenolic compounds in rat pulmonary arteries: lack of inhibition by NO-synthase inhibitor. **Fundamental & Clinical Pharmacology**, v. 22, p. 25-35, 2008.

LEE, D.H. et al. Isolation and characterization of a novel angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptide derived from the edible mushroom *Tricholoma giganteum*. **Peptides**, v. 25, p. 621-627, 2004.

LI, Q.L. et al. Three angiotensin-converting enzyme inhibitors from *Rabdosia coetsa*. **Phytomedicine**, v. 15, n. 5, p. 386-388, 2008.

LIMA, S.G. et al. Sistema renina-angiotensina: é possível identificar genes de suscetibilidade à hipertensão. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 89, n. 6, p. 427-433, 2007.

LOIZZO, M.R. et al. Inhibition of angiotensin converting enzyme (ACE) by flavonoids isolated from *Ailanthus excelsa* (Roxb) (Simaroubaceae). **Phytotherapy Research**, v. 21, n. 1, p. 32-36, 2007.

LY, J. Crataegus oxyacantha (aubepine) in the use as herb medicine in France. **Zhongguo Zhong Yao Za Zhi**, v. 30, n. 8, p. 634-640, 2005.

MA, M.S. et al. Purification and identification of angiotensin-I-converting enzyme inhibitory peptide from buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench). **Food Chemistry**, v. 96, n. 1, p. 36-42, 2006.

MABRY, T.J.; MARKHAM, K.R.; THOMAS, M.B. **The Systematic Identification of Flavonoids**, Springer-Verlag, Heidelberg-New York, 1970, 354 p.

MACARI, P.A.T.; EMERENCIANO, V.P.; FERREIRA, Z.M.G.S. Identificação dos triterpenos de *Miconia Albicans triana* através de análise por microcomputador. **Química Nova**, v. 13, n. 4, p. 260-262, 1990.

MARINI-BETOLLO, G.B. et al. Plant screening by chemical and chromatographic procedures under field conditions. **Journal of Chromatography A**, v. 213, n. 1, p. 113-127, 1981.

MARRIS, E. The forgotten ecosystem. **Nature**, v. 437, p. 944-945, 2005.

McNEILL, J.R.; JURGENS, T.M. A systematic review of mechanisms by which natural products of plant origin evoke vasodilatation. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 84, p. 803-821, 2006.

MENDES, C.C; CRUZ, F.G.; DAVID, J.M. Triterpenos esterificados com ácidos graxos e ácidos triterpênicos isolados de *Byrsonima microphyla*. **Química Nova**, v. 22, n. 2, p. 1-6, 1999.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Disponível em <[http://portal.saude.gov.br/portal/saude/visualizar\\_texto.cfm?idtxt=23616&janela=1](http://portal.saude.gov.br/portal/saude/visualizar_texto.cfm?idtxt=23616&janela=1)>. Acesso em 18/10/08.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Disponível em <<http://www.datasus.gov>>. Acesso em 28/01/06.

MINISI, A.J.; QUINN, M.S.; JEONG, H. Aortic baroreceptor function and depressed baroreflex sensitivity following myocardial infarction. **Autonomic Neuroscience**, article in press, 2009.

MONCADA, S.; PALMER, R.M.J.; HIGGS, E.A. Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology. **Pharmacological Reviews**, v. 43, p. 109-142, 1991.

MONCADA, S. Nitric oxide in the vasculature: physiology and pathophysiology. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 811, p. 60-67, 1997.

MONCADA, S. Adventures in vascular biology: a tale of two mediators. **Philosophical Transactions of the Royal Society B**, v. 361, p. 735-759, 2006.

MONCADA, S.; HIGGS, E.A. The discovery of nitric oxide and its role in vascular biology. **British Journal of Pharmacology**, v. 147, p. S193-S201, 2006.

MOROTA, T. et al. Studies on the crude drug containing the angiotensin I converting enzyme inhibitors. I. On the active principles of *Lycium chinense* Muller. **Shoyakugaku Zasshi**, v. 41, p. 169-173, 1987.

MOULARI, B. et al. Isolation and in vitro antibacterial activity of astilbin, the bioactive flavanone from leaves of *Hurungana madagascariensis* Lam. Ex Poir. (Hypericaceae). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 106, n. 2, p. 272-278, 2006.

