

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas
Faculdade de Farmácia

Ana Bárbara Dias Pereira

PADRONIZAÇÃO QUÍMICO-BIOLÓGICA DE FOLHAS DE *HANCORNIA SPECIOSA* GOMES (MANGABA): estudos de relação entre composição química e atividades anti-hipertensiva e antidiabética

Belo Horizonte

2016

Ana Bárbara Dias Pereira

PADRONIZAÇÃO QUÍMICO-BIOLÓGICA DE FOLHAS DE *HANCORNIA SPECIOSA* GOMES (MANGABA): estudos de relação entre composição química e atividades anti-hipertensiva e antidiabética

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do grau de Doutora em Ciências Farmacêuticas.

Área de concentração: Fármacos e Medicamentos

Orientador: Prof. Dr. Fernão Castro Braga, FAFAR, UFMG

Coorientador: Prof. Dr. Steyner de França Côrtes, ICB, UFMG

Colaborador: Prof. Dr. Marcelo Martins de Sena, ICEX, UFMG

Belo Horizonte

2016

P436p Pereira, Ana Bárbara Dias.
Padronização químico-biológica de folhas de *Hancornia speciosa* Gomes (mangaba) [recurso eletrônico] : estudos de relação entre composição química e atividades anti-hipertensiva e antidiabética / Ana Bárbara Dias Pereira. – 2016.

1 recurso eletrônico (200 f. : il.) : pdf

Orientador: Fernão Castro Braga.

Coorientador: Steyner de França Côrtes.

Colaborador: Marcelo Martins de Sena.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas.

Exigências do sistema: Adobe Acrobat Reader.

1. Apocynaceae – Teses. 2. Flavonoides – Teses. 3. Ciclitóis – Teses. 4. Hipoglicemiantes – Teses. 5. Vasodilatadores – Teses. 6. Hipertensão – Teses. 7. Diabetes mellitus – Teses. 8. Plantas medicinais – Teses. I. Braga, Fernão Castro. II. Cortes, Steyner de França. III. Sena, Marcelo Martins de. IV. Universidade Federal de Minas Gerais. Faculdade de Farmácia. V. Título.

CDD:615.321



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS



ATA DA DEFESA DE TESE DA ALUNA ANA BÁRBARA DIAS PEREIRA

Realizou-se, no dia 28 de janeiro de 2016, às 14 horas, na sala 3062 da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais, a 100ª defesa de tese do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, intitulada "**Padronização químico-biológica de *Hancornia speciosa* Gomes (mangaba): estudos de relação entre composição química e atividades anti-hipertensiva e antidiabética**", apresentada por Ana Bárbara Dias Pereira, número de registro 2012709456, graduada no curso de FARMÁCIA, como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutora em CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS, à seguinte Comissão Examinadora: Profa. Cláudia Maria Oliveira Simões (UFSC), Profa. Suzan Kelly Vilela Bertolucci (UFLA), Dra. Priscilla Rodrigues Valadares Campana (FUNED), Profa. Rachel Oliveira Castilho (UFMG), Prof. Steyner de França Côrtes - coorientador (UFMG), Prof. Fernão Castro Braga - orientador (UFMG).


A Comissão considerou a tese apresentada pela discente:

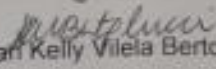
Aprovada

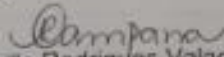
Reprovada

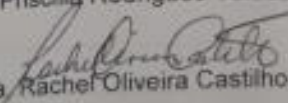
Finalizados os trabalhos, foi lavrada a presente ata que, após lida e aprovada, segue assinada pelos membros da Comissão.


Belo Horizonte, 28 de janeiro de 2016.

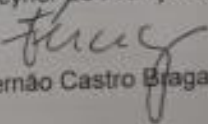

Profa. Cláudia Maria Oliveira Simões (Doutora)


Profa. Suzan Kelly Vilela Bertolucci (Doutora)


Dra. Priscilla Rodrigues Valadares Campana (Doutora)


Profa. Rachel Oliveira Castilho (Doutora)


Prof. Steyner de França Côrtes (Doutor)


Prof. Fernão Castro Braga (Doutor)

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus maiores amores: meus pais, meus irmãos, Dindinha e Claudinha.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos os colegas do laboratório de fitoquímica, atuais e antigos, que participaram dessa jornada e da minha formação profissional e pessoal.

Aos meus orientadores Fernão e Steyner, por acreditarem em mim e contribuírem para minha formação.

Ao meu colaborador, Prof. Marcelo, pela grande contribuição ao meu trabalho.

Às agências de fomento que viabilizaram o desenvolvimento deste projeto.

Aos amigos e familiares que sempre me apoiaram e acreditaram nos meus sonhos.

Agradeço ainda a cada colega, parceiro, funcionário da UFMG, professor, aluno de iniciação científica e aluno de Farmacognosia e Fitoquímica pela participação direta ou indireta na minha formação durante esses anos.

RESUMO

Hancornia speciosa Gomes, popularmente conhecida como mangaba, tem uso etnomédico para o tratamento de hipertensão e diabetes, entre outros. A potencial atividade anti-hipertensiva da espécie foi relatada em trabalhos anteriores de nosso grupo em modelos *in vitro*, *ex vivo* e *in vivo*, sendo rutina, L-(+)-bornesitol e ácido quínico identificados como constituintes bioativos. O presente trabalho teve como objetivo realizar a padronização químico-biológica de extratos de *H. speciosa*, com potencial atividade anti-hipertensiva e antidiabética. Para tanto, foram obtidos diferentes extratos de folhas da espécie utilizando solventes (etanol / água em diferentes proporções; metanol / acetato de etila), técnicas extrativas (percolação e maceração estática) e tempos variados. Os teores dos marcadores químicos foram quantificados nos extratos, utilizando método de CLAE-DAD e espectrofotometria no UV-Vis. Os extratos obtidos apresentaram variações nos teores de flavonoides totais ($2,68 \pm 0,14$ a $5,28 \pm 0,29\%$), bornesitol ($5,11 \pm 0,26$ a $7,75 \pm 0,78\%$), rutina ($1,46 \pm 0,06$ a $1,97 \pm 0,02\%$), FlavHS (triglicosídeo da quercetina; $0,72 \pm 0,05$ a $0,94 \pm 0,14\%$) e ácido clorogênico ($0,67 \pm 0,09$ a $0,91 \pm 0,02\%$). Os extratos foram avaliados em modelo *ex vivo* de vasodilatação em anéis de aorta torácica de ratos pré-contraídos com fenilefrina e *in vitro* de inibição da enzima α -glicosidase. Todos os extratos apresentaram atividade em ambos os modelos, com faixas de pCl_{50} de $4,97 \pm 0,22$ a $6,48 \pm 0,10$ para a atividade vasodilatadora, e de $3,49 \pm 0,21$ a $4,03 \pm 0,10$ para inibição da enzima α -glicosidase. Os dados obtidos foram submetidos à análise de componente principal (PCA) para avaliar a relação entre a composição química quantitativa e a atividade biológica dos extratos. PCA demonstrou existência de correlação positiva entre o efeito vasodilatador e os teores de ácido clorogênico, rutina, flavonoides totais e FlavHS, bem como correlação negativa com a concentração de bornesitol. Não se observou associação significativa entre os teores dos marcadores quantificados e a inibição da enzima α -glicosidase. Por sua vez, análises de componente principal entre as atividades biológicas e as áreas dos dez picos majoritários nos perfis cromatográficos dos extratos indicaram correlação positiva entre as substâncias lipofílicas e a inibição da α -glicosidase, bem como

entre a atividade vasodilatadora e os compostos flavonoídicos, além de ácido clorogênico. O extrato de *H. speciosa* obtido por percolação com etanol 96 °GL (EE-EC) e suas frações cromatográficas inibiram *in vitro* a α -glicosidase, sem diferença estatística entre eles (pCI_{50} de $4,75 \pm 0,16$ a $5,33 \pm 0,15$). EE-EC e a fração diclorometânica derivada deste reduziram a glicose sérica em aproximadamente 50 e 75%, respectivamente, em ensaio agudo de hiperglicemia, quando administrados por via oral a camundongos na dose de 300 mg/Kg. O refractionamento da fração diclorometânica resultou no isolamento de um sólido cuja estrutura química foi elucidada por métodos espectroscópicos usuais como sendo 3-O- β -(3'-*R*-hidroxi)-hexadecanoil-lupeol, inédito na espécie. Em conclusão, os resultados obtidos indicam que a atividade vasodilatadora de *H. speciosa* pode ser atribuída aos flavonoides e ácido clorogênico, enquanto a atividade antidiabética está associada aos compostos lipofílicos, ésteres do lupeol e da α/β -amirina.

Palavras-chaves: *Hancornia speciosa*; extratos padronizados; ciclitois; flavonoides; atividade antidiabética; atividade vasodilatadora; relação entre composição química quantitativa e atividade biológica; 3-O- β -(3'-*R*-hidroxi)-hexadecanoil-lupeol.

ABSTRACT

Hancornia speciosa Gomes, a plant species popularly named “mangaba”, has ethnomedical uses to treat hypertension and diabetes, among others. Its potential antihypertensive activity has been previously demonstrated by us employing *in vitro*, *ex vivo* and *in vivo* assays, rutin, L-(+)-bornesitol and quinic acid being regarded as the bioactive compounds. The goal of this work was to undertake the chemical-biological standardization of *H. speciosa* extracts with potential antihypertensive and antidiabetic activities. For this purpose, different extracts of *H. speciosa* leaves were obtained using distinct solvents (ethanol / water in different proportions; methanol / ethyl acetate), extraction techniques and extraction periods. The contents of the chemical markers, quantified by HPLC-DAD and UV-Vis spectrophotometry, were found to vary significantly among the extracts, including total flavonoids (2.68 ± 0.14 to $5.28 \pm 0.29\%$), bornesitol (5.11 ± 0.26 to $7.75 \pm 0.78\%$), rutin (1.46 ± 0.06 to $1.97 \pm 0.02\%$), FlavHS (a quercetin triglycoside; 0.72 ± 0.05 to $0.94 \pm 0.14\%$) and chlorogenic acid (0.67 ± 0.09 to $0.91 \pm 0.02\%$). The vasodilator activity of the extracts was assayed in rat aortic rings precontracted with phenylephrine, whereas their effect on α -glucosidase was evaluated *in vitro*. All extracts were active in both assays with pIC_{50} values in the range 4.97 ± 0.22 to 6.48 ± 0.10 for vasodilator activity and 3.49 ± 0.21 to 4.03 ± 0.10 for α -glucosidase inhibition. The obtained data was submitted to principal component analysis (PCA) to investigate the relationship between quantitative chemical composition and biological activity of the extracts. PCA indicated positive correlation between the vasodilator effect and the contents of chlorogenic acid, rutin, total flavonoids and FlavHS, in addition to negative correlation with the bornesitol concentrations. The contents of the assayed chemical markers showed no significant association to α -glucosidase inhibition. On the other hand, PCA carried out with the areas from the ten major peaks of extracts chromatograms disclosed positive correlation between the lipophilic compounds and α -glucosidase inhibition, as well as between the vasodilator activity and flavonoids contents, along with chlorogenic acid concentrations. The mangaba extract obtained by percolation with ethanol 96 °GL (EE-EC) and derived chromatographic fractions induced similar

α -glucosidase inhibition ($p > 0.05$; pIC_{50} from 4.75 ± 0.16 to 5.33 ± 0.15). EE-EC and the dichloromethane fraction (Fr DCM; 300 mg/Kg, *per ors*) inhibited the hyperglycemic effect induced by glucose (50 and 75%, respectively).

Chromatographic fractionation of Fr DCM afforded a solid, whose chemical structure was defined by spectroscopic analysis as lupeol 3-(3'*R*-hydroxy)-hexadecanoate, reported for the first time in *H. speciosa*. In conclusion, our results indicate that mangaba vasodilator activity seems to be related to the flavonoids and chlorogenic acid, whereas the antidiabetic activity is associated with lipophilic compounds, including esters of lupeol and α/β -amirin.

Keywords: *Hancornia Speciosa*; Standardization Extracts; Ciclitols; Flavonoids; Antidiabetic Activity; Vasodilatation Activity; Quantitative chemical composition and biological activity relationship; Lupeol 3-(3'*r*-Hydroxy)-Hexadecanoate.

LISTA DE FIGURAS

1 Extratos obtidos a partir dos ensaios extrativos com de folhas de <i>H. speciosa</i>	52
2 Perfis das curvas de gradiente disponíveis programa Empower 2 (Waters). 2 a 5: gradientes convexos, 6: linear, 7 a 10: gradientes côncavos.....	60
3 Esquema de fracionamento da fração diclorometânica (Fr DCM) de folhas de <i>H. speciosa</i>	57
4 Esquema representativo do ensaio agudo sobre a glicemia e tolerância à glicose.....	75
5 Perfis cromatográficos obtidos por CLAE-DAD dos diferentes extratos preparados com folhas de <i>H. speciosa</i> e de substâncias de referência.....	80
6 Espectros no UV obtidos <i>on-line</i> pelo detector DAD para os picos 1, 2 e 3 nos extratos de folhas de <i>H. speciosa</i> , identificados como ácido clorogênico, FlavHS e rutina, respectivamente.....	81
7 Espectros no UV obtidos <i>on-line</i> pelo detector DAD para os picos com TR entre 31 e 44 min.....	83
8 Perfis cromatográficos obtidos para (A) EE-EC, (B) quercitrina e (C) co-injeção de EE-EC e quercitrina.....	84
9 Espectro no UV obtido <i>on-line</i> pelo detector DAD para o pico com TR de 5,4 min.....	85
10 Perfis cromatográficos obtidos para (A) EE-EC, (B) ácido quínico (1) e (C) co-injeção de EE-EC e ácido quínico.....	86
11 Cromatograma obtido por CLAE-DAD para a quantificação de ácido clorogênico (1), FlavHS (2) e rutina (3) em extratos de <i>H. speciosa</i>	87
12 Cromatograma obtido por CLAE-DAD para a quantificação de bornesitol, após derivatização com cloreto de tosila em extratos de <i>H. speciosa</i> . Picos: (1) bornesitol e (2) padrão interno (pentaeritritol).....	88
13 Representação gráfica dos valores de pCl ₅₀ da atividade vasodilatadora dos extratos de <i>H. speciosa</i> , avaliada em preparações de anéis de aorta de ratos pré-contraídos com fenilefrina.....	93

14 Representação gráfica dos valores de pCl ₅₀ da atividade inibitória <i>in vitro</i> da enzima α -glicosidase dos extratos de <i>H. speciosa</i>	98
15 Dendograma obtido pela análise de cluster, empregando-se o método do vizinho mais próximo para a matriz de dados (18x6), considerando-se a atividade vasodilatadora dos extratos de <i>H. speciosa</i>	101
16 Análise de componentes principais dos extratos resultantes dos ensaios extrativos de <i>H. speciosa</i> e das variáveis teores de marcadores químicos e atividade vasodilatadora.....	102
17 Gráfico bivariado (<i>biplot</i>) obtido pela análise de componentes principais dos extratos resultantes dos ensaios extrativos de <i>H. speciosa</i> (em vermelho) e das variáveis teores de marcadores químicos e atividade vasodilatadora (em azul), destacando-se os grupos de extratos discriminados pela CP1.....	104
18 Gráfico bivariado (<i>biplot</i>) obtido pela análise de componentes principais dos extratos resultantes dos ensaios extrativos de <i>H. speciosa</i> (em vermelho) e das variáveis teores de marcadores químicos e atividade vasodilatadora (em azul), destacando-se os grupos de extratos discriminados pela CP2.....	105
19 Mapa de correlação obtido para as variáveis teores de flavonoides totais (1), bornesitol (2), rutina (3), FlavHS (4), ácido clorogênico (5) e valores de pCl ₅₀ no ensaio de vasodilatação (6) dos extratos de <i>H. speciosa</i>	106
20 Dendograma obtido pela análise de cluster, empregando-se o algoritmo do vizinho mais próximo para a matriz de dados (18x6) considerando a atividade inibitória da enzima α -glicosidase dos extratos de <i>H. speciosa</i>	111
21 Análise de componentes principais dos extratos de <i>H. speciosa</i> obtidos nos ensaios extrativos e as variáveis teores de marcadores químicos e atividade inibitória da enzima α -glicosidase, evidenciando os grupos de extratos discriminados pela CP1.....	112
22 Gráfico bivariado (<i>biplot</i>) obtido pela análise de componentes principais dos extratos de <i>H. speciosa</i> resultantes dos ensaios extrativos (em vermelho) e das variáveis teores de marcadores químicos e atividade inibitória da enzima α -glicosidase (em azul), destacando-se os grupos de extratos discriminados pela CP1.....	114
23 Gráfico bivariado (<i>biplot</i>) obtido pela análise de componente principal dos extratos de <i>H. speciosa</i> resultantes dos ensaios extrativos (em vermelho) e das variáveis teores de marcadores químicos e atividade inibitória da enzima α -glicosidase (em	

azul), destacando-se os grupos de extratos discriminados pela CP2.....	115
24 Mapa de correlação obtido para as variáveis teores de flavonoides totais (1), bornesitol (2), rutina (3), FlavHS (4), ácido clorogênico (5) e valores de pCl ₅₀ para atividade inibitória da enzima α-glicosidase (6) dos extratos de <i>H. speciosa</i>	116
25 Cromatograma obtido por CLAE-DAD para o extrato EE-EC (item 4.7 e 5.1) de folhas de <i>H. speciosa</i> . Os picos utilizados na análise quimiométrica estão numerados no cromatograma. (1) ácido quínico, (2) ácido clorogênico, (3) FlavHS, (4) rutina e (9) quercitrina.....	120
26 Dendograma obtido pela análise de cluster, empregando-se o método de Ward para a matriz de dados (18×12), considerando as atividades vasodilatadora e inibitória da enzima α-glicosidase dos extratos de <i>H. speciosa</i>	124
27 Análise de componentes principais dos extratos oriundos dos ensaios extrativos de <i>H. speciosa</i> e as variáveis área dos picos majoritários nos perfis cromatográficos dos extratos e atividade vasodilatadora.....	125
28 Gráfico bivariado (<i>biplot</i>) obtido pela análise de componentes principais dos extratos resultantes dos ensaios extrativos de <i>H. speciosa</i> (em vermelho) e das variáveis área dos picos majoritários nos perfis cromatográficos dos extratos e atividade vasodilatadora (em azul), destacando-se os grupos de extratos discriminados pela CP1.....	127
29 Gráfico bivariado (<i>biplot</i>) obtido pela análise de componentes principais dos extratos resultantes dos ensaios extrativos de <i>H. speciosa</i> (em vermelho) e das variáveis área dos picos majoritários nos perfis cromatográficos dos extratos e atividade vasodilatadora (em azul), destacando-se os grupos de extratos discriminados pela CP2.....	128
30 Mapa de correlação obtido para as variáveis pico 1 (1), pico 2 (2), pico 3 (3), pico 4 (4), pico 5 (5), pico 6 (6), pico 7 (7), pico 8 (8), pico 9 (9), pico 10 (10), valores de pCl ₅₀ para as atividade inibitória da α-glicosidase (11) e vasodilatação (12) dos extratos de <i>H. speciosa</i>	130
31 Representação gráfica dos valores de pCl ₅₀ da atividade inibitória <i>in vitro</i> da enzima α-glicosidase obtidos para o extrato EE-EC de <i>H. speciosa</i> e frações cromatográficas deste.....	136
32 Efeito do extrato etanólico de folhas de <i>H. speciosa</i> (EE-CC) e frações derivadas deste no ensaio agudo <i>in vivo</i> para avaliação da glicemia.....	137

33 Perfis cromatográficos obtidos por CLAE-DAD para as frações oriundas do fracionamento cromatográfico do extrato de <i>H. speciosa</i> (EE-EC).....	138
34 Perfil cromatográfico obtido por CCD de sílica gel para o extrato de <i>H. speciosa</i> EE-CC (1), fração DCM (2), mistura de lupeol e α -amirina (3), e éster do lupeol (4).....	140
35 Reação de hidrólise alcalina de éster do lupeol.....	144
36 Perfil cromatográfico obtido por CCD de sílica gel para Fr DCM (1), produto da hidrólise alcalina da Fr DCM (2) e mistura de lupeol/ α -amirina (3).....	145
37 Perfis cromatográficos obtidos por UPLC com detector de DAD (A) e de MS-ESI com ionização no modo negativo (B) e no modo positivo (C) para o extrato EE-EC. Picos (1) ácido quínico, (2) ácido clorogênico, (3) rutina, (4) canferol- <i>O</i> -rutinosídeo, (5) triglicosídeo do canferol e (6) bornesitol.....	147
38 Espectros obtidos por UPLC-MS-ESI para os picos selecionados no extrato EE-EC de folhas de <i>H. speciosa</i> (a-c). Picos: (a) ácido quínico; (b) bornesitol; (c) rutina.....	149
39 Perfis cromatográficos obtidos por UPLC com detector de DAD (A) e de MS-ESI com ionização no modo positivo (B) para a fração diclorometânica (Fr DCM) de folhas de <i>H. speciosa</i>	150
40 Perfis cromatográficos obtidos por UPLC com detector de DAD (A) e de MS-ESI com ionização no modo positivo (B) para o extrato etanólico EE-EC de folhas de <i>H. speciosa</i>	151
41 Espectros obtidos por UPLC-MS-ESI para os picos selecionados da fração diclorometânica (Fr DCM) de folhas de <i>H. speciosa</i> (a-c) e do extrato EE-EC (d). Picos: (a) TR = 7,71 min; (b) TR = 8,49 min; (c) TR = 9,55 min; (d) TR = 8,46 min.....	152
42 Perfil cromatográfico obtido por CCD de sílica gel para as frações reunidas 16-26 (1); 27-37 (2); 38-47 (3); 48-58 (4); 59-68 (5); 69-78 (6); 79-84 (7); 85-88 (8) provenientes do fracionamento de Fr DCM e mistura das substâncias de referência lupeol e α -amirina (9).....	156
43 Perfil cromatográfico obtido por CCD de sílica gel para as frações reunidas 89-92 (1); 93-94 (2); 95-96 (3); 97-104 (4); 105-118 (5); 119-130 (6) provenientes do fracionamento de Fr DCM e mistura das substâncias de referência lupeol e α -amirina (7).....	157

44	Espectro no UV obtido para TRPHS.....	158
45	Perfis cromatográficos obtidos por UPLC-MS-ESI para TRPHS, com detecção no UV (a) e por MS no modo positivo de ionização (b).....	158
46	Ampliação do cromatograma obtido por UPLC-MS-ESI para TRPSH, com detecção no UV (a) e por MS no modo positivo de ionização (b).....	159
47	Espectro de massas obtido por UPLC-MS-ESI no modo positivo para o pico com tempo de retenção de 8,49 min (20V), correspondente ao constituinte TRPHS.....	160
48	Espectro de massas obtido por UPLC-MS-ESI no modo positivo para o pico com tempo de retenção de 8,49 min (70V), correspondente a TRPHS.....	161
49	Espectro de RMN de ¹³ C obtido para TRPHS (100 MHz, CDCl ₃).....	162
50	Subespectro DEPT-135 obtido para TRPHS (100 MHz, CDCl ₃).....	165
51	Espectro de RMN de ¹³ C obtido para TRPHS e subespectro DEPT-135 obtido para TRPHS (100 MHz, CDCl ₃).....	165
52	Espectro de RMN de ¹ H obtido para TRPHS (400 MHz, CDCl ₃).....	167
53	Expansão do espectro de RMN de ¹ H obtido para TRPHS (400 MHz, CDCl ₃).....	168
54	Expansão do espectro de RMN de ¹ H obtido para TRPHS (400 MHz, CDCl ₃).....	169
55	Expansão do espectro de RMN de ¹ H obtido para TRPHS (400 MHz, CDCl ₃).....	170
56	Mapa de contornos COSY (400 MHz, CDCl ₃) obtido para TRPHS.....	173
57	Expansão do mapa de contornos COSY (400 MHz, CDCl ₃) obtido para TRPHS.....	174
58	Mapa de contornos HMQC obtido para TRPHS (¹ H, 400 MHz; ¹³ C, 100 MHz, CDCl ₃).....	175

59 Expansão do mapa de contornos HMQC obtido para TRPHS (^1H , 400 MHz; ^{13}C , 100 MHz, CDCl_3).....	176
60 Mapa de contornos HMBC obtido para TRPHS (^1H , 400 MHz; ^{13}C , 100 MHz, CDCl_3).....	177
61 Expansão do mapa de contornos HMBC obtido para TRPHS (^1H , 400 MHz; ^{13}C , 100 MHz, CDCl_3).....	178

LISTA DE TABELAS

1 Programa de eluição estabelecido para a quantificação de rutina e ácido clorogênico em extratos e frações de folhas de <i>H. speciosa</i>	59
2 Sistema de eluição estabelecido para o método por CLAE-DAD para quantificação de bornesitol em extratos e frações de folhas de <i>H. speciosa</i>	65
3 Fracionamento do extrato etanólico de folhas de <i>H. speciosa</i> por cromatografia em coluna aberta de sílica gel.....	68
4 Gradiente de eluição empregado para a análise dos extratos de <i>H. speciosa</i> provenientes do ensaio extrativo.....	69
5 Ensaios extrativos realizados com folhas de <i>H. speciosa</i>	78
6 Teores de marcadores químicos ($n = 3$) em extratos de folhas de <i>H. speciosa</i> provenientes dos ensaios extrativos.....	88
7 Valores de pCl_{50} para a atividade vasodilatadora dos extratos de <i>H. speciosa</i> , avaliada em preparações de anéis de aorta de ratos pré-contraídos com fenilefrina.....	92
8 Valores de pCl_{50} para a atividade inibitória <i>in vitro</i> da enzima α -glicosidase dos extratos de <i>H. speciosa</i>	96
9 Áreas dos picos selecionados para análise quimiométrica, obtidas a partir dos perfis cromatográficos dos extratos.....	121

10 Valores de pCl_{50} para a atividade inibitória da enzima α -glicosidase obtidos para o extrato EE-EC de <i>H. speciosa</i> e frações deste.....	135
11 Massa das frações obtidas do fracionamento de Fr DCM, empregando-se cromatografia em coluna aberta de sílica gel.....	155
12 Atribuição dos sinais de RMN de ^{13}C obtidos para TRPHS (100 MHz, $CDCl_3$).....	163
13 Dados do espectro de RMN de 1H obtido para TRPHS (400 MHz, $CDCl_3$).....	172

LISTA DE FÓRMULAS ESTRUTURAIS

- (1) acarbose
- (2) voglibose
- (3) miglitol (3)
- (4) ácidos gálico
- (5) 4-hidroxi-3,5-dimetoxibenzóico (ácido siríngico)
- (6) ácido 5-O-cafeoilquínico
- (7) ácido 3-O-cafeoilquínico
- (8) *cis*-clorogenato de metila
- (9) *trans*-clorogenato de metila
- (10) 2,7-diidroxixantona
- (11) 2,7-dimetoxixantona
- (12) óxido de *trans*-linalol
- (13) óxido de *cis*-linalol
- (14) α -terpineol
- (15) linalol
- (16) geraniol
- (17) metil-antranilato
- (18) eugenol
- (19) (E)-isoeugenol

- (20) apofarnesol
- (21) naftaleno
- (22) α -bisaboleno
- (23) spatulenol
- (24) ácido malônico
- (25) L-(+)-bornesitol
- (26) canferol-3-O-rutinosídeo
- (27) ácido cis 4-hidroxi-cinâmico
- (28) ácido *trans* 4-hidroxi-cinâmico
- (29) α -amirina
- (30) lupeol
- (31) 3 β -O-éster de ácido graxo do lupeol
- (32) ácido quínico
- (33) rutina
- (34) β -amirina
- (35) obtusalina
- (36) eritrodiol
- (37) β -sitosterol
- (38) éster 3 β -O-acilado de α -amirina
- (39) éster 3 β -O-acilado de β -amirina

- (40) éster 3 β -O-acilado do lupeol
- (41) catequina
- (42) *epicatequina*
- (43) galato de *epigalocatequina*
- (44) ácido ursólico
- (45) ácido oleanólico
- (46) uvaol
- (47) ácido betulínico
- (48) friedelina
- (49) ácido eburicoico
- (50) salvina A
- (51) ácido maslínico
- (52) 3-O- β -(5-hidroxi)-feruloil- α -amirina
- (53) acetato de α -amirina
- (54) palmitato de β -amirina
- (55) lupenona
- (56) 3-O- β -(3'-*R*-hidroxi)-hexadecanoil-lupeol (TRPHS)

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	25
2 OBJETIVOS	27
2.1 Objetivo geral	27
2.2 Objetivos específicos	27
3 REVISÃO DA LITERATURA	28
3.1 Hipertensão arterial	28
3.2 Diabetes mellitus	36
3.4 A química da espécie	41
4 PARTE EXPERIMENTAL	52
4.1 Equipamentos	52
4.2 Solventes e reagentes	53
4.3 Substâncias de referência	55
4.4 Vidrarias e materiais diversos	55
4.5 Reveladores para CCD	56
4.6 Material vegetal	56
4.7 Ensaio extrativos	56
4.7.1 Obtenção do perfil cromatográfico dos extratos por CLAE-DAD	58
4.7.2 Quantificação de marcadores químicos	60
4.7.2.1 Quantificação de flavonoides totais	60
4.7.2.2 Quantificação de rutina, ácido clorogênico e FlavHS	62
4.7.2.3 Quantificação de bornesitol	63
4.8 Ensaio biológicos	65
4.8.1 Avaliação da atividade vasodilatadora	65
4.8.2 Avaliação da atividade inibitória da enzima α -glicosidase	66
4.9 Fracionamento do extrato etanólico visando isolar os constituintes com atividade inibitória da α -glicosidase	67

4.9.1 Hidrólise da fração diclorometânica (Fr DCM)	69
4.9.1.1 Análise do produto de hidrólise por CCD de sílica gel	70
4.9.2 Fracionamento da fração diclorometânica (Fr DCM)	70
4.10 Caracterização de EE-EC e Fr DCM por UPLC-MS-ESI	72
4.11 Elucidação estrutural de TRPHS	73
4.12 Avaliação in vivo da atividade antidiabética	74
4.12.1 Avaliação do efeito do tratamento agudo sobre a glicemia e a tolerância à glicose	74
4.12.2 Análise dos resultados	75
4.13 Análises de CAR (relação entre composição química e atividade biológica)	75
4.13.1 Teores dos marcadores versus atividade biológica	75
4.13.2 Área dos picos versus atividade biológica	76
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	77
5.1 Ensaio extrativos	77
5.1.1 Obtenção dos perfis cromatográficos por CLAE-DAD	79
5.1.2 Quantificação dos marcadores químicos	86
5.1.3 Atividade vasodilatadora ex vivo dos extratos	91
5.1.4 Atividade inibitória da enzima α -glicosidase in vitro	95
5.2 Análises de relação entre composição química e atividade biológica (CAR) para os extratos de <i>H. speciosa</i>	98
5.2.1 Teores dos marcadores químicos versus atividade biológica	100
5.2.1.1 Análise de CAR para atividade vasodilatadora	100
5.2.1.2 Análise de CAR para atividade inibitória da enzima α -glicosidase	110
5.2.2 Área dos picos versus atividades biológicas	119
5.3 Fracionamento do extrato de folhas de <i>H. speciosa</i> (EE-EC)	134
5.3.1 Atividade inibitória da enzima α -glicosidase in vitro das frações do extrato EE-EC	135
5.3.2 Ensaio agudo in vivo de avaliação da glicemia do extrato e frações de <i>H.</i>	

speciosa	137
5.3.3 Hidrólise alcalina da fração diclorometânica (Fr DCM)	144
5.3.4 Análise por UPLC-MS da fração diclorometânica (Fr DCM) e do extrato EE- EC	146
5.3.5 Fracionamento cromatográfico da fração diclorometânica (Fr DCM)	154
5.4 Elucidação estrutural de TRPHS	157
6 CONCLUSÕES	181
REFERÊNCIAS	183

1 INTRODUÇÃO

As plantas constituem uma fonte rica de substâncias bioativas que os homens utilizaram ao longo da evolução com finalidades medicinais ou como drogas de abuso (MACÍAS et al., 2007). Produtos naturais constituíram a base de sofisticados sistemas de medicina tradicional, cujo primeiro relato data de 2.600 a.C. sobre o uso de plantas e derivados na Mesopotâmia (CRAGG & NEWMAN, 2013). Este uso se deu de forma empírica, a princípio, sem o conhecimento dos constituintes químicos e mecanismos relacionados aos seus efeitos (MACÍAS et al., 2007). A evolução nos estudos de produtos naturais de plantas culminou no isolamento da primeira substância pura, morfina, comercializada pela Merck em 1826, e na obtenção do primeiro fármaco semissintético derivado de produtos naturais, o ácido acetilsalicílico (Aspirina®), pela Bayer, em 1899. Apesar dos avanços nas técnicas de isolamento e identificação de produtos naturais bioativos de plantas e na otimização de protótipos moleculares, resultando na obtenção de novos fármacos, dados da Organização Mundial de Saúde (OMS) indicam que aproximadamente 80% da população mundial ainda utilizam plantas medicinais para o cuidado primário com a saúde (NEWMAN et al., 2000; FARNSWORTH et al., 1985).

A contribuição da química de produtos naturais para o desenvolvimento de novos fármacos é inquestionável e pode ser evidenciada pelos dados revistos por Newman e Cragg (2012): das 1.130 novas entidades químicas introduzidas no mercado americano, no período entre 1981 e 2010, cerca da metade (55%) são produtos naturais, análogos semissintéticos de produtos naturais ou produtos sintéticos baseados em grupos farmacofóricos de produtos naturais. Apesar disso, o número de plantas ainda não exploradas como fonte de compostos bioativos é enorme (BASSO et al., 2005). Estima-se que apenas 6% do total de 300.000 plantas superiores existentes no planeta foram avaliadas em estudos farmacológicos e 15% em estudos fitoquímicos (CRAGG & NEWMAN, 2013; FABRICANT & FARNSWORTH, 2001).

A enorme biodiversidade presente no território nacional insere o país em uma posição estratégica para o desenvolvimento e exploração racional e sustentada de produtos naturais bioativos, uma vez que o Brasil tem a flora mais rica do mundo, com mais de 56.000 espécies de plantas – quase 19% da flora mundial (BASSO et al., 2005; GIULIETTI et al., 2005). Apesar desse grande potencial, as plantas medicinais brasileiras ainda são pouco estudadas do ponto de vista químico e farmacológico (SIMÕES & SCHENKEL, 2002).

A pesquisa de produtos naturais bioativos no Brasil apresenta um elevado potencial para a identificação de novas drogas vegetais e substâncias bioativas com potencial para o desenvolvimento de fitoterápicos e fármacos, respectivamente, que poderão contribuir para consolidação e inovação do setor farmacêutico nacional. Neste contexto se insere o presente trabalho, que visa fornecer subsídios para a padronização de derivados da droga vegetal *Hancornia speciosa*, com vistas ao desenvolvimento futuro de um fitoterápico anti-hipertensivo e/ou antidiabético a partir de folhas dessa espécie.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Realizar a padronização químico-biológica de derivados da droga vegetal, folhas de *Hancornia speciosa*, com potencial atividade anti-hipertensiva e antidiabética.

2.2 Objetivos específicos

1. Obter diferentes extratos de folhas de *H. speciosa* utilizando solventes (etanol/água em diferentes proporções; metanol / acetato de etila), técnicas extrativas (percolação e maceração estática) e tempos variados.
2. Quantificar o teor de marcadores químicos (flavonoides totais, bornesitol, rutina, triglicósídeo da quercetina e ácido clorogênico) nos extratos supracitados, por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE-DAD) e espectrofotometria no UV-Vis.
3. Avaliar a atividade biológica *in vitro* dos extratos obtidos em “1” em modelo de vasodilatação em preparações isoladas de anéis de aorta e de inibição da enzima α -glicosidase.
4. Avaliar, por meio de análises quimiométricas, empregando análise de componentes principais (PCA) e análise hierárquica de agrupamentos (HCA), a participação dos marcadores químicos definidos para a espécie nas respostas biológicas ensaiadas (efeito vasodilatador e atividade inibitória da enzima α -glicosidase).
5. Selecionar o(s) extrato(s) mais ativo(s) no modelo *in vitro* de inibição da enzima α -glicosidase e avaliar seu efeito *in vivo* no tratamento agudo sobre a glicemia e a tolerância à glicose.
6. Selecionar o extrato ativo identificado do item “5” e realizar seu fracionamento visando isolar os constituintes bioativos.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Hipertensão arterial

As doenças cardiovasculares (DCV) são a principal causa de incapacidade e morte em todo o mundo, sendo responsáveis por aproximadamente 30% das 57 milhões de mortes no mundo em 2008 (WHO, 2011a; 2011b). Os fatores de risco para DCV incluem tabagismo, dieta não saudável, sedentarismo, dislipidemias, hipertensão arterial (HA) e diabetes (WHO, 2011b). Projeções da Organização Mundial de Saúde (OMS) estimam, para 2030, um total de 23,3 milhões de óbitos decorrentes de doenças cardiovasculares (WHO, 2011a; MATHERS & LONCAR, 2006).

Dentre os fatores de riscos citados, a hipertensão arterial é o principal, sendo definida como uma condição clínica na qual a pressão arterial sistólica eleva-se para valores superiores a 140 mmHg e/ou a diastólica para valores superiores a 90 mmHg, em indivíduos que não estejam fazendo uso de medicação anti-hipertensiva (ALESSI et al., 2013; MANCIA et al., 2013; VI DIRETRIZES BRASILEIRAS DE HIPERTENSÃO ARTERIAL, 2010). Segundo a OMS, em 2008 a prevalência de HA em adultos com idade igual ou superior a 25 anos foi de 29,2 e 24,8% para os sexos masculino e feminino, respectivamente (WHO, 2012; WHO, 2011a).

A hipertensão arterial sistêmica (HAS) é uma condição clínica multifatorial caracterizada por níveis elevados e sustentados de pressão arterial (PA). Associa-se frequentemente a alterações funcionais e/ou estruturais dos órgãos-alvo (coração, cérebro, rins e vasos sanguíneos) e a alterações metabólicas, com consequente aumento do risco de eventos cardiovasculares fatais e não-fatais (VI DIRETRIZES BRASILEIRAS DE HIPERTENSÃO ARTERIAL, 2010).

O controle da hipertensão reduz significativamente a morbidade e mortalidade associada ao sistema cardiovascular, diminui o risco de eventos fatais e não-fatais e de outros eventos coronarianos, além de diminuir a incidência de insuficiência cardíaca (JAMES et al., 2014; MANCIA et al., 2007). A abordagem terapêutica depende da gravidade da hipertensão e inclui mudança nos hábitos de vida ou, em

casos mais graves, abordagem farmacológica visando reduzir a pressão arterial. Os valores alvos para a pressão arterial dependem da estratificação do risco cardíaco para cada paciente. Para a população com idade inferior a 60 anos, a meta de redução da pressão arterial é para valores inferiores a 140/90 mmHg (JAMES et al., 2014).

A terapia medicamentosa inclui diferentes classes de fármacos: diuréticos tiazídicos e de alça, inibidores da ECA, bloqueadores dos canais de cálcio e antagonistas de receptor AT1 da angiotensina II, além dos beta-bloqueadores (JAMES et al., 2014; MANCIA et al., 2013; VI DIRETRIZES BRASILEIRAS DE HIPERTENSÃO ARTERIAL, 2010). A escolha do agente terapêutico inicial deve ser feita considerando-se os fatores de risco associados a um dado paciente, bem como os benefícios que o agente terapêutico possa fornecer para o quadro, uma vez que os diferentes fármacos podem gerar efeitos protetores diferenciados sobre o sistema cardiovascular (MANCIA et al., 2007).

A monoterapia atinge a meta de redução da pressão arterial em aproximadamente 2/3 dos pacientes (VI DIRETRIZES BRASILEIRAS DE HIPERTENSÃO ARTERIAL, 2010). Dessa forma, a maioria dos pacientes requer uma terapia combinada de agentes anti-hipertensivos de classes diferentes para o controle da pressão arterial. A implementação da terapia combinada adequada é um trabalho árduo para o médico e dispendioso para o paciente, devendo a abordagem ser individualizada e o sucesso terapêutico estritamente relacionado à adesão ao tratamento (MANCIA et al., 2013; VI DIRETRIZES BRASILEIRAS DE HIPERTENSÃO ARTERIAL, 2010; MANCIA et al., 2007). Ainda que seja difícil de ser estabelecida, a terapia combinada possui vantagens, dentre as quais a possibilidade de ocorrência de sinergismo fisiológico ou farmacológico entre as diferentes classes de fármacos, resultando em maior redução da PA (MANCIA et al., 2013).

Nesse contexto, devem-se considerar os efeitos adversos associados aos fármacos atualmente utilizados, uma vez que a adesão ao tratamento dependerá significativamente da tolerância do paciente. Exemplos de efeitos adversos causados por agentes anti-hipertensivos incluem ganho de peso, interferência com o metabolismo de lipídeos e aumento da incidência de diabetes com a utilização de

beta-bloqueadores, bem como efeitos dislipidêmicos e diabetogênicos relacionados ao uso de diuréticos tiazídicos (MANCIA et al., 2013).

As taxas de sucesso relacionadas ao controle da PA são reduzidas, apesar das evidências de que o tratamento anti-hipertensivo seja eficaz em diminuir a morbidade e a mortalidade cardiovasculares (VI DIRETRIZES BRASILEIRAS DE HIPERTENSÃO ARTERIAL, 2010). Este fato pode estar relacionado à incidência elevada de reações adversas e esquema terapêutico complexo, dificuldades na definição dos fármacos e doses adequados ao paciente, o que reduz a taxa de adesão ao tratamento, dentre outros fatores. Assim, a busca por novos fármacos anti-hipertensivos pode contribuir para a simplificação da terapia farmacológica. Neste contexto, os medicamentos fitoterápicos podem ser promissores, em função da possibilidade de sinergismo e da menor incidência de efeitos adversos (WAGNER & ULRICH-MERZENIC, 2009).

3.2 Diabetes mellitus

O *diabetes mellitus* (DM) constitui um grupo de doenças metabólicas ou um grupo heterogêneo de distúrbios metabólicos caracterizado por hiperglicemia, resultante de defeitos na secreção e/ou ação da insulina (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2012; DIRETRIZES DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2009).

Segundo a *International Diabetes Federation* (IDF), cerca de 366 milhões de pessoas no mundo apresentavam diabetes em 2011 e estima-se que em 2030 esse número atinja 552 milhões de indivíduos (WHITING et al., 2011). É considerada a quarta ou a quinta principal causa de mortes em países desenvolvidos e foi responsável por 4,6 milhões de óbitos em 2011 em todo o mundo (WHITING et al., 2011). No Brasil, o número de indivíduos adultos (20 – 79 anos) com diabetes foi estimado em 12,4 milhões em 2011 e, em 2030, esse número poderá alcançar 19,6 milhões (WHITING et al., 2011).

A hiperglicemia crônica característica do diabetes é associada à disfunção, insuficiência e danos a longo prazo de diferentes órgãos, traduzindo-se em complicações como retinopatia, nefropatia e neuropatia autonômica (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2012). Pacientes com diabetes apresentam incidência aumentada de doenças ateroscleróticas, cardiovasculares e cerebrovasculares, além da coexistência frequente de hipertensão arterial e anormalidades no metabolismo de lipoproteínas (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2012). As complicações do DM estão associadas à disfunção endotelial observada nos pacientes diabéticos, caracterizada por elevados níveis de espécies radicalares derivadas do oxigênio, o que resulta num balanço final direcionado para uma resposta vasoconstritora durante a evolução da doença (SHI & VANNHOUTTE, 2009).

A classificação atual de diabetes baseia-se na etiologia, sendo recomendada pela *American Diabetes Association* (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2013) e pela Sociedade Brasileira de Diabetes (DIRETRIZES DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2009) a divisão em quatro classes clínicas: *diabetes mellitus* tipo 1 (DM1), *diabetes mellitus* tipo 2 (DM2), outros tipos específicos de *diabetes mellitus* e diabetes gestacional.

O DM1 é responsável por 5 a 10% dos casos e é caracterizado por uma deficiência da secreção de insulina, resultante da destruição autoimune de células beta-pancreáticas (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2012; DIRETRIZES DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2009). A destruição dessas células possui múltiplas predisposições genéticas e também está relacionada a fatores ambientais, ainda não claramente definidos. O DM1 é frequente na infância ou adolescência, podendo, todavia, ocorrer em qualquer idade (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION 2012).

O DM2 compreende 90 a 95% dos casos, sendo caracterizado por uma combinação de resistência à ação da insulina e uma resposta secretória inadequada desse hormônio (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2012; DIRETRIZES DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2009). Ocorre com maior frequência em mulheres com relato de diabetes gestacional e indivíduos hipertensos ou com

dislipidemia. Apesar do DM2 possuir uma base genética, evidências apontam que fatores comportamentais considerados de risco, como obesidade e sedentarismo, possuem papel chave no desenvolvimento da doença (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2012; KAWAMORE et al., 2009).

O diagnóstico do diabetes é realizado considerando-se critérios relativos à determinação da glicemia e/ou hemoglobina glicada (HbA1c) no paciente. O indivíduo é considerado diabético se apresentar valor de glicemia em jejum (nenhuma ingestão calórica por no mínimo 8 h) maior ou igual a 126 mg/dl em duas dosagens; ou valor de glicemia determinado pelo teste de tolerância à glicose maior ou igual a 200 mg/dl (após sobrecarga com 75 g de dextrosol); ou valor de glicemia ao acaso maior ou igual a 200 mg/dl associado a sintomas clássicos de hiperglicemia; ou ainda pela determinação de HbA1c em duas amostras, sendo considerado diabético valores de HbA1C maiores ou iguais a 6,5% (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2013; ALESSI et al., 2013). HbA1c constitui um marcador extensamente utilizado para avaliação da glicemia crônica, que reflete os níveis glicêmicos médios dos últimos dois a três meses, sendo utilizado no diagnóstico do diabetes e no monitoramento do controle metabólico do paciente em tratamento (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2012).

A orientação nutricional e o estabelecimento de dieta para controlar pacientes com DM associada a mudanças no estilo de vida, incluindo atividades físicas, são considerados terapia de primeira escolha (DIRETRIZES DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2009). O tratamento de DM1 é realizado empregando-se insulino-terapia, individualizada para cada paciente. Em contrapartida, diversos agentes antidiabéticos orais estão disponíveis para emprego na farmacoterapia de DM2, indicados quando o paciente não responde ou deixa de fazê-lo adequadamente às medidas não medicamentosas, e possuem a finalidade de reduzir a glicemia. Esses fármacos podem ser subdivididos em classes, de acordo com seus mecanismos de ação: os hipoglicemiantes ou secretagogos de insulina (sulfonilureias e glinidina); os anti-hiperglicemiantes (inibidores da alfa-glicosidade, biguanidas e glitazonas); e os que aumentam a secreção de insulina de forma glicose-dependente, além de

promover a supressão do glucagon (gliptinas) (DIRETRIZES DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2009).

Os fármacos supracitados podem ser utilizados como monoterapia; porém, caso não seja alcançado um controle metabólico adequado, há necessidade de terapia combinada, idealmente utilizando fármacos com mecanismos de ação distintos. Em alguns casos faz-se necessário instituir uma combinação de insulinoterapia, devido ao declínio progressivo da função das células beta pancreáticas (DIRETRIZES DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2009; AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2013).

As DCV constituem a maior causa de morbidade e mortalidade em indivíduos com diabetes. Hipertensão arterial e *diabetes mellitus* representam importantes problemas de saúde pública e são condições clínicas que frequentemente se associam. Em pacientes com DM2, cerca de 40% encontram-se hipertensos por ocasião do diagnóstico de DM (DIRETRIZES DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2009). A prevalência de HA é duas a três vezes maior em diabéticos do que na população em geral, e cerca de 70% dos diabéticos são hipertensos (ALESSI et al., 2013). Na atualidade, observa-se uma tendência no aumento da prevalência de HA e DM, possivelmente relacionado ao crescimento da população de idosos e às taxas de sobrepeso e obesidade (ALESSI et al., 2013). Ambas as condições clínicas são reconhecidamente fatores de risco para DCV (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2013) e a coexistência das duas condições aumenta substancialmente o risco de Infarto Agudo do Miocárdio (IAM), Acidente Vascular Encefálico (AVE) e mortalidade por todas as causas, bem como maior risco de Insuficiência Cardíaca (IC), Doença Renal (DR) e complicações microvasculares (ALESSI et al., 2013). Em indivíduos diabéticos, mesmo com PA considerada normal, há um aumento moderado do risco cardiovascular, e na vigência de HA estabelecida o risco será alto ou muito alto (VI DIRETRIZES BRASILEIRAS DE HIPERTENSÃO ARTERIAL, 2010).

O tratamento da HA é de particular importância em pacientes diabéticos, tanto para prevenir doenças cardiovasculares, quanto para minimizar a progressão de

doença renal e retinopatia diabética. Por serem considerados pacientes de alto risco para eventos cardiovasculares, todos os indivíduos diabéticos com pressão arterial superior a 120/80 mmHg devem ser orientados a iniciar terapia anti-hipertensiva não medicamentosa, como alterações nos hábitos de vida. Em pacientes diabéticos com PA superior a 140/80 mmHg, deve-se instituir uma terapia medicamentosa anti-hipertensiva, a despeito da implementação de ações não farmacológicas (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2013). Neste contexto, os fármacos inibidores da enzima conversora de angiotensina (iECA) são de especial importância, uma vez que não apresentam efeitos adversos quanto ao metabolismo de lipídeos, podem reduzir os níveis séricos de glicose por aumentar a sensibilidade à insulina e, assim, reduzir a incidência do DM2. Adicionalmente, diminuem a progressão de nefropatia diabética em indivíduos com DM1 e reduzem a incidência de eventos cardiovasculares em pacientes diabéticos com alto risco cardiovascular (DIRETRIZES DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2009).

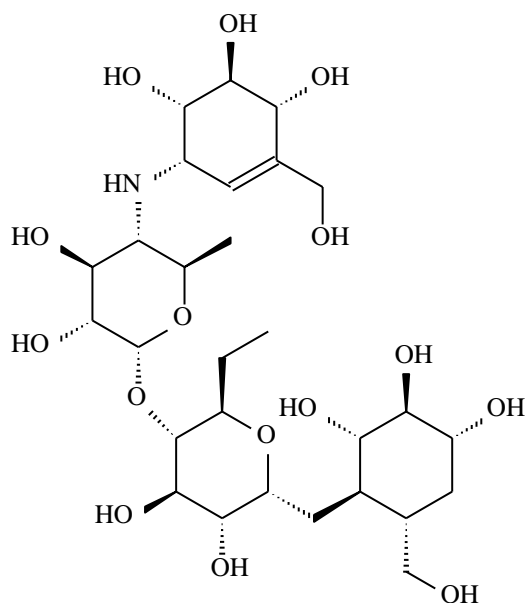
Existe um grupo intermediário de indivíduos que possuem níveis elevados de glicose plasmática, mas não se enquadram no critério para definição de diabetes. São referidos como pré-diabéticos ou categoria de risco aumentado de diabetes, indicando um risco relativamente alto de desenvolver diabetes, bem como doenças cardiovasculares (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2012; DIRETRIZES DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2009). Estratégias terapêuticas para postergar ou atrasar a progressão da intolerância à glicose são potencialmente úteis para reduzir a morbidade e mortalidade cardiovascular, bem como os custos no sistema de saúde (KAWAMORE et al., 2009). Alterações no estilo de vida, com o incremento da prática de exercícios físicos, objetivando a perda de peso, bem como o uso de alguns agentes farmacológicos se mostraram eficazes em prevenir ou adiar o desenvolvimento do diabetes (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2012; DIRETRIZES DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2009). Fármacos como metformina, acarbose, exenatida, orlistat e rosiglitazona se mostraram eficazes em prevenir ou adiar a progressão da intolerância à glicose (BERGMAN, 2013; SHIN et al., 2012).

A acarbose reduziu em 25% o risco relativo de desenvolvimento de diabetes em pacientes pré-diabéticos, além de reduzir o risco de novos casos de hipertensão em 34%, e de eventos cardiovasculares em 49% (CHIASSON et al., 2002). Todavia, aproximadamente um terço dos indivíduos tratados com acarbose não concluiu o estudo supracitado devido efeitos adversos gastrointestinais. Em outro estudo realizado por Kawamore e colaboradores (2009) com pacientes japoneses pré-diabéticos, a voglibose reduziu significativamente o risco de indivíduos com pré-diabetes de desenvolver DM2 e aumentou significativamente o número de indivíduos que alcançaram glicemia normal, quando comparado ao grupo placebo (KAWAMORE et al., 2009).

A hiperglicemia pós-prandial é um importante fator envolvido no desenvolvimento de DM2 e de complicações associadas, como alterações micro e macrovasculares (KIM et al., 2008). Os inibidores da enzima α -glicosidase são uma opção para o tratamento de DM2 (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2013) e atuam reduzindo a glicemia pós-prandial, por retardar a absorção de glicose, via inibição da enzima no aparelho digestivo (DIRETRIZES DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2009; KIM et al., 2008). A α -glicosidase se localiza nas vilosidades intestinais dos enterócitos, no intestino delgado, e catalisa a liberação de monossacarídeos da extremidade não redutora dos substratos oligossacarídeos e dissacarídeos (KUMAR et al., 2011; LEOVITZ, 1997).

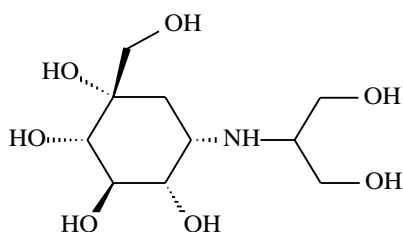
A α -glicosidase é largamente distribuída em microorganismos, plantas e tecidos animais. Diversos produtos naturais com atividade inibitória da α -glicosidase estão descritos na literatura (KUMAR et al., 2011; TUNDIS et al., 2010; KIM et al., 2008; TADERA et al., 2006). Alguns fármacos inibidores da enzima atualmente disponíveis são acarbose (**1**), voglibose (**2**) e miglitol (**3**) (LEOVITZ, 1997). Os inibidores da α -glicosidase também aumentam a secreção de incretina, além de alterarem a microbiota intestinal, o que pode estar associado aos benefícios demonstrados no tratamento de pacientes pré-diabéticos (MORIYA et al., 2009).

1 - Acarbose



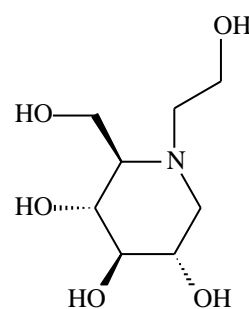
Fonte: Elaboração própria via *Chemdraw*

2 - Voglibose



Fonte: Elaboração própria via *Chemdraw*

3 - Miglitol



Fonte: Elaboração própria via *Chemdraw*

3.3 *Hancornia speciosa* Gomes: ocorrência, usos populares e atividades biológicas

Hancornia speciosa Gomes (Apocynaceae), espécie denominada popularmente de mangabeira, mangaba ou mangava, é uma árvore frutífera de clima tropical, nativa do Brasil e encontrada em várias regiões do país, desde os tabuleiros costeiros e baixadas litorâneas do Nordeste, onde é mais abundante, até os cerrados

das regiões centro-oeste, norte e sudeste. Apresenta frutos aromáticos, saborosos e nutritivos, com ampla aceitação de mercado, tanto para o consumo *in natura*, quanto para a indústria, sendo empregados na produção de compotas, sorvete e xaropes, e, através de fermentação, para a produção de vinagre e álcool, além de constituir uma importante fonte de vitamina C (RUFINO et al., 2009; ALMEIDA, 1993).

Diversas partes da planta têm usos etnomedicinais. A casca possui propriedades adstringentes e é utilizada para tratar afecções hepáticas. O látex é usado no tratamento da tuberculose, úlceras, herpes, dermatoses e verrugas, enquanto o chá das folhas é indicado para cólica menstrual e o decocto da raiz para tratar luxações, hipertensão e como hipoglicemiante (ALMEIDA, 1993; BRASIL, 1984; MOREIRA, 1984). Além do uso medicinal, o látex da espécie constitui matéria-prima para a fabricação de borracha (MALMONGE et al., 2009).

Em um levantamento de plantas utilizadas como anti-hiperlipidêmicas e anorexígenas em Mato Grosso, a mangaba foi incluída na lista das dez espécies mais citadas, sendo as entrecascas a parte da planta utilizada (SILVA et al., 2010). Em outro estudo etnobotânico, o chá de folhas de mangaba foi descrito para tratar doenças associadas ao aparelho genitourinário (MONTELES & PINHEIRO, 2007) e a espécie foi apontada como sendo utilizada para o tratamento de cólica menstrual, luxações e hipertensão (SOUZA & FELFILI, 2006). Em um levantamento etnobotânico de plantas medicinais do cerrado, decoctos das cascas foram relatados para o tratamento de diabetes e obesidade, e o unguento das cascas para tratar dermatoses (RODRIGUES & CARVALHO, 2001).

A revisão da literatura indica poucos trabalhos relativos às atividades biológicas de *H. speciosa*. O efeito gastroprotetor e ação anti-*Helicobacter pylori* do extrato etanólico das cascas foram demonstrados em ensaio *in vitro* por Moraes e colaboradores (2008). Também para um extrato obtido das cascas dos caules, a atividade antifúngica foi relatada por Costa e colaboradores (2008), usando ensaio de difusão em ágar. Neste trabalho, os constituintes responsáveis pela atividade não foram isolados, sendo essa atribuída aos taninos (COSTA et al., 2008). Cardoso e colaboradores (2008) avaliaram o potencial mutagênico de espécies com atividade

anti-ulcerogênica, dentre as quais, *H. speciosa*. Apenas seu extrato etanólico apresentou efeito mutagênico positivo frente às cepas TA98 e TA100 de *Salmonella typhimurium*. A atividade antioxidante foi relatada para os frutos em modelos *in vitro* (RUFINO et al., 2009). A atividade anti-inflamatória, avaliada em modelo de edema de pata induzido por carragenina, e a atividade hipoglicemiante, avaliada em ratos com diabetes induzido por aloxana, foram relatadas em comunicações em congresso (KLEIN et al., 1996 *apud* ENDRINGER, 2007; LIMA & MARTINS, 1996 *apud* ENDRINGER, 2007).

Para o látex, foi relatada atividade contra *Candida albicans* (SILVA et al., 2010), além de significativa atividade anti-inflamatória em camundongos, associada à inibição da produção de óxido nítrico (NO), prostaglandina E2 (PGE2) e citocinas (MARINHO et al., 2011). Em outro estudo, todavia, o látex da espécie não demonstrou atividade antimicrobiana frente à *Candida albicans* e algumas bactérias, tais como *Mycobacterium tuberculosis*, *Staphylococcus aureus*, *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus* spp., *Streptococcus pneumoniae*, *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* e *Cryptococcus neoformans* var. *gatti* (SANTOS et al., 2007). Mais recentemente, o látex da mangaba foi avaliado em ensaio de citotoxicidade e genotoxicidade e a ausência de toxicidade indicou ser um material biocompatível, com potencial para aplicações biomédicas. O trabalho também demonstrou o efeito do látex na neovascularização de tecidos (ALMEIDA et al., 2014).

Em um estudo mais recente, os extratos aquosos e hidroalcoólico das folhas, bem como o extrato hidroalcoólico das cascas foram avaliados quanto à atividade antimicrobiana frente às bactérias *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis* e *Staphylococcus aureus*. Os resultados demonstraram ausência de qualquer atividade antimicrobiana dos extratos, nas concentrações avaliadas (CARAZZA et al., 2011). Em outro estudo, foi descrita a atividade antiviral do extrato etanólico das folhas, contra os vírus HSV-1 (vírus do herpes humano tipo 1), VACV-WR (vírus da varíola) e EMCV (vírus causador de encefalomiocardites) (BRANDÃO et al., 2011).

Souza e colaboradores (2012a) avaliaram a atividade inibitória da enzima tirosinase, envolvida no processo de produção de melanina e associada a doenças

dermatológicas caracterizadas por hiperpigmentação da pele. O extrato hexânico das folhas inibiu a enzima (aproximadamente 79%), porém com elevado valor de CI_{50} (146,60 $\mu\text{g/mL}$) (SOUZA et al., 2012a). De Souza e colaboradores (2012) demonstraram a atividade inibitória da enzima α -glicosidase dos extratos etanólico e hexânico das folhas (ambos a 1.000 $\mu\text{g/mL}$) de *H. speciosa*, com porcentagem de inibição de $98,61 \pm 0,01$ e $98,15 \pm 0,00\%$, respectivamente. Nesse trabalho também foi descrita atividade inibitória da enzima α -amilase pelos mesmos extratos, avaliados na mesma concentração, com porcentagens de inibição de $57,32 \pm 0,01\%$ e $74,29 \pm 0,03\%$ para os extratos etanólico e hexânico, respectivamente.

Em um estudo de Geller e colaboradores (2015), investigou-se a capacidade cicatrizante do extrato etanólico de folhas da espécie, bem como de constituintes isolados do extrato. Foi empregado o ensaio *in vitro* de cicatrização e avaliou-se, ainda, a liberação da citocina pró-inflamatória Fator de Necrose Tumoral (TNF- α), utilizando-se células humanas monocíticas estimuladas (THP-1) por lipopolissacarídeos (LPS). O extrato etanólico de *H. speciosa* aumentou significativamente a migração e a proliferação de fibroblastos ($42.8\% \pm 5.4$; 25 $\mu\text{g/mL}$), assim como os constituintes isolados bornesitol ($80.8\% \pm 5.1$; 50 μM) e ácido quínico ($69.1\% \pm 6.2$, 50 μM). A liberação de TNF- α pelas células THP-1 foi significativamente reduzida pelo extrato etanólico da espécie ($62.9\% \pm 8.2$; 10 $\mu\text{g/mL}$), e pelas substâncias isoladas bornesitol ($48.9\% \pm 0.9$; 50 μM), ácido quínico ($90.2\% \pm 3.4$; 10 μM) e rutina ($82.4\% \pm 5.6$; 10 μM).

Nosso grupo de pesquisa tem trabalhado ativamente com *H. speciosa* nos últimos anos, com especial interesse na avaliação de sua potencial atividade anti-hipertensiva, utilizando diferentes modelos biológicos. A atividade inibitória da ECA *in vitro* foi inicialmente relatada para o extrato etanólico das folhas por Serra e colaboradores (2005). Posteriormente, foi relatada atividade vasodilatadora do extrato etanólico das folhas em preparações *ex vivo* de anéis de aorta de rato, efeito caracterizado como sendo dependente de endotélio, via NO, bem como efeito vasodilatador em anéis de artéria mesentérica superior de ratos, efeito este também dependente do endotélio, via NO, da ativação de canais de potássio e da liberação de

fator hiperpolarizante derivado do endotélio (FERREIRA et al., 2007a; FERREIRA et al., 2007b).

Em outro trabalho do nosso grupo, foi avaliada a atividade hipotensora de uma fração padronizada das folhas, enriquecida em flavonoides e ciclitóis, bem como seu mecanismo de ação (SILVA et al, 2011). Os resultados demonstraram uma redução significativa da pressão arterial sistólica de ratos normotensos após a administração intraperitoneal e oral da fração nas doses de 1 a 100 mg/Kg. Os resultados obtidos indicaram que o mecanismo da ação hipotensora envolve a inibição da ECA, com consequente redução dos níveis de angiotensina II, e aumento dos níveis séricos de NO, além de efeito vasodilatador direto pela ativação de proteína quinase A (PKA) e de canais de potássio (SILVA, 2010; SILVA et al., 2011).

Outros estudos foram conduzidos com esta fração padronizada em ratos hipertensos para avaliar o efeito do tratamento subcrônico, bem como investigar o mecanismo de ação envolvido na redução da pressão arterial (SILVA et al., 2012a; SILVA et al., 2012b). A fração apresentou efeito anti-hipertensivo pronunciado quando administrada por via oral na dose de 0,1 mg/kg, além de significativo efeito protetor do sistema cardiovascular (SILVA et al., 2012b). A redução da pressão arterial foi associada à vasodilatação de artérias de resistência e ao aumento da concentração de NO (SILVA, 2014; SILVA et al., 2012a)

O estudo fitoquímico do extrato etanólico das folhas, biomonitorado pelo ensaio *in vitro* de inibição da ECA, realizado por Endringer (2007), resultou na identificação de L-(+)-bornesitol e rutina como principais constituintes bioativos, com valores de CI_{50} de $8,0 \pm 1,8 \mu\text{g/mL}$ e $277,1 \pm 47,9 \mu\text{g/mL}$, respectivamente. Também foi avaliado, pelo nosso grupo, o efeito inibitório do fator de transcrição nuclear kapa B (NF- κ B) do extrato bruto, da fração rica em ciclitóis e flavonoides, das frações em EtOAc, EtOAc/MeOH (1:1), MeOH e MeOH/H₂O (1:1) provenientes do fracionamento do extrato bruto, bem como dos constituintes isolados (ENDRINGER, et al., 2010; ENDRINGER, et al., 2009). Alguns fármacos anti-hipertensivos em uso clínico, como captopril e telmisartan, apresentaram significativa inibição da ativação do NF- κ B (NAKANO et al., 2009; AL-MAGHREBI et al., 2008). Essa inibição constitui um efeito

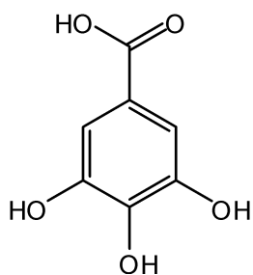
adicional no tratamento de DCV, visto que o NF- κ B é responsável pela sinalização de mediadores inflamatórios com efeitos deletérios sobre os vasos sanguíneos. A fração apresentou significativa inibição *in vitro* da ativação de NF- κ B, com CI_{50} de $1,1 \pm 0,0$ μ g/mL. Os constituintes da fração L-(+)-bornesitol ($CI_{50} = 5,3 \pm 0,7$ μ g/mL), rutina ($CI_{50} = 16,4 \pm 3,8$ μ g/mL) e ácido quínico (CI_{50} de $16,3 \pm 2,4$ μ g/mL) também foram ativos (ENDRINGER et al., 2009), porém com valores de CI_{50} superiores aos da fração, sugerindo a existência de sinergismo.

Em trabalho anterior do nosso grupo de pesquisa foi relatado o desenvolvimento e a validação de um método analítico por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a detector de arranjo de diodos (CLAE-DAD), após derivatização prévia da amostra, para quantificação do bornesitol em extratos e frações da espécie (PEREIRA, et al., 2012a).

3.4 A química da espécie

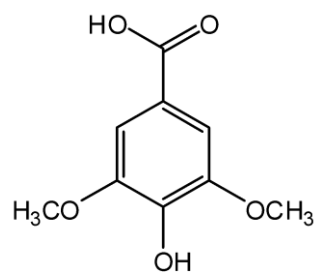
H. speciosa já foi objeto de alguns estudos fitoquímicos. Do infuso das cascas foram isolados os ácidos gálico (**4**), 4-hidroxi-3,5-dimetoxibenzóico (ácido siríngico) (**5**), 5-O-cafeoilquínico (**6**), 3-O-cafeoilquínico (**7**), além de *cis*-clorogenato de metila (**8**), *trans*-clorogenato de metila (**9**), 2,7-diidroxixantona (**10**) e 2,7-dimetoxixantona (**11**) (RODRIGUES et al., 2006). A presença de proantocianidinas do tipo B foi detectada em análises por CLAE acoplada a detector por espectrometria de massas (CLAE-EM), incluindo derivados C-glicosilados (RODRIGUES et al., 2007).

4 - Ácido gálico

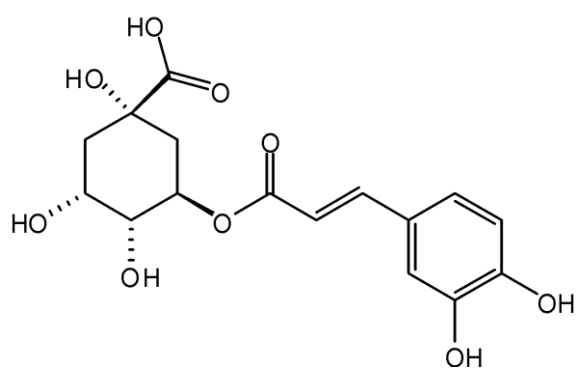


Fonte: Elaboração própria via *Chemdraw*

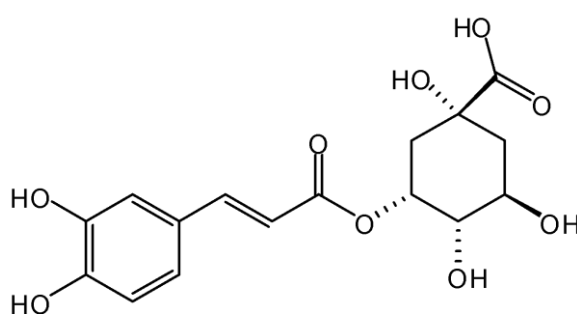
5 - Hidroxi-3,5-dimetoxibenzóico (ácido siríngico)



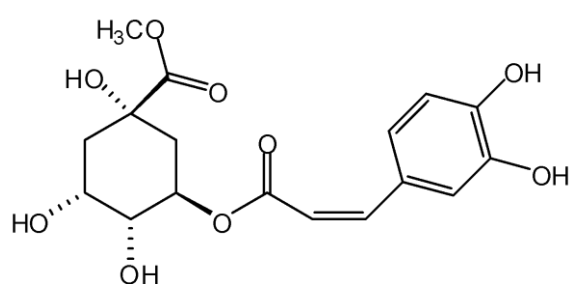
Fonte: Elaboração própria via *Chemdraw*

6 - Ácido 5-O-cafeoilquínico

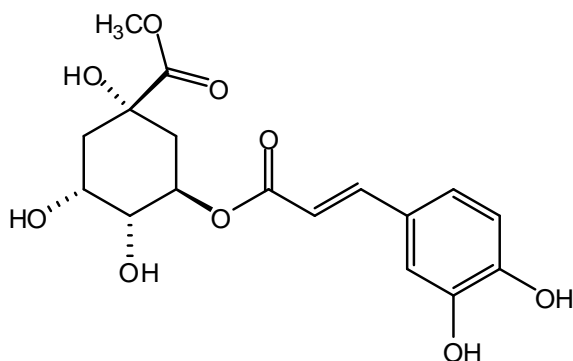
Fonte: Elaboração própria via *Chemdraw*

7 - Ácido 3-O-cafeoilquínico

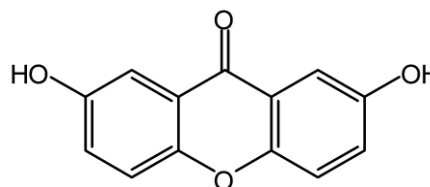
Fonte: Elaboração própria via *Chemdraw*

8 - *Cis*-clorogenato de metila

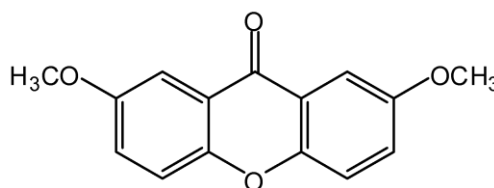
Fonte: Elaboração própria via *Chemdraw*

9 - *Trans*-clorogenato de metilaFonte: Elaboração própria via *Chemdraw*

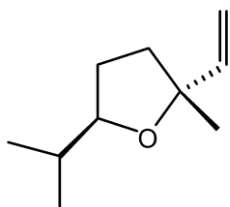
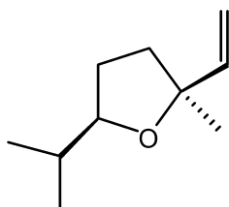
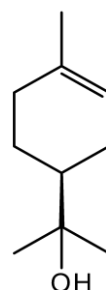
10 - 2,7-Diidroxixantona

Fonte: Elaboração própria via *Chemdraw*

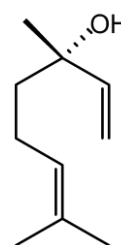
11 - 2,7-Dimetoxixantona

Fonte: Elaboração própria via *Chemdraw*

Os constituintes voláteis das folhas foram analisados por cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massas (CG-EM), possibilitando a identificação do óxido de *trans*-linalol (**12**), óxido de *cis*-linalol (**13**), α -terpineol (**14**), linalol (**15**), geraniol (**16**), metil-antranilato (**17**), eugenol (**18**) e (*E*)-isoeugenol (**19**) (SANTOS et al., 2006). Recentemente, o óleo essencial de *H. speciosa* var. *pubescens* foi obtido por hidrodestilação e também analisado por CG-MS, tendo sido identificados apofarnesol (**20**), naftaleno (**21**), α -bisaboleno (**22**), spatulenol (**23**) e ácido malônico (**24**) (PAULA et al., 2015). Em outro estudo, os frutos em três diferentes estágios de maturação foram avaliados empregando-se CG-EM e CG-DIC. Um total de 79 compostos voláteis foi identificado, entre aldeídos, ésteres, alcoóis, cetonas e monoterpenos (SAMPAIO & NOGUEIRA, 2006).

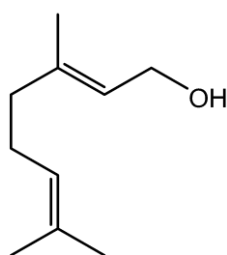
12 - Óxido de *trans*-linalol13 - Óxido de *cis*-linalol14 - α -terpineol

15 - Linalol

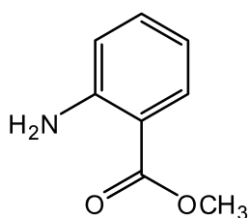


Fonte: Elaboração própria via *Chemdraw*

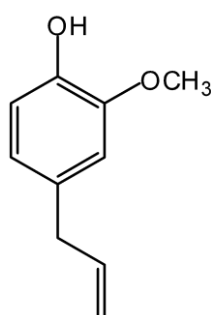
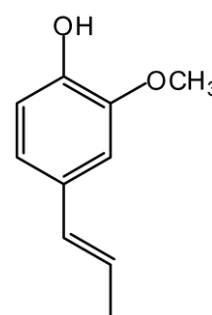
16 - Geraniol



17 - Metil-antranilato

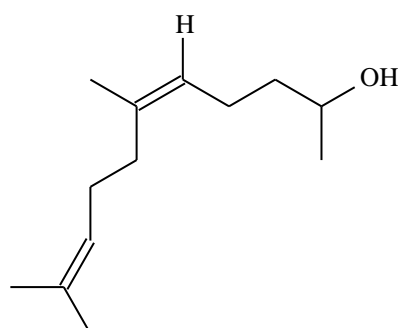


18 - Eugenol

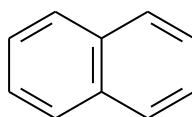
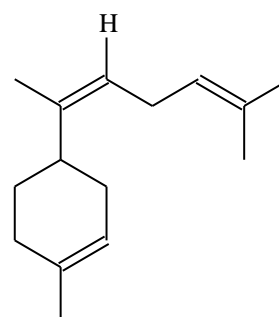
19 - (*E*)-isoeugenol

Fonte: Elaboração própria via *Chemdraw*

20- Apofarnesol

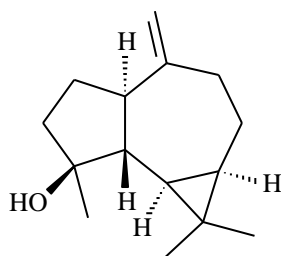


21 - Naftaleno

22 - α -bisaboleno

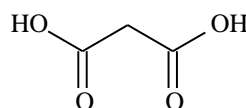
Fonte: Elaboração própria via *Chemdraw*

23 - Spatulenol



(23)

24 - Ácido malônico

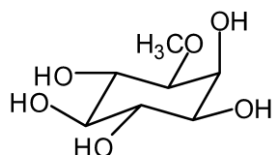


(24)

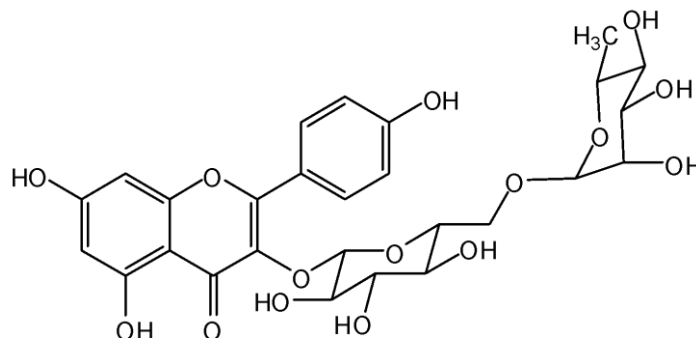
Fonte: Elaboração própria via Chemdraw

No trabalho de Endringer (2007), o fracionamento cromatográfico do extrato etanólico das folhas resultou no isolamento de L-(+)-bornesitol (**25**), canferol-3-O-rutinosídeo (**26**), ácido 5-O-cafeoil-quinico (**6**), ácidos *cis* (**27**) e *trans* 4-hidroxicinâmico (**28**), α -amirina (**29**), lupeol (**30**) e seu 3 β -O-éster de ácido graxo (**31**), além de ácido quinico (**32**) e rutina (**33**).

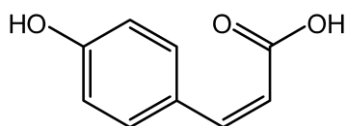
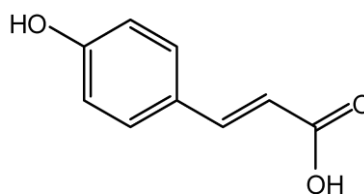
25 - L-(+)-bornesitol



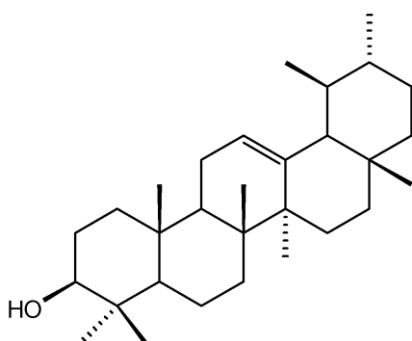
26 - Canferol-3-O-rutinosídeo



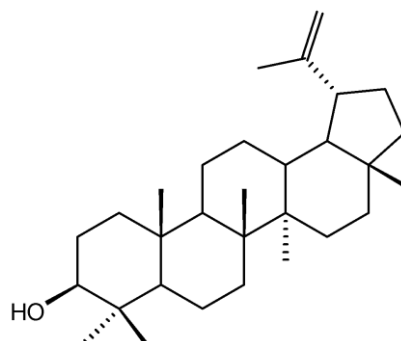
Fonte: Elaboração própria via Chemdraw

27 - Ácido *cis* 4-hidroxi-cinâmico28 - Ácido *trans* 4-hidroxi-cinâmico

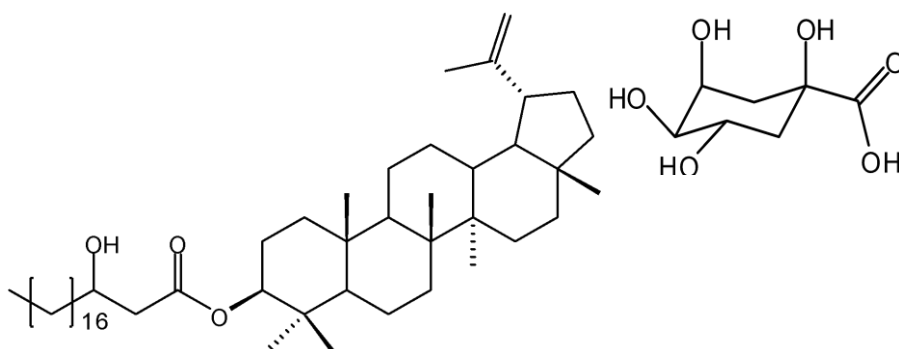
Fonte: Elaboração própria via *Chemdraw*

29 - α -amirina

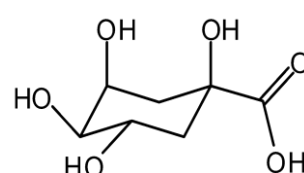
30 - Lupeol



Fonte: Elaboração própria via *Chemdraw*

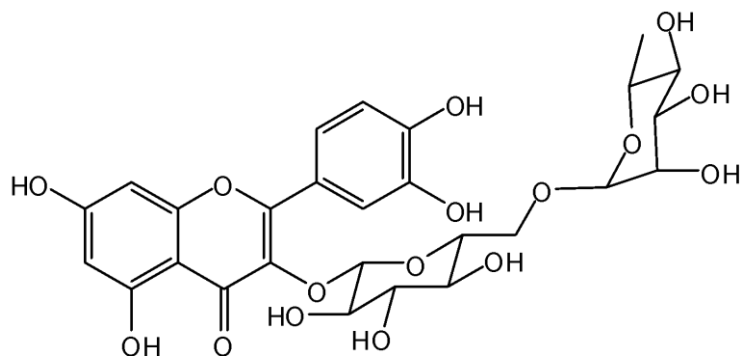
31 - 3 β -O-éster de ácido graxo do lupeol

32 - Ácido quínico



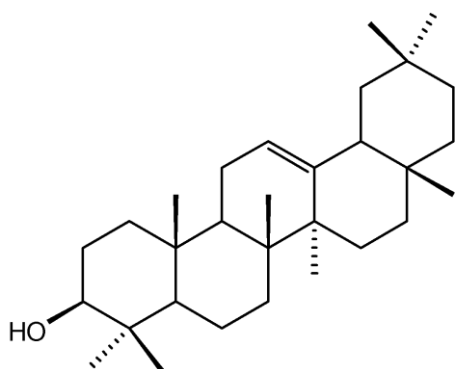
Fonte: Elaboração própria via *Chemdraw*

33 - Rutina



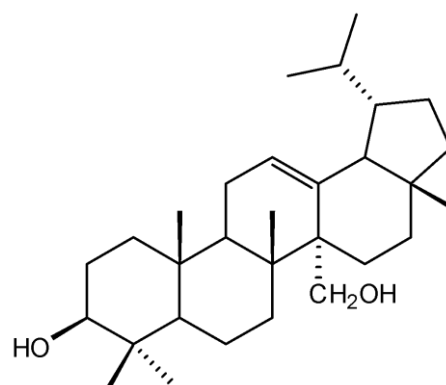
Fonte: Elaboração própria via *Chemdraw*

O fracionamento do extrato hexânico das folhas realizado por Barros (2008) resultou na obtenção de uma mistura de hidrocarbonetos, mistura de alcoóis de cadeia longa, mistura dos triterpenos α -amirina (29) e β -amirina (34), outra mistura dos triterpenos citados e lupeol (30), e uma mistura de obtusalina (35) e eritrodíol (36). O estudo do extrato hexânico forneceu, ainda, β -sitosterol (37) e uma mistura de ésteres 3β -O-acilados de α e β -amirina (38 e 39, respectivamente) e do lupeol (40). O estudo do extrato etanólico pelo mesmo grupo resultou na obtenção de uma mistura de rutina (33) e ácido clorogênico (7).

34 - β -amirina

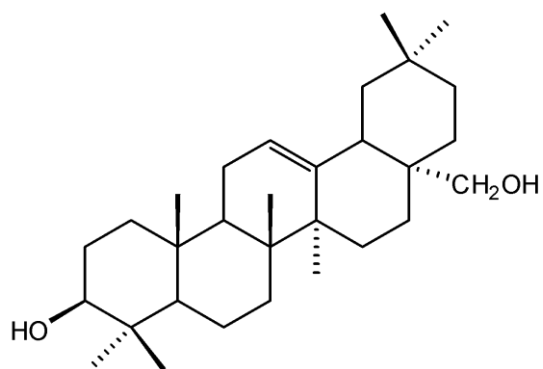
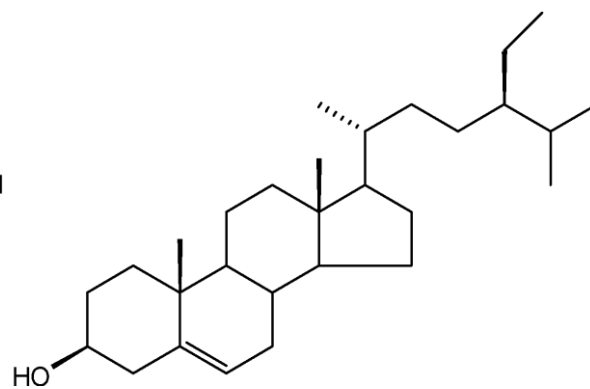
Fonte: Elaboração própria via *Chemdraw*

35 - Obtusalina

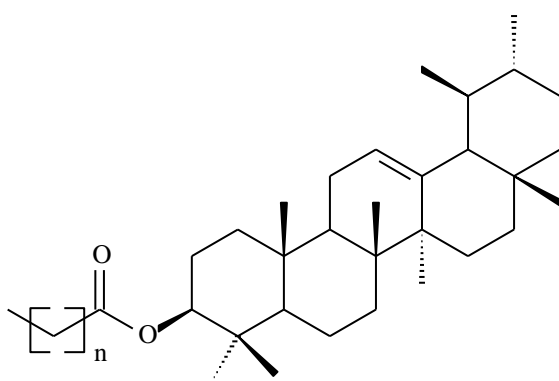
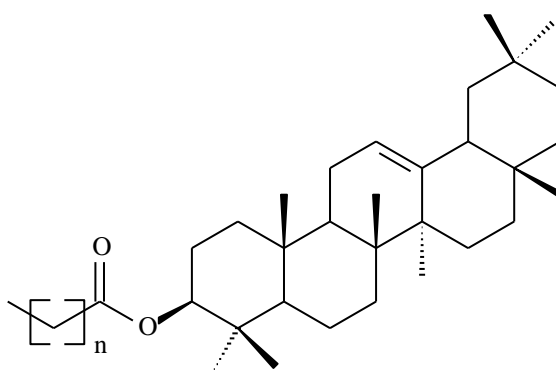


Fonte: Elaboração própria via *Chemdraw*

36 - Eritrodiol

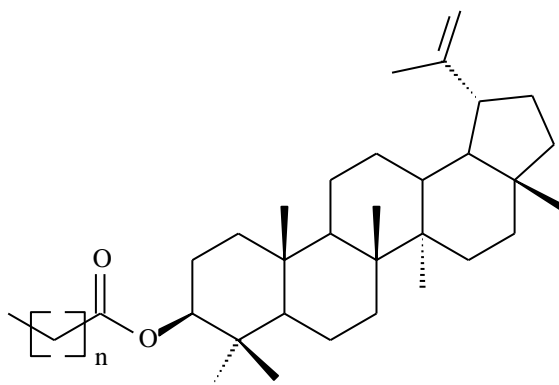
37 - β -sitosterol

Fonte: Elaboração própria via *Chemdraw*

38 - Éster 3 β -O-acilado de α -amirina39 - Éster 3 β -O-acilado de β -amirina

Fonte: Elaboração própria via *Chemdraw*

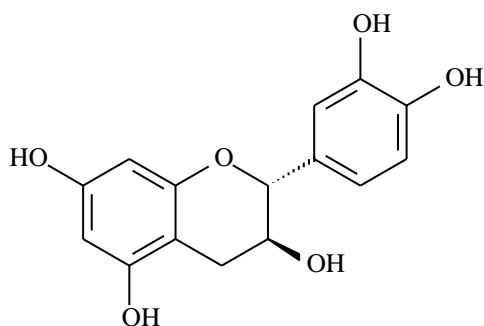
40 - Éster 3 β -O-acilado do lupeol



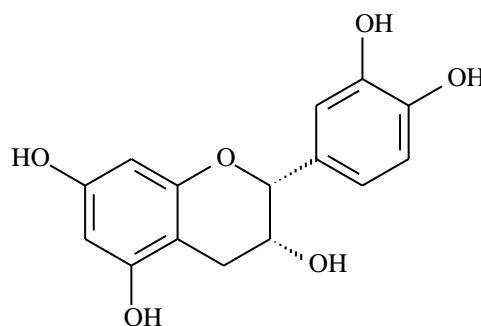
Fonte: Elaboração própria via *Chemdraw*

Em trabalho de Rodrigues (2007), a análise de uma infusão das cascas por CLAE-DAD levou à identificação do ácido clorogênico (7), catequina (41), epicatequina (42) e galato de epigalocatequina (43). Neste mesmo trabalho, utilizou-se espectrometria de massas acoplada a um *ion trap* com interface de ionização por eletrospray e inserção direta da amostra (FIA-ESI-IT-MS/MS) para identificar duas séries de proantocianidinas na espécie, com grau de polimerização de 1 a 6, dos tipos B e tipo B C-glicosiladas (RODRIGUES, 2007). Em trabalho recente de nosso grupo, um triglicosídeo da quercetina foi detectado por CLAE-EM em extratos de *H. speciosa* e denominado FlavHS, sendo composto por dois resíduos de ramnose e um resíduo de glicose (PEREIRA, 2012).

41 - Catequina

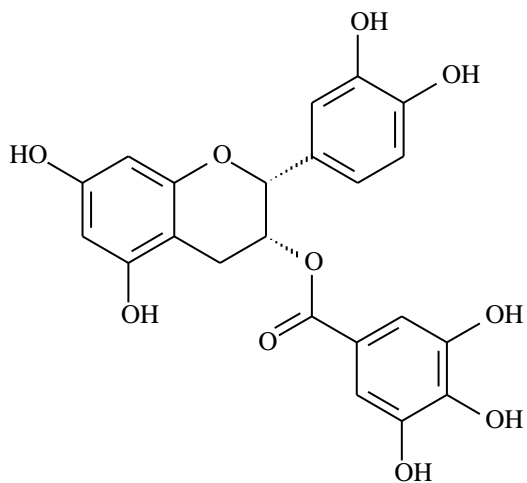


42 - Epicatequina



Fonte: Elaboração própria via *Chemdraw*

43 - Galato de epígalocatequina



Fonte: Elaboração própria via *Chemdraw*

4 PARTE EXPERIMENTAL

4.1 Equipamentos

- Amplificador, modelo TBM-4, *World Precision Instruments, Inc., USA*.
- Aparelho de ponto de fusão MQAPF-30, Microquímica.
- Balança analítica Mettler, modelo AB 204.
- Balança semi-analítica Núcleo, modelo PR 1000.
- Banho de ultrassom Thornton, modelo T 50.
- Banho de ultrassom Unique, modelo USC 1400.
- Banho seco com agitação, Mixing Block, modelo MB-101, Bioer.
- Bombas de vácuo Fabbe (modelo 0320) e Edwards (modelo C 560786).
- Centrífuga Hermle Z323K.
- Chapas para aquecimento Fisatom, modelo 752 A e Corning, modelo V-092.
- Coluna para UPLC Waters BEHC18 (50 x 2,1 mm d.i., partículas de 1,7 μm).
- Destilador de água Fabbe, modelo A 95.
- Espectrômetro de ressonância magnética nuclear *Bruker Avance DRX – 400 MHz* (Departamento de Química, ICEX, UFMG).
- Espectrofotômetro UV-Vis, HITACHI, modelo U-2900.
- Espectrofotômetro UV-Vis, *Perkin Elmer*, modelo Lambda 20.
- Evaporador rotatório Buchi, modelo B-480.
- Glicosímetro, ACCU-CHEK Active, Roche.
- Lâmpada de ultravioleta (UV) para cromatografia *Spectroline*, modelo 977 C (λ de 254 e 365 nm).
- Leitor de microplaca, *Thermoplate Reader*.

- Microcentrífuga Cientec, modelo CT-14000.
- Micropipetas HTL, vol. ajustável de 10 - 100 µL e 100 - 1000 µL.
- Moinho de facas Marconi, modelo MA680.
- Placa conversora analógico-digital, AD16JR, *World Precision Instruments*, Inc.
- Polarímetro ADP220 *Bellingham*, *Stanley* Ltda.
- Purificador de água Milli-Q Plus.
- Sistema de cromatografia líquida de alta eficiência *Waters*® 2695, constituído por injetor automático, detector de arranjos de diodos PDA 2996, bomba quaternária L-6200^a com degaseificador de linhas, e sistema computadorizado operado pelo programa *Empower*, *Waters*®.
- Sistema de UPLC-MS/MS ACQUITY Ultra Performance LC™, *Waters*®, composto por detector de arranjos de diodo (DAD) modelo PDA 2996 e detector de espectrometria de massas ACQUITY TQ (Water), equipado com fonte de ionização por spray de elétrons Z-spray (ESI) e software Mass Lynx™ (versão 4.1, *Waters*®).
- Soprador térmico serigráfico Steinel, modelo HL-500.
- Tamis Tyler 20 mesh.
- Transdutores isométricos, *World Precision Instruments*, Inc., USA.
- Vortex Mixer, Vixar.

4.2 Solventes e reagentes

- Acarbose, Sigma-Aldrich.
- Ácido fosfomolibdico, Vetec.
- Ácidos grau P.A.: ácido fórmico, ácido sulfúrico e ácido clorídrico, Merck.
- Álcool etílico comercial, Minálcool e Emfal.

- Amido, amido de milho, Maisena.
- Carbogênio (95% de O₂ e 5% de CO₂), White Martins, Brasil.
- Carbonato de sódio, Synth.
- Cloreto de benzoíla, Proquimios.
- Cloreto de *p*-toluenossulfonila (ReagentPlus), Sigma-Aldrich.
- Cromatofolhas de alumínio recobertas por sílica gel 60, 20 x 20 cm, Merck.
- Dimetilsulfóxido, Sigma-Aldrich.
- Fitas reativas ACCU-CHEK Active, Roche
- Fosfato de potássio monobásico anidro, Synth.
- Glibenclamida, Sigma-Aldrich.
- Glicose, Synth.
- Glutaciona reduzida, Sigma-Aldrich.
- Piridina anidra, Merck e Sigma-Aldrich.
- *p*-Nitrofenil- α -D-glicopiranosídeo, Sigma-Aldrich.
- Ração hiperlipidêmica, Rhostrer.
- Ração para roedores, Nuvilab.
- Sílica gel 60 G Merck.
- Sílica gel 60, 230-400 mesh, Merck.
- Sílica gel 60, 70-230 mesh, Merck.
- Solventes grau CLAE acetonitrila e metanol, Tedia.
- Solventes grau padrão analítico (P.A.): hexano, diclorometano, clorofórmio, acetato de etila, éter etílico, acetona, metanol e álcool etílico, Quimex; álcool etílico 95%, Fmaia.
- Tween, Sigma-Aldrich.

- α -Glicosidase, Sigma-Aldrich.

4.3 Substâncias de referência

Duas amostras de rutina foram utilizadas no estudo, ambas obtidas da Sigma-Aldrich: rutina triidratada (*Primary Reference Standard*), rutina para CLAE com teor mínimo de 95%. Pentaeritritol (teor mínimo de 98%) foi obtido da Merck e ácido clorogênico, quercitrina hidratada e ácido quínico (teor mínimo de 98%) da Sigma-Aldrich. Fenilefrina e acetilcolina foram obtidas da Sigma-Aldrich.

4.4 Vidrarias e materiais diversos

- Balões volumétricos de 1, 10, 25 e 100 mL, Satelit, Normax e Blaubrand.
- Borrifador de vidro.
- Coluna analítica para CLAE C-18 ODS Lichrospher 100 (250 × 4,0 mm d.i.), Merck, partículas de 5 μ m, com pré-coluna LiChrospher 100 RP-18 (4 × 4 mm d.i.), partículas de 5 μ m.
- Colunas cromatográficas de vidro de dimensões variadas.
- Cromatoplasmas de vidro de 5 × 10 cm e 10 × 10 cm.
- Cubas cromatográficas de vidro Pirex.
- Frascos de penicilina com tampa de borracha.
- Microtubo plástico de 2 mL e 1,5 mL do tipo *safe-lock*, Axygen.
- Papel indicador de pH Universal, pH 0-14, Merck.
- Percoladores de vidro e de aço inoxidável com volumes variados.
- Placa de 96 poços para cultivo celular, Corning
- Ponteiras plásticas, Corning.
- Tubos plásticos do tipo Falcon com volumes de 15 e 50 mL, TPP.

- Vials de vidro com tampa e septos de teflon para uso no injetor automático de sistema de CLAE e UPLC-MS.

4.5 Reveladores para CCD

Reagente anisaldeído - ácido sulfúrico (WAGNER & BLADT, 1996): Misturaram-se 0,5 mL de anisaldeído, 10,0 mL de ácido acético glacial, 85,0 mL de metanol e 5,0 mL de ácido sulfúrico concentrado, nesta ordem.

4.6 Material vegetal

O material vegetal (folhas) de *H. speciosa* foi fornecido pela Empresa Estadual de Pesquisa Agropecuária da Paraíba S.A. (EMEPA), em João Pessoa. Foi colhido em março de 2009 e identificado pela Dra. Maria das Dores Magalhães Veloso. Uma amostra da espécie (número 3816) foi depositada no herbário Montes Claros (UNIMONTE, Montes Claros, Brasil). O material vegetal (identificado pelo código E-SPA_c) foi colhido em 31 de março de 2009 (coordenadas geográficas 6°33' 13" S e 34° 48' 31" O, altitude de 30 m). As folhas frescas foram selecionadas, secas em estufa ventilada a 45 °C e, então, pulverizadas em moinho de facas. A massa da droga vegetal pulverizada seca foi de 303,87 g.

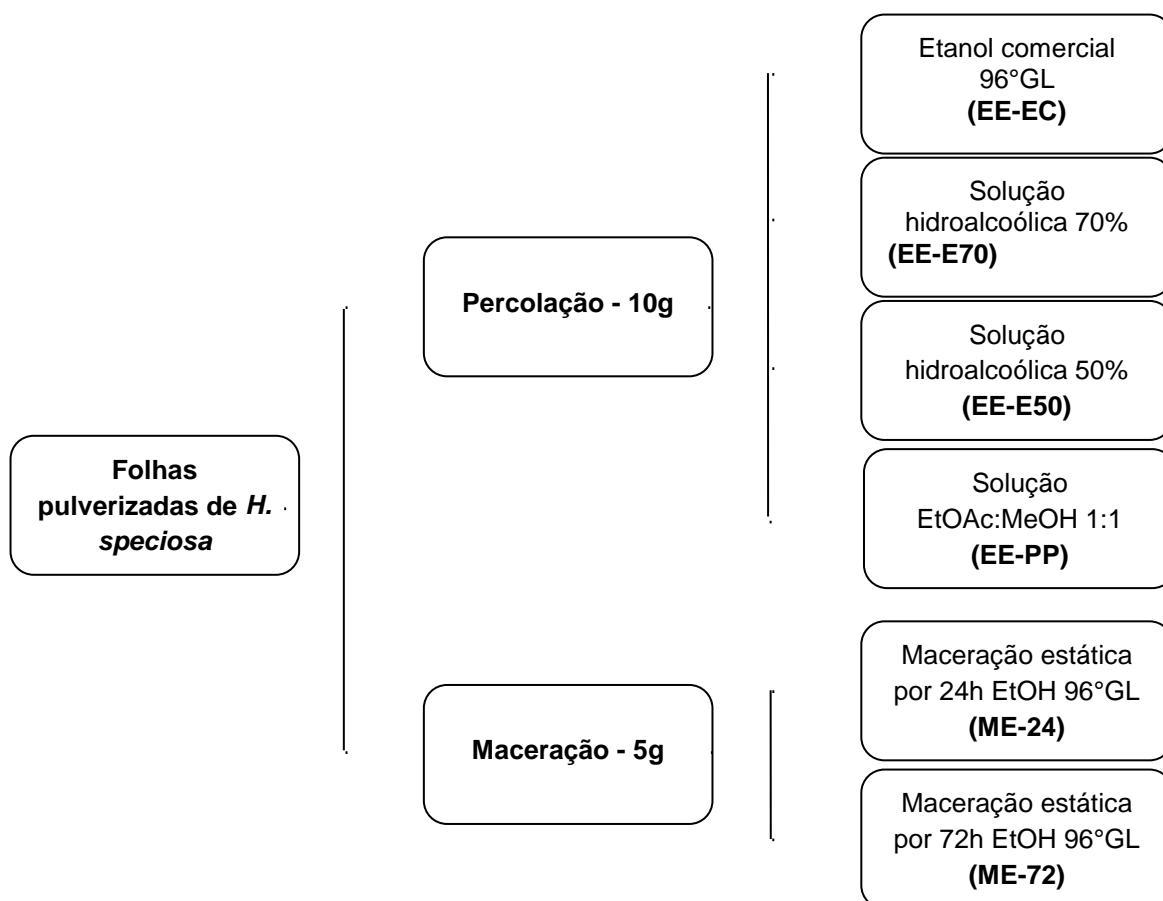
4.7 Ensaios extrativos

Foram realizados ensaios extrativos utilizando-se diferentes solventes e métodos de extração, em triplicata para cada condição, como esquematizado no fluxograma da Figura 1. O material vegetal E-SPA_c, previamente seco e pulverizado (item 4.6), foi submetido à percolação com diferentes solventes extratores, incluindo etanol comercial (código: EE-EC), soluções hidroetanólicas 70% (código: EE-E70) e 50% (código EE-E50), bem como metanol/acetato de etila 1:1 (código: EE-PP). Também foram obtidos extratos por maceração estática da droga vegetal por 24 (código: ME-24) e 72 horas (código: ME-72), empregando-se etanol comercial (96°GL) como solvente extrator. O solvente foi eliminado em evaporador rotatório, sob pressão reduzida, à temperatura máxima de 50°C, a cada ensaio realizado. Os resíduos

obtidos foram mantidos em dessecador, sob vácuo, por, no mínimo, 24 horas, para completa eliminação do solvente residual.

Os extratos obtidos foram avaliados com relação ao teor de extrativos, perfis cromatográficos por CLAE-DAD (item 4.7.1), bem como a partir da quantificação dos teores dos marcadores químicos (item 4.7.2).

Figura 1 – Extratos obtidos a partir dos ensaios extrativos com de folhas de *H. speciosa*



Fonte: Elaboração própria.

4.7.1 Obtenção do perfil cromatográfico dos extratos por CLAE-DAD

A impressão digital dos extratos obtidos nos ensaios extrativos (item 4.7) foi avaliada a partir dos perfis cromatográficos obtidos por CLAE-DAD, utilizando-se condição analítica otimizada no trabalho de Pereira (2012). Para tanto, foi empregado um sistema de CLAE Waters 2695, com coluna LiChrospher 100 RP-18 (250 x 4 mm d.i., 5 µm) e pré-coluna LiChrospher 100 RP-18 (4 x 4 mm d.i., 5 µm). A temperatura da coluna foi de 40 °C e a fase móvel utilizada compreendeu gradiente de eluição de água Milli-Q acidificada com 0,1% de ácido fosfórico (A) e acetonitrila grau CLAE acidificada com 0,1% de ácido fosfórico (B), como apresentado na Tabela 1. Vale ressaltar que o software utilizado no presente trabalho para o controle do sistema de CLAE e processamento dos cromatogramas (Empower 2) possibilita o emprego de gradientes côncavos e convexos representados na Figura 2. O método de análise desenvolvido empregou o gradiente convexo tipo 4. O fluxo empregado foi de 0,4 mL/min e a detecção foi realizada no comprimento de onda de 350 nm. Para obtenção das soluções amostrais, 5 mg de cada extrato foram pesados para tubo plástico *safe-lock* e adicionado 1 mL de MeOH grau CLAE. A suspensão foi mantida em banho de ultrassom por 15 min para auxiliar na solubilização da amostra. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas a 8.400 g, e 10 µL dos sobrenadantes foram injetados, automaticamente, no sistema de cromatografia descrito.

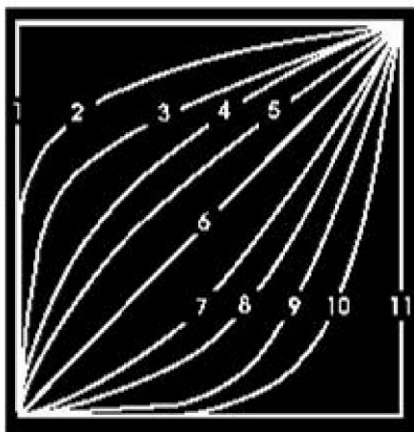
Tabela 1 - Programa de eluição estabelecido para a quantificação de rutina e ácido clorogênico em extratos e frações de folhas de *H. speciosa*

Tempo (min)	%A*	%B*	Modo de eluição
0	85	15	Isocrático
20	85	15	gradiente convexo (tipo 4)
40	80	20	Isocrático
45	80	20	gradiente convexo (tipo 4)
48	5	95	Isocrático
57	5	95	gradiente convexo (tipo 4)
60	85	15	Isocrático

***Solvente A:** água acidificada com 0,1% de ácido fosfórico;

Solvente B: acetonitrila grau CLAE acidificada com 0,1% de ácido fosfórico.

Figura 2 - Perfis das curvas de gradiente disponíveis no programa Empower 2 (Waters). 2 a 5: gradientes convexos, 6: linear, 7 a 10: gradientes côncavos



Fonte: Elaboração própria.

4.7.2 Quantificação de marcadores químicos

Os marcadores químicos, definidos em trabalho anterior de nosso grupo de pesquisa, foram quantificados empregando métodos desenvolvidos e validados na ocasião (PEREIRA, 2012; PEREIRA et al., 2012a). Foram determinados os teores de rutina, ácido clorogênico, bornesitol, FlavHS e flavonoides totais para cada extrato obtido.

4.7.2.1 Quantificação de flavonoides totais

Para a quantificação de flavonoides totais, expressos como rutina, foi empregado um método por espectrofotometria no UV-Vis, após reação com cloreto de alumínio, segundo descrito por Rusak e colaboradores (1993) e modificado por Garcia e colaboradores (2010). O método foi validado por Pereira (2012) de acordo com os normativos da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e Associação de Químicos Analíticos Oficiais (AOAC) (AOAC, 2002; BRASIL, 2003).

Para a extração dos flavonoides, foram pesados exatamente cerca de 30 a 50 mg do extrato, transferidos quantitativamente para um balão de fundo redondo de 125 mL. Adicionaram-se 12 mL de metanol e aqueceu-se a mistura em manta elétrica, sob refluxo, durante 30 min. O extrato obtido foi resfriado, deixado em repouso para que decantasse e filtrado através de algodão, recolhendo-se o filtrado, quantitativamente, em balão volumétrico de 25 mL. Recolheu-se, no balão anterior, o algodão e acrescentaram-se 10 mL de MeOH. A mistura foi extraída nas mesmas condições descritas anteriormente e filtrada, ao final, através de algodão, recolhendo-se o filtrado, quantitativamente, no mesmo balão. Lavou-se o algodão com 3 mL de metanol e completou-se o volume com este solvente.

Para a eliminação de carotenóides e clorofilas, 15 mL da solução metanólica obtida na etapa de extração foram misturados, em um béquer, a 6 mL de clorofórmio e 9 mL de água. A mistura foi homogeneizada, transferida para tubo tipo Falcon e centrifugada a 3.074 g, por 10 min, para completa separação das fases. A camada hidrometanólica (superior) foi retirada com ajuda de uma pipeta de Pasteur e transferida para um balão volumétrico de 25 mL, completando-se o volume com metanol.

A reação de coloração consistiu da transferência de 5,0 mL da solução hidrometanólica (obtida anteriormente) para um balão volumétrico de 25 mL; acrescentaram-se 0,6 mL de ácido acético glacial, 10 mL de solução de piridina/água (20:80) e 2,5 mL de solução metanólica de cloreto de alumínio hexahidratado a 12% e completou-se o volume com água. Agitou-se e deixou-se em repouso por 20 min. Centrifugou-se a 3.074 g por 10 minutos. Mediu-se a absorvância do sobrenadante no comprimento de onda de 420 nm, em cubetas de quartzo, frente à solução de compensação. Esta foi preparada para anular a interferência da coloração natural do extrato ou fração. Para cada amostra elaborou-se uma solução de compensação misturando-se 5 mL da solução hidrometanólica, 0,6 mL de ácido acético glacial, 10 mL de solução de piridina/água (20:80) e diluindo para 25 mL com água. Agitou-se e deixou-se em repouso por 20 min. Centrifugou-se a 3.074 g por 10 min e utilizou-se o sobrenadante.

Os teores obtidos para cada extrato ($n = 3$) foram submetidos à análise de variância e comparados pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Foi construída uma curva analítica com cinco concentrações diferentes: 0,002; 0,005; 0,010; 0,020 e 0,030 mg/mL de rutina, procedendo-se com a reação de coloração para cada solução de rutina, como descrito acima. Mediu-se a absorvância de cada solução no comprimento de onda de 420 nm, em cubetas de quartzo, frente ao branco. Este foi preparado em balão volumétrico de 25 mL adicionando-se 0,6 mL de ácido acético glacial, 10,0 mL de solução de piridina/água (20:80), 2,5 mL de solução metanólica de cloreto de alumínio hexaidratado a 12% e completando-se o volume com água. A partir das concentrações de rutina das soluções e das respectivas leituras de absorvância foram construídas três curvas analíticas em dias diferentes. Análise de covariância foi empregada para estimar se as curvas eram estatisticamente equivalentes. A equação da reta foi determinada pelo método dos mínimos quadrados e as análises estatísticas foram realizadas pelo programa GraphPad Prism, versão 5 (2007) da GraphPad Software.

4.7.2.2 *Quantificação de rutina, ácido clorogênico e FlavHS*

A quantificação de rutina, ácido clorogênico e FlavHS foi realizada empregando-se um método por CLAE-DAD, desenvolvido e validado por Pereira (2012) de acordo com as normas da Conferência Internacional de Harmonização (ICH), ANVISA e AOAC (AOAC, 2002; BRASIL, 2003; ICH, 1996). O sistema de cromatografia empregado, bem como as condições de análise e preparo de amostra estão descritos no item 4.7.1 e Tabela 1. A detecção foi realizada no comprimento de onda de 350 nm.