NEVALA, R.; KORPELA, R.; VAPAATALO, H. Planta derived estrogens relax rat mesenteric artery in vitro. **Life Sciences**, v. 63, n. 6, p. 95-100, 1998.

NEWMAN, D.J.; CRAGG, G.M. Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. **Journal of Natural Products**, v. 70, n. 3, p. 461-477, 2007.

NUTTING, C.W.; ISLAM, S.; DAUGIRDAS, J.T. Vasorelaxant effects of short chain acids salts in rat caudal artery. **Heart and Circulatory Physiology**, v. 261, n. 2, p. 561-567, 1991.

OBERLIES, N.H.; KROLL, D.J. Camptothecin and Taxol: Historic Achievements in Natural Products Research. **Journal of Natural Products**, v. 67, p. 129-135, 2004.

OH, H. et al. Isolation of angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitory flavonoids from *Sedum sarmentosum*. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 27, n. 12, p. 2035-2037, 2004.

OKAMOT, Y; YOSHIZAWA, T. Angiotensin-converting enzyme inhibitors and aldose reductase inhibitors containing *Passiflora quadrangularis* extracts or vitexin. **Patent-Japan Kokai Tokkyo Koho-06**, 293, 657,4PP, 1994.

PANDEY, R. et al. Vaccine for hypertension: modulating the rennin-angiotensin system. **Internationale Journal of Cardiology**, v. 134, p. 160-168, 2009.

PEARLMAN, R.S.; SMITH, K.M. Software for chemical diversity in the context of accelerated drug discovery. **Drugs of the future**, v. 23, n. 8, p. 885, 1998.

PERAZELLA, M.A.; SETARO, J.F. Renin-angiotensin-aldosterone system: fundamental aspects and clinical implications in renal and cardiovascular disorders. **Journal of Nuclear Cardiology**, v. 10, n. 2, p. 184-196, 2003.



PERSSON, K. et al. Nitric oxide donors and angiotensin-converting enzyme inhibitors act in concert to inhibit human angiotensin-converting enzyme activity and platelet aggregation *in vitro*. **European Journal of Pharmacology**, v. 406, p. 15-23, 2000.

PIERPOINT, W.S. Salicylic acid and its derivatives in plants: medicines, metabolites and Messenger molecules. **Advances in Botanical Research**, v. 20, p. 163-235, 1994.

PINTO, A.C. et al. Produtos naturais : atualidades, desafios e perspectivas. **Química Nova**, v. 25, n. 1, p. 45-61, 2002.

PLOWMAN, T.; HENSOLD, N. Names, types, and distribution of neotropical species of *Erythroxylum* (Erythroxylaceae). **Brittonia**, v. 56, n. 1, p. 1-53, 2004.

RAIJ, L. The Pathophysiologic basis for blocking the renin-angiotensin system in hypertensive patients with renal disease. **American Journal of Hypertension**, v. 18, p. 955-995, 2005.

RAMESAR, S. et al. Angiotensin I-converting enzyme inhibitor activity of nutritive plants in KwaZulu-Natal. **Journal of Medicinal Food**, v. 11, n. 2, p. 331-336, 2008.

RIJKE, E. et al. Analytical separation and detection methods for flavonoids. **Journal of Chromatography A**, v. 1112, p. 31-63, 2006.

RUBIO, A.R.; MORALES-SEGURA, M.A. Nitric oxide, an iceberg in cardiovascular physiology: far beyond vessel tone control. **Archives of Medical Research**, v. 35, p. 1-11, 2004.

SANTOS, C.C. et al. NMR assignment and X-ray diffraction spectra for two unusual kaurene diterpenes from *Erythroxylum barbatum*. **Magnetic Resonance in Chemistry**, v. 43, n. 12, p. 1012-1015, 2005.

SAVOIA, C.; SCHIFFRIN, E.L. Inflammation in hypertension. **Current Opinion in Nephrology and Hypertension**, v. 15, p. 152-158, 2006.

SERRA, C.P. Estudo de espécies vegetais com potencial atividade anti-hipertensiva: Desenvolvimento e validação de ensaio *in vitro* de inibição da enzima conversora de angiotensina e avaliação de atividade vasodilatadora. **Dissertação de Doutorado**. Universidade Federal de Minas Gerais, 2004.

SERRA, C.P. et al. Validation of a colorimetric assay for the *in vitro* screening of inhibitors of angiotensin-converting enzyme (ACE) from plants extracts. **Phytomedicine**, v. 12, p. 424-432, 2005.