Para obtenção das soluções de análise, pesaram-se, exatamente, cerca de 5,0 mg das amostras, às quais se adicionou 1,0 mL de solução hidrometanólica a 50%. A solubilização foi conduzida em banho de ultrassom por 15 min, seguida de agitação em vórtex. Na sequência, o extrato foi centrifugado a 8.400 g, por 10 min. Alíquotas de 20 μ L do sobrenadante foram injetadas automaticamente no sistema de CLAE descrito no item 4.7.1. Os teores foram calculados utilizando-se o fator de resposta

(SNYDER et al., 1997), sendo o teor de FlavHS expresso como rutina. Os teores obtidos ($n = 3$) foram submetidos à análise de variância e comparados pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

A linearidade foi determinada previamente no trabalho de Pereira (2012), a partir da construção de duas curvas analíticas, em dias consecutivos, utilizando-se cinco concentrações distintas de rutina e ácido clorogênico (0,2; 1,0; 2,0; 3,0 e 4,0 μg). Cada ponto das curvas analíticas foi obtido pela injeção, em triplicata, de massas diferentes das substâncias de referência. As curvas analíticas foram construídas relacionando-se as áreas integradas dos picos de interesse e as respectivas massas injetadas, para cada substância de referência. Os dados obtidos foram avaliados através de regressão linear pelo método dos mínimos quadrados e os coeficientes de determinação (r^2) correspondentes foram calculados. A análise estatística das curvas foi realizada por análise de variância ($p < 0,05$), pelo programa GraphPad Prism, versão 5 (2007) da GraphPad Software.

4.7.2.3 Quantificação de bornesitol

A determinação do teor de bornesitol foi realizada por CLAE-DAD, empregando-se o método desenvolvido e validado em trabalho anterior do nosso grupo (PEREIRA et al., 2012a). A validação do método cromatográfico desenvolvido foi conduzida de acordo com os critérios estabelecidos nos normativos do ICH, da ANVISA e da AOAC (AOAC, 2002; Brasil, 2003; ICH, 1996).

O sistema de cromatografia utilizado foi o mesmo descrito no item anterior (item 4.7.2.2) e as análises foram realizadas em coluna LiChrospher 100 RP-18 (250 \times 4 mm d.i., partículas de 5 μm), acoplada a pré-coluna LiChrospher 100 RP-18 (4 \times 4 mm d.i., partículas de 5 μm), com temperatura da coluna de 40 $^{\circ}\text{C}$ e fluxo de 1,0 mL/min. A fase móvel compreendeu eluição em gradiente de água Milli-Q (solução A), MeOH grau CLAE (solução B) e ACN grau CLAE (solução C), conforme descrito na Tabela 2. O comprimento de onda utilizado na detecção foi no comprimento de onda de 230 nm e o volume de injeção foi de 20 μL (concentração das amostras 1,5 mg/mL).

As amostras injetadas no sistema de cromatografia foram previamente derivatizadas, empregando-se cloreto de tosila em piridina, como descrito por Pereira et al. (2012a), tendo sido utilizado pentaeritritol como padrão interno (P.I.). Exatamente cerca de 3,0 mg de cada extrato foram pesados diretamente para tubos plásticos do tipo *safe-lock* de 2 mL de capacidade. Posteriormente, cerca de 50 mg de cloreto de tosila foram adicionados ao tubo, seguido de 50,0 μ L de solução do P.I. (1,0 mg/mL de piridina), com auxílio de micropipeta volumétrica. Os tubos foram, então, vedados com parafilme e transferidos para bloco agitador a 800 r.p.m., à 50 °C por 3 h. Ao término da reação, foram adicionados ao meio reacional ACN grau CLAE suficiente para perfazer um volume final de 2,0 mL, com o auxílio de micropipeta. A suspensão foi sonicada por 15 min, agitada em vortex e posteriormente centrifugada a 8.400 g por 10 min. Alíquotas de 20 μ L dos sobrenadantes foram injetadas automaticamente no sistema de CLAE descrito, empregando-se as condições de análise estabelecidas.

A linearidade foi determinada a partir de curvas analíticas, construídas utilizando-se cinco massas distintas. Cada ponto das curvas analíticas foi obtido pela injeção, em triplicata, de 20 μ L de cinco soluções preparadas com cinco diferentes massas de bornesitol no meio reacional (60,0; 120,0; 180,0; 240,0; 300,0 μ g e 100 μ g de P.I. em todos os pontos). As curvas analíticas foram determinadas empregando-se a relação de áreas dos picos do bornesitol (PTB) e do padrão interno (PPI) versus a massa injetada de PTB, em dois dias consecutivos.

Os dados obtidos foram avaliados através de regressão linear pelo método dos mínimos quadrados e os coeficientes de determinação (r^2) correspondentes foram calculados. A equivalência estatística das curvas obtidas em dias diferentes foi avaliada por análise de variância ($p < 0,05$), pelo programa GraphPad Prism, versão 5 (2007) da GraphPad Software.

Tabela 2 - Sistema de eluição estabelecido para o método por CLAE-DAD para quantificação de bornesitol em extratos e frações de folhas de *H. speciosa*

Tempo (min)	%A*	%B*	%C*	Modo de eluição
0	70	15	15	gradiente linear
10	45	40	15	Isocrático
13	45	40	15	gradiente linear
25	43	42	15	Isocrático
32	43	42	15	gradiente linear
34	30	20	50	Isocrático
55	30	20	50	gradiente linear
57	5	5	90	Isocrático
67	5	5	90	gradiente linear
70	70	15	15	-

***Solvente A:** água Milli-Q; **Solvente B:** MeOH grau CLAE e **Solvente C:** ACN grau CLAE.

Fonte: Elaboração própria.

4.8 Ensaios biológicos

Os ensaios foram realizados pelo grupo do Prof. Steyner F. Côrtes, Departamento de Farmacologia, Instituto de Ciências Biológicas, UFMG, Co-orientador desta tese. Os ensaios foram executados pela Dra. Grazielle Caroline da Silva e Dra. Aline Carvalho Pereira (bolsista de Pós-Doutorado) e acompanhada pela doutoranda desta tese.

4.8.1 Avaliação da atividade vasodilatadora

A atividade vasodilatadora dos extratos obtidos no item 4.7 foi avaliada em preparações de artéria aorta de ratos, previamente contraídas com fenilefrina (FERREIRA et al., 2007b). A atividade dos extratos foi comparada quanto aos valores de concentração inibitória a 50% (CI_{50}) e de $-\log$ da CI_{50} , empregando-se ANOVA e

pós teste de *Tuckey*. A realização deste ensaio consistiu, inicialmente, da obtenção e montagem dos anéis da artéria aorta torácica, após o sacrifício dos animais. Anéis de 2-3 mm de comprimento foram utilizados na montagem, que consiste de duas hastes metálicas triangulares passadas pelo lúmen do vaso e cubas de vidro com volume de 10 mL, contendo solução de Krebs-Henseleit (NaCl, 135,0 mmol/L; KCl, 5,0 mmol/L; NaHCO₃, 1,4 mmol/L; MgSO₄ 7H₂O, 20,0 mmol/L; CaCl₂, 11,0 mmol/L; e glicose, 2,5 mmol/L), areada continuamente com carbogênio (95 % de O₂ e 5 % de CO₂), a uma temperatura de 37 ± 1 °C. Uma das hastes foi presa à parede da cuba, e a outra foi acoplada a um transdutor de tensão isométrica. O registro das tensões foi feito através de transdutores isométricos, acoplados a um amplificador, e este conectado a um computador equipado com uma placa conversora analógico-digital. O programa Windaq (Datacq, Inc., EUA) foi utilizado para aquisição e análise dos dados experimentais, como descrito por Capettini e colaboradores (2008).

Após avaliação da integridade dos anéis aórticos, utilizando-se pré-contracção com fenilefrina (Phe; 0,3 µM) e posterior estímulo com acetilcolina (ACh; 10 µM), foi realizada a avaliação da resposta vasorelaxante, empregando-se fenilefrina (0,3 µM) para pré-contrair os vasos e curvas concentração-resposta cumulativas com acetilcolina (1 nM a 0,1 µM) foram então construídas. Posteriormente, foram avaliadas as amostras, construindo-se curvas concentração-resposta cumulativas como descrito anteriormente para a acetilcolina, porém com faixa de concentrações distintas (0,1; 0,3; 1,0; 3,0; 10,0 mg/L). A curva foi construída com cinco pontos e cada ponto foi obtido a partir de cinco animais.

4.8.2 Avaliação da atividade inibitória da enzima α-glicosidase

Os extratos obtidos no item 4.7 foram avaliados em modelo *in vitro* de inibição da enzima α-glicosidase, assim como as frações obtidas do fracionamento de EE-CC (item 4.9). A atividade dos extratos foi comparada à CI₅₀ empregando-se ANOVA e

pós-teste de *Bonferroni*. O ensaio foi realizado conforme descrito por Pereira e colaboradores (2012b). Em uma microplaca de 96 poços foram adicionados 20 µL de solução de glutatona reduzida (0,4 mM), 20 µL de solução de fosfato de potássio monobásico anidro (0,4 M, pH 6,8), 20 µL de solução de α-glicosidase (0,16 U/mL) e 20 µL de solução da amostra (100 µg/mL em 5-10% DMSO). A solução foi mantida a 37 °C por 10 min. Após, foram adicionados 20 µL do substrato *p*-nitrofenil-α-D-glicopiranosídeo (PNP-G) (10 mM), deixando por mais 20 min a 37°C. A reação foi interrompida pela adição de 80 µL de carbonato de sódio (0,2 M). Em seguida, utilizando um leitor de microplaca, foi feita a leitura da absorbância no comprimento de onda de 405 nm. Como controle positivo, foram empregados 20 µL de acarbose (0,1 µg/mL) e, como controle negativo, foram adicionados 20 µL de solução contendo 5% DMSO, juntamente com os demais reagentes, excetuando-se a amostra. A inibição (%) foi calculada pela seguinte fórmula: $A1 - A2 / A1 \times 100$, onde A1 é a absorbância do controle negativo e A2 é a absorbância da amostra. As curvas foram construídas com nove pontos, sendo que para cada ponto foram realizadas três replicatas.

4.9 Fracionamento do extrato etanólico visando isolar os constituintes com atividade inibitória da α-glicosidase

O extrato EE-EC (item 4.7) foi selecionado para fracionamento biomonitorado pelo ensaio de inibição da α-glicosidase. Para tanto, foi empregada cromatografia em coluna aberta de sílica gel. Empregou-se uma porção de 20,0 g do extrato, o qual foi incorporado à sílica gel em grau de porcelana. O resíduo foi depositado no topo de uma coluna preparada com 340 g de sílica gel 60 (0,2 – 5 mm) (dimensões da coluna empacotada: 330 × 60 mm d.i.), procedendo-se à eluição com solventes de polaridade crescente: hexano (Fr HX), diclorometano (Fr DCM), diclorometano/acetato de etila 1:1 (Fr DCM/EtOAc 1:1), acetato de etila (Fr EtOAc), acetato de etila/metanol 1:1 (Fr EtOAc/MeOH 1:1) e metanol (Fr MeOH). Todas as frações obtidas com o mesmo sistema eluente foram reunidas, resultando em seis grupos de frações (Tabela 3).

Tabela 3 – Fracionamento do extrato etanólico de folhas de *H. speciosa* por cromatografia em coluna aberta de sílica gel

Eluente/Fração	Massa (g)	Rendimento (%)
Hexano	0,031	0,2
DCM	1,198	6,0
DCM:EtOAc 1:1	1,252	6,3
EtOAc	0,108	0,5
EtOAc:MeOH 1:1	16,0	80,0
MeOH	0,827	4,14
Total: 19,416		

Fonte: Elaboração própria.

As frações obtidas foram avaliadas quanto ao perfil cromatográfico por CLAE-DAD. Para tanto, foi empregado um sistema de CLAE Waters 2695, com coluna LiChrospher 100 RP-18 (250 x 4 mm d.i., 5 µm) e pré-coluna LiChrospher 100 RP-18 (4 x 4 mm d.i., 5 µm). A temperatura da coluna foi de 40 °C e como fase móvel utilizou-se água Milli-Q (A) e acetonitrila grau CLAE (B), ambos acidificados com 0,1% de ácido fosfórico. Utilizou-se gradiente exploratório de eluição, com fluxo de 1 mL/min (Tabela 4). Para obtenção das soluções amostrais, 5 mg de cada fração foram pesados para tubo plástico *safe-lock* e adicionado 1 mL de MeOH grau CLAE.

A suspensão foi mantida em banho de ultrassom por 15 min para auxiliar na solubilização da amostra. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas a 8.400 g, e 10 µL dos sobrenadantes injetados no sistema de cromatografia descrito.

Tabela 4 - Gradiente de eluição empregado para a análise dos extratos de *H. speciosa* provenientes do ensaio extrativo

	Tempo (min)	%ACN*	%H₂O*	
*acidificados com	0	95	5	ácido fosfórico (0,1%).
	60	5	95	
	65	5	95	
Fonte: Elaboração	70	95	5	própria.

A potencial atividade antidiabética das frações foi avaliada em modelo *in vitro* de inibição da enzima α -glicosidase (item 4.8.2) e *in vivo* no tratamento agudo sobre a glicemia e no ensaio de tolerância à glicose (item 4.12).

4.9.1 Hidrólise da fração diclorometânica (Fr DCM)

Submeteu-se a fração diclorometânica à hidrólise alcalina, visando identificar as geninas presentes. Para tanto, 49,9 mg da fração Fr DCM foram pesados em balão de fundo redondo e solubilizados em 10 mL de solução metanólica de NaOH a 5%. A solução foi mantida à 55 – 60 °C, sob agitação e refluxo, durante 2 h. Em seguida, a solução foi neutralizada com HCl a 37%.

A mistura reacional foi então particionada com hexano (3 x 20 mL), as fases orgânicas reunidas e submetidas à partição com água (1 x 10 mL). Posteriormente, adicionou-se sulfato de sódio anidro à fase orgânica, que foi filtrada em seguida para remoção do resíduo sólido. Por fim, a fase orgânica foi concentrada até resíduo em evaporador rotatório, sob temperatura máxima de 50 °C.

4.9.1.1 Análise do produto de hidrólise por CCD de sílica gel

O produto da reação de hidrólise da fração diclorometânica (item 4.9.1) foi analisado por cromatografia em camada delgada (CCD) de sílica gel. Para tanto, foram aplicados, em uma placa cromatográfica, soluções metanólicas da fração de origem, o produto de hidrólise e uma solução da mistura de lupeol/ α -amirina (solução de referência). As soluções para esta análise foram preparadas a partir da solubilização de cerca de 1 mg da fração de origem, do produto e do padrão de lupeol/ α -amirina em 500 μ L de MeOH, com auxílio de banho de ultrassom. A análise foi realizada em cromatofolha de alumínio recoberta por sílica gel 60 (10 x 10 cm; Merck), empregando-se solução de acetato de etila / hexano (10:90) como eluente e anisaldeído sulfúrico como revelador (item 4.5).

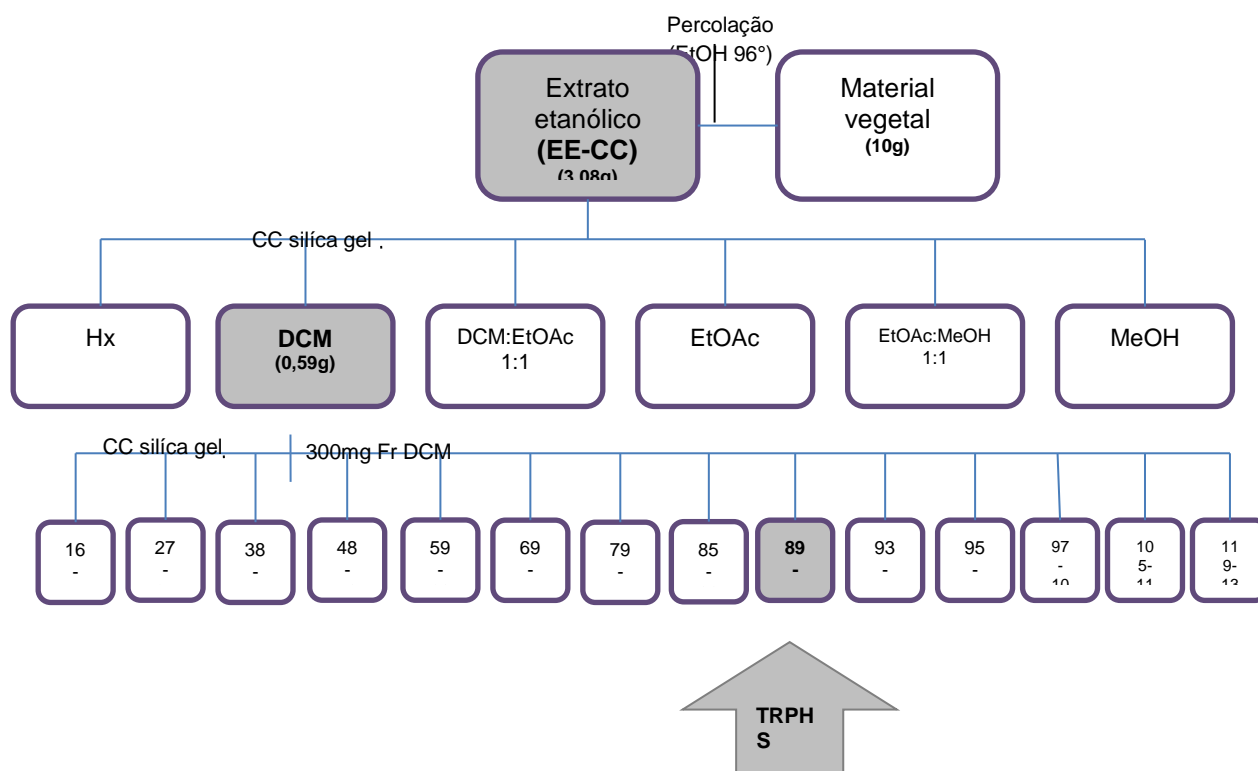
4.9.2 Fracionamento da fração diclorometânica (Fr DCM)

A fração diclorometânica (Fr DCM) foi fracionada empregando-se cromatografia em coluna aberta de sílica gel. Uma porção de 304,0 mg da fração Fr DCM foi incorporada à 350 g de sílica gel 60 (0,063 – 0,200 mm) em grau de porcelana. O resíduo foi depositado no topo da coluna preparada com 200 g de sílica (0,063 – 0,200 mm; dimensões da coluna empacotada: 310 x 55 mm d.i.). A eluição foi realizada de forma isocrática, utilizando como eluente uma solução de hexano/acetato de etila (99:1). Os primeiros 75 mL foram recolhidos conjuntamente, e as demais frações, com volume de aproximadamente 8 mL cada, foram coletadas em frascos de penicilina para análise posterior, resultando num total de 130 frações.

As frações foram analisadas por cromatografia em camada delgada de sílica gel, empregando como eluente 50 mL de solução de hexano / diclorometano (60:40), contendo 2 mL de acetato de etila e, como revelador, foi empregado anisaldeído sulfúrico (item 4.5). As frações foram reunidas de acordo com a similaridade dos perfis cromatográficos e transferidas para frascos de penicilina previamente tarados. O

fracionamento cromatográfico de Fr DCM resultou no isolamento de um sólido nomeado TRPHS (fração 89-92, massa 16,1 mg), que teve sua estrutura química elucidada por métodos espectroscópicos usuais (item 4.11). Na Figura 3, é representado o esquema geral do fracionamento realizado.

Figura 3 – Esquema de fracionamento da fração diclorometânica (Fr DCM) de folhas de *H. speciosa*



Fonte: Elaboração própria.

4.10 Caracterização de EE-EC e Fr DCM por UPLC-MS-ESI

A composição química do extrato EE-EC (item 4.7) foi avaliada empregando-se sistema de cromatografia líquida de ultra eficiência (UPLC) (Waters) acoplado a detector DAD e em interface com espectrômetro de massas triplo quadrupolo (TQD) (Waters Micromass). Para a análise do extrato EE-EC, empregou-se uma coluna de fase reversa (Acquity UPLC BEH C18, Waters; 50 × 2,1 mm d.i. 1,7 μm) em combinação com uma pré-coluna (Acquity UPLC BEH C18 VanGuard pre-column, Waters; 2,1 × 5 mm d.i. 1,7 μm), utilizando-se uma eluição em gradiente de água (A) e acetonitrila (B), ambos acidificados com 0,1 % v/v de ácido fórmico (5 a 95 % B em 10 min; 95 a 5 % B em 1 min, seguindo-se de 2 min de eluição isocrática), com fluxo

de 0,3 mL/min, e temperatura da coluna de 40 °C. O volume de injeção foi de 3 µL para EE-EC (2 mg/mL em MeOH). Para a fonte de ionização por *electrospray* (ESI), nos modos negativo e positivo, as seguintes condições foram empregadas: voltagem do capilar de 3,54 kV; voltagem do cone de 17 V; temperatura da fonte de 120 °C; temperatura de dessolvatação 300 °C. O intervalo de massas avaliado foi da relação carga / massa (m/z) de 100 a 2000.

Para a análise da Fr DCM (item 4.9) e também de EE-EC foram preparadas soluções com concentração de 5 mg/mL em acetonitrila. Procedeu-se a solubilização com auxílio do banho de ultrassom por 10 minutos, seguida de centrifugação a 8400 g, por 10 minutos, e os sobrenadantes obtidos foram filtrados diretamente para vial de vidro. As análises foram realizadas no mesmo sistema de UPLC-MS-ESI descrito anteriormente, porém empregando-se condição de análise distinta. Utilizou-se eluição em gradiente de água (A) e acetonitrila (B), ambos acidificados com 0,1 % v/v de ácido fórmico, com fluxo de 0,3 mL/min, e temperatura da coluna de 40 °C, nas seguintes condições: 0 minutos, 60 % de B; 3 minutos, 80 % de B; 10 minutos, 95 % de B, 11 minutos, 60 % de B, 13 minutos, 60 % de B. O volume de injeção foi de 7 µL. Para a fonte ESI, no modo positivo, as seguintes condições foram empregadas: voltagem do capilar de 3,49 kV; voltagem do cone ESI de 45 V; voltagem do cone APCI de 60 V; temperatura da fonte de 120 °C; temperatura de dessolvatação 400 °C. O intervalo de massas avaliado foi de m/z 90-1000.

4.11 Elucidação estrutural de TRPHS

A elucidação estrutural de TRPHS foi realizada a partir de dados de ressonância magnética nuclear (RMN) e espectrometria de massas. Os espectros de RMN de ¹H e de ¹³C foram obtidos no Departamento de Química, ICEX, UFMG, em equipamento Bruker Avance DRX400, a 25 °C, utilizando-se tetrametilsilano (TMS) como referência interna. Utilizou-se clorofórmio deuterado (CDCl₃) para solubilização da amostra. O espectro de massa de TRPHS foi obtido empregando-se sistema de UPLC-MS-ESI previamente descrito (item 4.10). A amostra (1 mg/mL em acetonitrila) foi solubilizada com auxílio do banho de ultrassom por 10 minutos, em seguida foi

centrifugada a 8400 g, por 10 minutos, e o sobrenadante foi filtrado para vial de vidro. As condições de eluição no sistema de UPLC-MS-ESI foram idênticas às aquelas descritas no item 4.10 para Fr DCM. O volume de injeção foi de 7 µL. Para a fonte ESI e APCI, no modo positivo, as seguintes condições foram empregadas: voltagem do capilar de 3,44 kV; voltagem do cone ESI de 45 V; voltagem do cone APCI de 20 V e 70 V; temperatura da fonte de 120 °C; temperatura de dessolvatação 400 °C. O intervalo de massas avaliado foi de m/z 200-1000.

A atividade óptica de TRPHS foi determinada empregando-se polarímetro ADP220 Bellingham, Stanley Ltda. A temperatura de análise foi de 27°C, o caminho óptico de 0,5 dm e utilizou-se CHCl₃ (0,82 mg/mL) para solubilização da amostra. Obteve-se, ainda, a faixa de fusão da substância em aparelho de ponto de fusão MQAPF-30, Microquímica.

4.12 Avaliação in vivo da atividade antidiabética

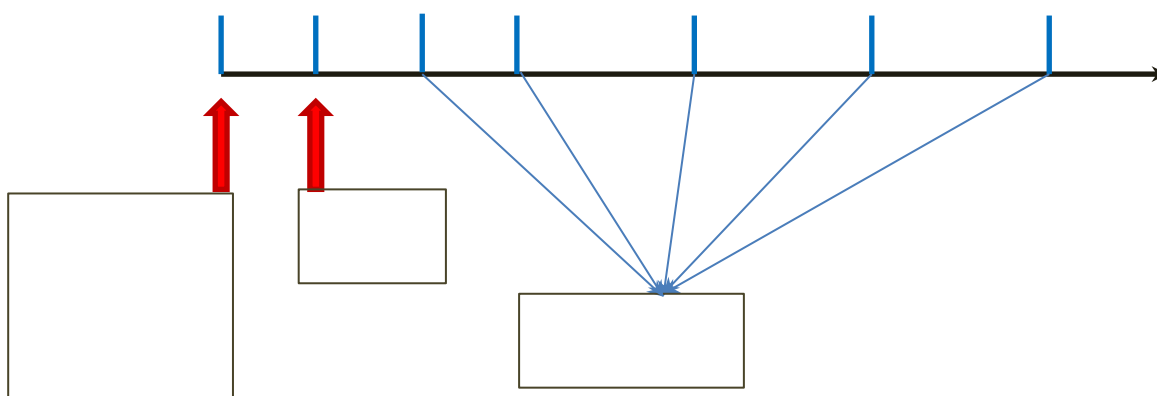
O trabalho experimental foi previamente aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), protocolo nº 163/10. Foram utilizados camundongos machos Swiss (8 semanas), provenientes do Centro de Bioterismo (CEBIO) do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG. Os animais foram mantidos em ciclos de claro-escuro (12h) com livre acesso à água e ração.

4.12.1 Avaliação do efeito do tratamento agudo sobre a glicemia e a tolerância à glicose

O ensaio foi realizado como descrito previamente (AGUILAR-SANTAMARÍA et al., 2009; HEO et al., 2009), com algumas modificações. Após 6 h de jejum diurno, foram coletadas amostras de sangue caudal para dosar a glicemia basal. Para tanto, foram utilizadas fitas reativas e glicosímetro. Em seguida, os animais receberam até 300 µL de soluções de amostras, diluídas em 10% de Tween, administradas por gavagem. Foram utilizados três grupos de animais normoglicêmicos: controle (tratado com veículo – salina a 10% de Tween), teste (tratado com amostras, 300 mg/Kg) e

controle positivo (tratado com acarbose - 10 mg/Kg). Após 15 min, os animais receberam solução de amido (2 g/Kg). Posteriormente foram coletadas amostras de sangue caudal aos 15, 30, 60, 90 e 120 min, para dosar a glicemia (JARALD et al., 2009; MARTINS et al., 2008). A **Figura 4** apresenta esquematicamente o ensaio realizado.

Figura 4 – Esquema representativo do ensaio agudo sobre a glicemia e tolerância à glicose



Fonte: Elaboração própria.

4.12.2 Análise dos resultados

O efeito dos tratamentos com as amostras foi analisado por test *t* de *Student* ou ANOVA com pós-teste de *Bonferroni*, comparando-se animais controle e animais diabéticos, tratados ou não tratados, considerando $p < 0,05$.

4.13 Análises de CAR (relação entre composição química e atividade biológica)

4.13.1 Teores dos marcadores *versus* atividade biológica

A relação entre a composição química quantitativa dos extratos (teores dos marcadores químicos quantificados; item 4.7.2) e as respostas biológicas (item 4.8) induzidas pelos mesmos (atividade vasodilatadora e atividade inibitória da enzima α -

glicosidase) foi avaliada a partir de análises quimiométricas, empregando-se o *software* MATLAB®, versão R2009b (The MathWorks, EUA), e o pacote PLS Toolbox, versão 6.5 (Eigenvector Technologies, EUA). Foram realizadas Análise de Componente Principal (*Component Principal Analysis*, PCA) e Análise Hierárquica de Agrupamento (HCA).

4.13.2 Área dos picos *versus* atividade biológica

Análises de CAR também foram realizadas empregando-se dados de composição química quantitativa dos extratos obtidos pelas áreas dos 10 picos majoritários selecionados nos cromatogramas (item 4.7.1) e as respostas biológicas correspondentes (vasodilatação e inibição da enzima α -glicosidase; item 4.8). Foram realizadas análises quimiométricas de PCA e HCA, empregando os softwares descritos no item 4.13.1.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Ensaios extrativos

Ensaios extrativos foram conduzidos objetivando-se obter extratos de folhas de *H. speciosa* com composições químicas diferentes e avaliar a relação entre os teores dos marcadores químicos definidos para a espécie e as respostas biológicas investigadas (atividade vasodilatadora e atividade inibitória da enzima α -glicosidase; item 4.8). Os solventes utilizados, bem como as técnicas extrativas avaliadas, foram selecionados visando a um posterior escalonamento industrial para a produção do extrato, com potencial emprego pela indústria farmacêutica. Dessa forma, deve-se considerar a disponibilidade de equipamentos e facilidade de realização da técnica extrativa, além da baixa toxicidade e custo dos solventes extratores.

Um único material vegetal foi utilizado para obtenção dos extratos (folhas de *H. speciosa*, código E-SPA; item 4.6), sendo as análises realizadas em triplicata, empregando-se diferentes solventes extratores e dois processos extrativos distintos: percolação e maceração estática (item 4.7). Os extratos obtidos foram caracterizados pelo rendimento em extrativos, teores dos marcadores químicos previamente definidos (PEREIRA, 2012), e perfil cromatográfico por CLAE-DAD (itens 4.7, 4.7.1 e 4.7.2). A Tabela 5 contém os resultados de rendimentos obtidos e do consumo de solventes extratores para cada ensaio.

Tabela 5 - Ensaio extrativos realizados com folhas de *H. speciosa*

Técnica Extrativa	Ensaio Extrativos*	Material vegetal (g)	Solvente (mL)	Extrato obtido (g)	Rendimento (%)	Rendimento médio (n = 3; %) ± D.P.**
Percolação	EE-EC 1	10,0	900	2,89	28,9	30,8 ± 1,9^b
	EE-EC 2	10,0	900	3,28	32,8	
	EE-EC 3	10,0	850	3,06	30,6	
	EE-E70 1	10,0	1265	4,08	40,8	39,3 ± 1,79^a
	EE-E70 2	10,0	1690	3,74	37,4	
	EE-E70 3	10,0	1150	3,96	39,6	
	EE-E50 1	10,0	1850	4,10	41,0	40,7 ± 0,69^a
	EE-E50 2	10,0	1750	4,11	41,1	
	EE-E50 3	10,0	1900	4,00	40,0	
	EE-PP 1	10,0	700	3,15	31,5	28,7 ± 2,4^c
	EE-PP 2	10,0	600	2,71	27,1	
	EE-PP 3	10,0	600	2,76	27,6	
Maceração	ME-24 1	5,0	500	1,02	20,5	14,7 ± 5,1^e
	ME-24 2	5,0	500	0,61	12,2	
	ME-24 3	5,0	500	0,57	11,3	
	ME-72 1	5,0	500	1,15	23,0	22,4 ± 0,9^d
	ME-72 2	5,0	500	1,07	21,4	
	ME-72 3	5,0	500	1,14	22,8	

*Solventes extratores: EE-EC=etanol 96° GL; EE-E50=solução hidroalcoólica a 50%; EE-E70= solução hidroalcoólica a 70%; ME-24=etanol 96° GL; ME-72=etanol 96° GL; EE-PP=solução EtOAc/MeOH 1:1 (item 4.7).

**As médias identificadas com a mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p > 0,05$).

Fonte: Elaboração própria.

A análise dos resultados indica que os rendimentos inferiores foram obtidos quando a maceração foi empregada como técnica extrativa. A maceração é um processo extrativo lento, que pode resultar em extração incompleta. É lento por ser predominantemente estático. Já a percolação é um processo dinâmico que consiste

em fazer atravessar a droga vegetal, convenientemente pulverizada, pelo líquido extrator, de maneira sucessiva, e assim esgotar os princípios ativos da mesma (HELOU, 1989). Para ilustrar tal diferença, devem-se avaliar ensaios extrativos que empregaram as duas técnicas, porém com o mesmo solvente extrator. Assim, considerando-se os extratos EE-EC, ME-72 e ME-24, a relação droga vegetal / solvente extrator foi, em média, de 11,4 g/L para EE-EC, de 10,0 g/L para ME-72 e ME-24 bem similar para os dois primeiros ensaios. Todavia, os rendimentos extrativos foram significativamente diferentes ($30,8 \pm 1,9\%$ para EE-EC, $22,4 \pm 0,9\%$ para ME-72 e $14,7 \pm 5,1\%$ para ME-24; $p < 0,05$), indicando que a percolação realmente fornece maior quantidade de extrativos do que a maceração.

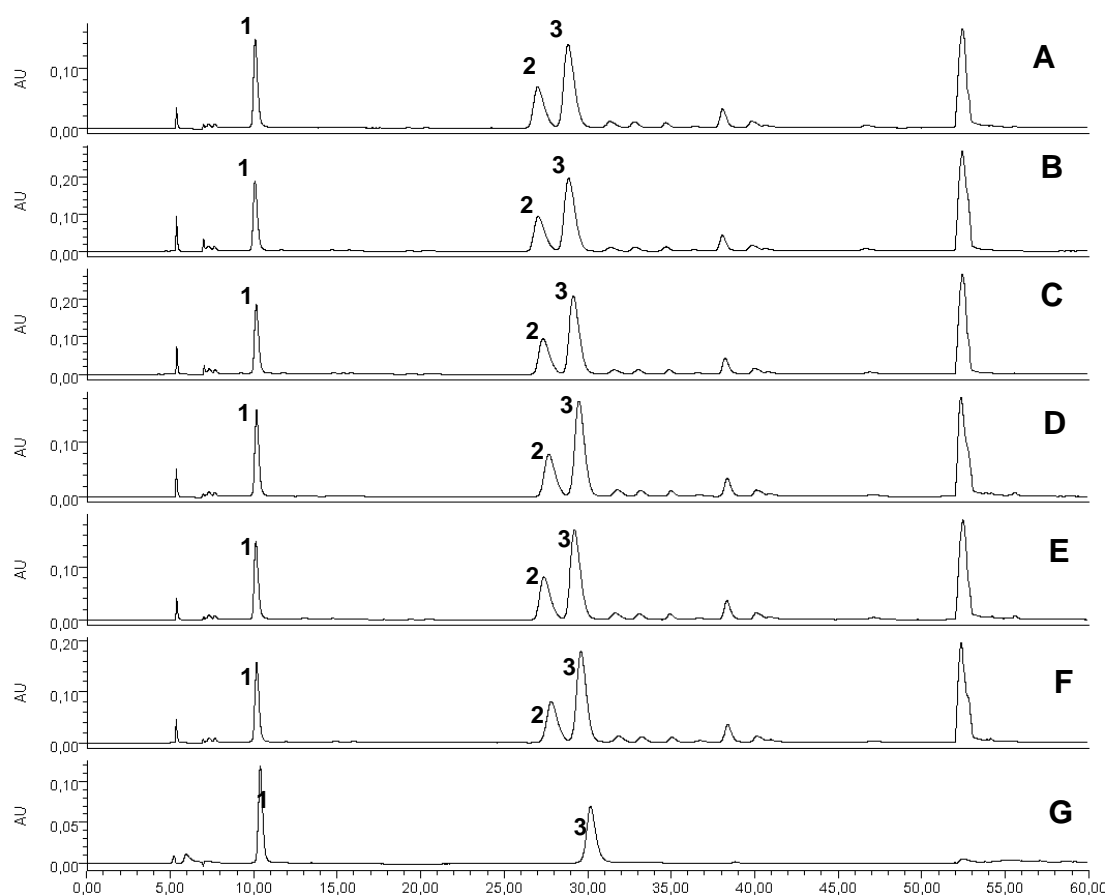
Em relação ao rendimento extrativo, de acordo com o solvente empregado foram obtidos valores de 30,8%, 40,7%, 39,3% e 28,7% respectivamente para EE-EC, EE-E50, EE-E70 e EE-PP, indicando que soluções hidroetanólicas resultam em maiores rendimentos extrativos do que EtOH 96%, não sendo observadas diferença estatisticamente significativa entre os rendimentos dos ensaios realizados com EtOH a 50 e 70% (Tabela 5). Importante ressaltar que o maior rendimento observado para estes extratos pode estar relacionado ao maior consumo de solvente extrator (relação droga vegetal / solvente extrator de 5,46 e 7,35 g/L para EE-E50 e EE-E70, respectivamente), em comparação com EE-EC e EE-PP (relação droga vegetal / solvente extrator de 11,4 e 15,9 g/L, respectivamente), cujo método extrativo foi também percolação. Vale salientar que, para todos os ensaios que empregaram percolação, a extração foi considerada finalizada quando se obteve massa de resíduo inferior à aproximadamente 50 mg para 100 mL de solvente extrator.

5.1.1 Obtenção dos perfis cromatográficos por CLAE-DAD

Foram obtidos perfis cromatográficos para os extratos resultantes dos ensaios extrativos (item 4.7) empregando-se as condições analíticas descritas no item 4.7.1. Na Figura 5 estão apresentados os perfis cromatográficos obtidos para um extrato de

cada réplica da triplicata. Vale ressaltar que os perfis cromatográficos de todas as réplicas ($n = 3$) foram avaliados e apresentaram-se similares aos aqui ilustrados.

Figura 5 - Perfis cromatográficos obtidos por CLAE-DAD dos diferentes extratos preparados com folhas de *H. speciosa* e de substâncias de referência



Condições extrativas: A: EE-EC; B: EE-E50; C: EE-E70; D: ME-24; E: ME-72; F: EE-PP. G (substâncias de referência): ácido clorogênico (1) e rutina (3). O pico (2) corresponde a FlavHS (triglicósido da quercetina). Para condições de extração e condições analíticas vide itens 4.7 e 4.7.1. Detecção no UV em λ de 350 nm.

Fonte: Elaboração própria.

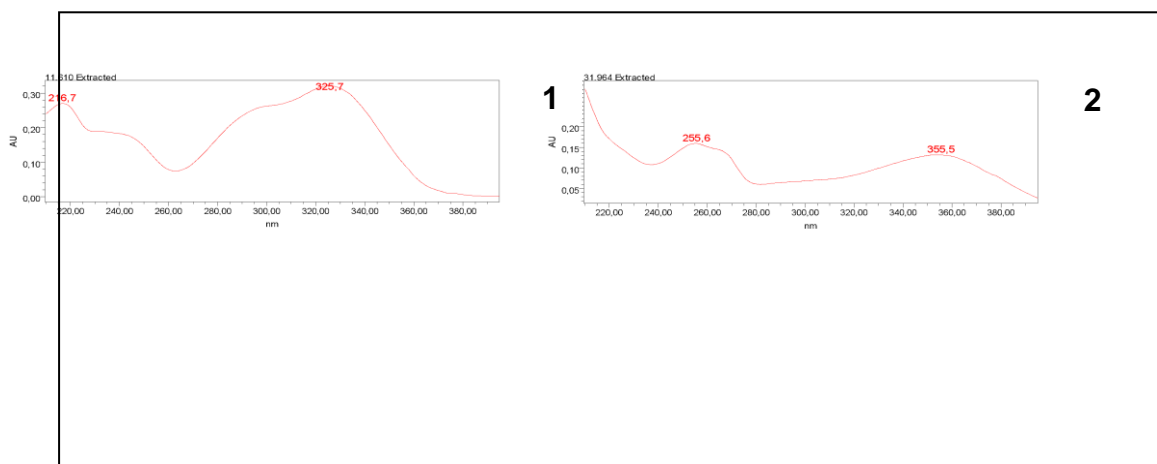
A análise dos perfis cromatográficos obtidos indica que a composição química qualitativa dos extratos é similar para todos os ensaios extrativos, apresentando-se simples e com predomínio de três picos majoritários, com TR até 40 min. O pico

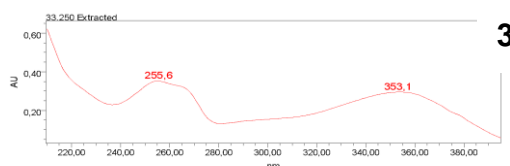
intenso com TR de aproximadamente 53 min corresponde a substâncias lipofílicas (triterpenos e esteróides), eluídas em conjunto.

A co-injeção de substâncias de referência e/ou análise do espectro no UV registrado pelo detector DAD permitiu verificar a presença de rutina (TR = 29,52 min) como pico majoritário em todos os cromatogramas, seguido de ácido clorogênico (TR = 10,08 min), e de FlavHS (TR = 27,61 min), um triglicósídeo da quercetina (item 3.4), relatado por Pereira (2012). FlavHS apresentou máximos de absorção nos comprimentos de onda de 255,6 e 355,5 nm, característico de flavonoides, como pode ser observado na Figura 6.

Segundo Ferreres e colaboradores (2005), flavonoide com máximo de absorção no comprimento de onda em torno de 353 nm é compatível com ligação glicosídica na hidroxila em C-3. Os dados de espectrometria de massas obtidos para FlavHS indicaram que o triglicósídeo tem como genina a quercetina e é constituído por dois resíduos de ramnose e uma hexose (PEREIRA, 2012). Como não foi possível isolar FlavHS, a posição de ligação dos resíduos de açúcar não foi estabelecida. A Figura 6 apresenta, ainda, os espectros no UV obtidos *on-line* pelo detector DAD para os picos 1, 2 e 3, ácido clorogênico, FlavHS e rutina, respectivamente. A ocorrência de rutina e ácido clorogênico já havia sido relatada para a espécie (RODRIGUES, 2007; RODRIGUES et al., 2006; BARROS, 2008; ENDRINGER, 2007).

Figura 6 – Espectros no UV obtidos *on-line* pelo detector DAD para os picos 1, 2 e 3 nos extratos de folhas de *H. speciosa*, identificados como ácido clorogênico, FlavHS e rutina, respectivamente

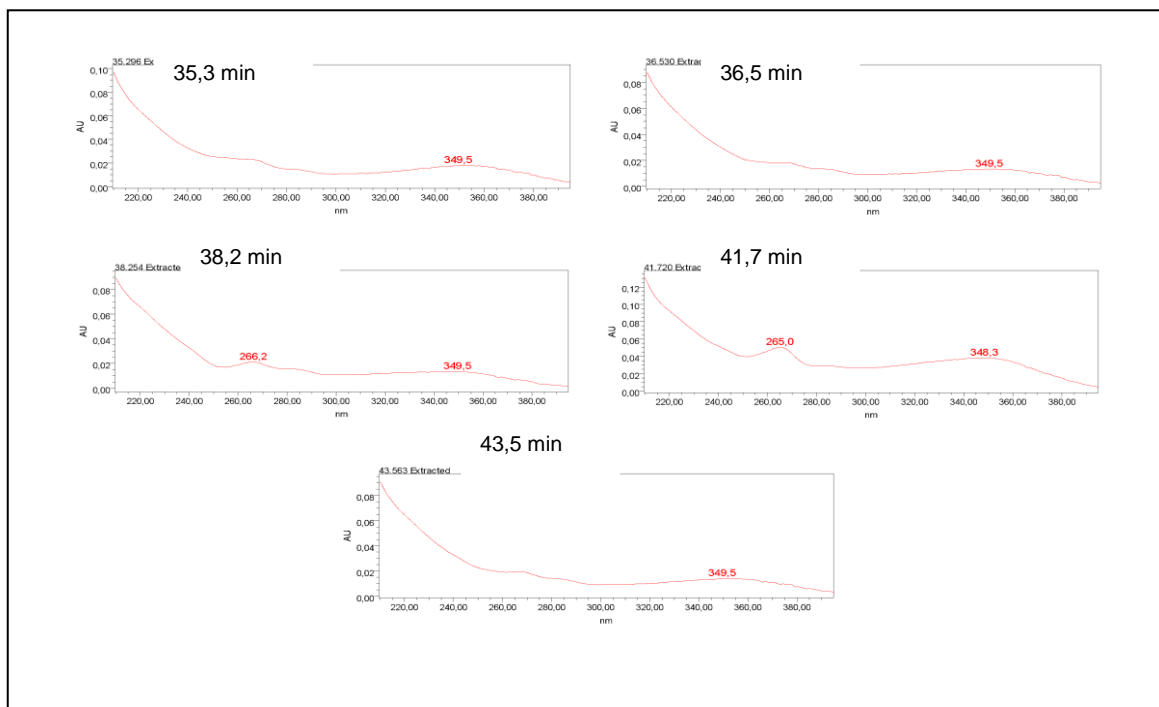




Fonte: Elaboração própria.

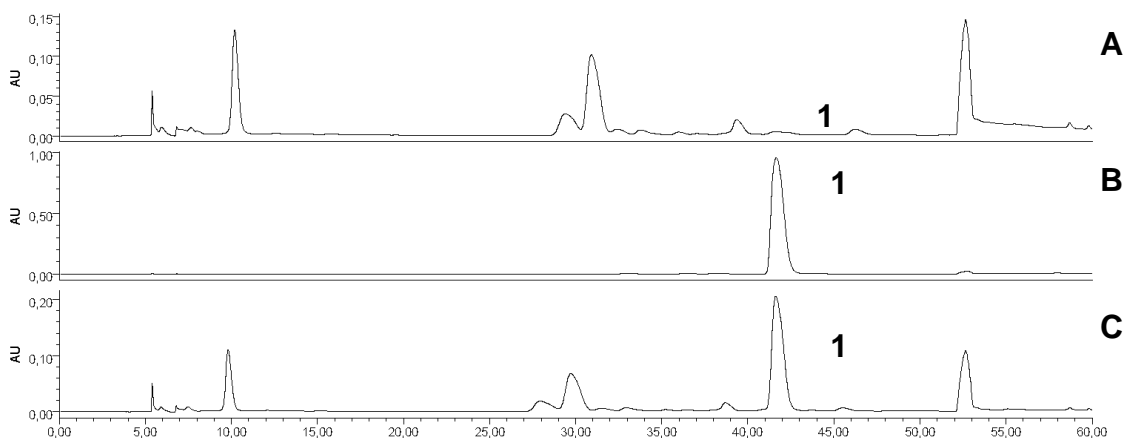
Nos cromatogramas obtidos para todas as condições extrativas avaliadas, observa-se a presença de picos com tempos de retenção entre 31 e 44 min. Os espectros de UV registrados para esses picos indicam tratarem-se de flavonóides, uma vez que apresentam máximos de absorção nos comprimentos de onda em torno de 265 e 350 nm, compatíveis com os máximos de absorção de derivados do flavonol canferol (BUDZIANOWSKI, 1990; ZERBACK et al., 1989; Figura 7). Além de rutina e FlavHS, o glicosídeo flavônico canferol-3-O-rutinosídeo (18) (item 3.4) foi relatado para a espécie (ENDRINGER, 2007), porém, devido à indisponibilidade de um padrão, não foi possível identificá-lo no perfil cromatográfico dos extratos, nas análises realizadas. Todavia, análises realizadas por CLAE-EM permitiram confirmar a presença de derivados do canferol, como discutido adiante no item 5.3.4. A co-injeção do extrato EE-EC com a substância de referência quercitrina permitiu identificar o pico com TR de 41,7 min como sendo este glicosídeo flavônico. Os resultados são apresentados na Figura 8.

Figura 7 – Espectros no UV obtidos *on-line* pelo detector DAD para os picos com TR entre 31 e 44 min



Fonte: Elaboração própria

Figura 8 - Perfis cromatográficos obtidos para (A) EE-EC, (B) quercitrina e (C) co-injeção de EE-EC e quercitrina (1)



Para condições de extração e condições analíticas vide itens 4.7 e 4.7.1. Detecção no UV no comprimento de onda de 350 nm.

Fonte: Elaboração própria.

Por último, observa-se um pico largo eluído em torno de 53 min, correspondente aos compostos lipofílicos presentes nos extratos, provavelmente relacionado aos triterpenos e esteróides ocorrentes na espécie. Como relatado anteriormente (item 3.4), os constituintes lipofílicos já identificados em extratos de *H. speciosa* foram compostos voláteis como óxido de *trans*-linalol (12), óxido de *cis*-linalol (13), α -terpineol (14), linalol (15), geraniol (16), metil-antranilato (17), eugenol (18) e (*E*)-isoeugenol (19) (SAMPAIO & NOGUEIRA, 2006), além de α -amirina (29), lupeol (30) e seu 3 β -O-éster de ácido graxo (31), β -amirina (38), uma mistura de hidrocarbonetos, uma mistura de alcoóis de cadeia longa, uma mistura de obtusalina (35) e eritrodiol (36), β -sitosterol (37), uma mistura de ésteres 3 β -O-acilados de α e β -amirina (38 e 39) e do lupeol (40) (ENDRINGER, 2007; BARROS, 2008).

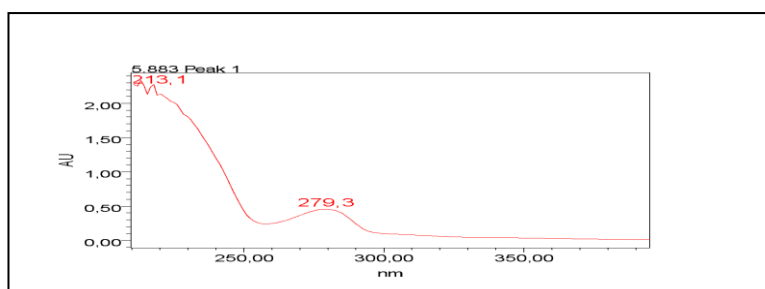
O pico com tempo de retenção de aproximadamente 5,4 min apresenta espectro no UV com máximos de absorção nos comprimentos de onda de 213 e 279,3 nm (Figura 9). A banda em λ de 279,3 nm é de baixa intensidade e pode ser atribuída

à presença de um grupo carbonila na molécula, cuja transição correspondente a $n \rightarrow \pi^*$ é, em geral, proibida.

Segundo Pavia e colaboradores (2001), esse tipo de transição do grupo carbonila ocorre entre 280 e 290 nm, em λ de aproximadamente 280 nm para carbonilas de cetonas, e possui baixo valor de ϵ ($\epsilon = 15$), apresentando-se com baixa intensidade de absorção. Trata-se de uma substância de alta polaridade, uma vez que é eluída em uma região de baixa concentração do modificador orgânico (ACN) e não apresenta grupo cromofórico característico, como anel aromático. Dentre as substâncias relatadas para a espécie *H. speciosa*, apenas o ácido quínico corresponde às características observadas (ENDRINGER, 2007). Objetivando-se confirmar a natureza do pico relatado, realizou-se a co-injeção, por CLAE-DAD, do extrato EE-EC com a substância de referência, nas mesmas condições de análise descritas no item 4.7.1.

Os cromatogramas obtidos (Figura 10) possibilitaram confirmar o pico com TR de 5,4 min como sendo o ácido quínico.

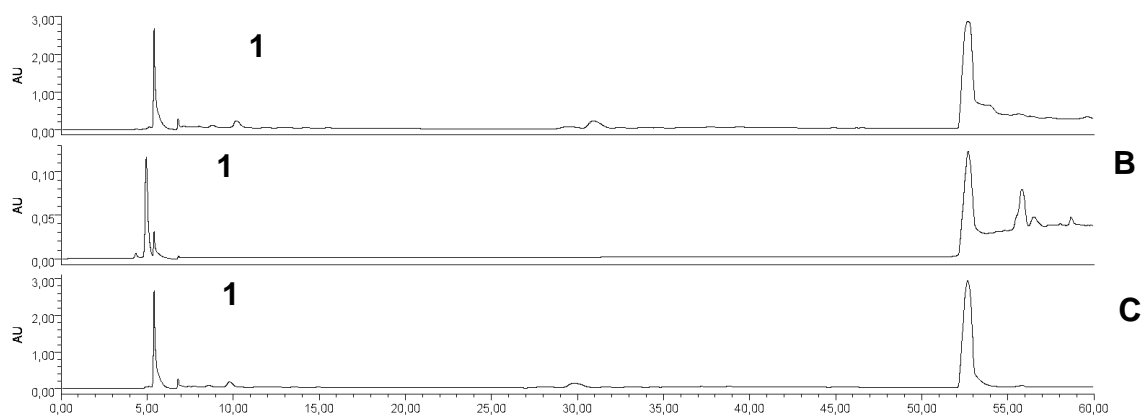
Figura 9 – Espectro no UV obtido *on-line* pelo detector DAD para o pico com TR de 5,4 min



Fonte: Elaboração própria.

A

Figura 10 - Perfis cromatográficos obtidos para (A) EE-EC, (B) ácido quínico (1) e (C) co-injeção de EE-EC e ácido quínico



Para condições de extração e condições analíticas vide itens 4.7 e 4.7.1. Detecção no UV em λ de 210 nm.

Fonte: Elaboração própria.

Vale destacar que o bornesitol não foi detectado nessas análises, uma vez que este ciclitol, por não possuir grupo cromofórico em sua estrutura, não absorve no detector de DAD empregado.

5.1.2 Quantificação dos marcadores químicos

Segundo a Resolução da Diretoria Colegiada nº26 de 2014 (BRASIL, 2014), marcador é

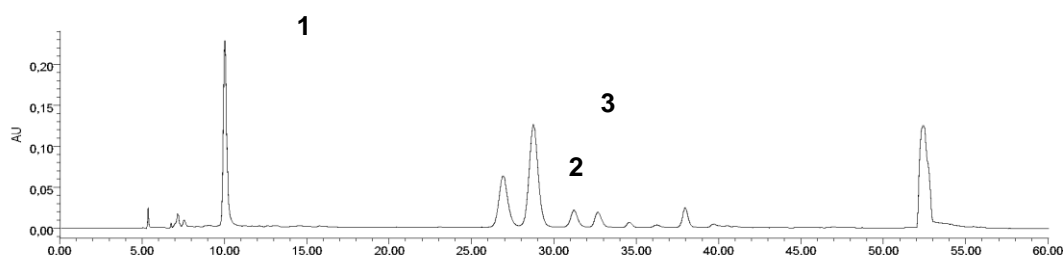
a substância ou a classe de substâncias (ex.: alcaloides, flavonoides, ácidos graxos, etc.) utilizada como referência no controle da qualidade da matéria-prima vegetal e do fitoterápico, preferencialmente tendo correlação com o efeito terapêutico. O marcador pode ser do tipo ativo, quando relacionado com a atividade terapêutica do fitocomplexo, ou analítico, quando não demonstrada, até o momento, sua relação com a atividade terapêutica do fitocomplexo.

Assim, em trabalho anterior do nosso grupo, bornesitol, rutina e ácido clorogênico foram definidos como marcadores químicos de *H. speciosa* (PEREIRA et

al., 2012a; PEREIRA, 2012) relacionados com a potencial atividade anti-hipertensiva da espécie (ENDRINGER, 2007). No presente trabalho, os teores desses marcadores químicos foram quantificados, a fim de avaliar seu papel na atividade vasodilatadora da espécie, a partir da relação entre composição química quantitativa e atividade biológica.

Os teores dos marcadores químicos definidos foram obtidos pelo emprego das metodologias descritas no item 4.7.2. Bornesitol foi quantificado por CLAE-DAD, após derivatização com cloreto de *p*-toluenosulfonila (PEREIRA et al., 2012a). Rutina, ácido clorogênico e o triglicósido da rutina FlavHS foram determinados simultaneamente por CLAE-DAD, utilizando um método previamente desenvolvido e validado por nosso grupo (PEREIRA, 2012). Já a quantificação de flavonoides totais nos extratos foi realizada por espectrofotometria no UV-Vis, após reação com cloreto de alumínio, sendo o método também previamente validado para as matrizes empregadas (PEREIRA, 2012). As Figuras 11 e 12 exemplificam cromatogramas oriundos das análises quantitativas realizadas para determinação dos teores de rutina, FlavHS, ácido clorogênico (Figura 11, item 4.7.2.2) e bornesitol (Figura 12, item 4.7.2.3).

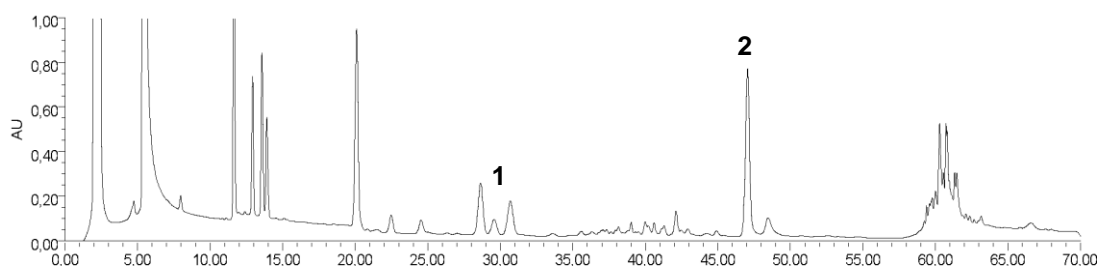
Figura 11 - Cromatograma obtido por CLAE-DAD para a quantificação de ácido clorogênico (1), FlavHS (2) e rutina (3) em extratos de *H. speciosa*



Condições cromatográficas: vide Parte Experimental, item 4.7.2.2; detecção em λ de 350 nm.

Fonte: Elaboração própria.

Figura 12 - Cromatograma obtido por CLAE-DAD para a quantificação de bornesitol, após derivatização com cloreto de tosila em extratos de *H. speciosa*. Picos: (1) bornesitol e (2) padrão interno (pentaeritritol)



Condições cromatográficas: vide Parte Experimental, item 4.7.2.3; detecção em λ de 230 nm.

Fonte: Elaboração própria.

A Tabela 6 apresenta os resultados dos teores determinados para os marcadores químicos previamente definidos para *H. speciosa* (PEREIRA, 2012).

Tabela 6 – Teores de marcadores químicos ($n = 3$) em extratos de folhas de *H. speciosa* provenientes dos ensaios extrativos

Ensaio Extrativo*	Flavonoides totais (%m/m \pm d.p.)	Bornesitol (%m/m \pm d.p.)	Rutina (%m/m \pm d.p.)	Ácido clorogênico (%m/m \pm d.p.)	FlavHS (%m/m \pm d.p.)
EE-EC**	4,53 \pm 0,25 ^{a,B}	6,76 \pm 0,83 ^{ab,A}	1,52 \pm 0,06 ^{b,C}	0,77 \pm 0,02 ^{b,C}	0,73 \pm 0,03 ^{b,C}
EE-E70**	5,28 \pm 0,29 ^{a,A}	5,11 \pm 0,26 ^{c,A}	1,97 \pm 0,02 ^{a,B}	0,91 \pm 0,02 ^{a,C}	0,91 \pm 0,03 ^{a,C}
EE-E50**	5,15 \pm 0,98 ^{a,A}	5,80 \pm 0,16 ^{bc,A}	1,96 \pm 0,02 ^{a,B}	0,91 \pm 0,03 ^{a,B}	0,93 \pm 0,01 ^{a,B}
EE-PP**	4,59 \pm 0,21 ^{a,B}	7,75 \pm 0,78 ^{a,A}	1,46 \pm 0,06 ^{b,C}	0,67 \pm 0,09 ^{b,C}	0,72 \pm 0,05 ^{b,C}
ME-24***	2,68 \pm 0,14 ^{b,B}	5,66 \pm 0,11 ^{bc,A}	1,95 \pm 0,3 ^{a,C}	0,74 \pm 0,02 ^{b,D}	0,94 \pm 0,14 ^{a,D}
ME-72***	4,43 \pm 0,09 ^{a,B}	6,72 \pm 0,33 ^{ab,A}	1,62 \pm 0,02 ^{ab,C}	0,73 \pm 0,01 ^{b,D}	0,80 \pm 0,01 ^{ab,D}

*Solventes extratores: EE-EC = etanol 96° GL; EE-E50 = solução hidroalcoólica a 50%; EE-E70 = solução hidroalcoólica a 70%; ME-24 = etanol 96° GL; ME-72 = etanol 96° GL; EE-PP = solução EtOAc/MeOH 1:1.

**Ensaio realizado empregando-se percolação

***Ensaio realizado empregando-se maceração 24 h (ME-24) e 72 h (ME-72)

As médias identificadas com a mesma letra (minúscula para coluna; maiúscula para linha) não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p > 0,05$).

A análise dos dados dos marcadores químicos permitiu verificar que, de uma forma geral, há variação significativa nos teores dos metabólitos quantificados, bem como da proporção entre eles, em função da técnica extrativa e/ou do solvente extrator empregado.

O bornesitol foi o constituinte que apresentou maior teor nos extratos analisados, exceto para os ensaios EE-E50 e EE-E70, nos quais os teores de bornesitol e de flavonoides totais não foram estatisticamente diferentes. Os teores de bornesitol variaram de $5,11 \pm 0,26\%$ a $7,75 \pm 0,78\%$ (m/m) em EE-E70 e EE-PP, respectivamente. No trabalho de Braga e colaboradores (2009), o teor desse metabólito no extrato e em uma fração padronizada, rica em flavonoides e ciclitóis, variou de 15% e 25% (m/m), bem superior ao determinado neste trabalho. Vale ressaltar que, no presente trabalho, foi empregada uma metodologia analítica validada para determinação do teor de bornesitol (PEREIRA et al., 2012a).

Na sequência, o teor de flavonoides totais apresenta-se apenas inferior ao de bornesitol, exceto para os ensaios EE-E50 e EE-E70, cujos teores não diferiram estatisticamente daqueles obtidos para o bornesitol, variando de $2,68 \pm 0,14\%$ a $5,28 \pm 0,29\%$ (m/m) em ME-24 e EE-E70, respectivamente. Dentre os flavonoides quantificados, rutina é o constituinte majoritário, com teores compreendidos entre $1,46 \pm 0,06\%$ e $1,97 \pm 0,02\%$ (m/m), respectivamente para EE-PP e EE-E70. Os teores de FlavHS e ácido clorogênico apresentaram uma relação aproximada de 1:1 em todos os extratos. Esses são os constituintes minoritários, dentre os determinados, com teores variando de $0,67 \pm 0,09\%$ (EE-PP) a $0,91 \pm 0,02\%$ (EE-E50 e EE-E70) para ácido clorogênico, e entre $0,72 \pm 0,05\%$ (EE-PP) a $0,94 \pm 0,14\%$ (ME-24) para FlavHS.

Os dois métodos de extração avaliados, ambos utilizando etanol 96 °GL como solvente extrator, percolação (EE-EC) e maceração por 72 h (ME-72), forneceram extratos com perfis cromatográficos e teores dos marcadores químicos estatisticamente equivalentes (Tabela 6 e Figura 5), ou seja, do ponto de vista da composição química quantitativa não existe diferença entre os dois extratos, apesar da percolação resultar em um maior rendimento extrativo, como discutido no item 5.1. Comparando-se os extratos obtidos por percolação com diferentes solventes, soluções hidroetanólicas parecem favorecer a extração de compostos flavonoídicos, especialmente rutina e FlavHS, que apresentaram maiores concentrações nos extratos EE-E50 e EE-E70. Porém, cabe destacar que o teor de flavonoides totais não variou significativamente nos três extratos obtidos por percolação EE-EC, EE-E50 e EE-E70. Em estudos realizados objetivando-se otimizar a extração de polifenóis e/ou flavonoides de drogas vegetais diversas, soluções hidroetanólicas mostraram-se mais eficientes para a extração desses constituintes (SOUZA-SARTORI et al., 2013; SUN et al., 2011; BENETIS et al., 2008; NEPOTE et al., 2005).

A extração com EtOAc/MeOH (1:1), ensaio EE-PP, foi proposta com base no procedimento empregado anteriormente para obtenção de uma fração enriquecida em flavonoides e ciclitóis de *H. speciosa*, a qual apresentou significativa atividade inibidora da ECA (ENDRINGER, 2007). A fração foi originalmente obtida a partir do fracionamento cromatográfico do extrato etanólico das folhas de *H. speciosa* em coluna de sílica gel, eluída com solventes de polaridade crescente. A fração em questão foi obtida pela eluição com EtOAc/MeOH (1:1). Visando simplificar o processo e eliminar o uso de diclorometano, que foi um dos solventes da série eluotrópica empregada, avaliou-se a extração direta da droga vegetal por percolação com EtOAc/MeOH (1:1). O perfil cromatográfico do extrato EE-PP se assemelha aos perfis dos demais extratos obtidos nesse ensaio (Figura 5). As condições extrativas empregadas na obtenção de EE-PP resultaram em concentração de bornesitol estatisticamente equivalente àquelas dos extratos EE-EC e ME-72. O teor de flavonoides totais também se mostrou elevado nesta condição, não diferindo dos

demais extratos, exceto ME-24. Não se observou aumento nos teores dos demais constituintes.

Com base nas análises realizadas, pode-se concluir que extração empregando-se percolação e solução hidroetanólica como solvente extrator resulta em maior rendimento extrativo e maior teor dos marcadores químicos, exceto quando se considera o teor de bornesitol.

5.1.3 Atividade vasodilatadora ex vivo dos extratos

Tendo em vista a potencial atividade anti-hipertensiva das folhas de *H. speciosa* descrita anteriormente por nosso grupo (SILVA, et al., 2012a; SILVA, et al., 2012b; FERREIRA, et al., 2007a; FERREIRA, et al., 2007b; ENDRINGER, 2007; SILVA, et al., 2011, SERRA, et al., 2005), no presente trabalho avaliou-se a atividade vasodilatadora dos extratos obtidos nos ensaios extrativos, objetivando-se verificar a influência da técnica extrativa e/ou do solvente extrator sobre a atividade biológica. Além disso, os dados de atividade vasodilatadora, em conjunto com os teores dos marcadores químicos quantificados, foram empregados para análise da relação entre composição química e atividade biológica (CAR), visando avaliar a contribuição dos marcadores químicos para a atividade biológica (item 5.2).

Assim, a atividade vasodilatadora dos 18 extratos obtidos nos ensaios extrativos foi avaliada em modelo *ex vivo* de vasodilatação em anéis de aorta pré-contraídos com fenilefrina (item 4.8.1). O valor de $-\log$ da concentração inibitória a 50% (pCl_{50}) obtido para cada extrato é apresentado na Tabela 7 e a Figura 13 apresenta graficamente esses resultados.

Os dados obtidos indicam que todos os extratos induziram vasodilatação significativa (Cl_{50} da ordem de $\mu\text{g/mL}$), com valores de pCl_{50} no intervalo de $6,48 \pm 0,10$ a $4,97 \pm 0,22$ para EE-EC e ME-24, respectivamente. Os valores de pCl_{50} dos extratos EE-CC, EE-E70 e EE-E50 não diferem estatisticamente ($p > 0,05$) e são superiores àqueles dos extratos ME-24, ME-72 e EE-PP, cujos valores médios de pCl_{50} também são estatisticamente equivalentes ($p > 0,05$). Portanto, pode-se concluir

que a percolação empregando-se etanol ou solução hidroetanólica como solvente extrator fornece extratos com atividade vasodilatadora mais pronunciada (pCl_{50} maior) que aqueles obtidos por maceração, empregando os mesmos solventes extratores.

A análise conjunta dos dados de rendimento extrativo (Tabela 5), teores de marcadores químicos (Tabela 6) e atividade vasodilatadora (Tabela 7) permite concluir que a extração empregando-se percolação e solução hidroetanólica fornece extratos com maior rendimento, maiores teores dos marcadores analisados (exceto para o bornesitol) e maior potência vasodilatadora.

Diversas espécies vegetais alteram a função do endotélio, responsável pela homeostase vascular, através da liberação de vários fatores vasoativos. Plantas como *Camellia sinensis* (chá verde e chá preto), *Vitis labrusca*, *Allium sativum* (alho), *Nigella sativa* e *Crataegus* spp. são exemplos e constituem ricas fontes de compostos polifenólicos, amplamente associados aos efeitos cardiovasculares observados (AHMAD et al., 2013).

Tabela 7 – Valores de pCl_{50} para a atividade vasodilatadora dos extratos de *H. speciosa*, avaliada em preparações de anéis de aorta de ratos pré-contraídos com fenilefrina

Ensaio Extrativos*	pCl_{50}	pCl_{50} média ($n = 3$; %) \pm D.P.
EE-EC 1**	6,59 \pm 0,35	
EE-EC 2**	6,45 \pm 0,25	6,48 \pm 0,10^a
EE-EC 3**	6,40 \pm 0,27	
EE-E70 1**	5,86 \pm 0,71	
EE-E70 2**	6,10 \pm 0,63	6,09 \pm 0,23^a
EE-E70 3**	6,32 \pm 0,42	
EE-E50 1**	6,51 \pm 0,19	
EE-E50 2**	5,55 \pm 0,56	6,16 \pm 0,54^a
EE-E50 3**	6,44 \pm 0,20	
ME-24 1***	4,71 \pm 0,12	
ME-24 2***	5,08 \pm 0,22	4,97 \pm 0,22^b
ME-24 3***	5,12 \pm 0,46	
ME-72 1***	5,36 \pm 0,14	5,14 \pm 0,31^b

ME-72 2^{***}	4,78 ± 0,40	
ME-72 3^{***}	5,28 ± 0,24	
EE-PP 1^{**}	5,32 ± 0,30	
EE-PP 2^{**}	4,85 ± 0,40	5,04 ± 0,24^b
EE-PP 3^{**}	4,97 ± 0,25	

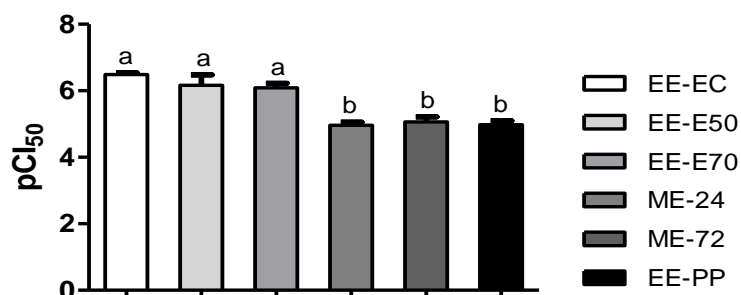
*Solventes extratores: EE-EC = etanol 96° GL; EE-E50 = solução hidroalcoólica a 50%; EE-E70 = solução hidroalcoólica a 70%; ME-24 = etanol 96° GL; ME-72 = etanol 96° GL; EE-PP = solução EtOAc/MeOH 1:1.

**Ensaio realizado empregando-se percolação

***Ensaio realizado empregando-se maceração 24 h (ME-24) e 72 h (ME-72)

As médias identificadas com a mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p > 0,05$).

Figura 13 – Representação gráfica dos valores de pCI_{50} da atividade vasodilatadora dos extratos de *H. speciosa*, avaliada em preparações de anéis de aorta de ratos pré-contraídos com fenilefrina



Condições extrativas: vide Parte Experimental, item 4.7. Solventes extratores: EE-EC = etanol 96° GL; EE-E50 = solução hidroalcoólica a 50%; EE-E70 = solução hidroalcoólica a 70%; ME-24 = etanol 96° GL; ME-72 = etanol 96° GL; EE-PP = solução EtOAc/MeOH 1:1. As médias identificadas com a mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p > 0,05$).

Fonte: Elaboração própria.

Espécies de *Crataegus* são extensamente estudadas e utilizadas clinicamente em países como Alemanha e Estados Unidos para o tratamento de doenças cardiovasculares, incluindo hipertensão, angina, arritmia, hiperlipidemia e insuficiência cardíaca congestiva (WANG et al., 2013; FLATTERY, 2008; RIGELSKI & SWEET, 2002). Em um estudo de Brixius e colaboradores (2006), um extrato padronizado de *Crataegus* (WS1442) usado na terapêutica para o tratamento de insuficiência

cardíaca classe II (leve), segundo a classificação funcional da *New York Heart Association* (NYHA), apresentou atividade vasodilatadora em preparações de anéis de aorta de ratos pré-contraídos com fenilefrina, exibindo CI_{50} de $15,1 \pm 0,6 \mu\text{g/ml}$ ($pCI_{50} = 4,82 \pm 0,19$). Ao compararmos este valor com os resultados obtidos no presente trabalho, observamos uma maior potência vasodilatadora para *H. speciosa*: o extrato etanólico EE-EC, por exemplo, apresentou uma $pCI_{50} = 6,48 \pm 0,10$.

Extratos de espécies do gênero *Crataegus* contêm diversas substâncias bioativas, especialmente flavonoides, ácidos triterpênicos e ácidos carboxílicos fenólicos, dentre os quais pode-se citar rutina, catequina e epicatequina, procianidinas oligoméricas, ácidos ursólico, oleanólico, clorogênico e cafeico, dentre outros (WANG et al., 2013). Os efeitos cardiovasculares relatados para os extratos de *Crataegus* incluem atividade antioxidante, efeito inotrópico positivo, efeito anti-inflamatório e vasodilatador (WANG et al., 2013). Anselm e colaboradores (2009) demonstraram que o extrato padronizado WS 1442 de *Crataegus* [extrato etanólico a 45%, constituído por 18,75% (m/m) de procianidinas oligoméricas induz relaxamento em anéis de artérias coronarianas de suínos, efeito caracterizado pela liberação de NO e de fator hiperpolarizante do endotélio (EDHF) (WANG et al., 2013; ANSELM et al., 2009).

A atividade vasodilatadora dependente de endotélio do extrato de *Crataegus*, avaliada em ensaio com anéis de aorta pré-contraídos com fenilefrina, foi relacionada com a presença de procianidinas na amostra (KIM et al., 2000). Proantocianidinas são largamente distribuídas na natureza, presentes em frutas como maçã, abacate, açaí, kiwi e uva, e efeitos cardioprotetores diversos são relatados para essa classe de compostos (KRUGER, et al, 2014; PONS, et al., 2014).

H. speciosa apresenta, além de compostos polifenólicos como flavonoides e ácido clorogênico, o ciclitol bornesitol, constituinte majoritário quantificado nos extratos da espécie obtidos neste trabalho. Essa classe de compostos possui distribuição limitada na natureza e pode estar relacionada com a potencial atividade anti-hipertensiva da espécie, como descrito por Endringer (2007). Além disso, a maior potência vasodilatadora observada para o extrato de mangaba em comparação com

extratos de *Crataegus* evidencia as potencialidades da espécie para emprego como anti-hipertensivo.

O efeito vasodilatador dos marcadores químicos avaliados isoladamente indica que bornesitol possui discreta atividade vasodilatadora, com pCl_{50} de $2,9 \pm 0,2$, calculada através da extrapolação da curva concentração-resposta construída anteriormente por nosso grupo (resultados não publicados), utilizando o mesmo modelo descrito para a análise dos extratos. Fusi e colaboradores (2003) avaliaram a rotina em ensaio com anéis de aorta de ratos pré-contraídos com fenilefrina, relatando um valor de pCl_{50} de $5,65 \pm 0,31$. Já o ácido clorogênico apresentou pCl_{50} de $7,48 \pm 0,08$ no trabalho de Suzuki e colaboradores (2006) e de $7,94 \pm 0,18$ no trabalho de Taubert e colaboradores (2002), valores obtidos, respectivamente, em anéis de aorta pré-contraídos com fenilefrina e em anéis coronarianos pré-contraídos com prostaglandina $F_{2\alpha}$ ($PGF_{2\alpha}$). Os valores de pCl_{50} relatados para o ácido clorogênico sugerem que ele deve ter uma participação importante na vasodilatação induzida pelos extratos de *H. speciosa*. Vale ressaltar que a potencial atividade anti-hipertensiva da mangaba não se relaciona apenas ao efeito vasodilatador descrito. Como relatado na Revisão da Literatura (item 3.3), dados *in vitro* e *in vivo* demonstram, para o extrato e/ou fração padronizada em ciclitóis e flavonoides, atividade inibitória da ECA, redução dos níveis de angiotensina II e aumento dos níveis séricos de NO (SILVA, 2010; SILVA et al., 2011; SERRA et al., 2005).

5.1.4 Atividade inibitória da enzima α -glicosidase *in vitro*

Em uma avaliação preliminar, o extrato etanólico de folhas de *H. speciosa* inibiu significativamente a enzima α -glicosidase em ensaio *in vitro* (item 4.8.2). Objetivando-se verificar a influência da técnica extrativa e/ou do solvente extrator sobre a potencial atividade antidiabética da espécie, avaliou-se a atividade inibitória da enzima α -glicosidase *in vitro* dos extratos obtidos nos ensaios extrativos. Assim como descrito no item anterior, os dados de atividade inibitória desta enzima, em conjunto com os dados de teores dos marcadores químicos, foram utilizados em análises de CAR,

visando estabelecer relação entre os marcadores definidos e a atividade biológica em pauta (item 5.2).

A atividade inibitória da enzima alfa-glicosidase foi avaliada em modelo *in vitro* para todos os extratos oriundos dos ensaios extrativos, como descrito no item 4.8.2. Os valores de pCl_{50} obtidos para cada extrato estão apresentados na Tabela 8. Na Figura 14, tem-se a representação gráfica desses dados.

Todos os extratos avaliados foram ativos no ensaio *in vitro* de inibição da enzima alfa-glicosidase, com valores de Cl_{50} na ordem de $\mu g/mL$, não se observando diferenças estatisticamente significativas entre eles ($p > 0,05$). Dessa forma, variações no método extrativo e nos solventes extratores empregados, e, conseqüentemente, nos teores dos marcadores químicos definidos, parecem não influenciar significativamente a inibição da enzima α -glicosidase.

Tabela 8 – Valores de pCl_{50} para a atividade inibitória *in vitro* da enzima α -glicosidase dos extratos de *H. speciosa*

Ensaio Extrativos*	pCl_{50}	pCl_{50} média ($n = 3$) \pm D.P.
EE-EC 1**	4,12 \pm 0,27	
EE-EC 2**	4,21 \pm 0,38	3,92 \pm 0,42^a
EE-EC 3**	3,44 \pm 0,04	
EE-E70 1**	3,65 \pm 0,29	
EE-E70 2**	3,87 \pm 0,39	3,69 \pm 0,15^a
EE-E70 3**	3,57 \pm 0,52	
EE-E50 1**	3,31 \pm 0,21	
EE-E50 2**	3,71 \pm 0,28	3,49 \pm 0,21^a
EE-E50 3**	3,43 \pm 0,75	
ME-24 1***	3,92 \pm 0,33	
ME-24 2***	4,08 \pm 0,34	4,03 \pm 0,10^a
ME-24 3***	4,09 \pm 0,46	
ME-72 1***	3,99 \pm 0,41	
ME-72 2***	4,11 \pm 0,47	3,98 \pm 0,13^a

ME-72 3^{***}	3,85 ± 0,39	
EE-PP 1^{**}	3,38 ± 0,06	
EE-PP 2^{**}	3,96 ± 0,51	3,67 ± 0,41^a
EE-PP 3^{**}	3,50 ± 0,54	

*Solventes extratores: EE-EC = etanol 96° GL; EE-E50 = solução hidroalcoólica a 50%; EE-E70 = solução hidroalcoólica a 70%; ME-24 = etanol 96° GL; ME-72 = etanol 96° GL; EE-PP = solução EtOAc/MeOH 1:1.

**Ensaio realizado empregando-se percolação.

***Ensaio realizado empregando-se maceração 24 h (ME-24) e 72 h (ME-72).

As médias identificadas com a mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p > 0,05$).

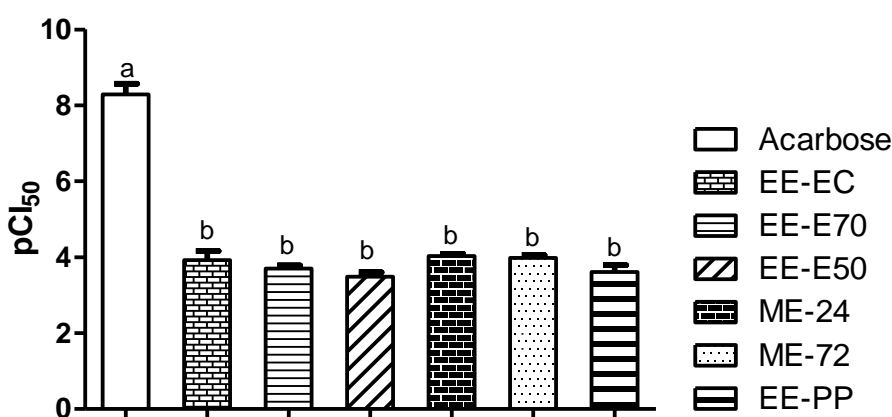
Fonte: Elaboração própria.

Existem diversos estudos descrevendo a atividade inibitória da enzima α -glicosidase por extratos vegetais e frações derivadas. Feng e colaboradores (2011) avaliaram frações do extrato etanólico de folhas de *Aquilaria sinensis* em ensaio *in vitro* de inibição da enzima. A fração em acetato de etila apresentou atividade inibitória significativa com CI_{50} de $0,366 \pm 0,045$ mg/mL (pCI_{50} de 3,44), enquanto o extrato aquoso de partes aéreas de *Brickellia cavanillesii* apresentou CI_{50} de 0,169 mg/mL (pCI_{50} de 3,77) (ESCANDÓN-RIVERA, et al., 2012). *Cichorium intybus* é utilizada na Anatólia oriental para o tratamento de diabetes e epilepsia, entre outros usos, e o extrato de folhas da espécie apresentou atividade inibitória da enzima α -glicosidase, com pCI_{50} de $2,37 \pm 0,08$ (DALAR & KONCZAK, 2014). Em um trabalho de Ranilla e colaboradores (2010), plantas medicinais da América Latina foram avaliadas quanto à atividade inibitória *in vitro* da enzima α -glicosidase.

As espécies medicinais que exibiram atividade inibitória mais pronunciada foram *Schinus molle*, *Smilax officinalis*, *Uncaria tomentosa* e *Phyllanthus niruri*, que induziram inibição de 35 a 99%, quando avaliadas na concentração de 2,5 mg/mL. Em um levantamento de plantas medicinais empregadas no tratamento de diabetes no México, 38 espécies foram avaliadas em ensaio de inibição da enzima α -glicosidase. Os valores de pCI_{50} variaram de 7,60 para o extrato de cascas de *Pinus* sp. até $1,62 \pm 0,13$ mg/mL para o extrato aquoso de sementes de *Cuminum cyminum* (MATA et al., 2013). Comparando-se os dados descritos na literatura com os resultados obtidos

para os extratos de *H. speciosa*, que apresentou pCl_{50} de, no mínimo, $3,49 \pm 0,21$ ou Cl_{50} de 0,324 mg/mL, fica evidente o potencial antidiabético da espécie.

Figura 14 – Representação gráfica dos valores de pCl_{50} da atividade inibitória *in vitro* da enzima α -glicosidase dos extratos de *H. speciosa*



Condições extrativas: vide Parte Experimental, item 4.7. Solventes extratores: EE-EC = etanol 96° GL; EE-E50 = solução hidroalcoólica a 50%; EE-E70 = solução hidroalcoólica a 70%; ME-24 = etanol 96° GL; ME-72 = etanol 96° GL; EE-PP = solução EtOAc/MeOH 1:1.

As médias identificadas com a mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p > 0,05$).

Fonte: Elaboração própria.

5.2 Análises de relação entre composição química e atividade biológica (CAR) para os extratos de *H. speciosa*

As técnicas analíticas modernas fornecem um grande volume de dados para um número grande de amostras, analisadas num intervalo de tempo curto. O resultado é uma matriz de dados multivariada, que requer o uso de procedimentos matemáticos e estatísticos para extrair o máximo de informação útil dos dados (ABAD-GARCÍA et al., 2012). Nesse contexto se insere a quimiometria, definida pela Sociedade Internacional de Quimiometria (International Chemometrics Society, ICS), como uma ciência que emprega métodos matemáticos e estatísticos multivariados para extrair o máximo de informação dos dados de um sistema ou processo químico

(GEMPERLINE, 2006). Métodos quimiométricos vêm sendo utilizados na atualidade para assegurar a autenticidade de espécies medicinais, como pode ser evidenciado na revisão de Gad e colaboradores (2013).

As Análises Hierárquicas de Agrupamento (HCA) e de Componentes Principais (PCA) são métodos quimiométricos de classificação não supervisionada que foram empregados neste trabalho. HCA destaca a existência de agrupamentos naturais entre amostras dentro do conjunto dos dados (ABAD-GARCIA et al., 2012). As PCA permitem reduzir a dimensionalidade dos dados, mantendo a maior parte da variância significativa. Através dos pesos das componentes principais mais significativas, é possível avaliar quais variáveis estão mais ou menos correlacionadas. De maneira recíproca, através dos escores, é possível avaliar melhor o comportamento dos objetos ou amostras (SOUZA et al., 2012b).

Neste trabalho, HCA e PCA foram utilizadas a fim de investigar a relação entre os teores dos marcadores químicos definidos para *H. speciosa* e as atividades biológicas determinadas (vasodilatação e inibição da enzima α -glicosidase). Objetivou-se, com essa análise, identificar os marcadores mais relacionados com as atividades biológicas, que poderão futuramente ser utilizados no monitoramento da qualidade da droga vegetal, extratos e eventuais produtos fitoterápicos.

Na rotina de controle de qualidade de extratos e frações de espécies vegetais, a composição química das amostras é frequentemente determinada, porém suas propriedades biológicas geralmente não são avaliadas. Uma abordagem mais moderna para o controle de qualidade desses produtos deveria combinar a análise química com a atividade biológica das amostras, uma vez que a relação entre essas variáveis está diretamente relacionada com a eficácia e segurança de produtos derivados de espécies vegetais (RONOWICZ et al., 2013).

O conjunto dos dados analisados constituiu uma matriz 18 x 6. As linhas constituem as amostras (os extratos oriundos dos seis ensaios extrativos realizados em triplicata - EE-EC, EE-E50, EE-E70, ME-24, ME-72 e EE-PP) (item 4.7, Figura 1). As colunas representam as variáveis utilizadas na análise: teores dos marcadores químicos (item 5.1.2) e pCI₅₀ relativa à atividade vasodilatadora (item 5.1.3) ou

atividade inibitória da enzima α -glicosidase (item 5.1.4). Os dados incluídos na matriz estão apresentados nas Tabelas 6, 7 e 8, nos itens 5.1.2, 5.1.3 e 5.1.4, respectivamente.

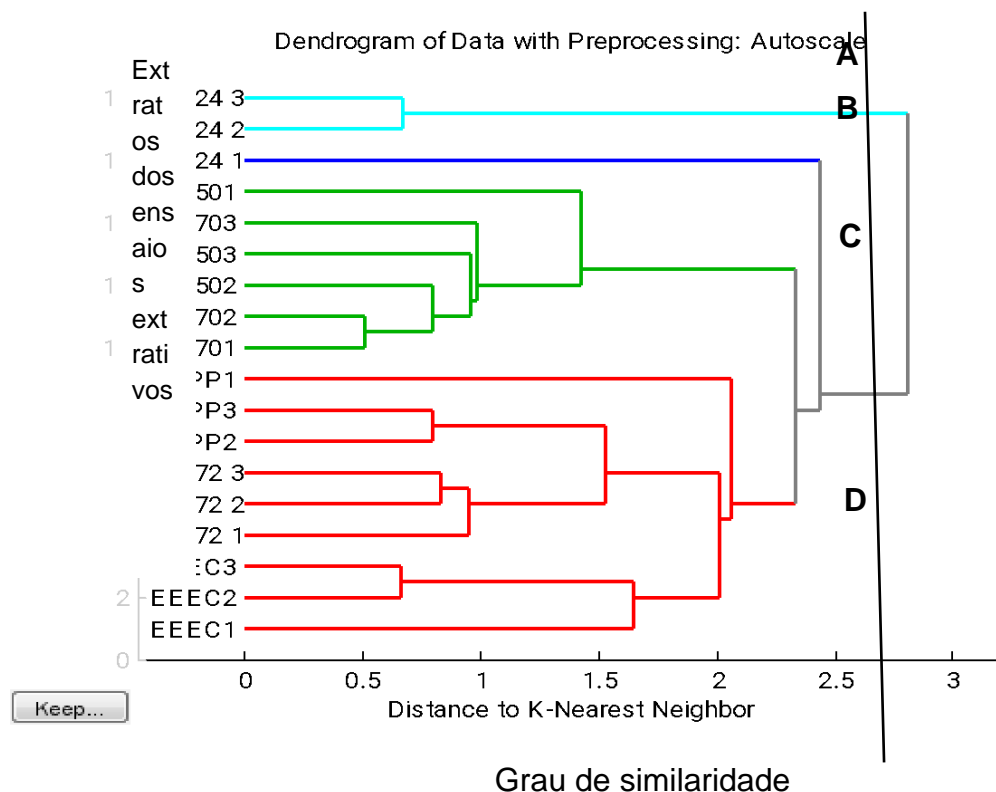
Nas análises de HCA e PCA efetuadas, os dados foram previamente auto-escalados. Esse pré-processamento consiste em extrair a média de cada variável de cada valor e, na sequência, dividir pelo respectivo desvio padrão. Essa operação garante um mesmo peso ou importância para todas as variáveis na análise quimiométrica (RONOWICZ et al., 2013).

5.2.1 Teores dos marcadores químicos versus atividade biológica

5.2.1.1 Análise de CAR para atividade vasodilatadora

O dendograma obtido pela análise de HCA empregando-se critério de agrupamento do vizinho mais próximo (*K-Nearest Neighbor*) está apresentado na Figura 15. Nessa análise exploratória, objetos similares são classificados em um mesmo cluster, sendo esta uma estratégia para obter padrões naturais dentro do conjunto de dados (RONOWICZ et al., 2013).

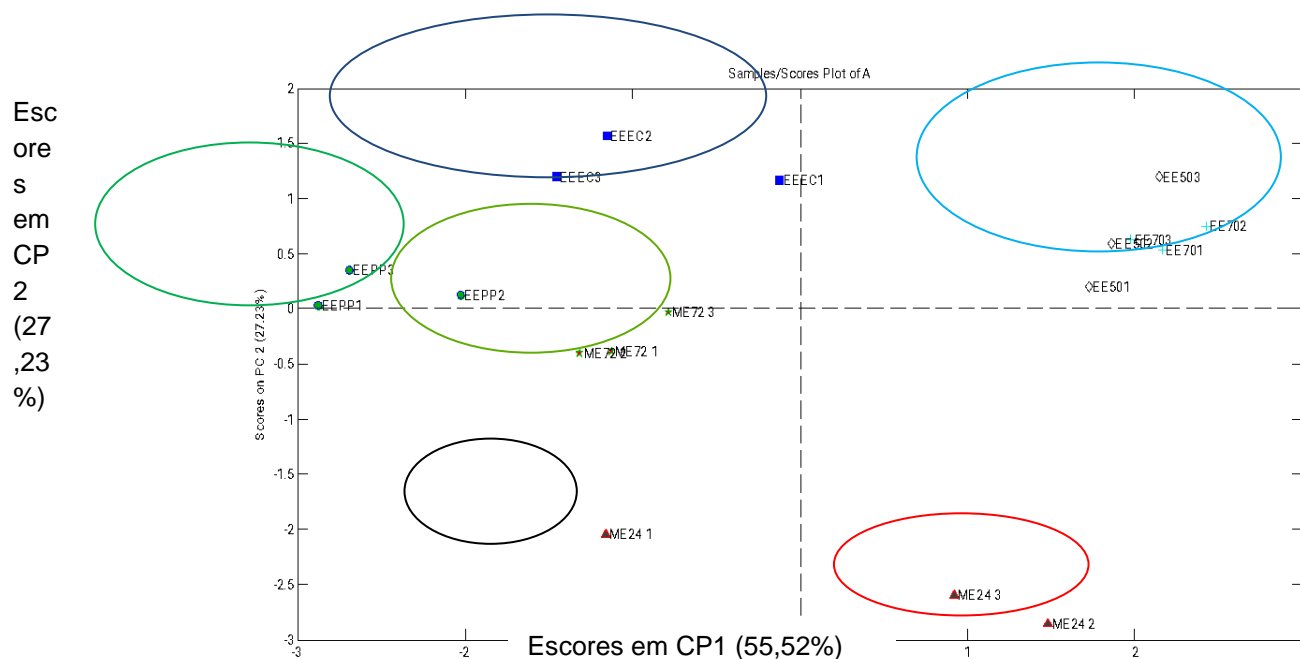
Figura 15 – Dendrograma obtido pela análise de cluster, empregando-se o método do vizinho mais próximo para a matriz de dados (18x6), considerando-se a atividade vasodilatadora dos extratos de *H. speciosa*



Observa-se, claramente, o agrupamento das amostras do conjunto de dados em quatro clusters: A, B, C e D. Os extratos 2 e 3 do ensaio ME-24 reuniram-se no cluster A. Todavia, o extrato 1 do mesmo ensaio apresentou-se isolado, gerando o cluster B, sendo indicativo de um *outlier*. O grupo C é composto pelos extratos obtidos nos ensaios com solução hidroetanólica (50 e 70%) como solvente extrator (EE-E50 e EE-E70). O último grupo, D, reuniu todos os demais extratos (Figura 15) e, dentro desse grupo, observam-se, grosseiramente, sub-grupos organizados de acordo com o ensaio extrativo (EE-PP, ME-72 e EE-EC).

A PCA resultou em um modelo com duas componentes principais (CP), que foram consideradas significativas. As duas CPs explicam 82,74% da variância total dos dados. Os resultados estão dispostos na Figura 16, na qual as amostras apresentam-se projetadas num plano definido pelas duas CPs.

Figura 16 – Análise de componentes principais dos extratos resultantes dos ensaios extrativos de *H. speciosa* e das variáveis teores de marcadores químicos e atividade vasodilatadora



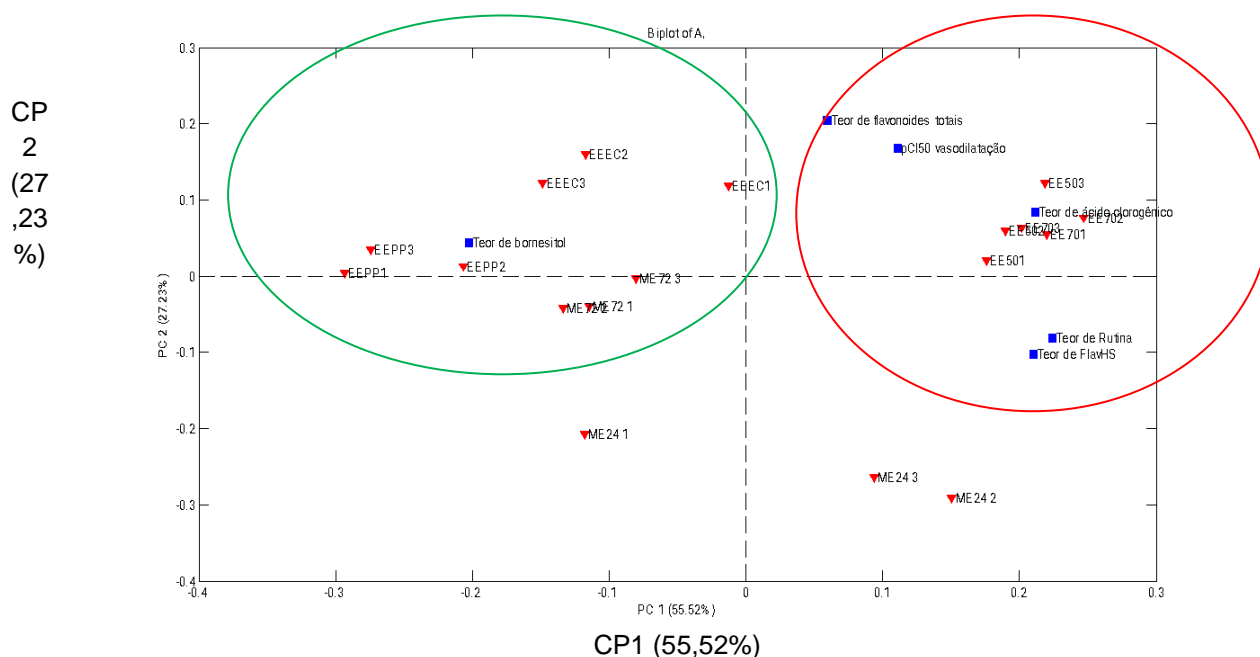
Fonte: Elaboração própria.

É possível visualizar seis grupos pela análise dos resultados obtidos por PCA (Figura 16). Três deles agrupam os três extratos obtidos dos ensaios ME-72, EE-PP e EE-EC. Outro grupo reúne os seis extratos obtidos por percolação com soluções hidroetanólicas EE-E50 e EE-E70. Conforme destacado anteriormente, eles também foram agrupados no cluster C na análise por HCA (Figura 15). Os últimos dois grupos reúnem os extratos do ensaio ME-24, sendo as réplicas 2 e 3 agrupadas em um grupo, enquanto 1 constitui um grupo isolado, reproduzindo os resultados observados na análise por HCA (Figura 16).

Na Figura 17 os resultados são apresentados na forma de um gráfico bivariado (*biplot*), o qual permite visualizar a influência de cada variável em cada objeto, através da observação simultânea dos escores (amostras) e dos pesos ou variáveis (*loadings*) do modelo.

Os escores em CP1, que explicam 55,52% da variância dos dados, discriminam claramente o grupo de extratos cujo solvente extrator foi a solução hidroalcoólica (EE-E50 e EE-E70) dos demais. As principais variáveis (pesos) relacionadas com essa divisão são teores de ácido clorogênico e, menos significativamente, valores de pCl_{50} , teores de flavonoides totais, de rutina e de FlavHS (Figura 17). Os teores dos marcadores citados apresentam-se maiores nos extratos hidroetanólicos, e a atividade vasodilatadora é mais pronunciada (maiores valores de pCl_{50}), sugerindo uma relação positiva entre os teores desses marcadores e a atividade biológica em questão. O outro grupo é composto pelos extratos dos ensaios extrativos EE-EC, EE-PP e ME-72, relacionando-se significativamente com a variável teor de bornesitol. A concentração de bornesitol nesses extratos é superior àquela do grupo de extratos EE-E50 e EE-E70, sugerindo, portanto, uma relação inversa entre o teor de bornesitol e a atividade vasodilatadora (Figura 17).

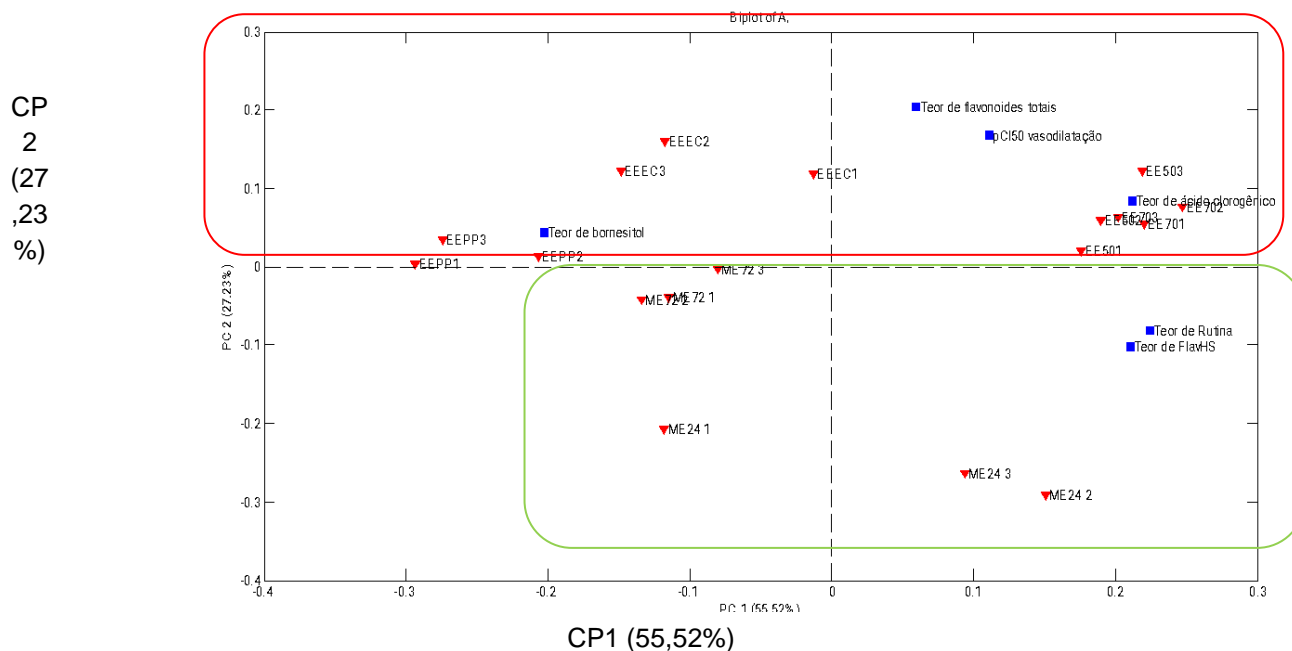
Figura 17 – Gráfico bivariado (*biplot*) obtido pela análise de componentes principais dos extratos resultantes dos ensaios extrativos de *H. speciosa* (em vermelho) e das variáveis teores de marcadores químicos e atividade vasodilatadora (em azul), destacando-se os grupos de extratos discriminados pela CP1



Fonte: Elaboração própria.

Os escores em CP2, que explicam 27,23% da variância dos dados, discriminam os extratos de acordo com a técnica extrativa, percolação ou maceração (Figura 18). As variáveis relacionadas aos extratos obtidos empregando-se maceração (ME-24 e ME-72) são teores de rutina e de FlavHS (encontram-se na parte negativa do eixo da CP2), enquanto as demais variáveis (teores de bornesitol, ácido clorogênico, flavonoides totais e pCl₅₀) situam-se na parte positiva do eixo da CP2, relacionando-se aos extratos obtidos por percolação (EE-EC, EE-E50, EE-E70 e EE-PP).

Figura 18 – Gráfico bivariado (*biplot*) obtido pela análise de componentes principais dos extratos resultantes dos ensaios extrativos de *H. speciosa* (em vermelho) e das variáveis teores de marcadores químicos e atividade vasodilatadora (em azul), destacando-se os grupos de extratos discriminados pela CP2



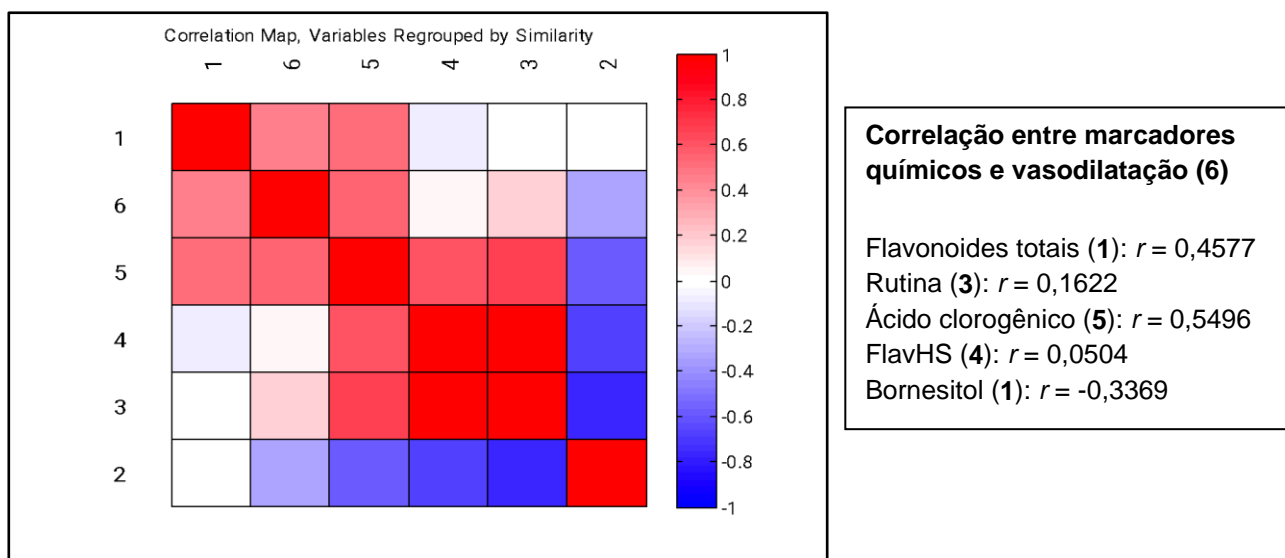
Fonte: Elaboração própria.

A Figura 19 apresenta o mapa de correlação entre as variáveis, obtido pelo mesmo *software*. A análise do gráfico permite verificar claramente a correlação positiva entre a atividade vasodilatadora e os teores de flavonoides totais ($r = 0,4577$), rutina ($r = 0,1622$) e ácido clorogênico ($r = 0,5496$) e, menos significativamente, entre a atividade biológica e o teor de FlavHS ($r = 0,0504$). Em conformidade com os resultados da PCA, observa-se correlação negativa entre a atividade vasodilatadora e o teor de bornesitol ($r = -0,3369$).

Os resultados da análise quimiométrica indicam uma correlação positiva entre a atividade vasodilatadora e os teores de ácido clorogênico, flavonóides totais, rutina e FlavHS e, em contrapartida, relação negativa entre a atividade biológica e o teor de bornesitol. No trabalho de Endringer (2007), a atividade inibitória da ECA de *H.*

speciosa foi relacionada aos marcadores químicos bornesitol e rutina. Em trabalho recente realizado com carboidratos e ciclitóis, bornesitol e *myo*-inositol apresentaram atividade inibitória da ECA com CI_{50} de 41,4 e 449,2 μ M, respectivamente (ENDRINGER et al., 2014). No entanto, os dados obtidos no presente trabalho sugerem que o bornesitol não contribui significativamente para a atividade vasodilatadora dos extratos de *H. speciosa*.

Figura 19 – Mapa de correlação obtido para as variáveis teores de flavonoides totais (1), bornesitol (2), rutina (3), FlavHS (4), ácido clorogênico (5) e valores de pCI_{50} no ensaio de vasodilatação (6) dos extratos de *H. speciosa*



Fonte: Elaboração própria.

A hipertensão arterial é uma doença multifatorial e mais de uma via pode estar envolvida no desenvolvimento da condição (VI DIRETRIZES BRASILEIRAS DE HIPERTENSÃO ARTERIAL, 2010). Conforme destacado na Revisão da Literatura (item 3.3), nosso grupo de pesquisa vem realizando estudos com *H. speciosa*, visando definir os mecanismos da ação anti-hipertensiva. Em um modelo *in vitro*, o extrato etanólico de folhas da espécie apresentou atividade inibitória da ECA (SERRA et al., 2005), enquanto a atividade vasodilatadora do extrato foi demonstrada em modelos *ex vivo* de anéis de aorta e de artéria mesentérica superior de ratos (FERREIRA et al.,

2007a; FERREIRA et al., 2007b). Uma fração padronizada, enriquecida em flavonoides e ciclitóis, apresentou atividade hipotensora em camundongos normotensos, via inibição da ECA, redução da produção de angiotensina II e aumento dos níveis séricos de nitrito, além de efeito vasodilatador direto pela ativação de PKA e de canais de potássio (SILVA, 2010; SILVA et al., 2011).

A fração também foi avaliada em ratos hipertensos em tratamento subcrônico, e a redução da pressão arterial observada foi associada à vasodilatação de artérias de resistência e aumento da concentração de NO (SILVA et al., 2012a).

Dessa forma, não se pode afirmar que bornesitol não possui relação com a atividade anti-hipertensiva de *H. speciosa*, embora o marcador tenha exibido discreta atividade vasodilatadora no mesmo modelo, com pCI_{50} de $2,9 \pm 0,2$ (resultados não publicados). Conforme descrito anteriormente, diversos mecanismos de ação estão envolvidos na atividade anti-hipertensiva induzida pelo extrato e pela fração padronizada de *H. speciosa* e a contribuição do bornesitol para este efeito deve se dar majoritariamente pela inibição da ECA (ENDRINGER et al., 2014), e não pela ação direta na aorta, provocando vasodilatação.

Em contrapartida, os resultados obtidos pela análise quimiométrica indicam uma correlação positiva entre a atividade vasodilatadora e o teor de rutina, corroborando resultados de Fusi e colaboradores (2003), que demonstraram potente atividade vasodilatadora desse flavonoide em anéis de aorta de ratos, com pCI_{50} de $5,65 \pm 0,31$. Uma significativa correlação positiva foi observada entre o teor de ácido clorogênico e a resposta biológica. Diversos estudos apontam a potencial relação entre a atividade anti-hipertensiva e a presença deste metabólito em várias espécies. A administração de ácido clorogênico a ratos hipertensos atenuou a hipertensão, a disfunção endotelial e a hipertrofia vascular, além de aumentar a biodisponibilidade de NO, provocando resposta vasodilatadora com pCI_{50} de $7,48 \pm 0,08$ (SUZUKI et al., 2006). Estes dados corroboram os resultados da análise quimiométrica obtidos no presente trabalho.

Em outro trabalho foi demonstrada a potencial atividade anti-hipertensiva do ácido clorogênico, principal constituinte de um extrato de café verde solúvel em água,

em ensaio com ratos hipertensos (SUZUKI et al., 2002), e posteriormente em estudo clínico com indivíduos com hipertensão leve (KOZUMA et al., 2005). O estudo também identificou os ácidos ferúlico e cafeico como metabólitos do ácido clorogênico possivelmente relacionados com a redução da pressão arterial, induzida pela administração de ácido clorogênico aos animais hipertensos (SUZUKI et al., 2002). Em um estudo com voluntários saudáveis, a ingestão de ácido clorogênico provocou redução estatisticamente significativa das pressões sistólica e diastólica no grupo tratado (MUBARAK et al., 2012). O ácido clorogênico, portanto, parece estar relacionado com a atividade vasodilatadora dos extratos de *H. speciosa*, contribuindo para a potencial atividade anti-hipertensiva da espécie.

É importante salientar, também, que derivados de drogas vegetais são misturas complexas e muitas vezes exibem sinergismo. O sinergismo pode ser resultante de vários efeitos, incluindo inibição da inativação de algum composto bioativo da mistura, promoção da absorção de certos constituintes do extrato/fração, melhoria da solubilidade de um ou de vários constituintes da mistura, ou devido à interação dos diversos compostos com diferentes alvos moleculares (WINK, 2008; WAGNER; ULRICH-MERZENIC, 2009). Assim, efeitos sinérgicos de constituintes bioativos em extratos de plantas explicariam a maior efetividade de derivados de drogas vegetais em relação a seus constituintes isolados (WAGNER; ULRICH-MERZENIC, 2009). Dessa forma, é factível supor que os constituintes presentes nos extratos de *H. speciosa* possam atuar de maneira sinérgica, via mecanismos de ação distintos, especialmente ao se considerar o aspecto multifatorial da hipertensão arterial.