SHARMA, S. Control of arterial blood pressure. **Physiology**, issue 1, p. 1-1, 1992.

SILVA JUNIOR, M.C. da. **100 Árvores do Cerrado - Guia de Campo**. Ed. Rede de Sementes do Cerrado. Brasília, 2005, 278 p.

SILVERSTEIN, R.M.; WEBSTER, F.X. **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos**. 6 ed, Rio de Janeiro: LTC, 2000, 460 p.

SLADE, D.; FERREIRA, D.; MARAIS, J.P.J. Circular dichroism, a powerful tool for the assessment of absolute configuration of flavonoids. **Phytochemistry**, v. 66, p. 2177-2215, 2005.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA. V Diretrizes Brasileiras de Hipertensão arterial. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 89, n. 3, p. e24-e79, 2007.

STALIKAS, C.D. Extraction, separation, and selection methods for phenolic acids and flavonoids. **Journal of Separation Science**, v. 30, p. 3268-3295, 2007.

STECKELINGS, U.M.; RETTIG, R.; UNGER, T. Angiotensin in the kidney: a key to understanding hypertension? **Cell Metabolism**, v. 5, n. 1, p. 7-8, 2007.

TATSIS, E.C. et al. Identification of the major constituents of *Hypericum perforatum* by LC/SPE/NMR and/or LC/MS. **Phytochemistry**, v. 68, p. 383-393, 2007.

TONNESEN, M.G. et al. Identification of a human neutrophil angiotensin II-generating protease as cathepsin G. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 69, p. 25-30, 1982.

UENO, H. et al. Chemical and pharmaceutical studies on medicinal plants in Paraguay. Geraniin, an angiotensin-converting enzyme inhibitor from "Paraparai mi", *Phyllanthus niruri*. **Journal of Natural Products**, v. 51, n. 2, p. 357-359, 1988.

URATA, H. et al. Identification of a highly specific chymase as the major angiotensin II-forming enzyme in the human heart. **Journal of Biological Chemistry**, v. 265, p. 2348-2357, 1990.

VARAGIC, J. et al. New angiotensins. **Journal of Molecular Medicine**, v. 86, p. 663-671, 2008.

VELLUZ, L.; LEGRAND, M.; GROSJEAN, M. **Optical circular dichroism: principles, measurements and applications**. Verlag Chemie, GMBH, Academic Press Inc., New York and London, p. 5-182, 1965.

VIEGAS J.R.C.; BOLZANI, V.S.; BARREIRO, E.J. Os produtos naturais e a química medicinal moderna. **Química Nova**, v. 29, n. 02, p. 326-337, 2006.

WAGNER, H. et al. Evaluation of natural products as inhibitors of angiotensin I-converting enzyme (ACE). **Pharmaceutical and Pharmacological Letters**, v. 1, p. 15-18, 1991.

WAGNER, H.; BLADT, S.; ZGAINSKY, E.M. **Plant drug analysis: a thin layer chromatography atlas**. Berlin: Springer Verlag, 1984. 320p.

WERNER, C. et al. RAS blockade with ARB and ACE inhibitors: current perspective on rationale and patient selection. **Clinical Research in Cardiology**, v. 97, n. 7, p. 418-431, 2008.

WHO; ISH. World Health Organization (WHO) / International Society of Hypertension (ISH) statement on management of hypertension. **Journal of Hypertension**, v. 21, n. 11, p. 1983-1992, 2003.

WINTROUB, B. et al. Angiotensin I conversion by human and rat chymotryptic proteinases. **Journal of Investigate Dermatology**, v. 83, p. 336-339, 1984.

YAMADAKI, M.; SHIMOYAMA, A. Angiotensin-converting enzyme I inhibitor from *Eucommia ulmoides* leaves. **Patent Jpn Kokai Tokkyo Koho JP04368336 (92368336)**. (Chemical Abstracts 1993; v.118, (154549c)457).

YUNES, R.A.; PEDROSA, R.C.; CECHINEL-FILHO, V. Fármacos e fitoterápicos: a necessidade do desenvolvimento da indústria de fitoterápicos e fitofármacos no Brasil. **Química Nova**, v. 24, n. 01, p. 147-152, 2001.

ZAGO, A.S; ZANESCO, A. Nitric Oxide, Cardiovascular Disease and Physical Exercise. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 87, n. 6, p. e264-e270, 2006.