Segundo a resolução RDC nº 14 da ANVISA (BRASIL, 2014), marcador é a substância ou classe de substâncias empregada como referência no controle da qualidade da matéria-prima vegetal e do fitoterápico, preferencialmente tendo correlação com o efeito terapêutico. Apesar da importância de se estabelecer marcadores químicos para espécies vegetais, em especial aquelas empregadas na produção de fitoterápicos, estudos com plantas brasileiras com esse propósito ainda são incipientes, especialmente aqueles que visam correlacionar a atividade biológica com os marcadores químicos (PINTO et al., 2002; SIMÕES & SCHENKEL, 2002).

Atualmente, um ou dois marcadores são empregados para avaliar a qualidade e autenticidade de drogas vegetais e seus derivados. Todavia, essa estratégia não fornece informações completas acerca da composição e qualidade dos produtos, uma vez que os efeitos terapêuticos são frequentemente associados a múltiplos constituintes da mistura (BANSAL et al., 2014). Como mencionado anteriormente, esses constituintes podem agir sinergicamente ou podem se comportar de maneira antagônica. A determinação da relação entre a composição química de matrizes complexas com a atividade biológica é, assim, um desafio para a área de pesquisa em produtos naturais.

Análises quimiométricas vêm sendo utilizadas para identificar constituintes de matrizes complexas relacionados com uma determinada resposta biológica, para a padronização e controle de qualidade de produtos naturais, bem como para averiguar a autenticidade desses produtos (BANSAL et al., 2014). Tais aplicações estão majoritariamente relatadas para produtos utilizados na Medicina Tradicional Chinesa (QIN et al., 2015; LI et al., 2015; CHAU et al., 2009; KONG et al., 2009; TISTAERT et al., 2009). Kvalheim e colaboradores (2011) relataram a aplicação da quimiometria para determinar a contribuição dos constituintes de misturas sintéticas de produtos naturais na atividade antioxidante. Chau et al. (2009) relataram a relação entre a atividade antioxidante e a composição quantitativa do extrato aquoso de *Puerariae lobatae*, empregando método quimiométrico supervisionado. A partir do modelo criado, é possível prever a atividade antioxidante de outras amostras não avaliadas no ensaio (CHAU et al., 2009). Em um trabalho recente, Ebrahimabadi e colaboradores (2016) investigaram a composição química quantitativa e qualitativa do óleo essencial de *Myrtus communis* L. por CG-DIC-EM. A atividade antimicrobiana do óleo foi avaliada frente a *Candida albicans*, *Shigella dysenteriae* e *Klebsiella pneumoniae*. Os dados obtidos foram utilizados para construção de modelos quimiométricos que possibilitaram identificar os principais constituintes relacionados à atividade biológica do óleo essencial da espécie (EBRAHIMABADI et al., 2016). De forma similar, métodos quimiométricos foram empregados para identificar os picos presentes no *fingerprint* de espécies de *Mallotus* responsáveis pela atividade antioxidante dos

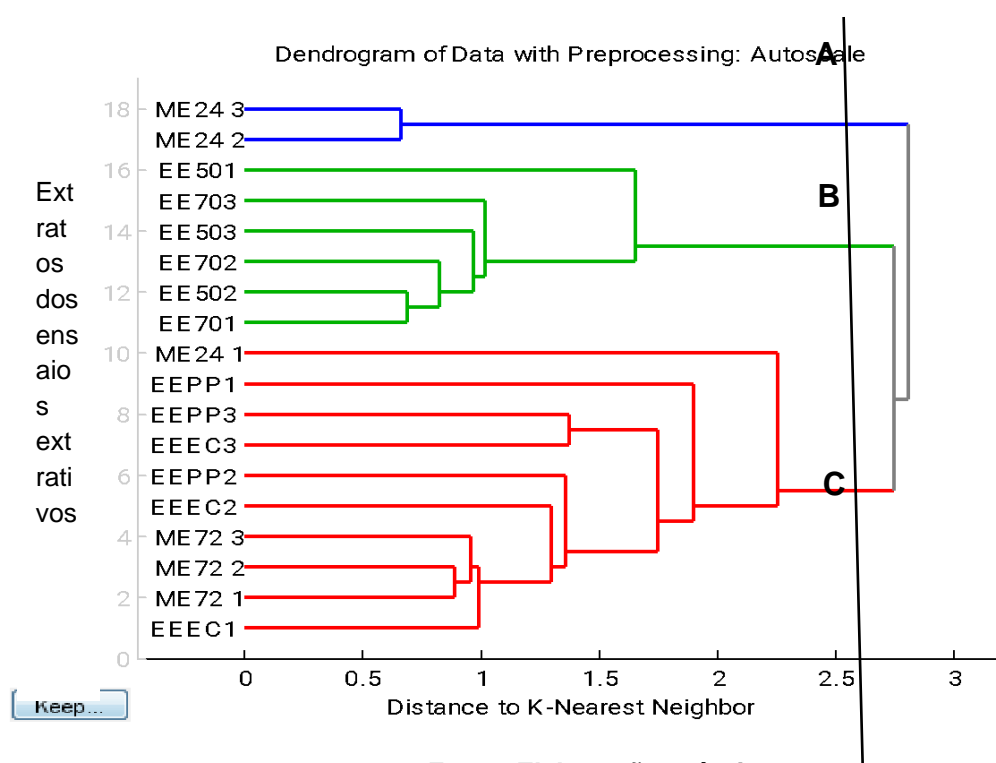
extratos (TISTAERT et al., 2009). Em outro estudo de Kulakowski et al. (2014), modelos quimiométricos foram construídos utilizando dados de composição química do extrato metanólico de *Phaleria nisidai*, obtidos por CLAE-EM, e de atividade imunoestimulante dos extratos, tendo sido identificados diterpenos envolvidos na atividade biológica descrita.

Pelo exposto, a quimiometria, como apresentado neste trabalho, constitui uma ferramenta estatística relevante para as pesquisas de CAR e, portanto, para a definição de marcadores químicos para as espécies vegetais. Em relação a *H. speciosa*, a análise quimiométrica forneceu subsídios para confirmar os marcadores químicos ácido clorogênico, rutina, FlavHS e flavonoides totais como aqueles relacionados com a atividade vasodilatadora da espécie.

5.2.1.2 Análise de CAR para atividade inibitória da enzima α -glicosidase

O dendograma obtido pela análise de HCA, empregando-se o algoritmo do vizinho mais próximo (*K-Nearest Neighbor*), para os extratos de *H. speciosa* e a atividade inibitória *in vitro* da enzima α -glicosidase está apresentado na Figura 20.

Figura 20 – Dendrograma obtido pela análise de cluster, empregando-se o algoritmo do vizinho mais próximo para a matriz de dados (18×6) considerando a atividade inibitória da enzima α -glicosidase dos extratos de *H. speciosa*



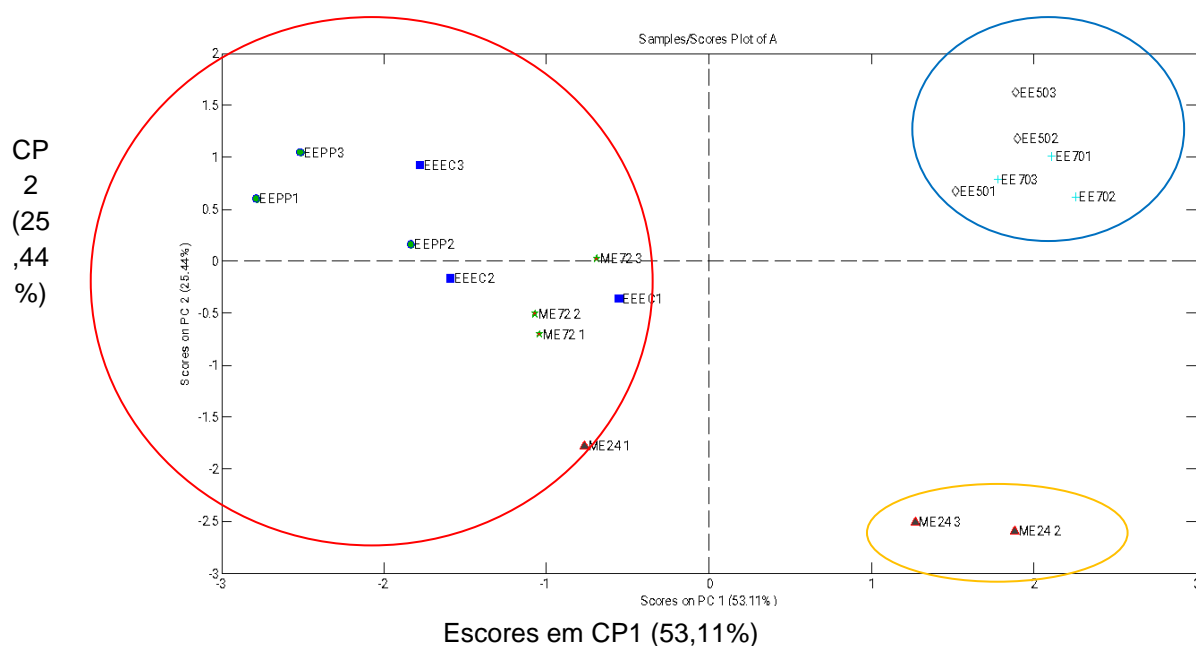
Fonte: Elaboração própria.

É possível observar o agrupamento das amostras em três clusters, denominados A, B e C. O cluster A contém as amostras 2 e 3 do ensaio extrativo ME-24; em B observa-se o agrupamento dos extratos obtidos com solução hidroetanólica, de maneira semelhante ao observado na HCA para atividade vasodilatadora (item 5.2.1), e o grupo C reúne os demais extratos dos ensaios extrativos (EE-PP, EE-EC, ME-72 e a amostra 1 de ME-24). No geral, as amostras foram reunidas de maneira similar à observada na análise quimiométrica para atividade vasodilatadora (item 5.2.1). Apesar de terem sido avaliadas atividades biológicas distintas, isso não significa que a composição química desses agrupamentos esteja relacionada com a atividade biológica determinada. Os agrupamentos parecem ter sido realizados considerando-se predominantemente a constituição química das amostras, tendo em

vista que dentre as seis variáveis avaliadas, cinco são relativas aos teores de marcadores.

A PCA resultou em um modelo com duas componentes principais (CP), que foram consideradas significativas. As duas CPs explicam 78,54% da variância total dos dados. Os resultados são apresentados na Figura 21, na qual as amostras encontram-se projetadas em um plano definido pelas duas CPs.

Figura 21 – Análise de componentes principais dos extratos de *H. speciosa* obtidos nos ensaios extrativos e os variáveis teores de marcadores químicos e atividade inibitória da enzima α -glicosidase, evidenciando os grupos de extratos discriminados pela CP1



Fonte: Elaboração própria.

É possível visualizar três diferentes grupos pela análise dos resultados obtidos por PCA (Figura 21). Um deles reúne os extratos obtidos nos ensaios extrativos EE-50 e EE-70, os quais também foram agrupados no cluster B da HCA (Figura 20). Em outro grupo estão reunidos os extrativos EE-EC, EE-PP e ME-72, conjunto também

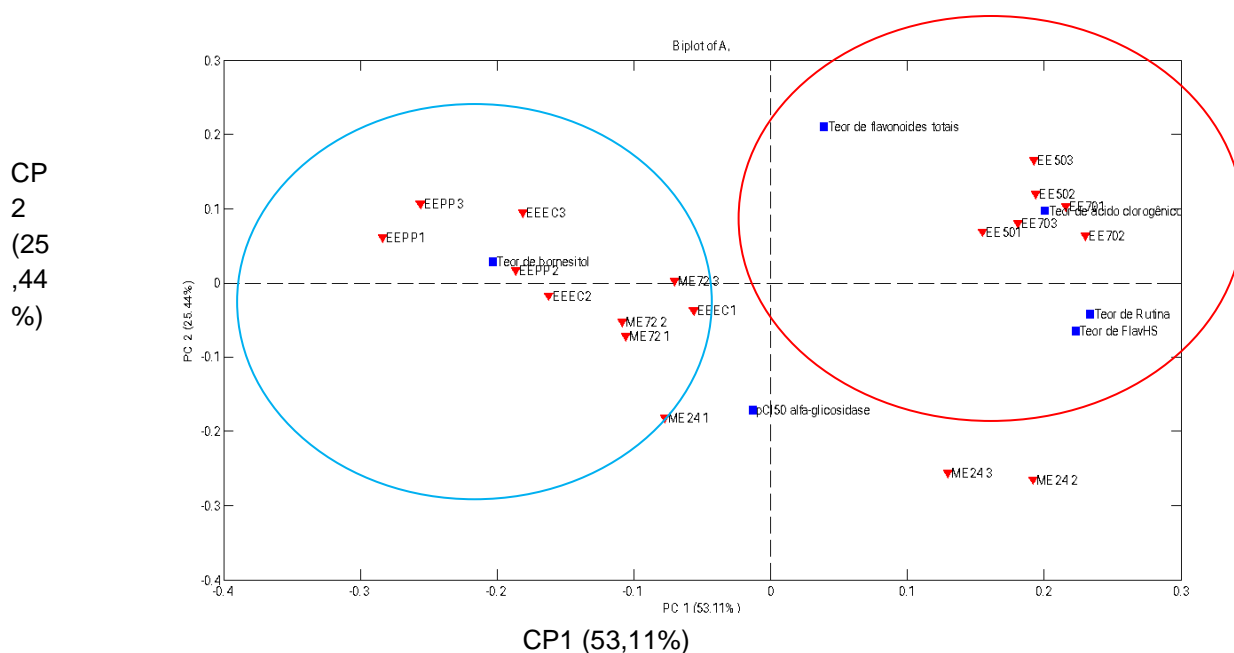
observado no cluster C da HCA (Figura 20). Por último, observa-se um grupo constituído pelos extratos ME-24 2 e 3, também evidenciados na HCA (Figura 20).

Na Figura 22, os resultados são apresentados na forma de um gráfico bivariado (*biplot*), o qual permite visualizar a influência de cada variável medida em cada objeto, através da observação simultânea dos escores (amostras) e dos pesos ou variáveis (*loadings*) do modelo.

Os escores em CP1, que explicam 53,11% da variância dos dados, discriminam o grupo de extratos dos ensaios extrativos EE-50 e EE-70, nos quais se empregou solução hidroetanólica como solvente extrator. Um comportamento similar foi observado para este grupo de extratos na PCA para atividade vasodilatadora, anteriormente descrita (item 5.2.1). As principais variáveis relacionadas com essa divisão são teor de ácido clorogênico e, menos significativamente, teores de rutina, FlavHS e flavonoides totais (Figura 22), sendo que os teores dos marcadores citados se apresentam maiores nesse grupo de extratos. O outro grupo de extratos, localizado no lado negativo do eixo da CP1, é composto pelos extrativos EE-EC, EE-PP, ME-24 1 e ME-72.

Este grupo relaciona-se significativamente com a variável teor de bornesitol, cuja concentração é, de maneira geral, superior nesses extratos. É possível observar, ainda, que a variável pCl_{50} para a atividade inibitória da enzima α -glicosidase apresenta-se próxima a zero do eixo da CP1. Dessa forma, independente do solvente usado (discriminado em CP1), os extratos apresentam atividades inibitórias semelhantes. Por outro lado, a maceração (parte negativa de CP2) parece produzir extratos com maior atividade inibitória dessa enzima.

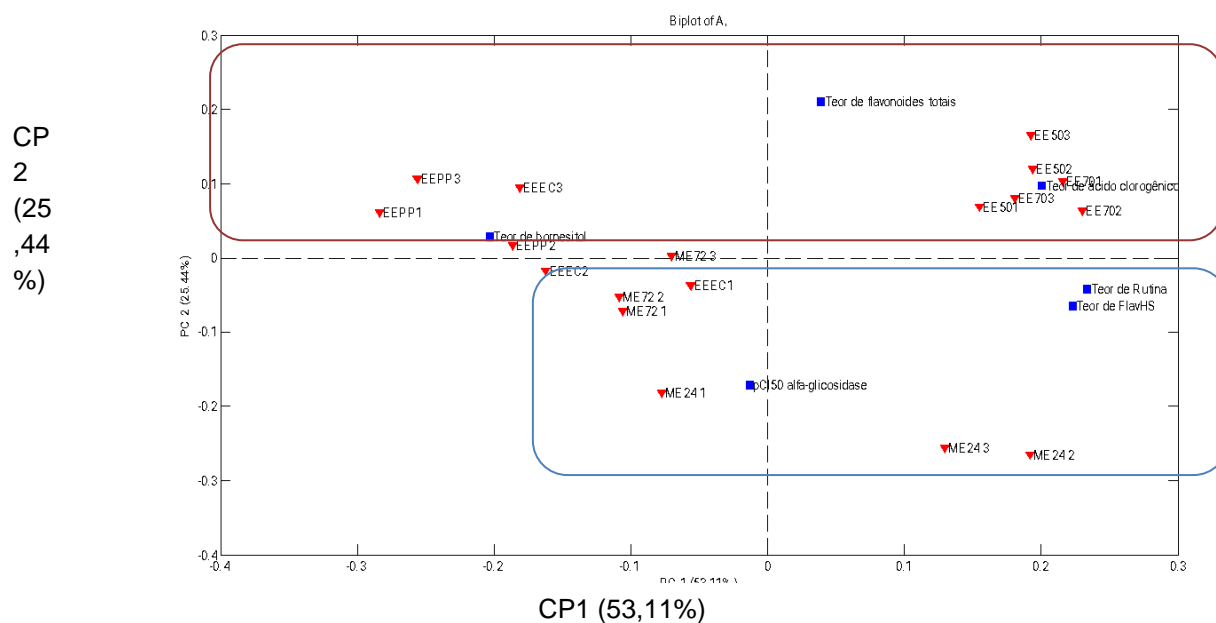
Figura 22 – Gráfico bivariado (*biplot*) obtido pela análise de componentes principais dos extratos de *H. speciosa* resultantes dos ensaios extrativos (em vermelho) e das variáveis teores de marcadores químicos e atividade inibitória da enzima α -glicosidase (em azul), destacando-se os grupos de extratos discriminados pela CP1



Fonte: Elaboração própria.

Os escores em CP2, que explicam 25,44% da variância dos dados, discriminam, a grosso modo, os extratos de acordo com a técnica extrativa empregada, percolação ou maceração (Figura 23). As variáveis relacionadas aos extratos obtidos empregando-se maceração (ME-24 e ME72) são teores de rutina e FlavHS, bem como valores de pCl_{50} , cujos pesos estão localizados na parte negativa do eixo da CP2. Já as variáveis teores de bornesitol, ácido clorogênico e flavonoides totais, distribuídas na parte positiva do eixo da CP2, relacionam-se aos extratos obtidos por percolação (EE-EC, EE-50, EE-70 e EE-PP).

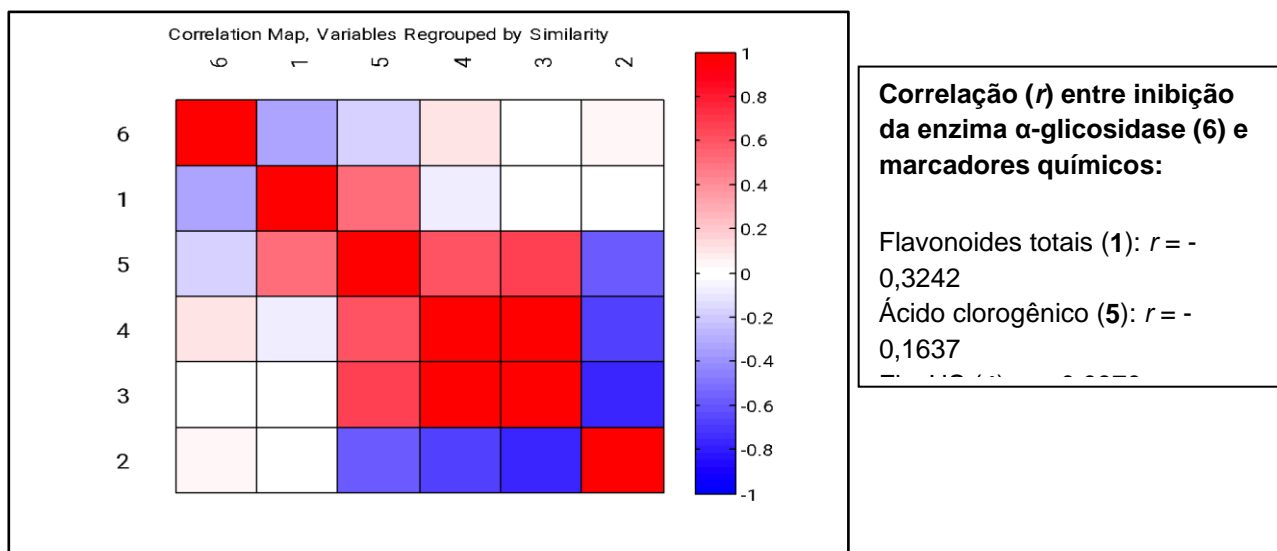
Figura 23 – Gráfico bivariado (*biplot*) obtido pela análise de componente principal dos extratos de *H. speciosa* resultantes dos ensaios extrativos (em vermelho) e das variáveis teores de marcadores químicos e atividade inibitória da enzima α -glicosidase (em azul), destacando-se os grupos de extratos discriminados pela CP2



Fonte: Elaboração própria.

A Figura 24 apresenta o mapa de correlação entre as variáveis analisadas, obtido pelo mesmo *software*. A análise do gráfico indica existência de correlação positiva, de baixa intensidade, entre a atividade inibitória da enzima α -glicosidase e os teores de FlavHS ($r = 0,0970$) e bornesitol ($r = 0,0362$). Por outro lado, observa-se correlação negativa entre a atividade biológica e os teores de flavonoides totais ($r = -0,3242$) e de ácido clorogênico ($r = -0,1637$).

Figura 24 – Mapa de correlação obtido para as variáveis teores de flavonoides totais (1), bornesitol (2), rutina (3), FlavHS (4), ácido clorogênico (5) e valores de pCl₅₀ para atividade inibitória da enzima α -glicosidase (6) dos extratos de *H. speciosa*



Fonte: Elaboração própria.

Apesar dos resultados apresentados não demonstrarem uma relação entre a atividade inibitória da enzima α -glicosidase e o teor de rutina nas matrizes avaliadas, dados da literatura relatam a atividade inibitória da enzima por este flavonoide, com valores distintos de Cl₅₀: 0,74 mM (JO et al., 2009-2010), 0,196 mM (LI et al., 2009a) e 13,19 μ M (HONG et al., 2013). Vale ressaltar que a análise por PCA a partir de amostras complexas, como os extratos vegetais, permite avaliar a participação de determinado constituinte presente na amostra na atividade biológica da matriz. Assim, não é possível avaliar a ação da substância isoladamente, o que pode explicar os resultados deste trabalho. Ácido clorogênico, por outro lado, apresentou correlação negativa pouco significativa com a atividade biológica. No estudo de Gao e colaboradores (2008), ácido clorogênico apresentou apenas discreta inibição da enzima α -glicosidase (menos de 20% na concentração de 1 mM), enquanto no trabalho de Tan e colaboradores (2013) o composto não apresentou atividade inibitória significativa da enzima. Já Ishikawa e colaboradores (2007) relataram a

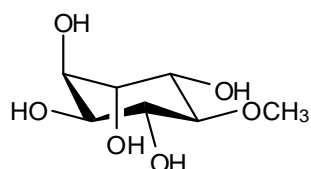
atividade inibitória da enzima α -glicosidase para esta substância, com CI_{50} de $2,99 \pm 0,38$ mM. Esses dados indicam que a atividade inibitória do ácido clorogênico sobre a α -glicosidase é pouco intensa, situando-se na faixa de milimolar.

Uma fraca correlação positiva foi observada entre o teor de bornesitol e a atividade inibitória da enzima α -glicosidase ($r = 0,0362$). Bornesitol foi avaliado por nosso grupo no ensaio de inibição da enzima α -glicosidase e não apresentou atividade (pCI_{50} superior a 1 mg/mL, não tendo apresentado efeito inibitório). Por outro lado, alguns trabalhos na literatura relatam significativa atividade inibitória da enzima α -glicosidase para derivados insaturados de ciclitóis, bem como para amino e imino ciclitóis (GUERREIRO et al., 2013; WORAWALAI et al., 2012; ARCELLI et al., 2001).

O potencial dos ciclitóis para o controle da diabetes é grande. O pinitol (**35**), um ciclitol encontrado em grãos de soja, foi avaliado em um ensaio clínico com 30 pacientes (dose de 600 mg de pinitol ou placebo duas vezes ao dia) e reduziu significativamente a glicemia em jejum, a insulina, a HbA1c, a fructosamina e o índice de resistência à insulina. Observou-se, também, redução do colesterol total, do LDL-colesterol, da razão LDL/HDL-colesterol e das pressões sistólica e diastólica, além de aumento do HDL-colesterol, indicando benefícios na redução do risco cardiovascular em pacientes com DM2 (KIM et al., 2005).

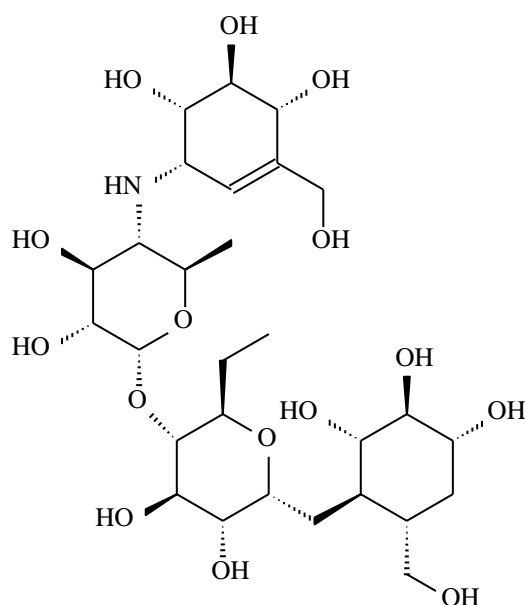
Acarbose (1) é um produto natural isolado de espécies de *Streptomyces*, que inibe a enzima α -glicosidase intestinal, empregado no tratamento de DM2 e como controle positivo nos ensaios de inibição da enzima (GLOSTER, 2012). Estruturalmente, a acarbose (1) é um pseudo-tetrassacarídeo. No presente trabalho, o bornesitol não inibiu significativamente a α -glicosidase e a análise quimiométrica realizada não indicou a participação deste ciclitol no efeito dos extratos de *H. speciosa*. Porém, considerando a atividade inibitória da α -glicosidase relatada para outros ciclitóis, o bornesitol apresenta-se como um bom substrato para transformações químicas, visando esta atividade biológica. Também não se pode descartar o efeito sinérgico do bornesitol com outros constituintes da matriz para a atividade de *H. speciosa*.

43 galato de epigalocatequina



Fonte: Elaboração própria via *Chemdraw*

44 ácido ursólico



Fonte: Elaboração própria via *Chemdraw*

Os dados da análise quimiométrica não nos permitiram estabelecer relações fortes entre o teor dos marcadores quantificados e a inibição da α -glicosidase. Essa ausência de correlação pode ser resultante da faixa de concentração desses compostos nos extratos testados, ou da existência de antagonismo com outros constituintes presentes nas matrizes. Além disso, é possível que outros compostos, distintos dos avaliados nesta análise, estejam associados à atividade inibitória da enzima α -glicosidase. Essa hipótese é reforçada pelos resultados descritos do item

5.3.2, que indicam compostos lipofílicos como os responsáveis pela atividade antidiabética da espécie.

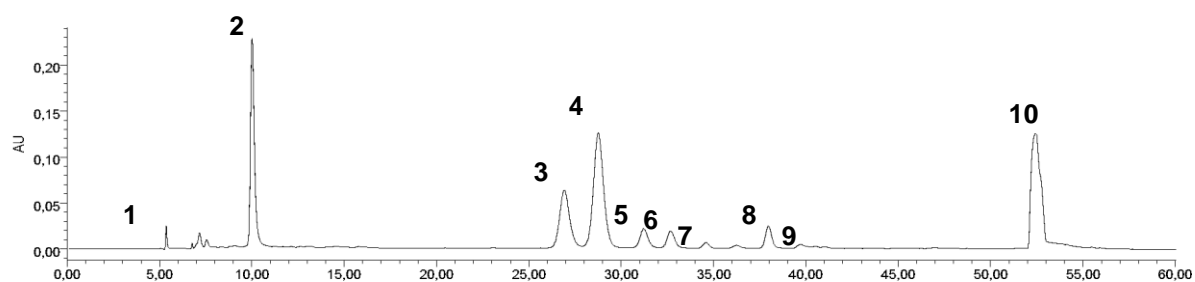
5.2.2 Área dos picos versus atividades biológicas

A complexidade de derivados de drogas vegetais impossibilita a identificação de todos os constituintes, o que torna menos robustas as análises de relação entre composição química e atividade biológica. Muitos dos constituintes não identificados e/ou quantificados nos extratos/frações de espécies vegetais podem estar relacionados com a eficácia e segurança do derivado da droga vegetal (RONOWICZ et al., 2013). Os dados dos perfis cromatográficos fornecem um maior volume de informações do que aqueles provenientes da identificação e quantificação de marcadores químicos individuais (XIE et al., 2006). Assim, objetivando-se avaliar a relação entre um maior número de constituintes nos extratos de *H. speciosa*, sejam eles dos marcadores quantificados ou dos constituintes não identificados (itens 5.1.1 e 5.1.2), e as atividades inibitória da enzima α -glicosidade e vasodilatadora, selecionaram-se os 10 picos majoritários dos cromatogramas para análise quimiométrica.

Os picos foram selecionados considerando-se sua abundância relativa (áreas maiores que 180.000) e resolução superior a 1,5, calculada nos testes de adequabilidade do sistema pelo programa Empower 2 (Waters). Valores de resolução menores que dois são aceitos para testes de adequabilidade do sistema em matrizes biológicas e análise de traços, no caso de análises quantitativas (DONG et al., 2001). A condição cromatográfica empregada está descrita no item 4.7.1. A título de exemplo, a Figura 25 apresenta um perfil cromatográfico obtido para um dos extratos, bem como os picos selecionados para a análise. A Tabela 9 apresenta as áreas dos picos selecionados. Os valores de pCl_{50} dos extratos estão descritos nas Tabelas 7 e 8. Destaca-se que os picos referentes aos marcadores químicos ácido clorogênico,

FlavHS e rutina foram inseridos nesta análise. Porém, como bornesitol não absorve na região do UV, este marcador não foi incluído nessa avaliação.

Figura 25 - Cromatograma obtido por CLAE-DAD para o extrato EE-EC (item 4.7 e 5.1) de folhas de *H. speciosa*. Os picos utilizados na análise quimiométrica estão numerados no cromatograma. (1) ácido quínico, (2) ácido clorogênico, (3) FlavHS, (4) rutina e (9) quercitrina



Condições cromatográficas: vide Parte Experimental, item 4.7.1; detecção em λ de 350 nm.

Fonte: Elaboração própria.

Tabela 9 – Áreas dos picos selecionados para análise quimiométrica, obtidas a partir dos perfis cromatográficos dos extratos

Técnica extrativa	Ensaio Extrativos	Pico 1 (TR~5,4)	Pico 2 (TR~10,2)	Pico 3 (TR~27,4)	Pico 4 (TR~29,3)	Pico 5 (TR~31,7)	Pico 6 (TR~33,0)	Pico 7 (TR~35,0)	Pico 8 (TR~38,1)	Pico 9 (TR~40,0)	Pico 10 (TR~52,4)	
Percolação	EEEC 1	231678	2675457	3289846	6811033	319224	269088	210302	861823	297742	6116574	
	EEEC 2	177226	2649121	3230128	6609228	298900	232450	220013	785749	250816	5878886	
	EEEC 3	195667	2703541	3057200	6420708	295113	252577	190789	813671	261779	5724151	
	EEE70 1	509838	3297430	3890359	8302037	284840	281924	245756	977667	352054	8691295	
	EEE70 2	393838	3117633	3861682	8139704	296437	294080	243349	959294	358779	8090881	
	EEE70 3	356159	2929852	3755539	7912753	272450	280282	234703	928578	348246	7596191	
	EEE50 1	540576	3241803	4000628	8421464	305262	298302	248466	994086	360867	1908056	
	EEE50 2	568133	3407778	4066276	8575642	314564	314564	253836	1015210	362880	1953311	
	EEE50 3	517594	3161991	4028218	8462349	300989	301478	254224	998288	367528	2090636	
	EEPP 1	125955	1912691	2867728	5806717	284024	189388	190167	714918	231707	4820148	
	EEPP 2	153590	2476366	3369167	6693172	295271	238447	227619	775696	258843	6064873	
	EEPP 3	150287	2430336	3225857	6429874	281063	227067	218532	738505	231616	6001149	
	Maceração	ME24 1	284432	2550821	3263575	6663386	317260	249871	202670	821339	283761	5948737
		ME24 2	283503	2713949	4372590	9073638	372488	314846	276329	1076021	387814	7545358
		ME24 3	268296	2642635	4169415	8602771	369799	307413	265275	1039520	370940	7211338
ME72 1		229716	2433226	3370595	6761605	341063	272431	214210	842271	303312	5835970	
ME72 2		284939	2558243	3281680	6687741	318506	246873	200971	817454	270399	6106472	

ME72 3	282197	2625940	3361072	6785248	329642	264722	211366	840346	295096	6045096
--------	--------	---------	---------	---------	--------	--------	--------	--------	--------	---------

Fonte: Elaboração própria

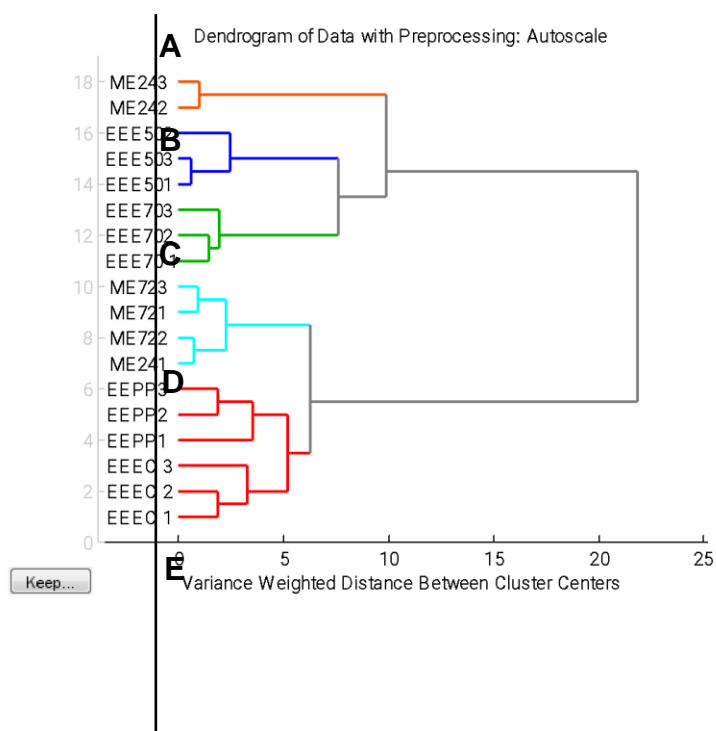
Conforme discutido no item 5.1.1, a análise do perfil cromatográfico dos extratos possibilitou identificar o pico com TR de 5,4 min (pico 1) como sendo o ácido quínico e os picos com TR entre 31 e 44 min como sendo derivados flavonoídicos, devido aos máximos de absorção registrados nos espectros de UV obtidos *on line* pelo detector DAD. Assim, os picos 3 (FlavHS), 4 (rutina), 5, 6, 7, 8, e 9 são derivados flavônicos, sendo que o pico 9 foi identificado como quercitrina, como descrito no item 5.1.1. O pico 10, como também descrito nesse mesmo item, corresponde a compostos lipofílicos.

HCA e PCA foram utilizadas a fim de investigar a relação entre as áreas dos picos definidos nos extratos de *H. speciosa* e as atividades vasodilatadoras e inibitória da enzima α -glicosidase. O conjunto dos dados analisados constituiu uma matriz 18x12. As linhas constituem as amostras (os extratos oriundos dos ensaios extrativos), pertencentes a seis categorias, cada qual representada por três extratos (o ensaio extrativo foi realizado em triplicata): EE-EC, EE-E50, EE-E70, ME-24, ME-72 e EE-PP (item 4.7). As colunas representam as variáveis utilizadas na análise: as áreas dos picos definidos (Figura 25 e Tabela 9) e valores de pCl_{50} relativos à atividade vasodilatadora (Tabela 7; item 5.1.3) e atividade inibitória da enzima α -glicosidase (Tabela 8; item 5.1.4).

Os dados foram previamente auto-escalados para as análises de HCA e PCA.

O dendograma obtido pela análise de HCA empregando-se critério de agrupamento pelo Método de Ward está apresentado na Figura 26.

Figura 26 – Dendrograma obtido pela análise de cluster, empregando-se o método de Ward para a matriz de dados (18×12), considerando as atividades vasodilatadora e inibitória da enzima α -glicosidase dos extratos de *H. speciosa*. (Extratos dos ensaios extrativos)



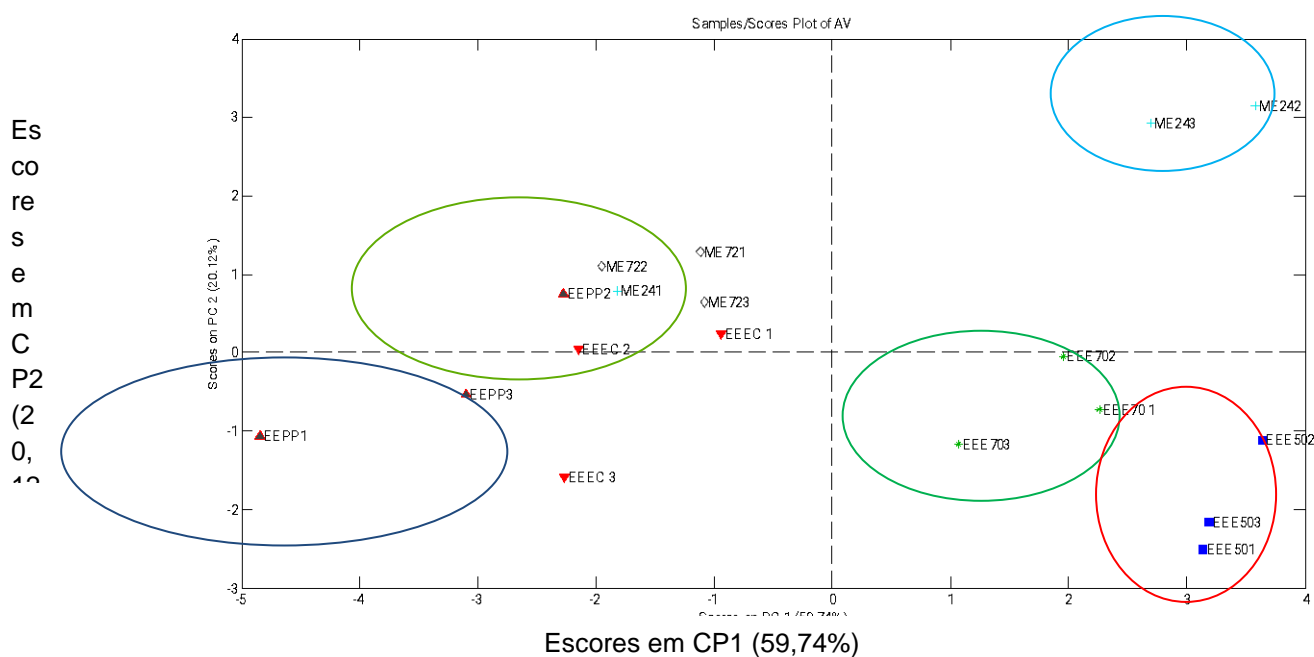
Fonte: Elaboração própria.

É possível observar o agrupamento das amostras do conjunto de dados em cinco clusters: A, B, C, D e E. Os extratos 2 e 3 do ensaio ME-24 reuniram-se no cluster A, enquanto o extrato 1 desse ensaio apresentou-se agrupado aos ensaios ME-72 no cluster D, indicando novamente tratar-se de um *outlier*, conforme observado nas análises anteriores (item 5.2.1). O grupo B é composto pelos extratos obtidos nos ensaios com solução hidroetanólica a 50% como solvente extrator (EE-E50), enquanto o cluster C inclui os extratos obtidos também com solução hidroetanólica, porém a 70% (EE-E70). No grupo D, reúnem-se os extratos obtidos empregando-se maceração por 72 hs e ME-24 1. Os demais extratos, ensaios EE-EC e EE-PP,

compõem o cluster E, sendo possível verificar a subdivisão dos extratos obtidos a partir desses ensaios extrativos.

A PCA forneceu um modelo com duas componentes principais (CP), que foram consideradas significativas. As duas CPs explicam 79,86% da variância total dos dados e os resultados estão dispostos na Figura 27, na qual as amostras apresentam-se projetadas num plano definido pelas duas CPs.

Figura 27 – Análise de componentes principais dos extratos oriundos dos ensaios extrativos de *H. speciosa* e das variáveis área dos picos majoritários nos perfis cromatográficos dos extratos e atividade vasodilatadora



Fonte: Elaboração própria.

Cinco grupos foram discriminados pela PCA (Figura 27), com perfil similar ao observado na análise por HCA (Figura 26): os extratos ME24 2 e 3 foram reunidos em um mesmo grupo; os extratos do ensaio ME72 foram agrupados juntamente com os extratos EE-PP 2, EE-EC 1 e 2 em outro grupo; os extratos EE-PP 1 e 3 agruparam-se com o extrato EE-EC 3 e, por último, os ensaios EE-E70 constituem um grupo distinto, assim como os extratos do ensaio EE-E50.

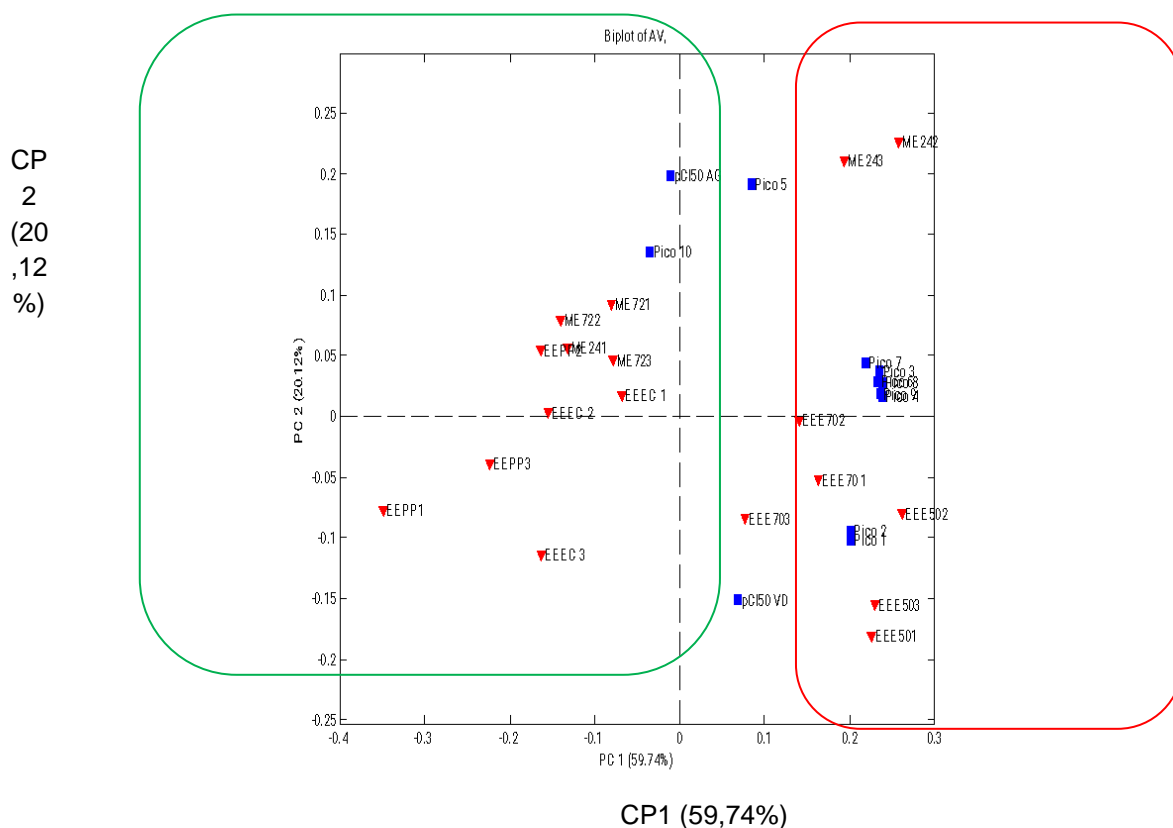
Na Figura 28, os resultados são apresentados na forma de um gráfico bivariado (*biplot*), que permite avaliar a influência de cada variável em cada objeto, pela observação simultânea dos escores (amostras) e dos pesos ou variáveis (*loadings*) do modelo.

Os escores em CP1, que explicam 59,74% da variância dos dados, discriminam um grupo de extratos constituído pelos ensaios extrativos EE-EC, EE-PP, ME-72 e ME-24 1 (circulado em verde), e um segundo grupo de extratos, constituído pelos extratos obtidos nos ensaios ME-24 2 e 3, EE-E50 e EE-E70 (circulado em vermelho) (Figura 28). A divisão obtida não parece estar relacionada com a técnica extrativa nem com o solvente extrator empregado em cada ensaio. Observa-se que o grupo de extratos circulados em verde associa-se com as variáveis “pico 10” e “pCl₅₀ para atividade inibitória da enzima α -glicosidase”. Isso sugere uma relação positiva entre os compostos de baixa polaridade e a atividade em questão, corroborando os resultados *in vivo* de atividade antidiabética obtidos para as frações de *H. speciosa* (item 5.3.2).

Em contrapartida, o grupo de extratos circulado em vermelho relaciona-se às demais variáveis: picos 1 a 9 e pCl₅₀ para a atividade vasodilatadora. Esta, parece se relacionar positivamente com o teor dos picos 1 e 2 (ácido clorogênico). Menos pronunciadamente, a atividade vasodilatadora é também relacionada aos picos 3, 4 e 6 a 9, caracterizados como compostos flavonoídicos (item 5.1.1), e pouco relacionada à variável pico 5, mais distante da pCl₅₀ na projeção. Os dados obtidos corroboram os resultados da análise anterior (item 5.2.1.1), na qual a pCl₅₀ da atividade vasodilatadora relacionou-se positivamente com os teores de ácido clorogênico, FlavHS, flavonoides totais e rutina.

Ademais, o grupo de extratos que apresentou atividade biológica mais pronunciada na presente análise (EE-E50, EE-E70 e ME-24) também corresponde ao evidenciado pela análise anterior. A análise sugere, ainda, uma relação inversa entre o teor de substâncias de caráter lipofílico, pico 10 e a atividade vasodilatadora, relação também observada para a concentração de bonesitol e a pCl₅₀ para a atividade vasodilatadora (item 5.2.1.1).

Figura 28 – Gráfico bivariado (*biplot*) obtido pela análise de componentes principais dos extratos resultantes dos ensaios extrativos de *H. speciosa* (em vermelho) e das variáveis área dos picos majoritários nos perfis cromatográficos dos extratos e atividade vasodilatadora (em azul), destacando-se os grupos de extratos discriminados pela CP1

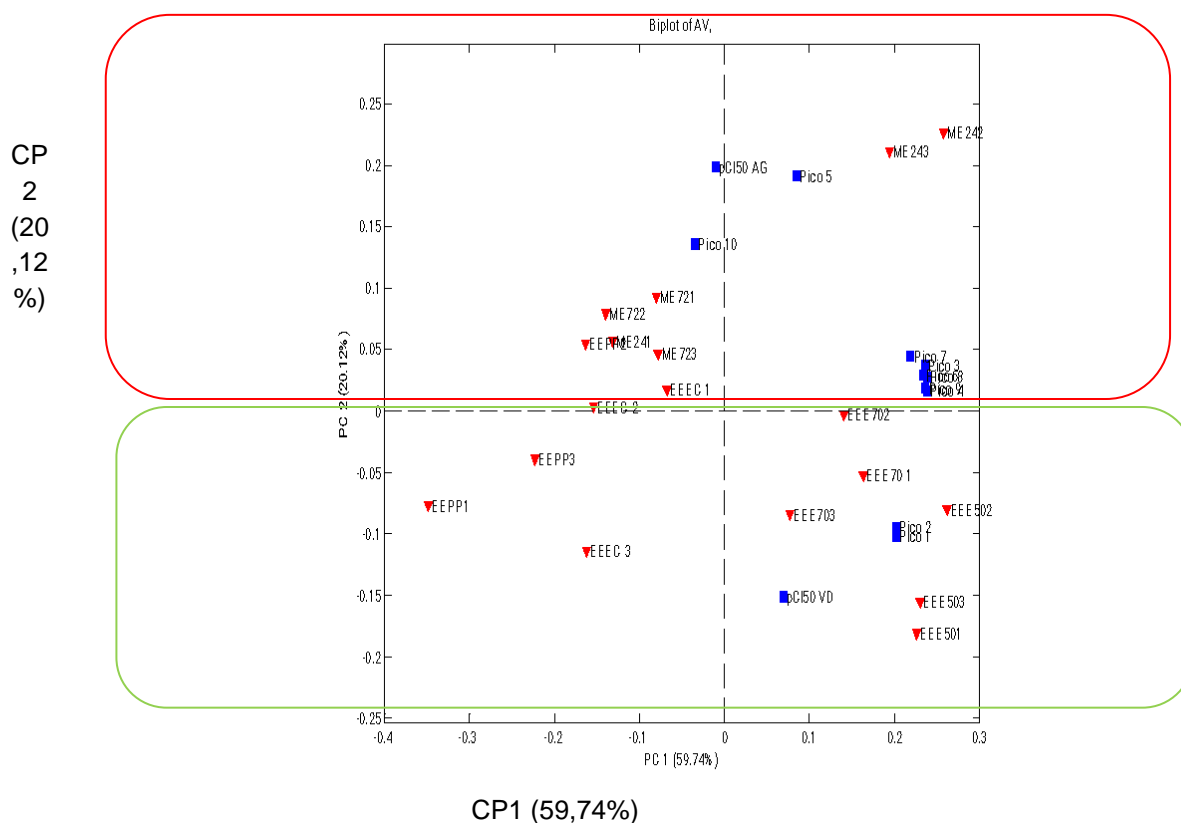


Fonte: Elaboração própria.

Os escores em CP2 explicam 20,12% da variância dos dados e discriminam, a grosso modo, os extratos de acordo com o solvente extrator empregado: etanol comercial ou outro solvente (solução hidroetanólica ou metanol: acetato de etila 1:1) (Figura 29). As variáveis relacionadas aos extratos obtidos empregando-se etanol comercial (EE-EC, ME-24 e ME-72) são os picos 3 a 10 e valores de pCl_{50} para a atividade inibitória da α -glicosidase (parte positiva do eixo da CP2). Já as variáveis picos 1 e 2 e valores de pCl_{50} para atividade vasodilatadora situam-se na parte negativa do eixo da CP2, associando-se aos extratos obtidos com solução hidroetanólica e metanol: acetato de etila 1:1 (EE-E50, EE-E70 e EE-PP). É importante

destacar que o extrato EEPP 2, nesta análise, aparece no eixo positivo, associando-se aos extratos obtidos com etanol comercial. Por outro lado, o extrato EE-EC3 apresenta-se no eixo negativo, relacionando-se aos extratos obtidos com outros solventes extratores.

Figura 29 – Gráfico bivariado (*biplot*) obtido pela análise de componentes principais dos extratos resultantes dos ensaios extrativos de *H. speciosa* (em vermelho) e das variáveis área dos picos majoritários nos perfis cromatográficos dos extratos e atividade vasodilatadora (em azul), destacando-se os grupos de extratos discriminados pela CP2



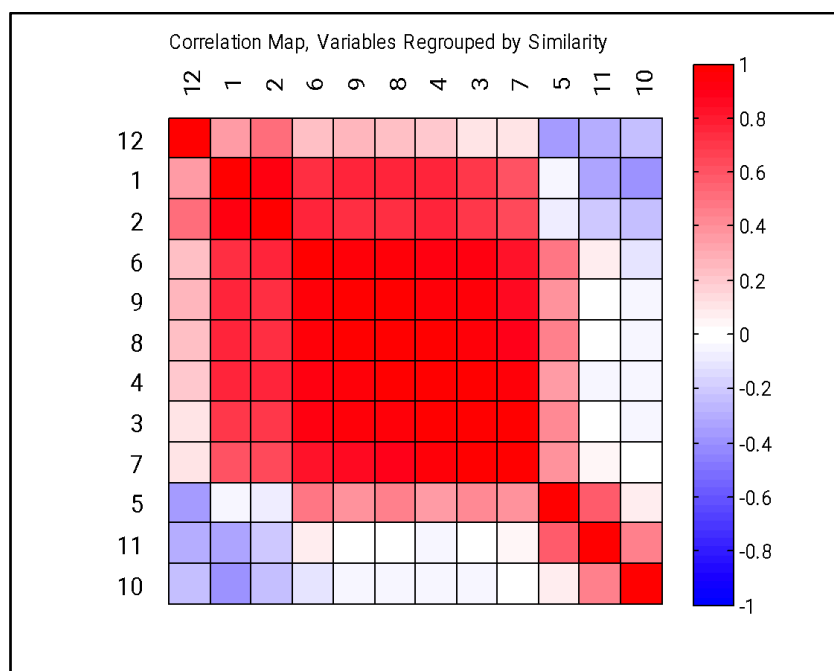
Fonte: Elaboração própria.

O mapa de correlação entre as variáveis analisadas está disposto na Figura 30. A atividade inibitória da α -glicosidase apresentou correlação positiva com as variáveis pico 5 ($r = 0,5918$) e pico 10 ($r = 0,4558$) e, menos pronunciadamente, com o pico 3 (FlavHS, $r = 0,0241$); e correlação negativa com os picos 1 (ácido quínico, r

= -0,3285) e 2 (ácido clorogênico, $r = -0,2050$). Esses resultados corroboram os resultados obtidos na análise realizada com os marcadores químicos (item 5.2.1.2) uma vez que a atividade inibitória da enzima correlacionou-se negativamente com o teor de ácido clorogênico e positivamente com o teor de FlavHS. Ressalta-se que, nesta análise, a pCl_{50} da atividade biológica em questão apresentou correlação positiva com o teor do pico 5, que constitui um derivado flavonoídico, como discutido anteriormente (item 5.1.1).

Observa-se correlação positiva entre a atividade vasodilatadora e os picos 1 (ácido quínico, $r = 0,3607$), 2 (ácido clorogênico, $r = 0,5011$) e, menos pronunciadamente, com os picos 3 (FlavHS, $r = 0,1199$), 4 (rutina, $r = 0,2080$), 6 ($r = 0,2444$), 7 ($r = 0,0971$), 8 ($r = 0,2321$) e 9 ($r = 0,2534$). Essa atividade biológica apresenta uma associação negativa com os picos 5 ($r = -0,3609$) e 10 ($r = -0,2208$). Os resultados obtidos nesta análise corroboram, novamente, os resultados obtidos na análise descrita anteriormente (item 5.2.1.1) na qual os marcadores químicos ácido clorogênico, FlavHS e rutina apresentaram correlação positiva com a atividade vasodilatadora.

Figura 30 – Mapa de correlação obtido para as variáveis pico 1 (1), pico 2 (2), pico 3 (3), pico 4 (4), pico 5 (5), pico 6 (6), pico 7 (7), pico 8 (8), pico 9 (9), pico 10 (10), valores de pCl₅₀ para as atividades inibitórias da α -glicosidase (11) e vasodilatação (12) dos extratos de *H. speciosa*



Fonte: Elaboração própria.

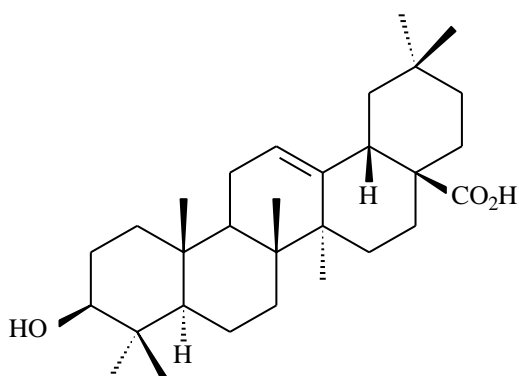
Os resultados da análise quimiométrica indicam uma correlação positiva entre a atividade vasodilatadora e os teores dos ácidos clorogênico e quínico e de flavonoides (exceto pico 5). O ácido clorogênico é um derivado cafeoil-quínico, no qual uma molécula de ácido cafeico está ligada a uma molécula de ácido quínico. Tendo em vista que o pico 1 corresponde ao ácido quínico, sua relação estrutural com o ácido clorogênico pode estar relacionada com sua associação com a resposta vasodilatadora.

Por outro lado, a atividade vasodilatadora correlacionou-se negativamente com pico 10, resultante da eluição conjunta de compostos de baixa polaridade, incluindo triterpenos (BARROS, 2008; ENDRINGER, 2007). Todavia, alguns autores relatam atividade vasodilatadora de triterpenos. Ibarra-Alvarado e colaboradores (2014) relataram significativa atividade vasodilatadora concentração-dependente para os triterpenos pentacíclicos ácido ursólico (44), ácido oleanólico (45), uvaol (46), ácido betulínico (47), friedelina (48), e lupeol (30), em preparações isoladas de aorta. A

atividade foi relacionada com a liberação de NO (IBARRA-ALVARADO et al., 2014; IBARRA-ALVARADO et al., 2013). No trabalho de Hosoe e colaboradores (2006) é descrita a atividade vasodilatadora do extrato de *Phellinus gilvus*, do qual foram isolados dois triterpenos do tipo lanostano, sendo que apenas o ácido eburicoico (49) exibiu moderado efeito vasodilatador. Em outro estudo, uma mistura de salvina A (50) e ácido maslínico (51), isolados de *Vitex cincinnensis*, produziu efeito vasodilatador em anéis de aorta de ratos com CI_{50} de 1,99 $\mu\text{g/mL}$ (DONGMO et al., 2011). Dessa forma, ainda que a análise quimiométrica realizada não indique a participação dos compostos lipofílicos na atividade vasodilatadora, não se pode excluir a possibilidade de sinergismo ou antagonismos entre os compostos de baixa polaridade e outros constituintes do extrato para a atividade biológica de *H. speciosa*.

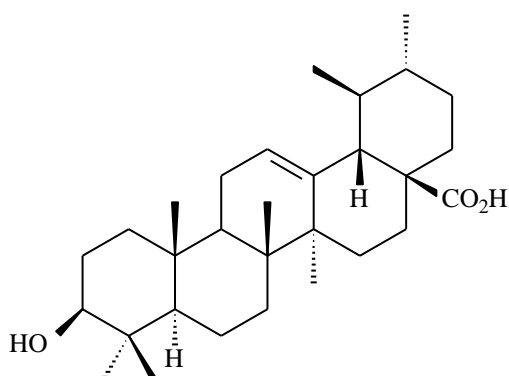
Observou-se, ainda, correlação positiva entre a atividade vasodilatadora e os picos referentes ao ácido clorogênico, FlavHS e rutina, bem como para os picos 6, 7, 8 e 9, correspondentes a constituintes flavonoídicos. Conforme discutido no 5.2.1, flavonoides e ácido clorogênico possuem atividade vasodilatadora relatada na literatura, e os resultados da presente análise corroboram esses relatos bem como os resultados da análise dos marcadores químicos, descrita no 5.2.1 (MUBARAK et al., 2012; SUZUKI et al., 2006; KOZUMA et al., 2005; FUSI et al., 2003; SUZUKI et al., 2002).

44 ácido ursólico



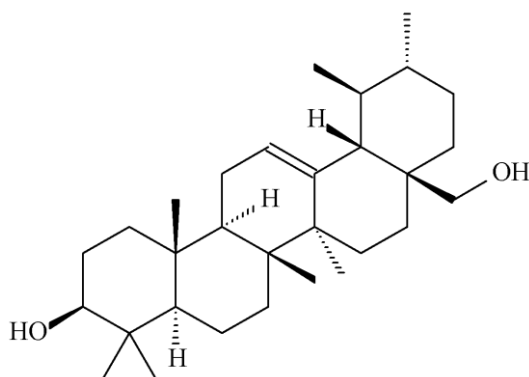
Fonte: Elaboração própria via Chemdraw

45 ácido oleanólico



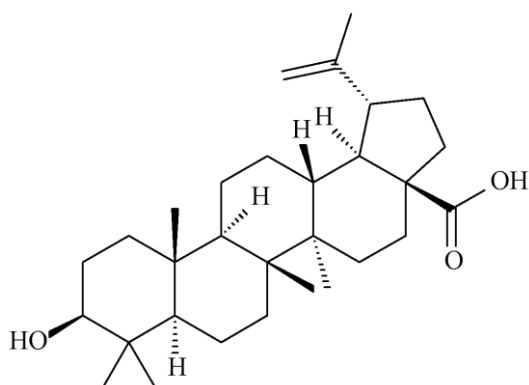
Fonte: Elaboração própria via Chemdraw

46 uvaol



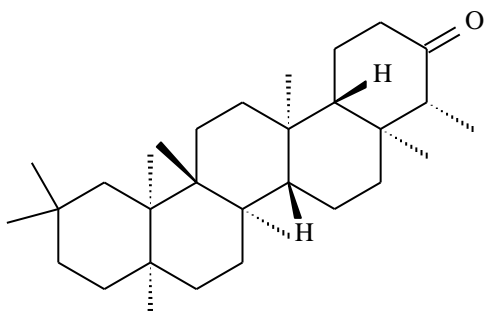
Fonte: Elaboração própria via
Chemdraw

47 ácido betulínico



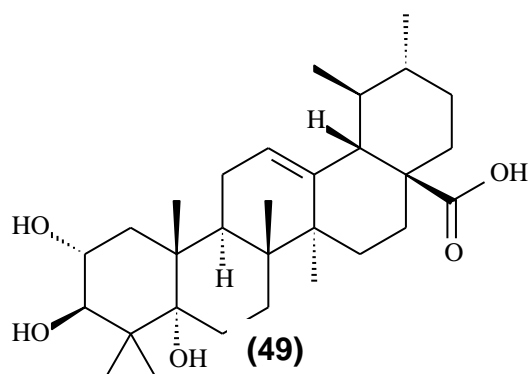
Fonte: Elaboração própria via
Chemdraw

48 friedelina



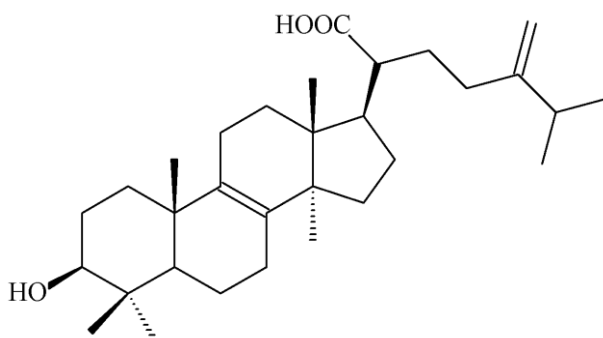
Fonte: Elaboração própria via *Chemdraw*

49 ácido eburicoico



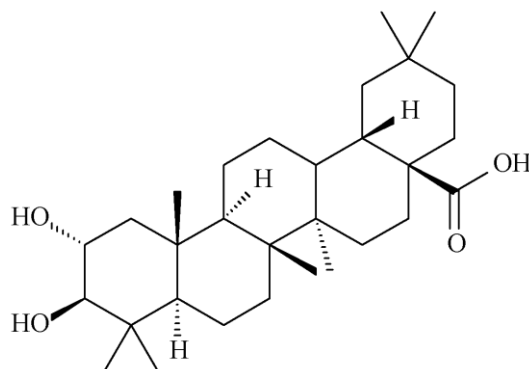
Fonte: Elaboração própria via *Chemdraw*

50 salvina A



Fonte: Elaboração própria via *Chemdraw*

51 ácido maslínico



Fonte: Elaboração própria via *Chemdraw*

Diferentemente do observado na análise quimiométrica para os teores dos marcadores químicos definidos e a atividade inibitória da α -glicosidase (item 5.2.1.2), que não apresentou correlação positiva significativa com os constituintes analisados, na presente análise observa-se correlação positiva entre a atividade biológica em questão e o pico 5, um derivado flavonoídico, e o pico 10, correspondente aos constituintes de baixa polaridade e, menos pronunciadamente, com o pico 3, FlavHS.

Conforme discutido anteriormente, a atividade inibitória da enzima α -glicosidase foi relatada para diversos flavonoides (HONG et al., 2013; PEREIRA et al., 2011; JO et al., 2009-2010; LI et al., 2009a e 2009b). No trabalho de Tadera e colaboradores (2006) foi realizada uma avaliação de relação entre a estrutura química de flavonoides e a atividade inibitória da enzima α -glicosidase de diferentes fontes (levedura, ratos). A enzima proveniente de leveduras foi potentemente inibida pelos grupos antocianidina, isoflavona e flavonol ($CI_{50} < 15 \mu M$). Insaturação no anel C, presença de hidroxila na posição 3, de carbonila na posição 4, ligação do anel B na posição 3, e substituição desse anel por grupos hidroxila melhoram a atividade. A α -glicosidase de ratos foi fracamente inibida por muitos flavonoides. A presença de hidroxila na posição 3, bem como hidroxilação do anel B aumentam a atividade inibitória da enzima (TADERA et al., 2006). Assim, os resultados obtidos na presente análise corroboram os relatos da literatura e apontam a participação de flavonoides presentes nos extratos de *H. speciosa*, com características estruturais favoráveis à atividade biológica, na inibição da α -glicosidase induzida pelas preparações.

Em contrapartida, a atividade inibitória da enzima α -glicosidase correlacionou-se negativamente com os picos 1 (ácido quínico) e 2 (ácido clorogênico). Conforme discutido anteriormente (item 5.2.1.2), relatos na literatura sobre a atividade inibitória da enzima pelo ácido clorogênico são controversos (TAN et al., 2013; GAO et al., 2008; ISHIKAWA et al., 2007). Os resultados obtidos no presente trabalho sugerem que o ácido clorogênico não deva contribuir diretamente para a atividade inibitória da enzima α -glicosidase. Contudo, não se pode descartar a ocorrência de sinergismos entre as substâncias presentes nos extratos.

5.3 Fracionamento do extrato de folhas de *H. speciosa* (EE-EC)

Na sequência do trabalho, buscou-se isolar as substâncias responsáveis pela atividade antidiabética de *H. speciosa*. Uma vez que os extratos avaliados no ensaio de inibição da enzima α -glicosidase apresentaram valores de pCI_{50} estatisticamente equivalentes (item 5.1.4), o extrato EE-EC foi selecionado para fracionamento, devido à maior disponibilidade de massa.

O extrato EE-EC foi inicialmente fracionado por cromatografia em coluna aberta de sílica gel, empregando-se eluentes de polaridades crescentes (item 4.9). Todas as frações obtidas com um mesmo eluente foram reunidas, originando um total de seis grupos de frações, cujas massas estão apresentadas na Tabela 3 (item 4.9).

As frações resultantes do fracionamento preliminar foram avaliadas em modelo *in vitro* de inibição da enzima α -glicosidase (item 4.8.2) e em modelo *in vivo* de avaliação da glicemia (item 4.12), bem como tiveram seu perfil cromatográfico registrado por CLAE-DAD (item 4.9).

5.3.1 Atividade inibitória da enzima α -glicosidase *in vitro* das frações do extrato EE-EC

As frações oriundas do fracionamento cromatográfico do extrato EE-EC foram avaliadas no ensaio de inibição da enzima α -glicosidase (item 4.8.2). Os valores de pCl_{50} de cada fração estão descritos na Tabela 10 e graficamente apresentados na Figura 31. Vale ressaltar que a fração hexânica não apresentou atividade e não está incluída na tabela.

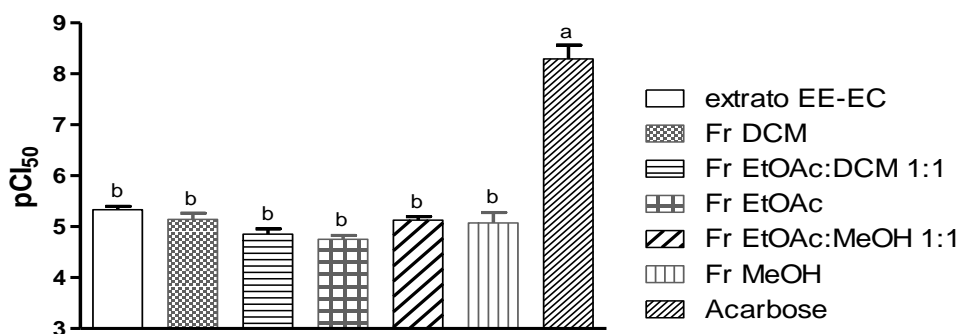
Tabela 10 – Valores de pCl_{50} para a atividade inibitória da enzima α -glicosidase obtidos para o extrato EE-EC de *H. speciosa* e frações deste

Fração	pCl_{50}
EE-EC	5,33 \pm 0,15 ^b
DCM	5,14 \pm 0,24 ^b
DCM:EtOAc 1:1	4,85 \pm 0,28 ^b
EtOAc	4,75 \pm 0,16 ^b
EtOAc:MeOH 1:1	5,13 \pm 0,14 ^b
MeOH	5,07 \pm 0,42 ^b
Acarbose	8,29 \pm 0,82 ^a

As médias identificadas com a mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p > 0,05$).

Fonte: Elaboração própria.

Figura 31 – Representação gráfica dos valores de pCl_{50} da atividade inibitória *in vitro* da enzima α -glicosidase obtidos para o extrato EE-EC de *H. speciosa* e frações cromatográficas deste



As médias identificadas com a mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p > 0,05$).

Fonte: Elaboração própria.

A análise dos dados indica que todas as frações apresentaram-se ativas no ensaio de inibição da enzima α -glicosidase (Cl_{50} na ordem de μg), ainda que nenhuma fração tenha exibido potência comparável ao controle positivo, acarbose. Os valores de pCl_{50} obtidos para todas as frações não diferiram estatisticamente ($p > 0,05$). No trabalho de Abd El-Mohsen e colaboradores (2014), um extrato em acetato de etila de partes aéreas de *Marrubium alysson* exibiu significativa inibição da enzima α -glicosidase (88,78% de inibição na concentração de 50 $\mu g/mL$), com Cl_{50} de $8,36 \pm 0,00 \mu g/mL$ ($pCl_{50} = 5,07$), superior ao controle positivo acarbose (54,98% de inibição na concentração de 250 $\mu g/mL$), com Cl_{50} de $64,14 \pm 0,00 \mu M$. O extrato hidroetanólico a 50% de frutos de *Aronia melanocarpa* apresentou uma Cl_{50} de $3,5 \pm 0,1 \mu g/mL$ ($pCl_{50} = 5,46$) para inibição *in vitro* da α -glicosidase e a fração metanólica apresentou Cl_{50} de $0,55 \pm 0,01 \mu g/mL$ ($pCl_{50} = 6,26$) (BRÄUNLICH et al., 2013). A espécie *Hintonia latiflora* é empregada popularmente no México para o tratamento de diabetes. O extrato etanólico da espécie inibiu a α -glicosidase em $39,2 \pm 3,5\%$, quando ensaiada na concentração de 1 mg/mL (RAMIREZ et al., 2012). A espécie apresentou, ainda, potencial atividade no tratamento de diabetes em um estudo clínico com 41 pacientes com diabetes do tipo 2 (KORECOVA & HLADIKOV, 2014). A comparação com esses

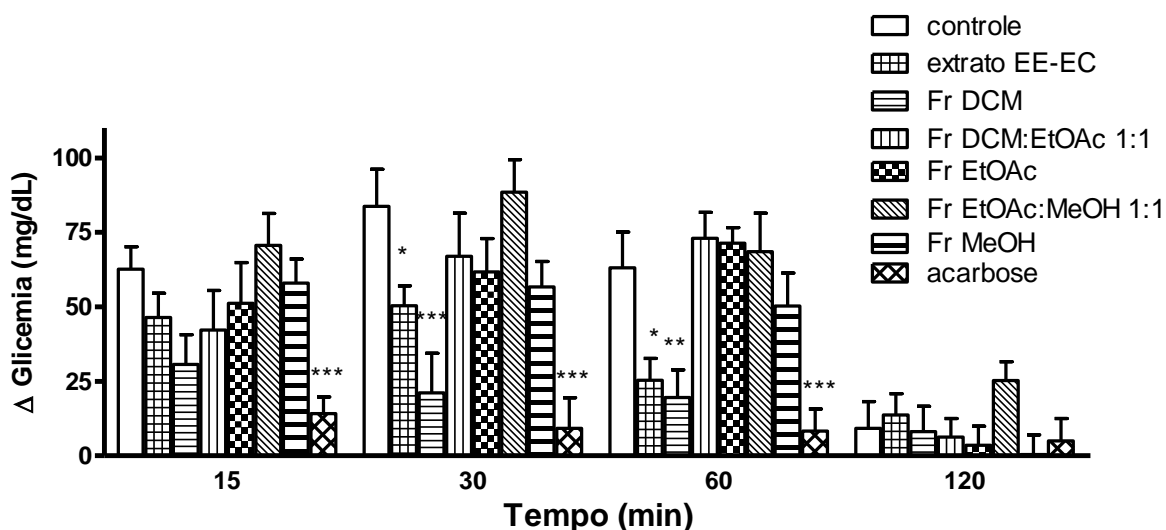
dados da literatura evidencia o potencial de *H. speciosa* para desenvolvimento como antidiabético.

As frações de *H. speciosa* foram também ensaiadas em modelo *in vivo* de avaliação da glicemia e os resultados estão apresentados no item 5.3.2.

5.3.2 Ensaio agudo *in vivo* de avaliação da glicemia do extrato e frações de *H. speciosa*

O efeito do extrato etanólico de folhas de *H. speciosa* (EE-EC) e das frações resultantes deste sobre a glicemia foi avaliado em camundongos (item 4.12) e os dados obtidos estão representados na **Figura 32**.

Figura 32 – Efeito do extrato etanólico de folhas de *H. speciosa* (EE-CC) e frações derivadas deste no ensaio agudo *in vivo* para avaliação da glicemia



* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. ANOVA e pós teste de Bonferroni.

Fonte: Elaboração própria.

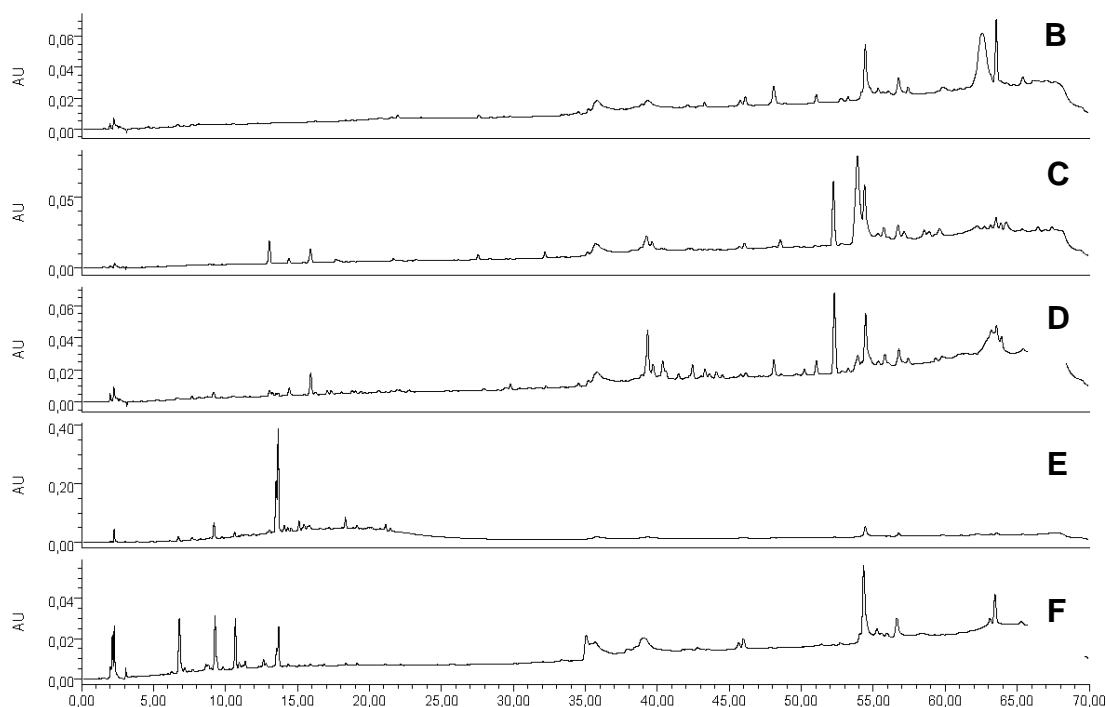
Os resultados indicam uma redução significativa da glicemia apenas para a fração diclorometânica (Fr DCM) e o extrato bruto (EE-EC), nos tempos de 30 e 60 min. Cabe destacar que, no tempo de 30 min, a redução na glicemia induzida pela fração não diferiu estatisticamente do efeito do controle positivo da acarbose.

Tendo em vista o caráter apolar da fração DCM, a atividade antidiabética da espécie parece estar relacionada com compostos lipofílicos, corroborando os resultados da análise quimiométrica anteriormente descritos (item 5.2). Já quando as frações resultantes do fracionamento cromatográfico de EE-EC foram avaliadas no ensaio de inibição da enzima α -glicosidase (item 5.3.1), não se observou maior atividade para a fração diclorometânica.

A Figura 33 apresenta os perfis cromatográficos obtidos para as frações oriundas do fracionamento cromatográfico do extrato EE-EC de *H. speciosa* (itens 4.9 e 5.3).

Figura 33 - Perfis cromatográficos obtidos por CLAE-DAD para as frações oriundas do fracionamento cromatográfico do extrato de *H. speciosa* (EE-EC)





Amostras: A = EE-EC; B = DCM; C = DCM/EtOAc 1:1; D = EtOAc; E = EtOAc/MeOH 1:1; F = MeOH. Para condições analíticas vide item 4.9. Detecção em λ de 210 nm.

Fonte: Elaboração própria.

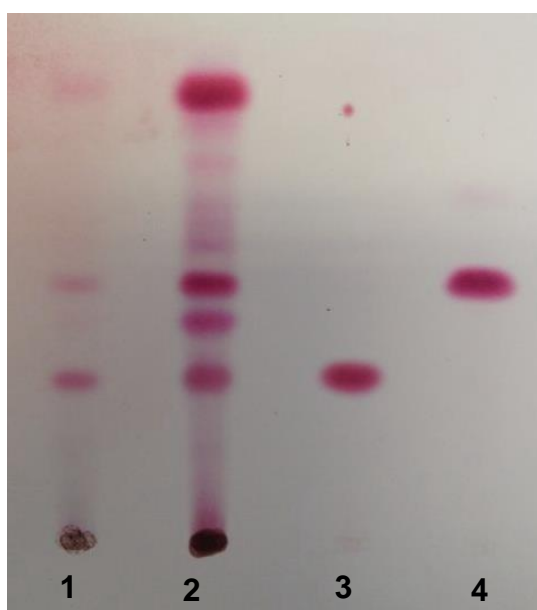
O fracionamento cromatográfico do extrato resultou em frações com perfis químicos distintos. Como esperado, a fração diclorometânica apresenta predomínio de compostos apolares, com TR superior a 35 min, indicando que constituintes lipofílicos estão relacionados com a potencial atividade antidiabética de *H. speciosa*.

Conforme descrito na revisão da literatura (item 3.4), diversos constituintes lipofílicos já foram identificados nas folhas de *H. speciosa*, incluindo compostos voláteis como óxido de *trans*-linalol (12), óxido de *cis*-linalol (13), α -terpineol (14), linalol (15), geraniol (16), metil-antranilato (17), eugenol (18) e (*E*)-isoeugenol (19) (SAMPAIO & NOGUEIRA, 2006). Além desses constituintes, também já foi relatada a presença de α -amirina (29), lupeol (30) e seu 3β -O-éster de ácido graxo (31), β -amirina (38), uma mistura de hidrocarbonetos, uma mistura de alcoóis de cadeia longa, uma mistura de obtusalina (35) e eritrodíol (36), β -sitosterol (37), uma mistura

de ésteres 3 β -O-acilados de α e β -amirina (38 e 39) e do lupeol (40) (ENDRINGER, 2007; BARROS, 2008).

A análise por CCD da fração DCM e do extrato etanólico, bem como de uma mistura das substâncias de referência α -amirina (29) e lupeol (30), bem como do 3 β -O-éster de ácido graxo do lupeol (31), isolados por nosso grupo (ENDRINGER, 2007), permitiu verificar a presença desses compostos no extrato etanólico e na fração DCM (Figura 34).

Figura 34 – Perfil cromatográfico obtido por CCD de sílica gel para o extrato de *H. speciosa* EE-CC (1), fração DCM (2), mistura de lupeol e α -amirina (3), e éster do lupeol (4)



Eluente: hexano/diclorometano/acetato de etila (35:15:2). Revelador: anisaldeído sulfúrico (item 4.5).

Fonte: Elaboração própria.

A potencial atividade antidiabética de triterpenos foi anteriormente descrita em diversos trabalhos (ALQAHTANI et al., 2013; CASTELLANO et al., 2013; ATTA-UR-RAHMAN et al., 2008; MBAZE et al., 2007). Compostos dessa classe possuem mecanismos de ação diversos, incluindo inibição de enzimas envolvidas no metabolismo da glicose, prevenção do desenvolvimento de resistência à insulina e

normalização dos níveis plasmáticos de insulina e glicose (NAZARUK & BORZYM-KLUCZYK, 2014).

Lupeol, um triterpeno pentacíclico do grupo dos lupenos, apresenta atividade inibitória da enzima α -amilase (ALI et al., 2006; NKOBOLÉ et al., 2011) e α -glicosidase, com CI_{50} de 66,48 μ M e $4,79 \pm 2,54$ μ g/mL, respectivamente (NKOBOLÉ et al., 2011; DEUTSCHLÄNDER et al., 2011). Esses dados sugerem uma potencial relação entre a redução da glicemia e a presença do triterpeno no extrato e na fração diclorometânica, uma vez que a inibição dessas enzimas reduz a absorção de carboidratos e, portanto, a glicemia após ingestão calórica. Outros ensaios foram descritos para o lupeol, que apresentou atividade antidiabética por diversos mecanismos (KHAN et al., 2014; GUPTA et al., 2012; NA et al., 2009).

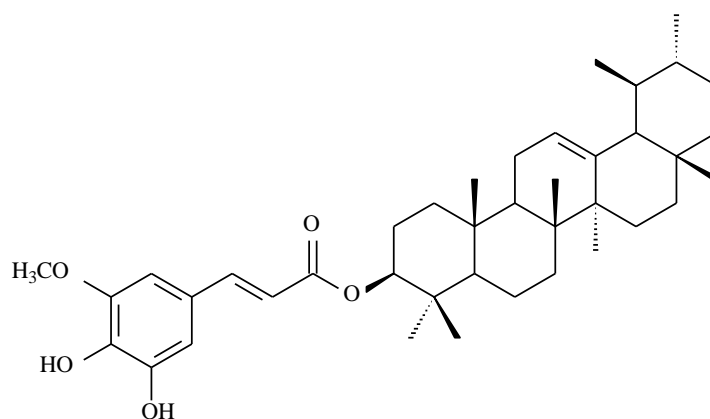
Em um estudo de Santos e colaboradores (2012), uma mistura de α e β -amirina, triterpenos pentacíclicos do grupo dos ursanos, obtida da resina de *Protium heptaphyllum*, reduziu significativamente os níveis sanguíneos de glicose, colesterol total e triglicerídeos séricos e, no teste de tolerância à glicose, observou-se redução do nível de glicose plasmática. Com base nestes dados da literatura, é possível supor que α e β -amirina também estejam associados à redução de glicemia observada no ensaio com o extrato e a fração diclorometânica de *H. speciosa*, visto que ambos foram identificados nas amostras ensaiadas.

Há diversos relatos de derivados de α/β -amirina e lupeol com potencial atividade antidiabética, incluindo 3-O- β -(5-hidroxi)-feruloil- α -amirina (52), que exibiu atividade inibitória da enzima α -glicosidase (DEUTSCHLÄNDER, et al., 2011); acetato de α -amirina (53), que provocou redução dos níveis sanguíneos de glicose em ratos com diabetes induzida por estreptozotocina (NARENDER et al., 2009); palmitato de β -amirina (54), que apresentou atividade anti-hiperglicemiante no ensaio de tolerância à glicose com ratos Wistar (NAIR et al., 2014); e lupenona (55), que exibiu atividade inibitória da proteína tirosina fosfatase 1B (PTP1B) (NA et al., 2009).

Além desses terpenos, há relatos de outros compostos triterpênicos com potencial atividade antidiabética, como ácido oleanólico (45) e ácido ursólico (44), que apresentaram atividade inibitória da enzima α -amilase (ALI et al., 2006).

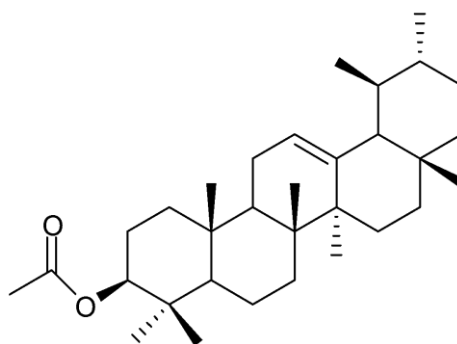
Portanto, existem dados sugestivos sobre a potencial atividade antidiabética de triterpenos, incluindo-se aqui lupeol e α/β -amirina, que já foram isolados de *H. speciosa* (ENDRINGER, 2007).

52 3-O- β -(5-hidroxi)-feruloil- α -amirina

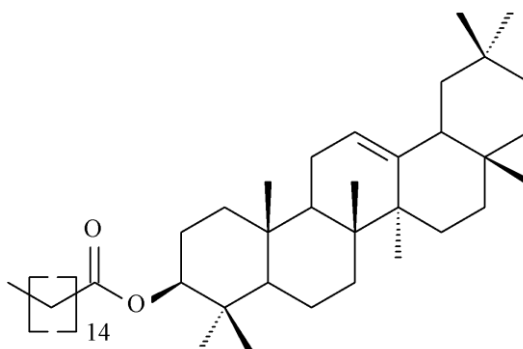


Fonte: Elaboração própria via Chemdraw

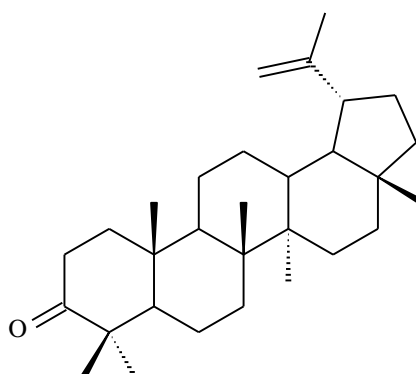
53 acetato de α -amirina



Fonte: Elaboração própria via Chemdraw

54 palmitato de β -amirina

Fonte: Elaboração própria via Chemdraw

55 lupenona

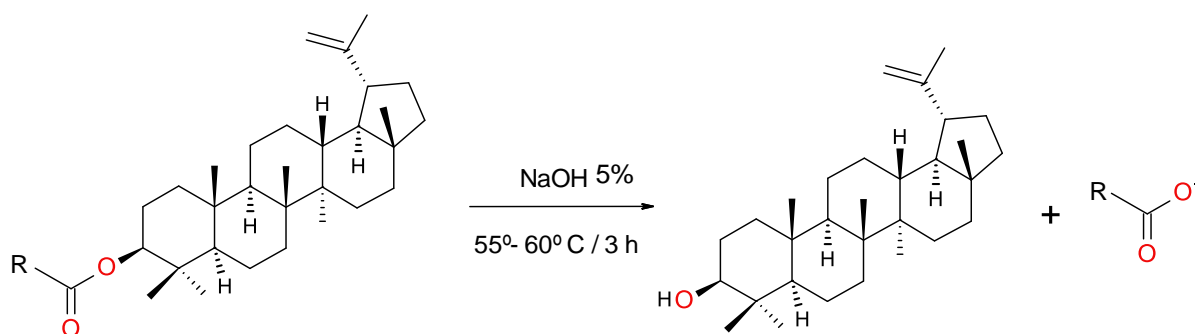
Fonte: Elaboração própria via Chemdraw

Considerando-se os resultados deste trabalho, bem como os dados da literatura, possivelmente os constituintes relacionados com a atividade antidiabética da espécie são compostos de baixa polaridade, especialmente triterpenos.

5.3.3 Hidrólise alcalina da fração diclorometânica (Fr DCM)

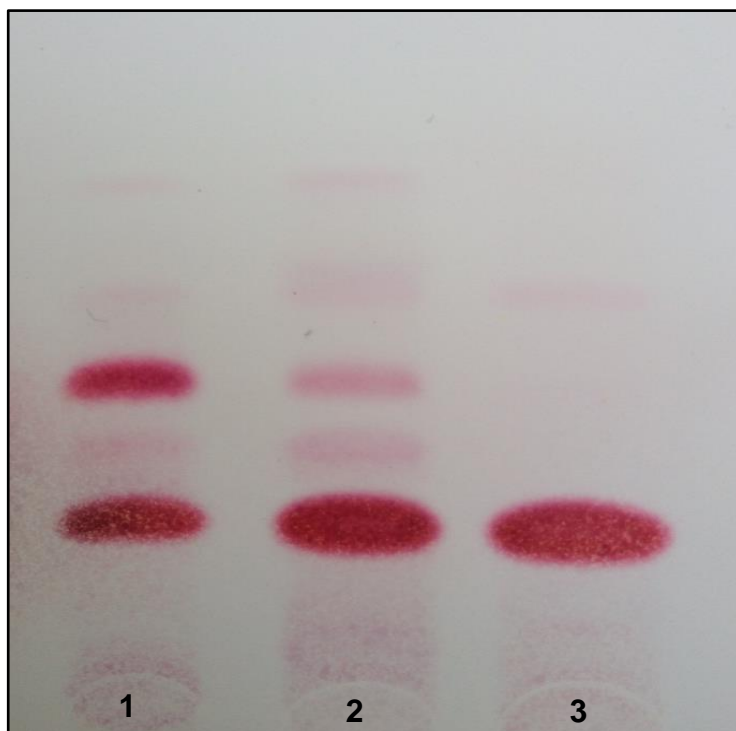
Objetivando-se caracterizar a Fr DCM e identificar se os constituintes dessa fração são ésteres de triterpenos derivados do lupeol e/ou da α/β -amirina, procedeu-se à hidrólise alcalina da fração. A reação é demonstrada, esquematicamente, na Figura 35.

Figura 35 – Reação de hidrólise alcalina de éster do lupeol



A análise do produto da reação foi realizada por CCD de sílica gel, cujo perfil cromatográfico obtido está apresentado na Figura 36.

Figura 36 - Perfil cromatográfico obtido por CCD de sílica gel para Fr DCM (1), produto da hidrólise alcalina da Fr DCM (2) e mistura de lupeol/ α -amirina (3)



Eluente: hexano/acetato de etila (90:10). Revelador: anisaldeído sulfúrico (item 4.5).

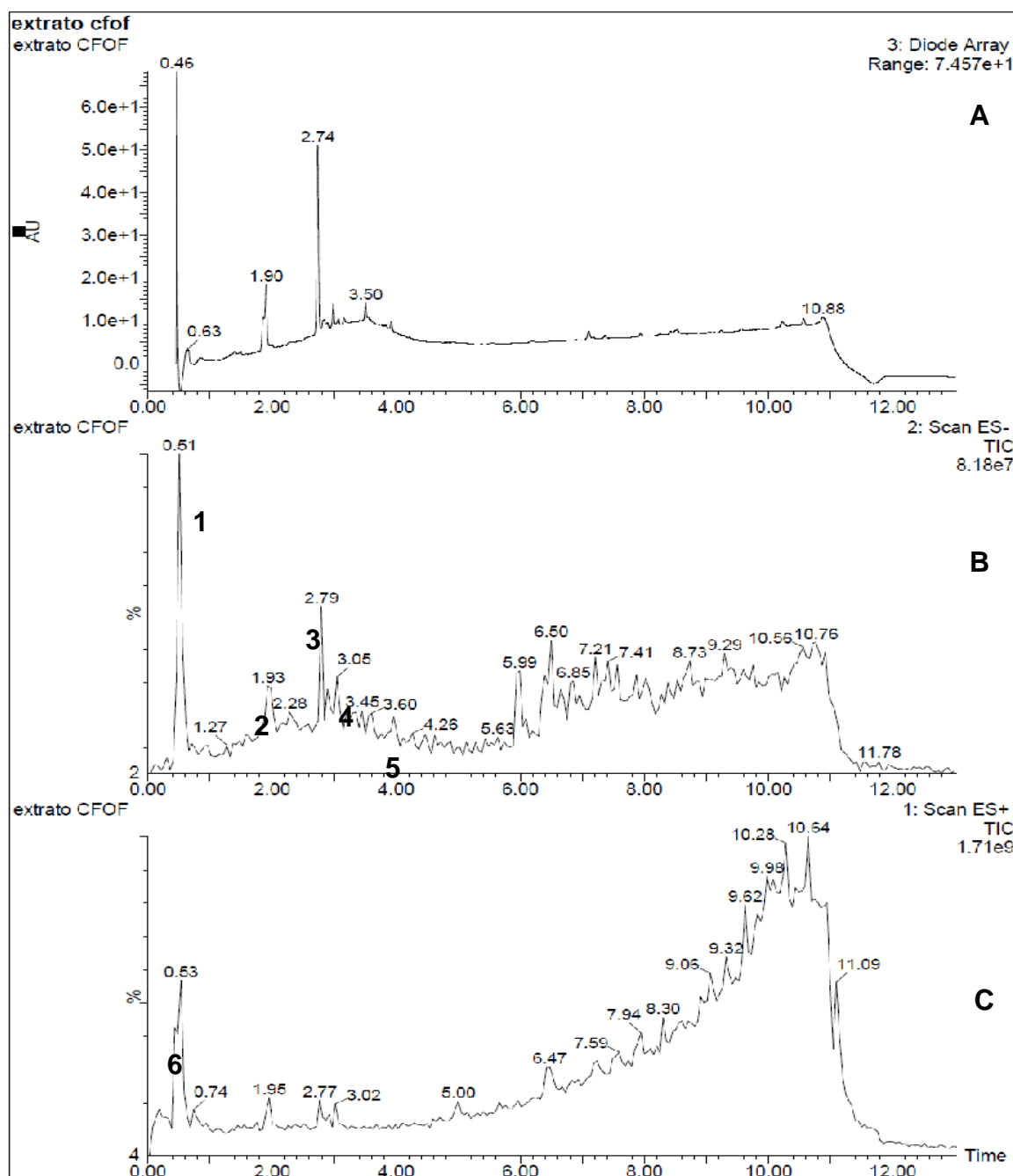
Fonte: Elaboração própria.

O perfil cromatográfico da Figura 36 indica que a banda superior ($R_f = 0,48$) presente em (1) torna-se menos intensa em (2), após a reação de hidrólise. Por outro lado, a banda inferior ($R_f = 0,25$), correspondente ao lupeol / α -amirina em (1), aumenta sua intensidade no produto hidrolisado, demonstrando o aumento na concentração de agliconas. A mistura das substâncias de referência aplicada em (3), confirma que a banda com R_f de 0,25 presente no material de partida e no produto da hidrólise corresponde à mistura de lupeol/ α -amirina.

5.3.4 Análise por UPLC-MS da fração diclorometânica (Fr DCM) e do extrato EE-EC

Com o objetivo de caracterizar a composição química do extrato ativo (EE-EC) de *H. speciosa* e da fração diclorometânica do mesmo, foi realizada uma análise por UPLC-MS-ESI (item 4.10), sendo os resultados comparados com substâncias de referência e/ou dados da literatura para a espécie. Os perfis cromatográficos obtidos são apresentados na Figura 37. A análise do extrato EE-EC no modo negativo de ionização possibilitou detectar o ácido quínico (32) (TR = 0,51 min) pelo pico em m/z 191,4 [M - H]⁻ (Figura 37; a) e ácido clorogênico (7) (TR = 1,93 min) em m/z 353,6 [M - H]⁻, além de rutina (33) (TR = 2,79 min), identificada pelo pico em m/z 609,7 [M - H]⁻ (Figura 37; c). Por outro lado, a presença de bornesitol (25) (TR = 0,53 min) foi confirmada pelo pico de seu aduto com sódio em m/z 217,4 [M + 23]⁺ no modo positivo de ionização do extrato EE-EC (Figura 37; b).

Figura 37 – Perfis cromatográficos obtidos por UPLC com detector de DAD (A) e de MS-ESI com ionização no modo negativo (B) e no modo positivo (C) para o extrato EE-EC. Picos (1) ácido quínico, (2) ácido clorogênico, (3) rutina, (4) canferol-*O*-rutinosídeo, (5) triglicósídeo do canferol e (6) bornesitol



Para condições de análise vide 4.10.

Fonte: Elaboração própria

O constituinte eluído em 3,05 min forneceu um pico em m/z 593,7 $[M - H]^-$, compatível com um diglicosídeo do canferol, evidenciado por um fragmento em m/z 447,7 $[M - H - 146]^-$, resultante da perda de um resíduo de açúcar (ramnose). Endringer (2007) isolou e caracterizou o constituinte canferol-3-O-rutinosídeo, que possui a mesma massa molecular descrita para o pico, sugerindo tratar-se desse flavonoide. Da mesma forma, o constituinte com tempo de retenção de 3,60 min foi atribuído a um triglicosídeo do canferol, a partir do pico em m/z 755,6 $[M - H]^-$, compatível com a estrutura constituída da genina canferol, dois resíduos de hexose e um resíduo de ramnose.

B

A análise do perfil cromatográfico e dos espectros de massas obtidos para a fração diclorometânica (Fr DCM; Figura 39) indicou a presença de alguns prováveis ésteres do lupeol e/ou α/β -amirina. Assim, o constituinte eluído em 7,51 min produziu um pico atribuído ao íon *quasi*-molecular em m/z 723,78 $[M + H]^+$, compatível com um éster do lupeol/ α/β -amirina de fórmula molecular $C_{49}H_{86}O_3$ (Figura 41; a). Observa-se, nesse espectro, um pico em m/z 577,58 $[M + H - 18 - 127]^+$, correspondente ao fragmento resultante da perda de parte da cadeia lateral do éster (C_9H_{19}), bem como de sua desidratação. A análise do espectro de massas do constituinte eluído em 8,49 min revela um pico em m/z 663,58 $[M + H]^+$, também um provável éster do lupeol/ α -amirina, de fórmula molecular $C_{46}H_{78}O_2$ (Figura 41; b). A análise desse espectro indica um pico em m/z 685,56 $[M + Na]^+$, atribuído ao aduto do éster com o íon sódio. Por sua vez, a análise do espectro de massas do constituinte com TR de 9,55 minutos indica um íon *quasi*-molecular em m/z 823,73 $[M + H]^+$, que é compatível com um éster do lupeol/ α -amirina de fórmula molecular $C_{55}H_{98}O_4$ (Figura 41; c).

A análise do espectro de massas do extrato EE-EC (Figura 40), obtido por LC-MS-ESI empregando as mesmas condições de análise da fração diclorometânica, permitiu identificar o provável éster de lupeol/ α -amirina relatado para Fr DCM e eluído com mesmo tempo de retenção (8,47 min). Os picos em m/z 663,62 $[M + H]^+$ e m/z 685,56 $[M + Na]^+$ estão destacados na Figura 41 (d) do espectro do extrato.

Figura 38 – Espectros obtidos por UPLC-MS-ESI para os picos selecionados no extrato EE-EC de folhas de *H. speciosa* (a-c). Picos: (a) ácido quínico; (b) bornesitol; (c) rutina

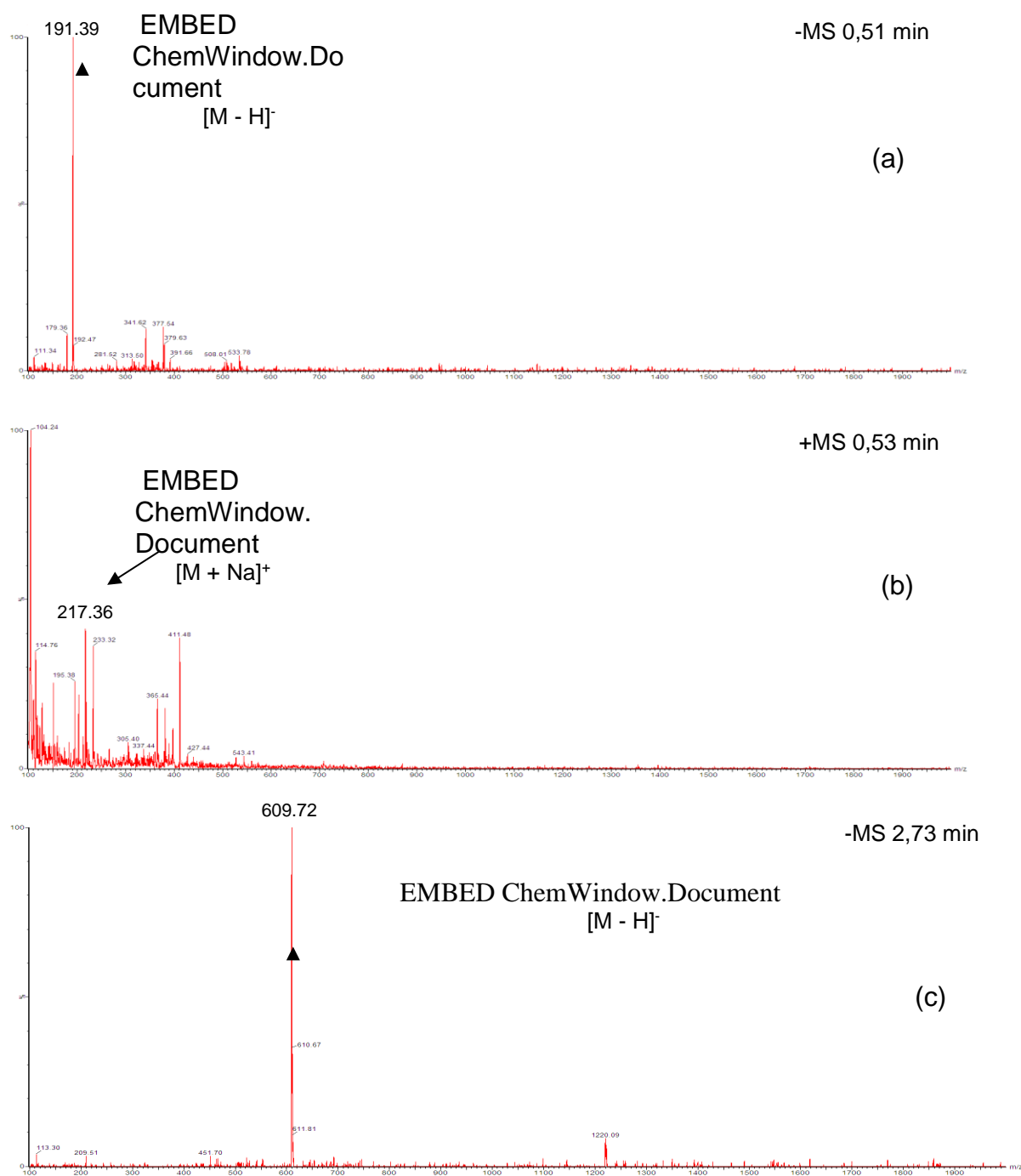
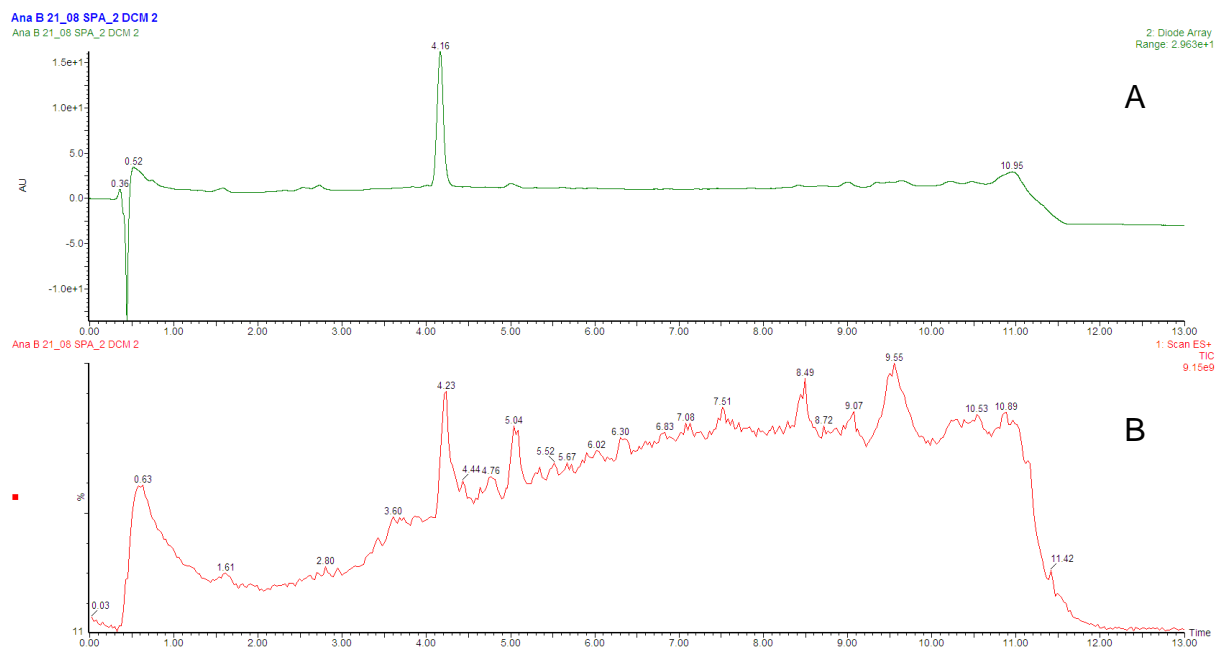


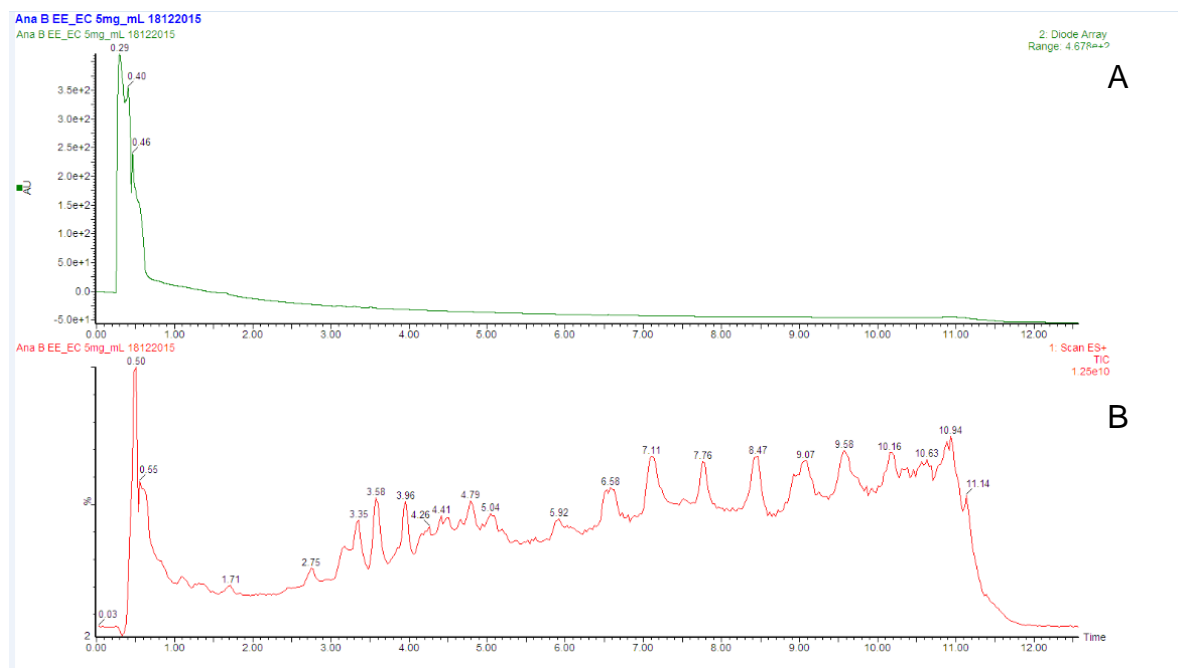
Figura 39 – Perfis cromatográficos obtidos por UPLC com detector de DAD (A) e de MS-ESI com ionização no modo positivo (B) para a fração diclorometânica (Fr DCM) de folhas de *H. speciosa*.



Condições de análise vide item x.

Fonte: Elaboração própria

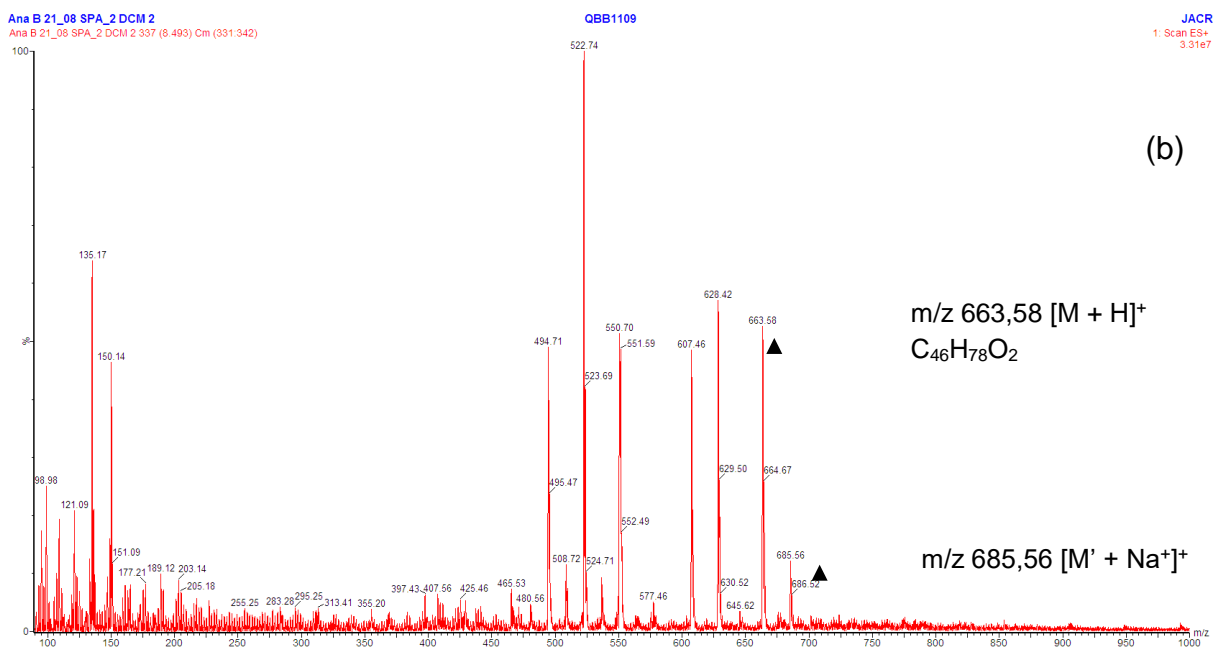
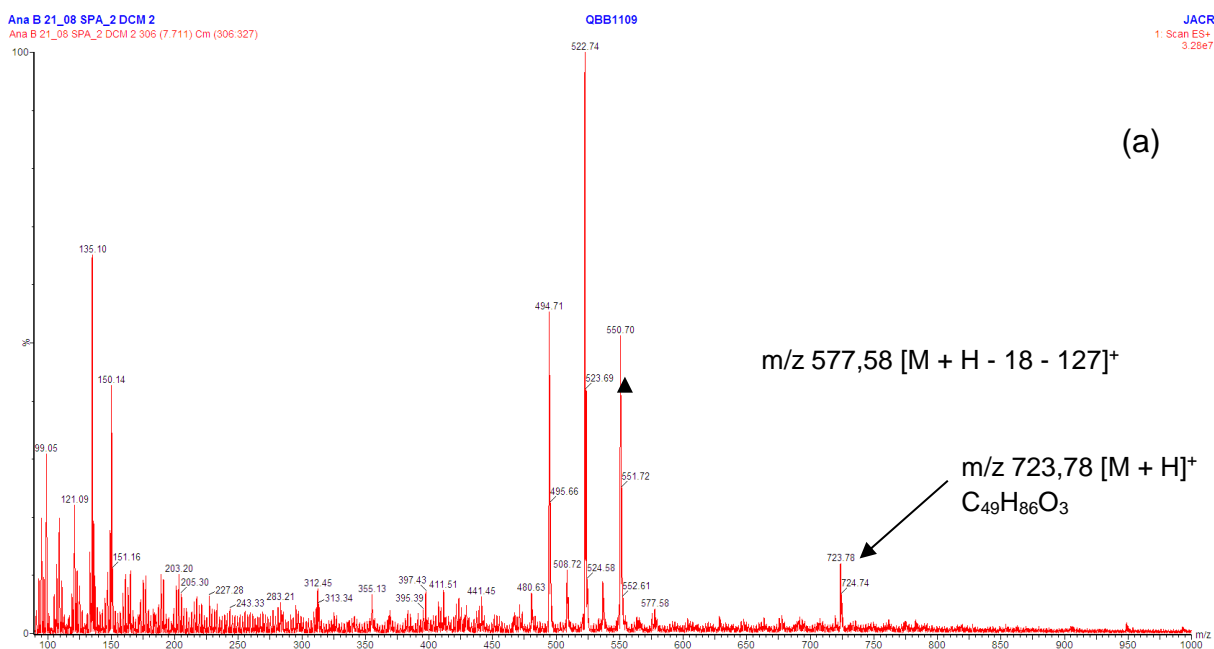
Figura 40 – Perfis cromatográficos obtidos por UPLC com detector de DAD (A) e de MS-ESI com ionização no modo positivo (B) para o extrato etanólico EE-EC de folhas de *H. speciosa*



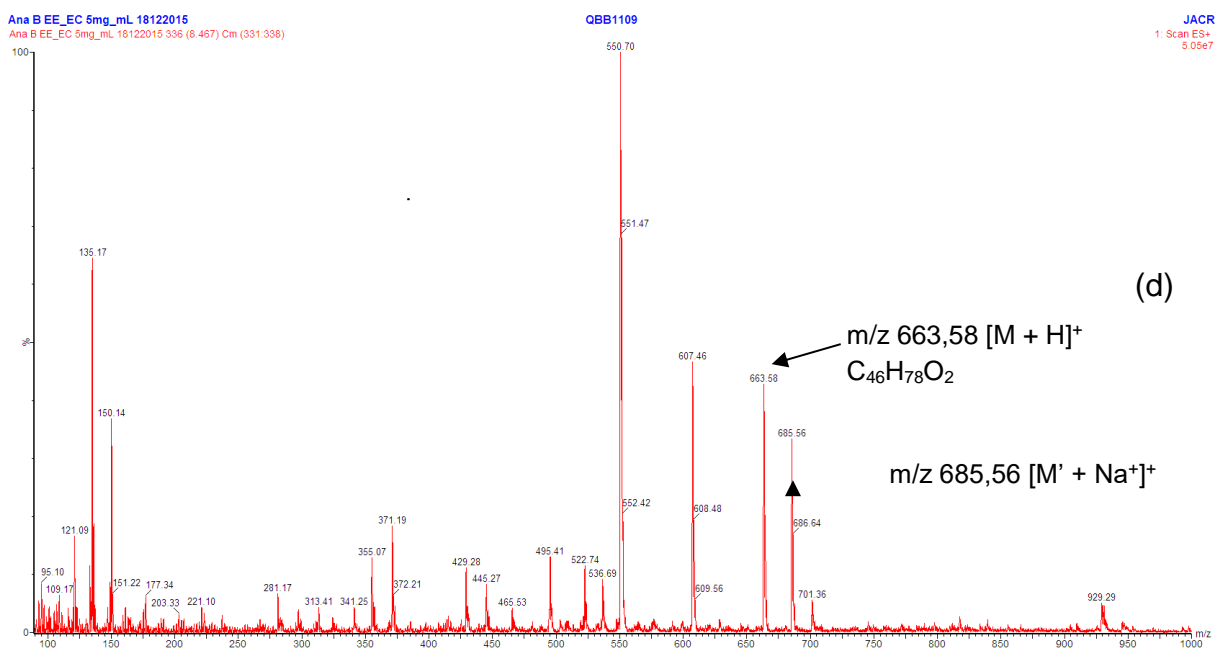
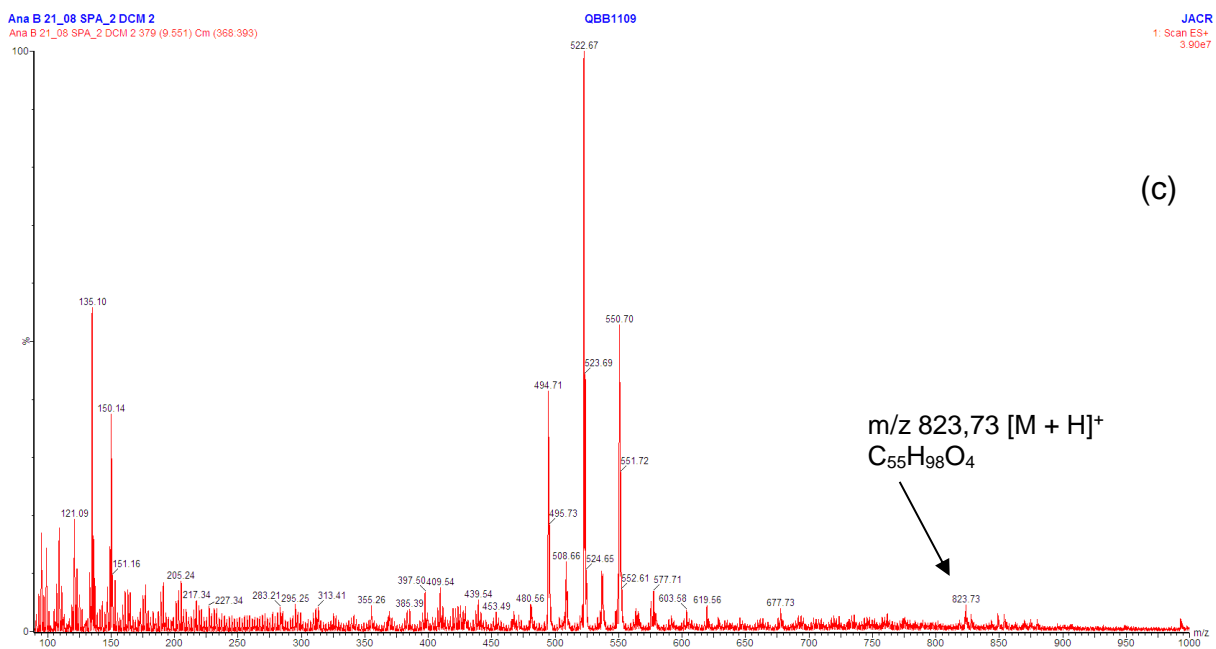
Condições de análise vide item x.

Fonte: Elaboração própria

Figura 41 – Espectros obtidos por UPLC-MS-ESI para os picos selecionados da fração diclorometânica (Fr DCM) de folhas de *H. speciosa* (a-c) e do extrato EE-EC (d). Picos: (a) TR = 7,71 min; (b) TR = 8,49 min; (c) TR = 9,55 min; (d) TR = 8,46 min



Continua



Fonte: Elaboração própria

Sabe-se que, idealmente, o tratamento da hiperglicemia também deveria proporcionar benefícios na prevenção de doença macrovascular e microvascular. Contudo, até o momento não está disponível uma abordagem terapêutica para hiperglicemia que efetivamente atue na prevenção de DCV (DIRETRIZES DA

SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2009). Uma vez que HA e DM constituem fatores de risco para DCV e que, frequentemente, essas condições coexistem, fármacos que promovam ações benéficas em ambas são de especial relevância, principalmente ao se considerar os esquemas terapêuticos complexos existentes, empregados no tratamento dessas doenças isoladamente. Os resultados obtidos neste trabalho apontam que a potencial atividade anti-hipertensiva de *H. speciosa* relaciona-se à presença de compostos polares. Em contrapartida, a potencial atividade antidiabética da espécie parece estar relacionada aos compostos lipofílicos presentes nos extratos avaliados. Assim, objetivando-se benefícios em ambas as condições clínicas, o extrato hidroalcoólico obtido por percolação apresenta-se como a melhor opção, uma vez que demonstrou maior potência no ensaio de vasodilatação e sua atividade não diferiu dos demais extratos avaliados no ensaio de inibição da enzima α -glicosidase.

5.3.5 Fracionamento cromatográfico da fração diclorometânica (Fr DCM)

Visando isolar substâncias potencialmente relacionadas com a potencial atividade antidiabética, demonstrada para o extrato EE-EC e para a Fr DCM (item 5.3.2), esta foi fracionada empregando-se cromatografia em coluna aberta de sílica gel, conforme descrito no item 4.9.2. As frações coletadas durante o fracionamento foram reunidas de acordo com similaridade dos perfis cromatográficos obtidos por CCD de sílica gel e, após a reunião e evaporação do solvente, as frações reunidas foram pesadas e suas massas estão apresentadas na Tabela 11. As frações de 1 a 15 não apresentaram massa apreciável e não foram incluídas na tabela.

Foram obtidos os perfis cromatográficos das frações reunidas por CCD de sílica gel, que estão ilustrados nas Figuras 42 e 43. A análise desses perfis revela a presença de bandas de coloração rosa/arroxeadas com fator de retenção (Rf) variando de 0,15 a 0,71. A comparação dos perfis cromatográficos das frações com as substâncias de referência empregadas. Lupeol e α -amirina (Rf = 0,4; ponto 9 da Figura 42 e ponto 7

da Figura 43, respectivamente), indica a presença desses triterpenos nas frações iniciais (pontos 1 a 7 da Figura 42), bem como nas frações finais, nas quais essas bandas apresentam-se mais intensas ($R_f = 0,4$; pontos 4 a 6 da Figura 43). Também é possível verificar a presença de vários outros constituintes terpenoides, com predomínio de uma banda de menor polaridade ($R_f = 0,71$; pontos 1 a 8 da Figura 42), referente ao éster do lupeol isolado e identificado por Endringer (2007). Observa-se, ainda, a presença de uma banda com polaridade intermediária entre o éster do lupeol citado e o lupeol / α -amirina ($R_f=0,48$; pontos 5 a 8 da Figura 42; pontos 1 a 4 da Figura 43). Esta substância foi isolada nas frações 89-92 (TRPHS; massa = 16,1 mg) e procedeu-se à sua caracterização estrutural (item 5.4).

Tabela 11 – Massa das frações obtidas do fracionamento de Fr DCM, empregando-se cromatografia em coluna aberta de sílica gel

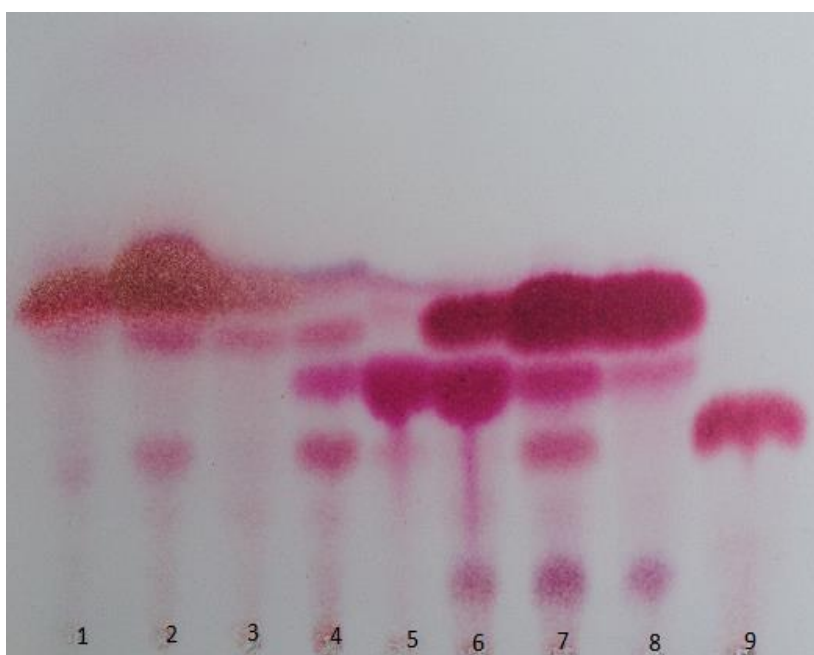
Reunião	Massa (mg)
16 a 26	4,7
27 a 37	5,7
38 a 47	4,8
48 a 58	3,8
59 a 68	2,5
69 a 78	5,2
79 a 84	15,1
85 a 88	19,6
89 a 92	16,1
93 e 94	9,2
95 e 96	8,0
97 a 104	25,6
105 a 118	53,7
119 a 130	47,3
Massa total: 221,4	

Rendimento: 72,8%

Fonte: Elaboração própria

O fracionamento cromatográfico de Fr DCM resultou em subfrações com perfis cromatográficos mais simplificados e permitiu concentrar substâncias em algumas delas, bem como possibilitou isolar o constituinte TRPHS. A análise da composição química da fração diclorometânica por UPLC-MS indica o predomínio de terpenos, especialmente ésteres do lupeol e da α -amirina. Ambos os triterpenos foram anteriormente isolados da espécie, assim como alguns ésteres deles (BARROS, 2008; ENDRINGER, 2007). Tendo em vista essas informações e o valor de Rf de TRPHS, comparativamente às substâncias de referência lupeol e α -amirina, bem como os resultados da hidrólise da fração diclorometânica, é possível conjecturar que a substância isolada seja um éster desses triterpenos.

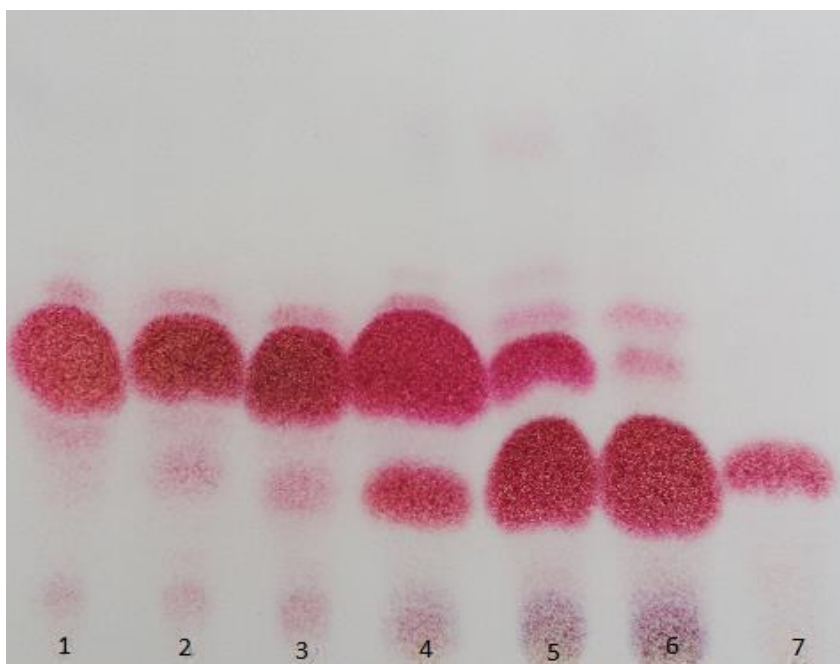
Figura 42 - Perfil cromatográfico obtido por CCD de sílica gel para as frações reunidas 16-26 (1); 27-37 (2); 38-47 (3); 48-58 (4); 59-68 (5); 69-78 (6); 79-84 (7); 85-88 (8) provenientes do fracionamento de Fr DCM e mistura das substâncias de referência lupeol e α -amirina (9)



Eluente: Hexano / diclorometano (60:40) + 2 mL de acetato de etila. Revelador: anisaldeído sulfúrico.

Fonte: Elaboração própria.

Figura 43 - Perfil cromatográfico obtido por CCD de sílica gel para as frações reunidas 89-92 (1); 93-94 (2); 95-96 (3); 97-104 (4); 105-118 (5); 119-130 (6) provenientes do fracionamento de Fr DCM e mistura das substâncias de referência lupeol e α -amirina (7)



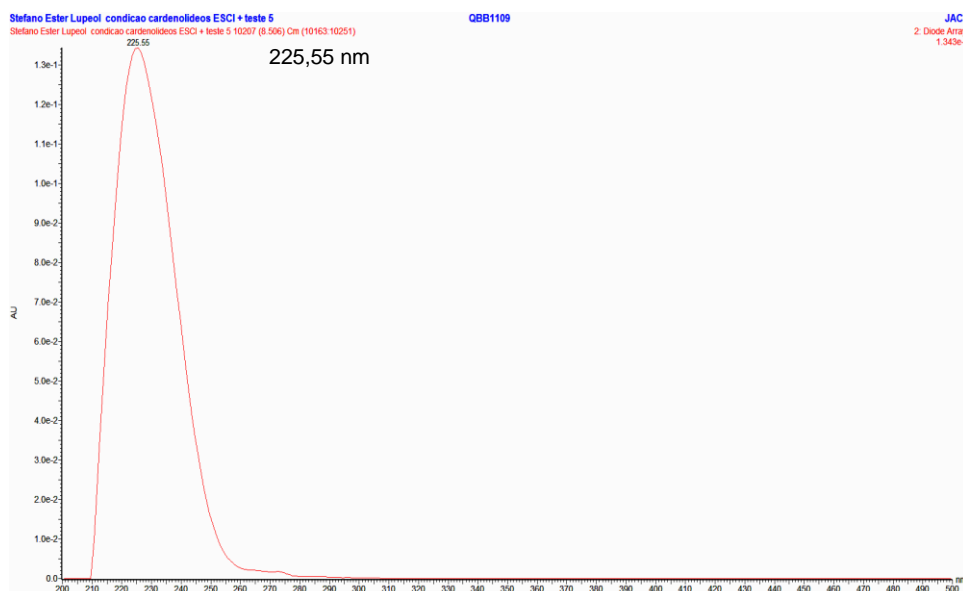
Eluente: hexano:diclorometano (60:40) + 2 mL de acetato de etila. Revelador: anisaldeído sulfúrico.

Fonte: Elaboração própria

5.4 Elucidação estrutural de TRPHS

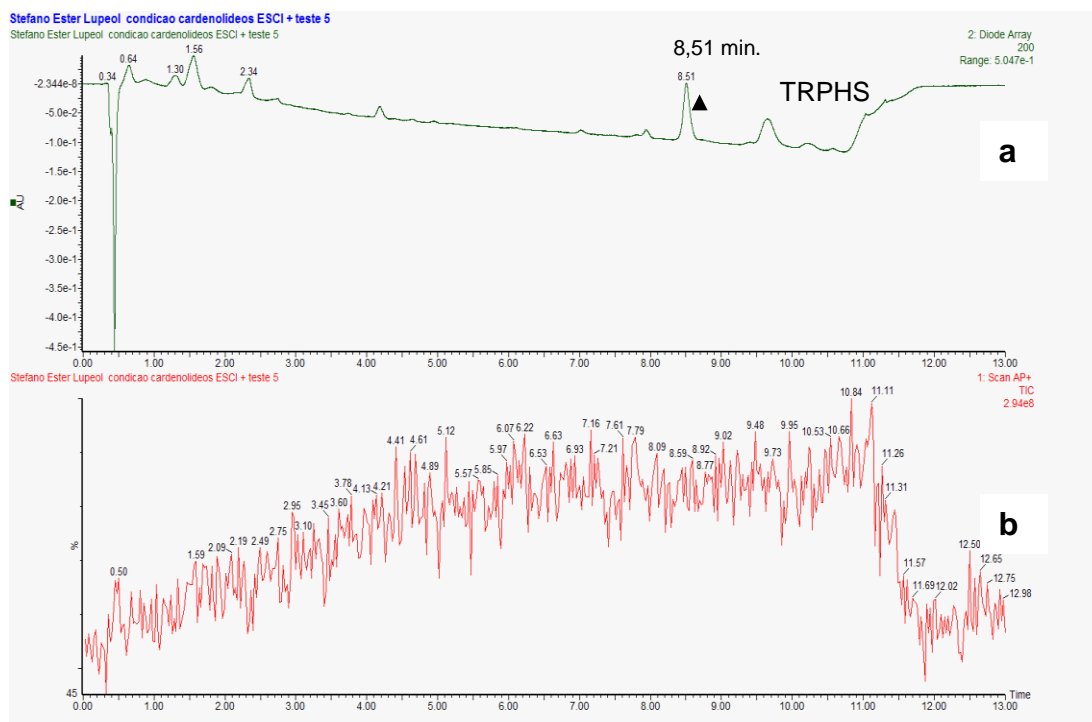
TRPHS apresentou-se como um sólido branco amorfo, com faixa de fusão de 39,2 a 43,0°C. Seu espectro no UV, obtido *on line* pelo detector DAD do sistema de LC-MS-ESI (Figura 44), apresenta um máximo de absorção em λ de 225,55 nm, evidenciando a ausência de grupo cromofórico conjugado. Na Figura 45 é apresentado o perfil cromatográfico obtido pelo detector DAD e pelo detector de massas no modo positivo (LC-MS-ESI). A Figura 46 apresenta uma ampliação do perfil cromatográfico na região de eluição de TRPHS.

Figura 44 – Espectro no UV obtido para TRPHS



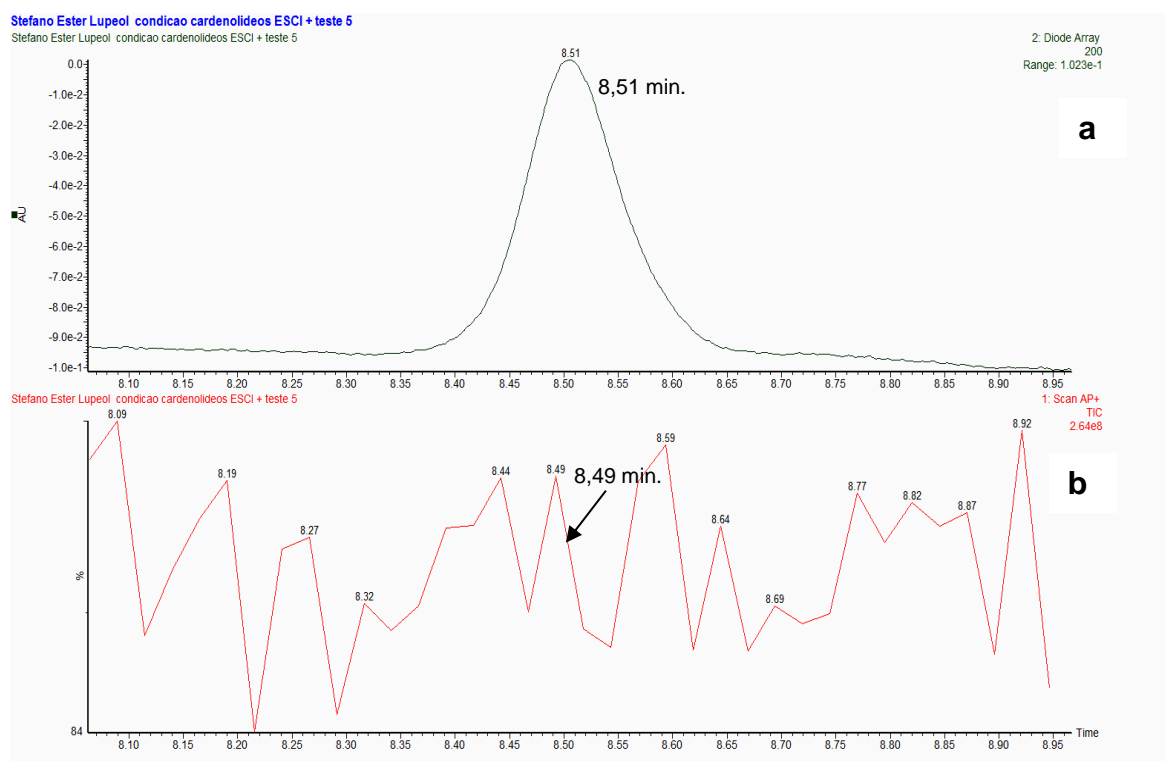
Fonte: Elaboração própria

Figura 45 – Perfis cromatográficos obtidos por UPLC-MS-ESI para TRPHS, com detecção no UV (a) e por MS no modo positivo de ionização (b)



Fonte: Elaboração própria.

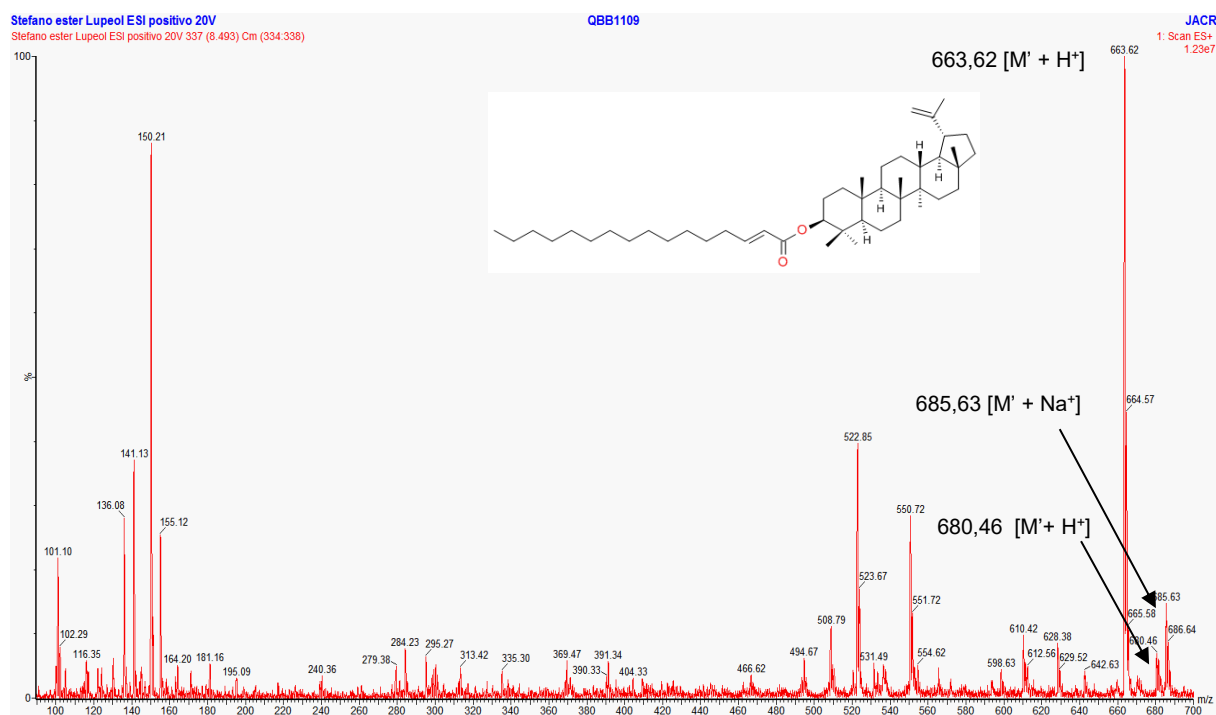
Figura 46 – Ampliação do cromatograma obtido por UPLC-MS-ESI para TRPSH, com detecção no UV (a) e por MS no modo positivo de ionização (b)



Fonte: Elaboração própria.

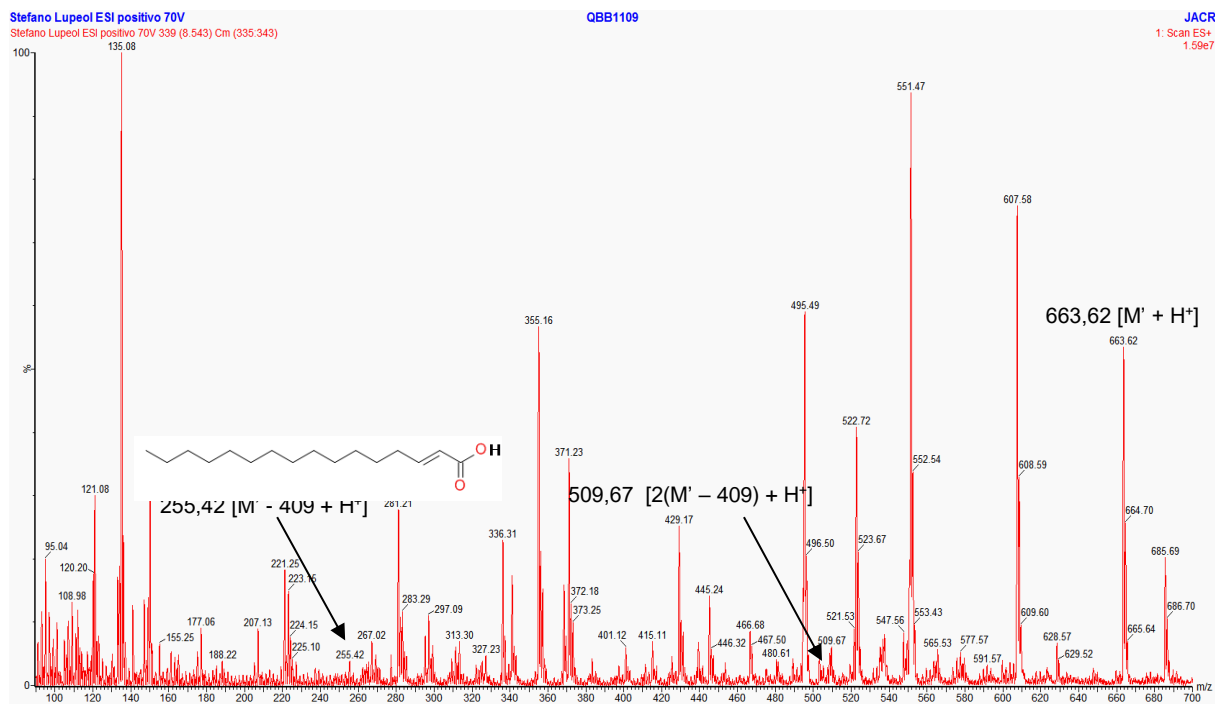
Os espectros de massas obtidos por LC-MS-ESI no modo positivo para o pico com TR de 8,49 min, empregando voltagem de ionização de 20V e 70V, estão representados nas Figuras 47 e 48, respectivamente.

Figura 47 – Espectro de massas obtido por UPLC-MS-ESI no modo positivo para o pico com tempo de retenção de 8,49 min (20V), correspondente ao constituinte TRPHS



Fonte: Elaboração própria

Figura 48 – Espectro de massas obtido por UPLC-MS-ESI no modo positivo para o pico com tempo de retenção de 8,49 min (70V), correspondente a TRPHS



O espectro de massas obtido para TRPHS empregando a menor energia de ionização (Figura 47) forneceu o pico em m/z 663,62 $[M + H^+]$, que é compatível com um éster do lupeol/ α -amirina, de fórmula molecular $C_{46}H_{78}O_2$. Destaca-se também o pico em m/z 685,63 $[M + Na^+]$, atribuído ao aduto do constituinte com o íon sódio.

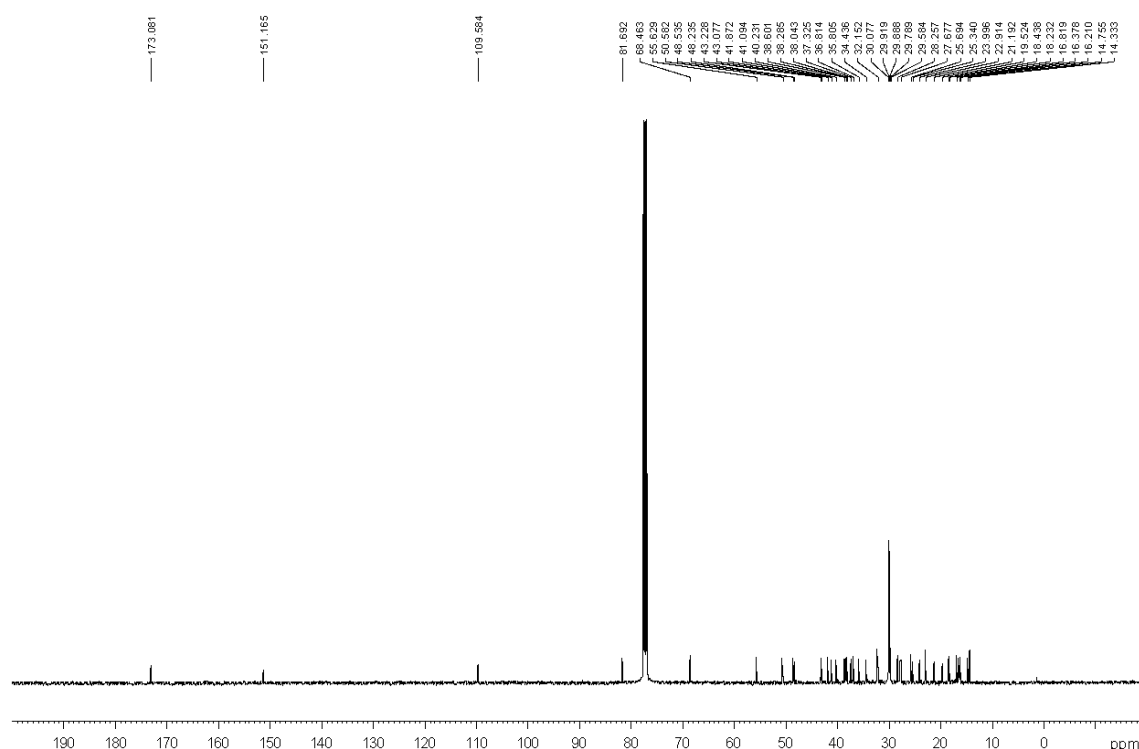
Para analisar a cadeia lateral do éster – por espectrometria de massas, empregou-se maior energia de ionização. Assim, o espectro de massas de TRPHS obtido (Figura 48) forneceu novamente o pico em m/z 663,62 $[M' + H^+]$, compatível com o íon *quasi*-molecular do éster, bem como o pico em m/z 255,42 $[M' - 409 + H^+]$, atribuído à cadeia lateral do éster de fórmula molecular $C_{16}H_{30}O_2$. Nota-se, também, o pico em m/z 509,67 $[2(M - 409) + H^+]$, que foi atribuído ao dímero resultante da associação de duas cadeias laterais.

Apesar da análise do espectro de massas sugerir que o composto possui fórmula molecular $C_{46}H_{78}O_2$, também se observa no espectro um pico em m/z 680,46 $[M' + H^+]$ (Figura 47), compatível com um éster do lupeol/ α -amirina de fórmula

molecular $C_{46}H_{80}O_3$. A diferença de massa molecular desses picos é equivalente a uma hidroxila, sugerindo sua presença na cadeia lateral de TRPHS. Essa hidroxila, todavia, está sujeita à desidratação durante a ionização no espectrômetro de massas, resultando na diminuição da intensidade do seu sinal.

A atribuição dos sinais dos espectros de RMN de 1H e de ^{13}C (400 e 100 MHz, respectivamente, $CDCl_3$) (Figura 49 e 52; Tabelas 12 e 13) obtidos para TRPHS foi realizada a partir da comparação com valores descritos na literatura para triterpenos estruturalmente relacionados (BARROS, 2008; ENDRINGER, 2007; FURUKAWA et al., 2002; OLEA; ROQUE, 1990; MENDES et al., 1999).

Figura 49 - Espectro de RMN de ^{13}C obtido para TRPHS (100 MHz, $CDCl_3$)



Fonte: Elaboração própria.

Tabela 12 – Atribuição dos sinais de RMN de ^{13}C obtidos para TRPHS (100 MHz, CDCl_3)

C	δ^1 *	DEPT-135	δ^{2**}	δ^{3**}
1	41,87	CH ₂	38,38	40,2
2	23,99	CH ₂	23,77	24,3
3	81,68	CH	81,46	80,6
4	38,04	C	37,82	38,2
5	55,62	CH	55,41	55,7
6	18,43	CH ₂	18,21	18,5
7	34,43	CH ₂	34,21	34,5
8	41,09	C	41,64	41,1
9	50,58	CH	50,39	50,5
10	37,32	C	37,10	37,3
11	19,51	CH ₂	20,97	21,1
12	27,67	CH ₂	25,11	27,8
13	38,28	CH	38,06	38,3
14	43,07	C	43,01	43,1
15	30,07	CH ₂	27,45	30,0
16	35,80	CH ₂	35,58	35,8
17	43,22	C	42,89	43,2
18	48,53	CH	48,31	48,6
19	48,23	CH	48,01	48,3
20	151,16	C	150,9	151,0
21	29,91	CH ₂	29,8	30,1
22	40,23	CH ₂	40,0	38,6
23	28,25	CH ₃	28,03	28,2
24	16,81	CH ₃	16,59	17,0
25	16,37	CH ₃	16,16	16,3
26	14,33	CH ₃	16,16	14,3
27	16,21	CH ₃	14,53	16,2
28	18,23	CH ₃	18,01	18,2
29	109,58	CH ₂	109,35	110,0
30	19,52	CH ₃	19,30	19,5
1'	173,08	C	170,0	172,2
2'	41,85	CH ₂	40,87	44,0
3'	68,46	CH	68,23	68,4
4'	38,60	CH ₂	-	38,2
(CH ₂) _n	25,34 – 32,15	CH ₂	-	25-32
14'	32,15	CH ₂	-	32,1
15'	22,91	CH ₂	-	23,0

16'	14,33	CH ₃	14,11	14,3
-----	-------	-----------------	-------	------

* δ^1 : valores de deslocamentos químicos obtidos neste trabalho.

** δ^2 : valores de deslocamentos químicos relatados por Lee e col. (1997) para lup-20(29)-en-3-3(R)-hidroxihexadecanoato (CDCl₃, 125 MHz).

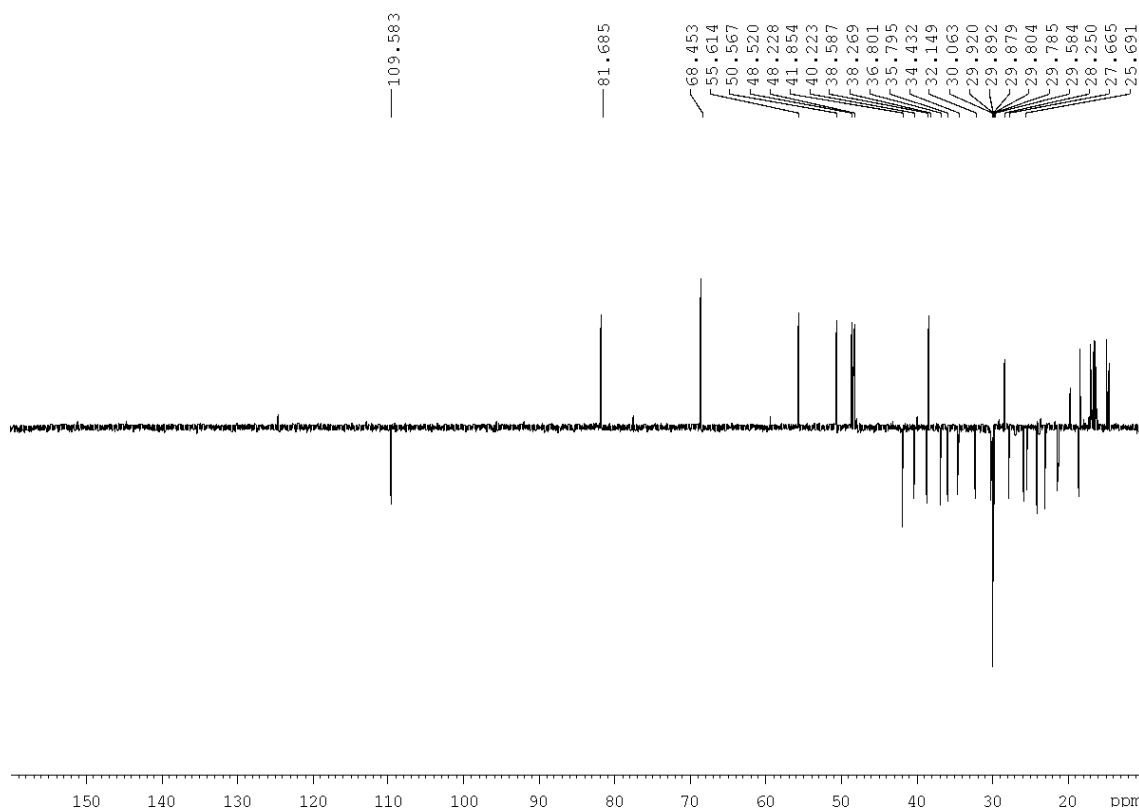
** δ^3 : valores de deslocamentos químicos descritos por Furukawa e col. (2002) para procrima A (piridina-*d*5, 125 MHz).

Fonte: Elaboração própria.

O espectro de RMN de ¹³C obtido para TRPHS apresentou 46 sinais de carbono (Figura 49, Tabela 12), compatível com um éster do lupeol/ α -amirina sugerido pela análise do espectro de massas anteriormente discutido. A análise do espectro de RMN de ¹³C e do subespectro DEPT-135 (Figuras 49, 50 e 51, Tabela 12) permitiu identificar sete carbonos não hidrogenados, 24 do tipo metilênico, sete do tipo metínico e oito do tipo metílico (Tabela 12). O sinal em δ 173,08 ppm sugere a presença de carbonila de éster alifático e o sinal em 68,46 ppm é compatível com um carbono oximetínico (SILVERSTEIN et al., 1991). A observação desses dados em conjunto com o deslocamento diamagnético do sinal referente à C2 [27,6 ppm para o lupeol (ENDRINGER, 2007) e 23,99 ppm para TRPHS] e deslocamento paramagnético do sinal atribuído à C3 [79,21 ppm para o lupeol (ENDRINGER, 2007) e 81,68 ppm para TRPHS] evidenciam que a hidroxila em C3 encontra-se esterificada em TRPHS (ENDRINGER, 2007; OLEA & ROQUE, 1990; MENDES et al., 1999).

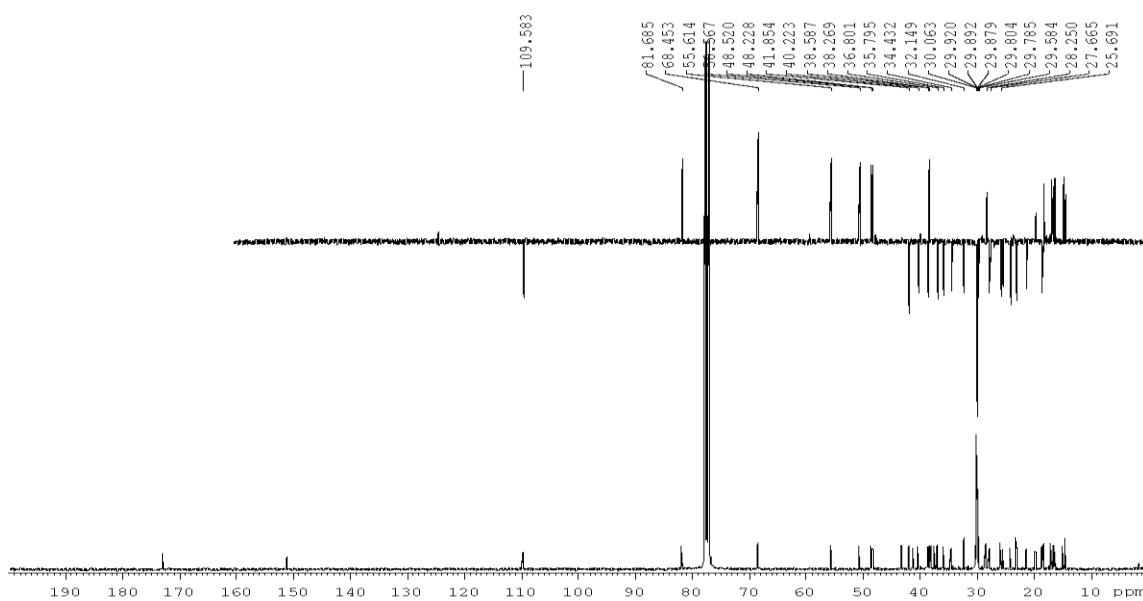
O valor de deslocamento químico de C3 varia em função da estereoquímica da ligação do grupo hidroxila (ou derivado éster ou éter), com valores em torno de 75 ppm quando a estereoquímica da ligação é alfa e 79 ppm quando é beta (BARROS, 2008; MAHATO & KUNDU, 1994). Dessa forma, o valor de deslocamento químico observado para C3 em TRPHS (81,68 ppm) indica que a ligação da cadeia lateral apresenta uma estereoquímica beta.

Figura 50 - Subespectro DEPT-135 obtido para TRPHS (100 MHz, CDCl_3)



Fonte: Elaboração própria

Figura 51 - Espectro de RMN de ^{13}C obtido para TRPHS e subespectro DEPT-135 obtido para TRPHS (100 MHz, CDCl_3)

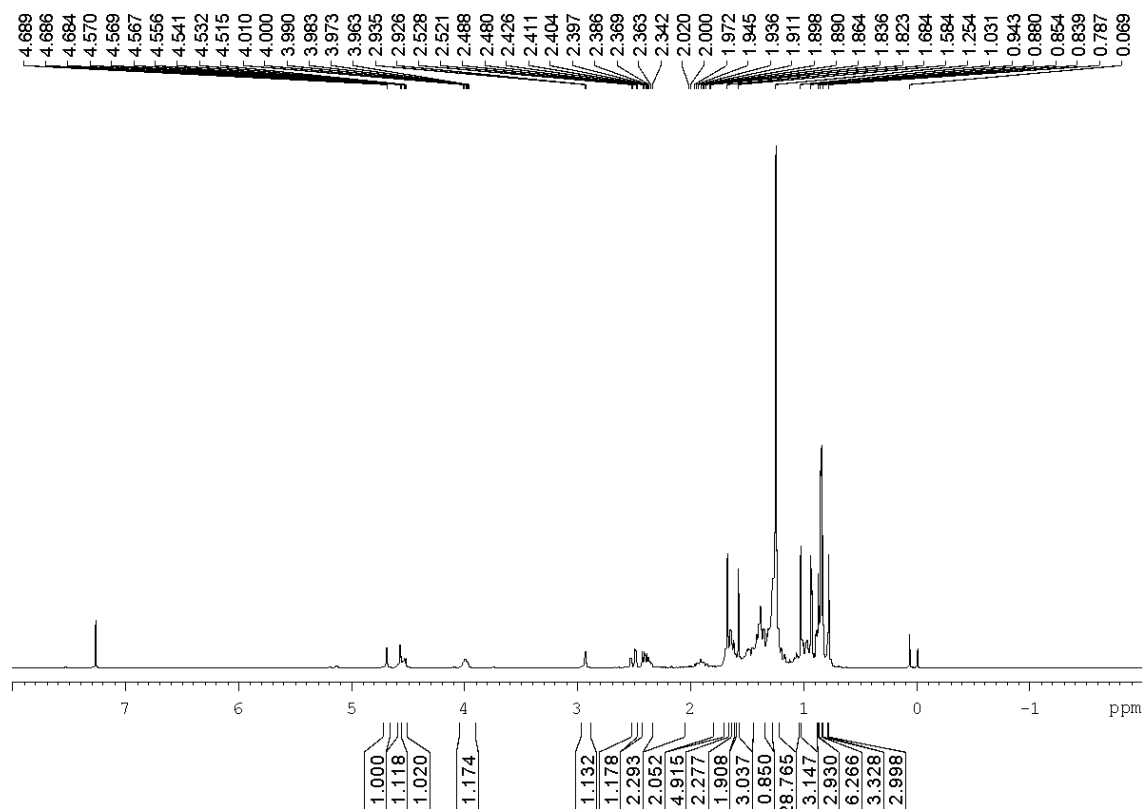


Fonte: Elaboração própria

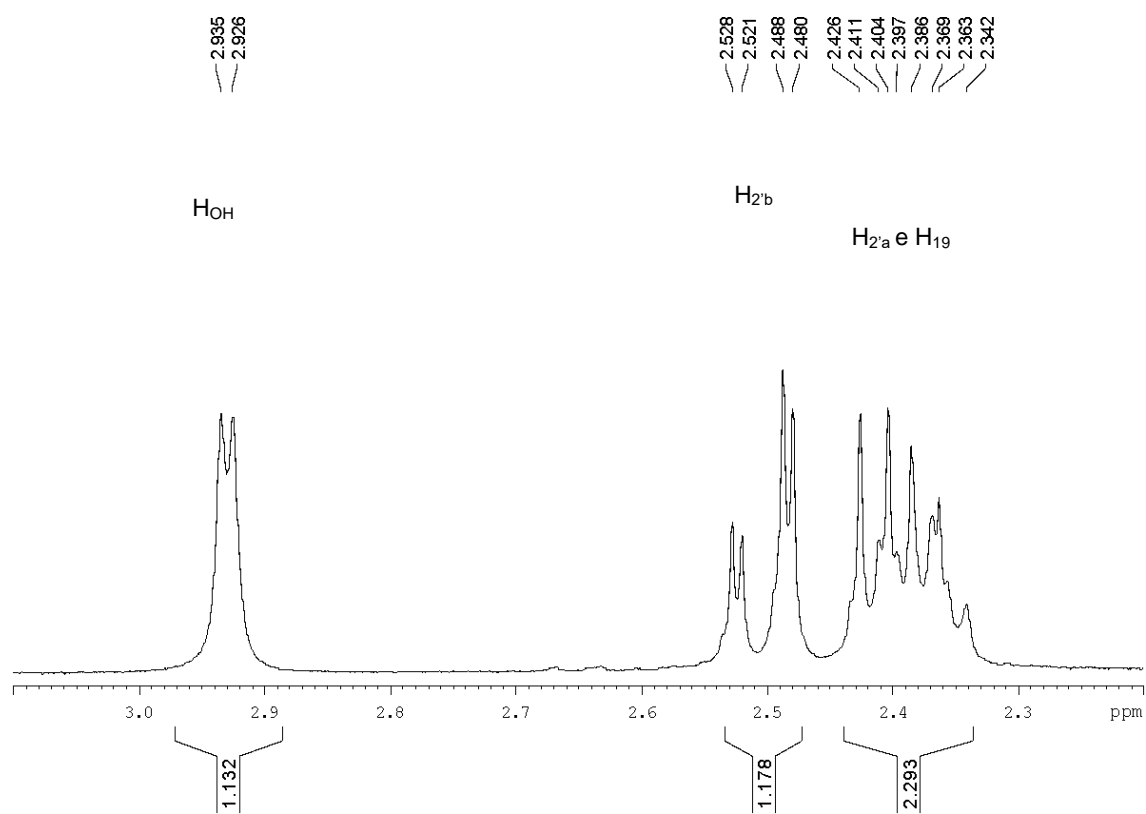
Os sinais na região de δ 25 a 32 ppm indicam a presença de cadeia alifática (FURUKAWA et al., 2002). Observa-se, também, um carbono carbinólico com deslocamento químico de 68,46 ppm, atribuído ao carbono C3' (ENDRINGER, 2007; FURUKAWA et al., 2002).

Os dados do espectro de RMN de ^{13}C permitiram, ainda, definir o esqueleto triterpênico como sendo do tipo lup-20(29)-eno (lupeol), a partir dos sinais em δ 151,16 e 109,58 ppm, atribuídos aos carbonos olefínicos C20 e C29 (Tabela 12; Figura 49). O esqueleto do tipo urs-12-eno (α -amirina) forneceria sinais característicos para os carbonos C12 e C13 em δ 139 e 124 ppm, respectivamente, o que não é condizente com os dados observados para TRPHS (C12 = 27,67 ppm e C13 = 38,28 ppm) (ENDRINGER, 2007; FURUKAWA et al., 2002; OLEA & ROQUE, 1990).

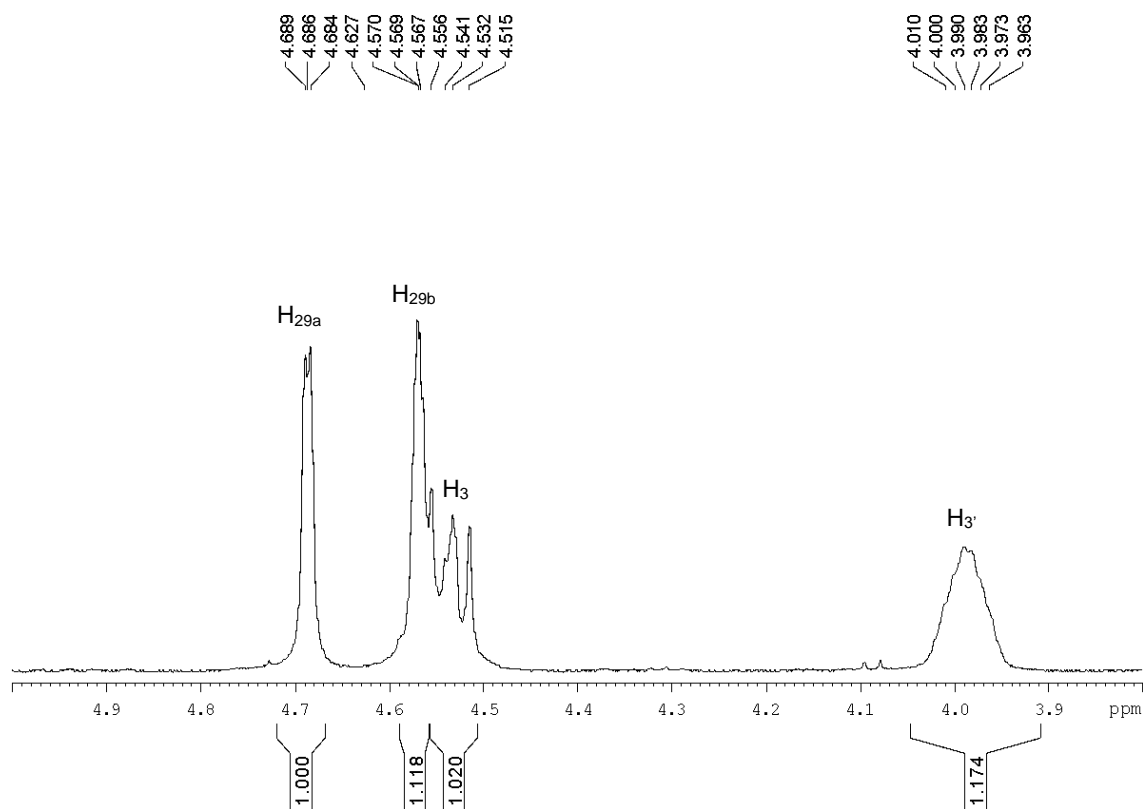
A análise dos dados de RMN de ^1H também possibilitou caracterizar TRPHS como sendo um éster do lupeol, com base nas diferenças estruturais dos esqueletos ursano e lupano (BARROS, 2008). Constituintes do grupo lupano possuem sinais característicos dos hidrogênios da dupla exocíclica de C29 (dupletos, CH_2 29a e C H_2 29b, δ 4,68 e 4,56 ppm e J 2 e 1,2), condizentes com os valores de deslocamento químicos encontrados para TRPHS (Tabela 13; Figuras 52, 53, 54 e 55).

Figura 52 - Espectro de RMN de ^1H obtido para TRPHS (400 MHz, CDCl_3)

Fonte: Elaboração própria

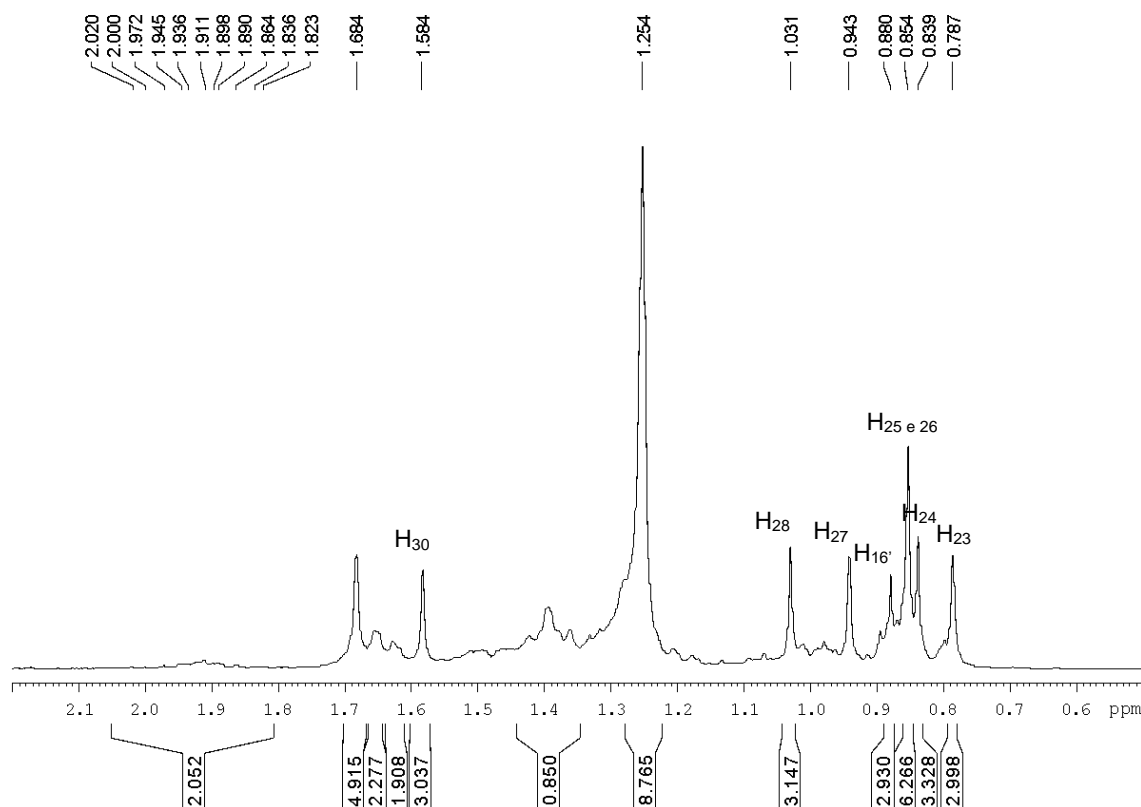
Figura 53 - Expansão do espectro de RMN de ^1H obtido para TRPHS (400 MHz, CDCl_3)

Fonte: Elaboração própria

Figura 54 - Expansão do espectro de RMN de ^1H obtido para TRPHS (400 MHz, CDCl_3)

Fonte: Elaboração própria

Figura 55 - Expansão do espectro de RMN de ^1H obtido para TRPHS (400 MHz, CDCl_3)



Fonte: Elaboração própria

Outros sinais do espectro de RMN de ^1H de TRPHS foram atribuídos tendo como base os dados relatados por Furukawa e colaboradores (2002) para um éster do lupeol, denominado procrima A, bem como por Lee et al. (1997) para o éster lup-20(29)-en-3-3(*R*)-hidroxihexadecanoato, substâncias de igual estrutura. O duplo duplete aparente centrado em δ 4,53 ppm foi atribuído a H3, e sua multiplicidade resulta dos acoplamentos com os hidrogênios metilênicos em C2 ($J_{\text{H}_3\text{-H}_2\text{ a,a}} = 9,8$ Hz; $J_{\text{H}_3\text{-H}_2\text{ e,e}} = 6,6$ Hz), confirmando a posição beta de ligação da hidroxila (ENDRINGER, 2007; FURUKAWA et al., 2002). Observa-se um deslocamento paramagnético deste sinal (δ 4,53 ppm) em comparação com o valor descrito para o lupeol (δ 3,47 ppm), confirmando a esterificação da hidroxila nessa posição (FURUKAWA et al., 2002; ENDRINGER, 2007). Foi possível, também, atribuir os sinais referentes aos grupos metílicos do esqueleto lupeno. Assim, os grupos CH_3 nas posições 23, 24, 25, 26, 27,

28 e 30 foram atribuídos aos sinais em δ 0,78; 0,83; 0,83; 0,85; 0,94; 1,03; e 1,58 ppm, respectivamente (FURUKAWA et al., 2002).

Dentre os sinais da cadeia lateral do éster, destacam-se o multiplete em δ 3,96 - 4,01 ppm, com integral de um hidrogênio, atribuído a H3', um duplo duplete centrado em δ 2,50 ppm, e outro sinal sobreposto em δ 2,42 - 2,44 ppm, atribuídos aos hidrogênios H-2'a e H-2'b, respectivamente (Figura 53). O sinal centrado em δ 0,88 ppm (simpleto) foi atribuído aos hidrogêneos metílicos terminais ($\text{CH}_3\text{16}'$) da cadeia lateral (Figura 55 e Tabela 13) (FURUKAWA et al., 2002). A atribuição dos sinais de H2' e H3' foi confirmada pela análise do mapa de contornos COSY (400 MHz, CDCl_3) (Figuras 56 e 57; Tabela 13).

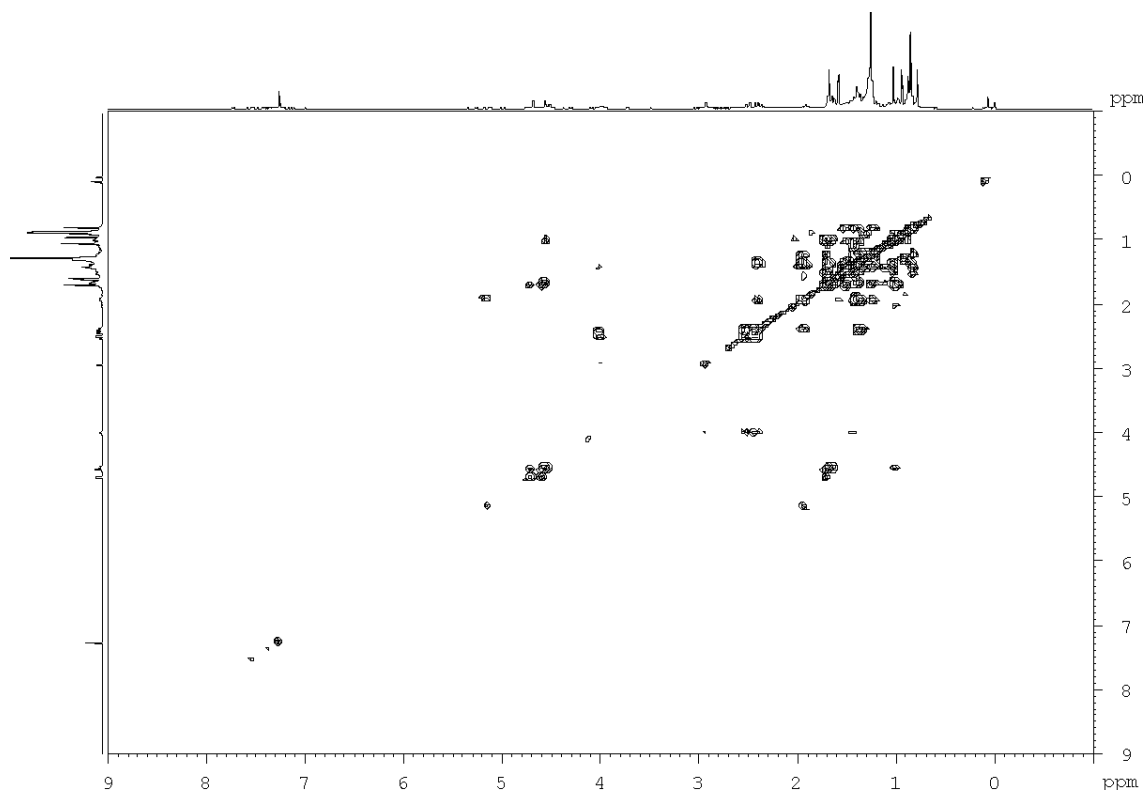
A análise desse mapa permitiu confirmar a posição de ligação da hidroxila na cadeia lateral, a partir da correlação entre o sinal atribuído à H3' (δ 2,50) e o próton da hidroxila (duplete aparente, δ 2,93 ppm), bem como pela conectividade do sistema de spins de H2'a, H2'b e H3'. Foi possível, ainda, visualizar a correlação entre os sinais de H29a e H29b, como destacado na expansão do mapa, na Figura 57.

Tabela 13 - Dados do espectro de RMN de ^1H obtido para TRPHS (400 MHz, CDCl_3)

H	δ (ppm)	Multiplicidade	J (Hz)
OH	2,93	d_{ap}	$J_{\text{H3}'\text{-HOH}}=3,6$
3	4,53	dd_{ap}	$J_{\text{H3-H2 a,a}}=9,8$ $J_{\text{H3-H2 a,e}}=6,6$
2'a / 19	2,42 a 2,34	m	-
2'b	2,50	dd	$J_{\text{H2}'\text{b-H2}'\text{a}}=16,2$ $J_{\text{H2}'\text{b-H3}}=3,12$
3'	4,01 a 3,96	m	-
16'	0,88	s	-
23	0,78	s	-
24	0,83	s	-
25	0,85	s	-
26	0,85	s	-
27	0,94	s	-
28	1,03	s	-
29a	4,68	d	2,0
29b	4,56	d	1,2
30	1,58	s	-

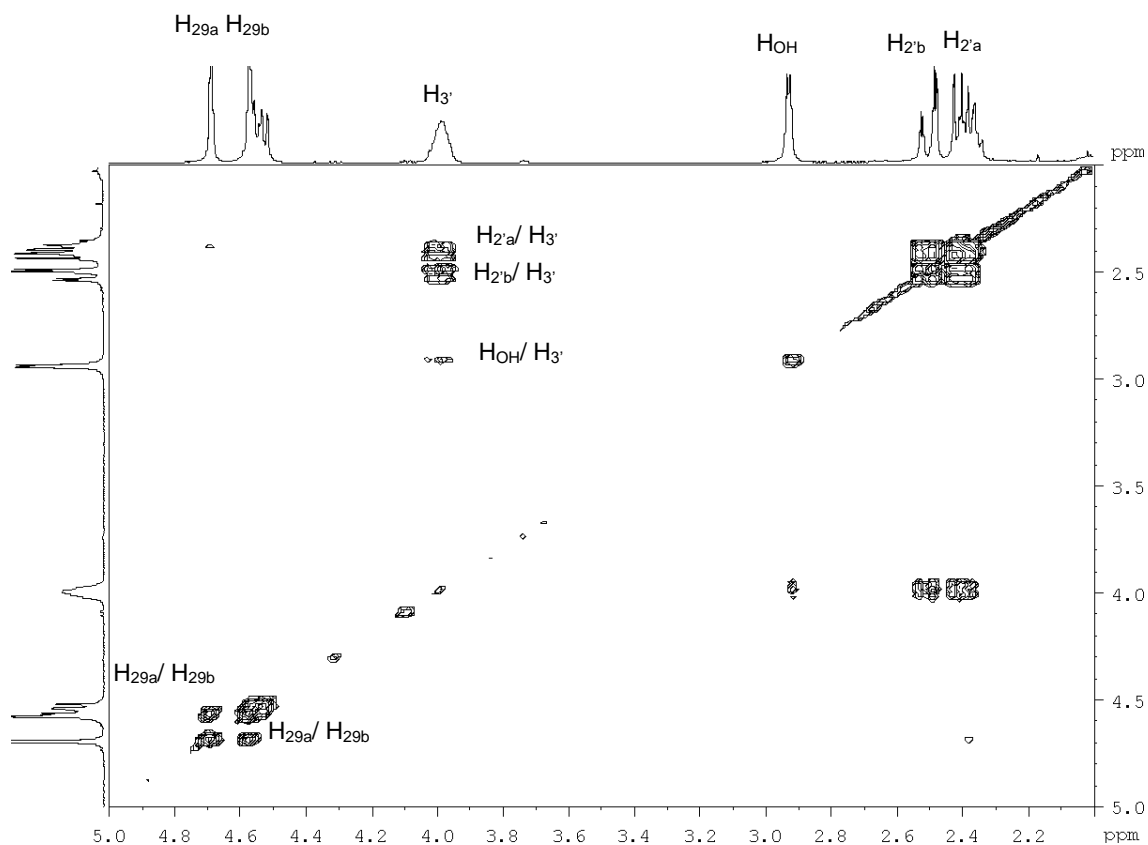
Fonte: Elaboração própria.

Figura 56 - Mapa de contornos COSY (400 MHz, CDCl₃) obtido para TRPHS



Fonte: Elaboração própria.

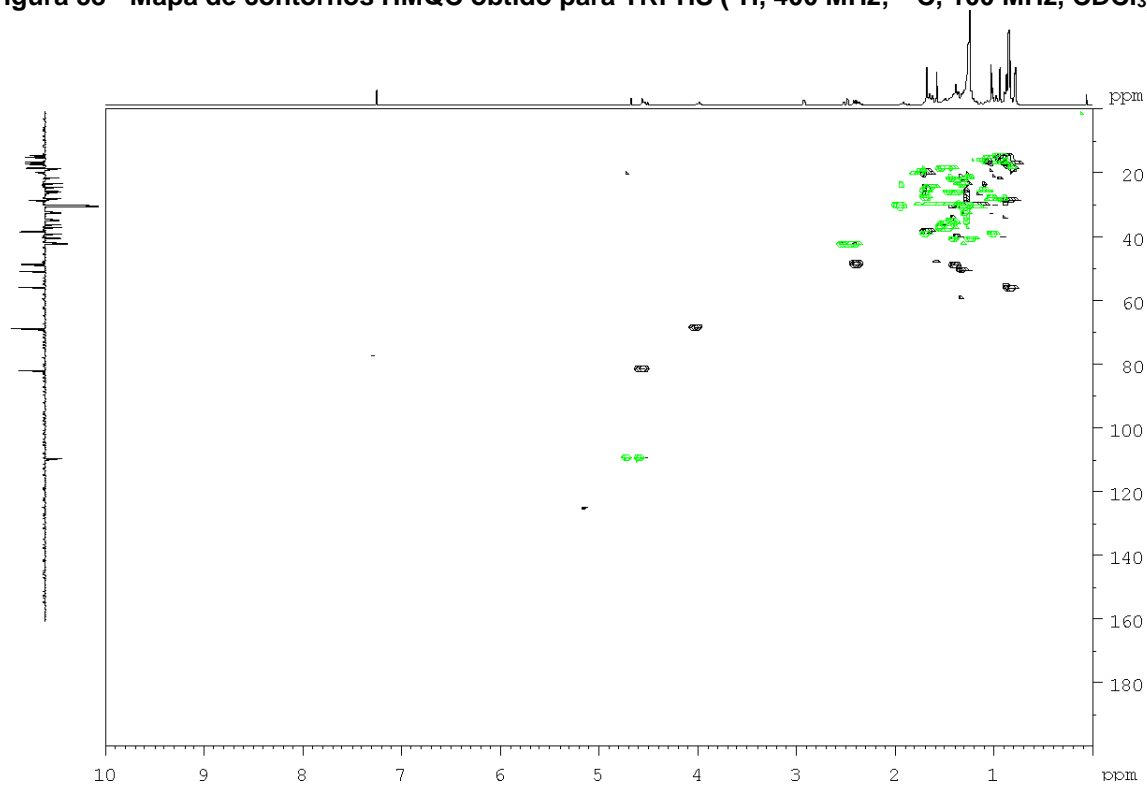
Figura 57 - Expansão do mapa de contornos COSY (400 MHz, CDCl_3) obtido para TRPHS



Fonte: Elaboração própria.

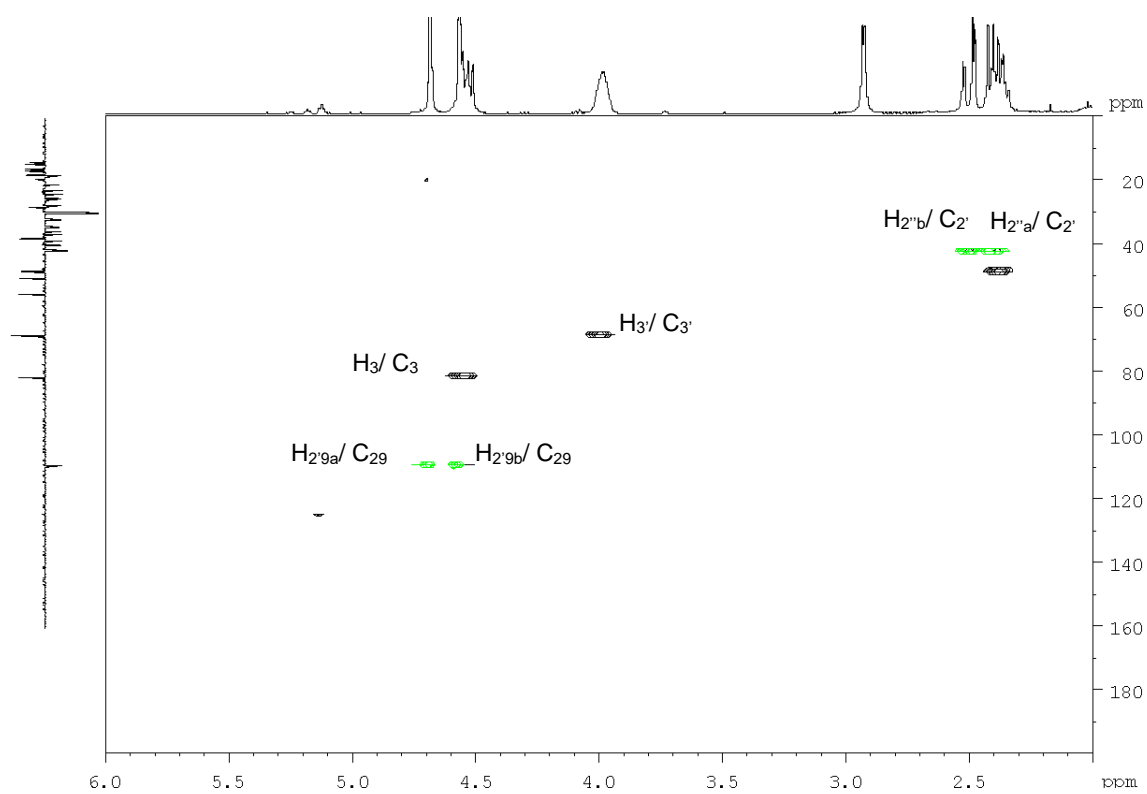
O mapa de contorno HMQC obtido para TRPHS (^1H , 400 MHz; ^{13}C , 100 MHz, CDCl_3) foi empregado para confirmar algumas das atribuições e está apresentado nas Figuras 58 e 59. Assim, observaram-se manchas de correlação entre o sinal atribuído à $\text{C}2'$ e os prótons $\text{H}2'a$ e $\text{H}2'b$; entre $\text{C}3'$ e $\text{H}3'$, bem como entre o sinal de $\text{C}29$ e os prótons $\text{H}29'a$ e $\text{H}29'b$. Por sua vez, a análise do mapa de contorno HMBC (Figuras 60 e 61) evidenciou a correlação entre os sinais atribuídos a $\text{H}3$ (δ 4,53 ppm) e $\text{C}1'$ (δ 41,87 ppm), possibilitando confirmar a esterificação da hidroxila em $\text{C}3$, bem como a localização da carbonila na cadeia lateral do éster.

Figura 58 - Mapa de contornos HMQC obtido para TRPHS (^1H , 400 MHz; ^{13}C , 100 MHz, CDCl_3).



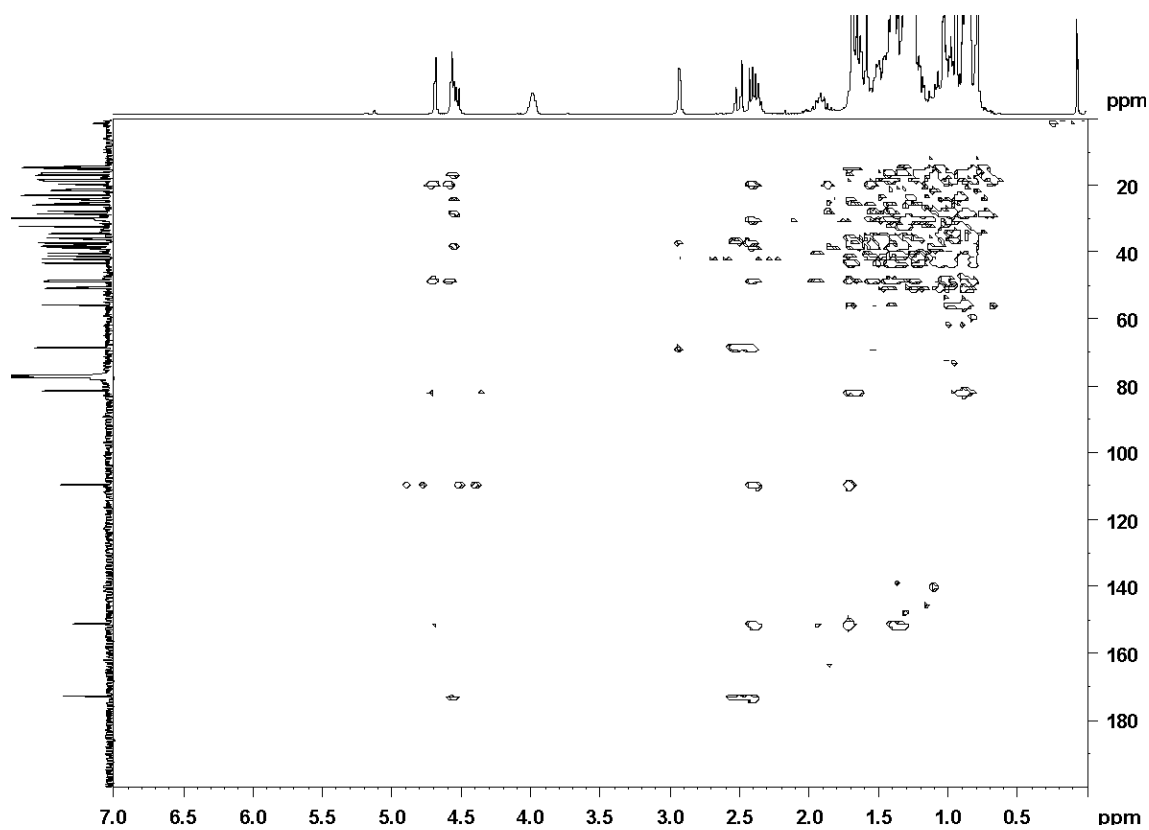
Fonte: Elaboração própria.

Figura 59 – Expansão do mapa de contornos HMQC obtido para TRPHS (^1H , 400 MHz; ^{13}C , 100 MHz, CDCl_3)



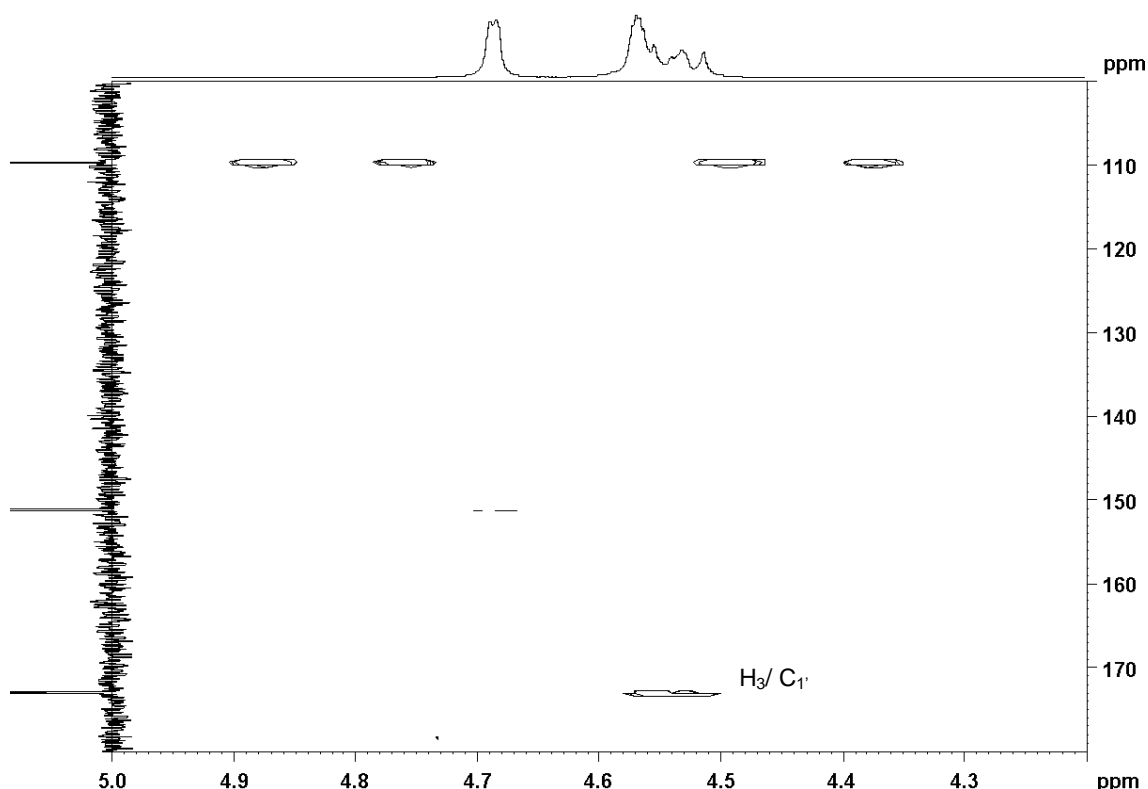
Fonte: Elaboração própria.

Figura 60 - Mapa de contornos HMBC obtido para TRPHS (^1H , 400 MHz; ^{13}C , 100 MHz, CDCl_3)



Fonte: Elaboração própria.

Figura 61 – Expansão do mapa de contornos HMBC obtido para TRPHS (^1H , 400 MHz; ^{13}C , 100 MHz, CDCl_3)



Fonte: Elaboração própria.

Assim, com base na análise dos dados espectrais disponíveis e comparação com dados relatados na literatura para derivados do lupeol, TRPHS foi definido como um éster do lupeol, com cadeia lateral de 16 carbonos (**56**). Os valores de deslocamentos químicos de C3 e H3, bem como os dados dos mapas de contorno HMQC e HMBC, permitiram definir a posição da esterificação na hidroxila em C3. Por sua vez, a presença de hidroxila na cadeia lateral do éster foi confirmada por dados de espectrometria de massas e de RMN. A localização da hidroxila em C3' foi indicada pelos valores de deslocamento químico de C3' e H3', bem como pela conectividade do sistema de spins de H2'a, H2'b e H3', além da correlação entre H3' e o próton da hidroxila. A estereoquímica da ligação da hidroxila em C3' não pôde ser definida a partir dos dados espectrais obtidos.

Ésteres do lupeol e de α - ou β -amirina com cadeias laterais hidroxiladas ou não foram previamente isolados e identificados em extratos de *H. speciosa* (item 3.4) (BARROS, 2008; ENDRINGER, 2007). Ésteres de cadeias longas do lupeol e da α/β -amirina foram identificados no látex de *Periploca laevigata* (NEJMA et al. 2013). O estudo fitoquímico de cascas de *Pentalinon andrieuxii* resultou no isolamento de um éster do lupeol com cadeia lateral hidroxilada, denominado de procrima B (PEÑA-RODRÍGUEZ, 2014). Das partes aéreas de *Koelpinia linearis*, Razdan e colaboradores (1996) isolaram cinco ésteres de cadeia longa do lupeol, contendo de 14 a 18 átomos de carbonos.

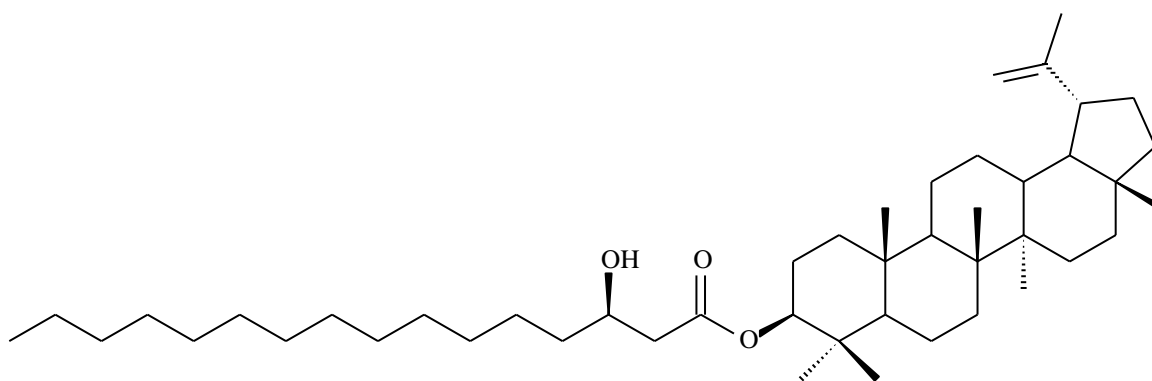
Furukawa e colaboradores (2002) isolaram e caracterizaram dois ésteres do lupeol de cadeia longa, a partir do própolis de alecrim. O éster denominado de procrima A (FURUKAWA et al., 2002) tem estrutura química idêntica àquela definida para TRPSH (**56**). Na mesma direção, o lupeol β -hidroxihexadecanoato isolado de folhas de *Holarrhena pubescens* possui a mesma estrutura química de TRPHS (TUNTIWACHWUTTIKUL et al., 2007). Ainda, o éster isolado do própolis verde de *Maclura pomifera*, 3-O- β -(3'-*R*-hidroxi)-hexadecanoil-lupeol, tem estrutura química equivalente à TRPHS (HATTORI et al., 2011; LEE et al., 1997).

Lee e colaboradores (1997) relataram um valor de $[\alpha]_D^{24}$ de + 20,5 (CHCL₃, c=0,01) para o 3-O- β -(3'-*R*-hidroxi)-hexadecanoil-lupeol. Conforme descrito anteriormente, não foi possível estabelecer a estereoquímica da ligação da hidroxila em C3' a partir dos dados espectrais. Assim, na tentativa de estabelecer a configuração absoluta de TRPHS determinou-se sua atividade óptica e comparou-se o resultado obtido com o valor descrito na literatura para 3-O- β -(3'-*R*-hidroxi)-hexadecanoil-lupeol. O valor obtido ($[\alpha]_D^{27}$ + 21,9) (CHCL₃, c=0,09) foi similar ao relatado na literatura ($[\alpha]_D$ de + 20,5), sendo possível inferir, portanto, que TRPHS possui estereoquímica idêntica ao 3-O- β -(3'-*R*-hidroxi)-hexadecanoil-lupeol (**56**), previamente relatado por Lee et al. (1997).

É a primeira vez que 3-O- β -(3'-*R*-hidroxi)-hexadecanoil-lupeol é relatado para a espécie *H. speciosa*. A revisão da literatura realizada não indica atividades biológicas relatadas para este éster do lupeol. Apesar dessa substância não ter sido

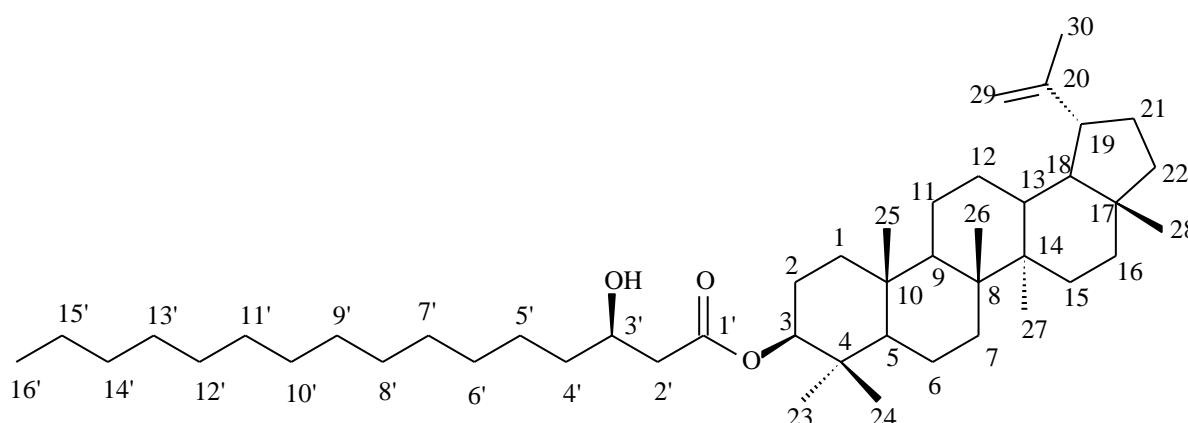
avaliada nos ensaios *in vitro* e *in vivo* de atividade antidiabética, é possível supor sua contribuição para a atividade biológica de *H. speciosa*, tendo em vista sua presença na fração diclorometânica e o fato de que a hidrólise do éster no trato gastro-intestinal resulta no lupeol, triterpeno com conhecida atividade antidiabética, conforme discutido anteriormente (item 5.2).

55 - Lupenona



Fonte: Elaboração própria via *Chendraw*.

56 - 3-O-β-(3'-R-hidroxi)-hexadecanoil-lupeol (TRPHS)



Fonte: Elaboração própria via *Chendraw*.

6 CONCLUSÕES

Os ensaios extrativos realizados com folhas de *H. speciosa* forneceram extratos com composições químicas distintas, sendo bornesitol o constituinte majoritário na maioria dos extratos (exceto naqueles obtidos com solução etanólica a 50% e 70%), seguindo-se o teor de flavonoides totais (exceto nos extratos obtidos com solução etanólica a 50% e 70%), rutina, ácido clorogênico e FlavHS.

Análise quimiométrica de componente principal indicou que a atividade vasodilatadora dos extratos de folhas de *H. speciosa* correlaciona-se positivamente com os teores de ácido clorogênico, rutina, flavonoides totais e FlavHS, observando-se uma correlação negativa com o teor de bornesitol.

A análise de componente principal para a atividade inibitória da enzima α -glicosidase não demonstrou relação significativa entre os teores dos constituintes químicos quantificados e a atividade biológica das preparações.

A análise quimiométrica de componente principal entre a atividade inibitória da enzima α -glicosidase e as áreas dos picos majoritários nos perfis cromatográficos de CLAE-DAD dos extratos demonstrou correlação positiva com o pico 10 (substâncias lipofílicas), pico 5 (derivado flavonoídico) e FlavHS, bem como correlação negativa com o pico 1 (ácido quínico) e ácido clorogênico.

A análise de componente principal para a atividade vasodilatadora forneceu correlação positiva entre a atividade biológica e o pico 1 (ácido quínico) e ácido clorogênico e, menos pronunciadamente, com os picos dos derivados flavonoídicos. Correlação negativa foi observada para as variáveis pico 5 (derivado flavonoídico) e para compostos lipofílicos.

Todas as frações resultantes do fracionamento do extrato de *H. speciosa* apresentaram atividade inibitória da enzima α -glicosidase, sem diferença estatística entre elas.

O extrato de *H. speciosa* e a fração diclorometânica derivada deste reduziram a glicose sérica em ensaio agudo de avaliação da glicemia, quando administrados por via oral a camundongos.

Os constituintes responsáveis pela potencial atividade antidiabética da espécie são os componentes lipofílicos, provavelmente lupeol, α -amirina e seus ésteres. O fracionamento da fração diclorometânica resultou no isolamento de um sólido cuja estrutura química foi elucidada por métodos espectroscópicos usuais como sendo 3-O- β -(3'-*R*-hidroxi)-hexadecanoil-lupeol, inédito na espécie.

REFERÊNCIAS

- ABAD-GARCÍA, B.; BERRUETA, L.A.; GARMÓN-LOBATO, S.; URKAREGI, A.; GALLO, B.; VICENTE, F. Chemometric Characterization of Fruit Juices from Spanish Cultivars According to Their Phenolic Compound Contents: I. Citrus Fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.60, p.3635–3644, 2012.
- ABD EL-MOHSEN, M.M.; RABEH, M.A.; ABOU-SETTA, L.; EL-RASHEDY, A.A.; HUSSEIN, A.A. Marrubiin: a potent α -glucosidase inhibitor from *Marrubium alysson*. *International Journal of Applied Research in Natural Products*, v.7, p.21-27, 2014.
- AGUILAR-SANTAMARÍA, L.; RAMÍREZ, G.; NICASIO, P.; ALEGRÍA-REYES, C.; HERRERA-ARELLANO, A. Antidiabetic activities of *Tecoma stans* (L.) Juss. ex Kunth. *Journal of Ethnopharmacology*, v.124, p.284-288, 2009.
- AHMAD, A.; KHAN, R.M.A.; ALKHARFY, K.M. Effects of selected bioactive natural products on the vascular endothelium. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, v.62, p.111-121, 2013.
- ALESSI, A.; BONFIM, A.V.; BRANDÃO, A.A.; FEITOSA, A.; AMODEO, C.; ALVES, C.R.; BORELLI, F. I posicionamento brasileiro em hipertensão arterial e diabetes mellitus. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*, v.100, n.6, p.491-501, 2013.
- ALI, H.; HOUGHTON, P.J.; SOUMYANATH, A. α -Amylase inhibitory activity of some Malaysian plants used to treat diabetes; with particular reference to *Phyllanthus amarus*. *Journal of Ethnopharmacology*, v.107, p.449–455, 2006.
- AL-MAGHREBI, M.; BENTER, I.F.; DIZ, D.I. Endogenous angiotensin-(1-7) reduces cardiac ischemia-induced dysfunction in diabetic hypertensive rats. *Pharmacological Research*, v.59, p.263-268, 2008.
- ALMEIDA, L.M.; FLORIANO, J.F.; RIBEIRO, T.P.; MAGNO, L.N.; MOTA, L.S.L.S.; PEIXOTO, N.; MRUE, F.; MELO-REIS, P.; JUNIOR, R.S.L.; GRAEFF, C.F.O.; GONÇALVES, P.J. *Hancornia speciosa* latex for biomedical applications: physical and chemical properties, biocompatibility assessment and angiogenic activity *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, v.25, p.2153–2162, 2014.
- ALMEIDA, E.R. *Plantas medicinais brasileiras: conhecimentos populares e científicos*. Hemus, 1993. 341p.
- ALQAHTANI, A.; HAMID, K.; KAM, A.; WONG, K.H.; ABDELHAK, Z.; RAZMOVSKI-NAUMOVSKI, V.; CHANA, K.; LI, K.M.; GROUNDWATER, P.W.; LI, G.Q. The pentacyclic triterpenoids in herbal medicines and their pharmacological activities in

diabetes and diabetic complications. *Current Medicinal Chemistry*, v.20, p.908-931, 2013.

AMERICAN DIABETES ASSOCIATION (ADA). Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care*, v.36, 2013.

AMERICAN DIABETES ASSOCIATION (ADA). Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care*, v.35, 2012.

ANSELM, E.; SOCORRO, V.F.M.; DAL-ROS, S.; SCHOTT, C.; BRONNER, C.; SCHINI-KERTH, V.B. *Crataegus* special extract ws 1442 causes endothelium-dependent relaxation via a redox-sensitive Src- and Akt-dependent activation of endothelial NO synthase but not via activation of estrogen receptors. *Journal Cardiovascular Pharmacology*, v.53, p.253–260, 2009.

AOAC. Association of Official Analytical Chemists. AOAC Guidelines for Single Laboratory Validation of Chemical Methods for Dietary Supplements and Botanicals. 2002. <http://www.aoac.org/Official_Methods/slv_guidelines.pdf> Acesso em: 05/12/2011.

ARCELLI, A.; CARÈ, V.; PERI, F.; POLLICINO, S.; RICCI, A. Synthesis and glycosidase inhibition of new enantiopure 2,3-diamino conduritols. *Tetrahedron*, v.57, p.3439-3444, 2001.

ATTA-UR-RAHMAN; ZAREEN, S.; CHOUDHARY, M.I.; AKHTAR, M.N.; KHAN, S.N. α -Glucosidase inhibitory activity of triterpenoids from *Cichorium intybus*. *Journal of Natural Products*, v.71, p.910–913, 2008.

BANSAL, A.; CHHABRA, V.; RAWAL, R.K.; SHARMAN, S. Chemometrics: A new scenario in herbal drug standardization. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, v.4, n.4, p.223–233, 2014.

BARROS, I.M.C. *Contribuição ao estudo químico e biológico de Hancornia speciosa Gomes (Apocynaceae)*. Brasília: Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília, 2008. 194p.

BASSO, L.A.; SILVA, L.H.P.; FETT-NETO, A.G.; JUNIOR, W.F.A.; MOREIRA, I.S.; PALMA, M.S.; CALIXTO, J.B.; FILHO, S.A.; SANTOS, R.R.; SOARES, M. B.P.E.; SANTOS, D. S. 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. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, v.100, p.575-606, 2005.

BENETIS, R.; RADUSIENE, J.; JAKSTAS, V.; JANULIS, V.; MALINAUSKAS, F. Development of an RP-HPLC method for the analysis of phenolic compounds in *Achillea millefolium* L. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, v.31, p.596–610, 2008.

BERGMAN, m. Pathophysiology of prediabetes and treatment implications for the prevention of type 2 diabetes mellitus. *Endocrine*, v.43, p.504–513, 2013.

BRAGA, F.C.; ENDRINGER, D.C.; SILVA, G.C.; CORTÊS, S.F. *Extrato e fração padronizados de folhas de Hancornia speciosa e sua composição farmacêutica*. Patente, n. PI0802004-3 A2, 2009.

BRANDÃO, G.C.; KROON, E.G.; SANTOS, J.R.; STEHMANN, J.R.; LOMBARDID, J.A.; OLIVEIRA, A.B. Antiviral activity of plants occurring in the state of Minas Gerais (Brazil): Part III. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, v.3, p.223-236, 2011.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº26 de 13.05.14. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos e o registro e a notificação de produtos tradicionais fitoterápicos. *Diário Oficial da União*, 14.05.14.

BRASIL. Ministério da saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RE nº 899 de 29.05.03. Determina a Publicação do “Guia para a validação de métodos analíticos e bioanalíticos”. *Diário Oficial da União*, 02.06.03.

BRASIL. Boletim Agropecuário - n.º 67 - p. 1-12 Lavras/MG. GOVERNO DO BRASIL 1984.

BRÄUNLICH, M.; SLIMESTAD, R.; WANGENSTEEN, H.; BREDE, C.; MALTERUD, K.E.; BARSETT, H. Extracts, anthocyanins and arocyanidins from *Aronia melanocarpa* as radical scavengers and enzyme inhibitors. *Nutrients*, v.5, p.663-678, 2013.

BRIXIUS, K.; WILLMS, S.; NAPP, A.; TOSSIOS, P.; LADAGE, D.; BLOCH, W.; MEHLHORN, U.; SCHWINGER, R.H.G. *Crataegus* special extract WS\ 1442 induces an endothelium-dependent, NO-mediated vasorelaxation via eNOS-phosphorylation at serine 1177. *Cardiovascular Drugs Therapy*, v.20, p.177–184, 2006.

BUDZIANOWSKI, J. Kaempferol glycosides from *Hosta ventricosa*. *Phytochemistry*, v.29, p.3643-3647, 1990.

CAPETTINI, L.S.A.; CORTES, S.F.; GOMES, M.A.; SILVA, G.A.B.; PESQUERO, J.L.; LOPES, M.J.; TEIXEIRA, M.M.; LEMOS, V.S. Neuronal nitric oxide synthase-derived hydrogen peroxide is a major endothelium-dependent relaxing factor. *American Journal of Physiology – Heart and Circulatory Physiology*, v.295, p.H2503–H2511, 2008.

CARDOSO, C.R.P.; TUBALDINI, F.R.; RODRIGUES, C.M.; RINALDO, D.; SEVERI, J.A.; CÓLUS, I.M.S.; VILEGAS, W.; VARANDA, E.A. Mutagenic effect of native species of the Brazilian "Cerrado" with anti-ulcerogenic activity. *Current Topics in Toxicology*, v.5, p.31-41, 2008

CARRAZZA, T.G.; CANABRAVA, H.A.N.; CARRAZZA, L.G.; SANT'ANA, D.S.; OLIVEIRA, M.L.; ALVES, L.R. Atividade antimicrobiana de extratos da Mangabeira (*Hancornia speciosa* GOMES). *PUBVET*, v.5, n.7, Ed.154, Art.1034, 2011.

CASTELLANO, J.M.; GUINDA, A.; DELGADO, T.; RADA, M.; CAYUELA, J.A. Biochemical basis of the antidiabetic activity of oleanolic acid and related pentacyclic triterpenes. *Diabetes*, v.62, p.1791-1799, 2013.

CHAU, F-T.; CHAN, H-Y.; CHEUNG, C-Y.; XU, C-J.; LIANG, Y.; KVALHEIM, O.M. Recipe for uncovering the bioactive components in herbal medicine. *Analytical Chemistry*, v.81, p.7217-7225, 2009.

CHIASSON, J.L.; JOSSE, R.G.; GOMIS, R.; HANEFELD, M.; KARASIK, A.; LAAKSO, M. STOP-NIDDM trial research group, Acarbose for prevention of type 2 diabetes: the STOP-NIDDM randomised trial. *Lancet*, v.359, p.2072-2077, 2002.

COSTA, E.S.; HIRUMA-LIMA, C.A.; LIMA, E.O.; SUCUPIRA, G.C.; BERTOLIN, A.O.; LOLIS, S.F.; ANDRADE, F.D.P.; VILEGAS, W.E.; SOUZA-BRITO, A.R.M. Antimicrobial Activity of Some Medicinal Plants of the Cerrado, Brazil. *Phytotherapy Research*, v.22, p.705-707, 2008.

CRAGG, G.M.; NEWMAN, D.J. Natural products: A continuing source of novel drug leads. *Biochimica et Biophysica Acta*, v.1830, p.3670-3695, 2013.

DALAR, A.; KONCZAK, I.; *Cichorium intybus* from Eastern Anatolia: Phenolic composition, antioxidant and enzyme inhibitory activities. *Industrial Crops and Products*, v.60, p.79-85, 2014.

DE SOUZA, P.M.; SALES, P.M.; SIMEONI L.A.; SILVA, E.C.; SILVEIRA, D.; MAGALHÃES, P.O. Inhibitory activity of α -amylase and α -glucosidase by plant extracts from the Brazilian cerrado. *Planta Medica*, v.78, p.393-399, 2012.

DEUTSCHLÄNDER, M.S.; LALL, N.; VENTER, M.V.; HUSSEIN, A.A. Hypoglycemic evaluation of a new triterpene and other compounds isolated from *Euclea undulata* Thunb. var. *myrtina* (Ebenaceae) root bark. *Journal of Ethnopharmacology*, v.133, p.1091-1095, 2011.

DIRETRIZES DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES 2009/ *Sociedade Brasileira de Diabetes*, 3ª ed., Itapevi, SP: A. Araujo Silva Farmacêutica, 2009.

DONG, M.; PAUL, R.; GERSHANOV, L. Getting the peaks perfect: System Suitability for HPLC. *Today's chemist at work [on-line]*, v.10, n.9, p.38-40, 2001. Disponível em: <http://pubs.acs.org/subscribe/journals/tcaw/10/i09/html/09dong.html>. Acesso em: 02 dez 2001.

DONGMO, A.B.; AZEBAZE, A.G.B.; DONFACK, F.M.; DIMO, T.; NKENG-EFOUET, P.A.; DEVKOTA, K.P.; SONTIA, B.; WAGNER, H.; SEWALD, N.; VIERLING, W. Pentacyclic triterpenoids and ceramide mediate the vasorelaxant activity of *Vitex cienkowskii* via involvement of NO/cGMP pathway in isolated rat aortic rings. *Journal of Ethnopharmacology*, v.133, p.204–212, 2011.

EBRAHIMABADIA, E.H.; GHOREISHIA, S.M.; MASOUMA, S.; EBRAHIMABADIB, A.H. Combination of GC/FID/Mass spectrometry fingerprints and multivariate calibration techniques for recognition of antimicrobial constituents of *Myrtus communis* L. essential oil. *Journal of Chromatography B*, v.1008, p.50–57, 2016.

ENDRINGER, D.C.; OLIVEIRA, O.V.; BRAGA, F.C. *In vitro* and *in silico* inhibition of angiotensin-converting enzyme by carbohydrates and cyclitols. *Chemical Papers*, v.68, p.37–45, 2014.

ENDRINGER, D.C.; VALADARES, Y.M.; CAMPANA, P.R.V.; CAMPOS, J.J.; GUIMARÃES, K.G.; PEZZUTO, J.M.; BRAGA, F.C. Evaluation of brazilian plants on câncer chemoprevention targets *in vitro*. *Phytotherapy Research*, v.24, p.928–933, 2010.

ENDRINGER, D.C. *Química e atividades biológicas de Hancornia speciosa Gomes (Apocynaceae): inibição da enzima conversora de angiotensina (ECA) e efeito na quimioprevenção de câncer*. Belo Horizonte: Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais, 2007. 260p.

ENDRINGER, D.C.; PEZZUTO, J.M.; BRAGA, F.C. NF- κ B inhibitory activity of cyclitols isolated from *Hancornia speciosa*. *Phytomedicine*, v.16, p.1064–1069, 2009.

ESCANDÓN-RIVERA, S.; GONZÁLEZ-ANDRADE, M.; BYE, R.; LINARES, E.; NAVARRETE, A.; MATA, R. α -Glucosidase inhibitors from *Brickellia cavanillesii*. *Journal of Natural Products*, v.75, p.968–974, 2012.

FABRICANT, D.S.; FARNSWORTH, N.R. The value of plants in traditional medicine for drug discovery. *Environmental Health Perspectives*, v.109, p.69-75, 2001.

FARNSWORTH, N.R.; AKERELE, O.; BINGEL, A.S.; SOEJARTO, D.D.; GUO, Z. Medicinal plants in therapy. *Bulletin of the World Health Organization*, v.63, p.965-981, 1985.

FENG, J.; YANG, X.; WANG, R. Bio-assay guided isolation and identification of α -glucosidase inhibitors from the leaves of *Aquilaria sinensis*. *Phytochemistry*, v.72, p.242–247, 2011.

FERREIRA, H.C.; SERRA, C.P.; ENDRINGER, D.C.; LEMOS, V.S.; BRAGA, F.C.; CORTES, S.F. Endothelium-dependent vasodilation induced by *Hancornia speciosa* in rat superior mesenteric artery. *Phytomedicine*, v.14, p.473–478, 2007a.

FERREIRA, H.C.; SERRA, C.P.; LEMOS, V.S.; BRAGA, F.C.; CORTES, S.F. Nitric oxide-dependent vasodilatation by ethanolic extract of *Hancornia speciosa* via phosphatidylinositol-3-kinase. *Journal of Ethnopharmacology*, v.109, n.1, p.161-164, 2007b.

FERRERES, F.; SOUSA, C.; JUSTIN, M.; VALENTÃO, P.; ANDRADE, P.B.; LLORACH, R.; RODRIGUES, A.; SEABRA, R.M.; LEITÃO, A. Characterisation of the phenolic profile of *Boerhaavia diffusa* L. by HPLC-PAD-MS/MS as a tool for quality control. *Phytochemical Analysis*, v.16, p.451-458, 2005.

FLATTERY, M. Herbal Therapies and cardiac side effects. *Prog Cardiovascular Nursing*, v.23, p.187-90, 2008.

FURUKAWA, S.; TAKAGI, N.; IKEDA, T.; ONO, M.; NAFADY, A.M.; NOHARA, T.; SUGIMOTO, H.; DOI, S.; YAMADA, H. Two Novel Long-Chain Alkanoic Acid Esters of Lupeol from Alecrim-Propolis. *Chemical Pharmaceutical Bulletin*, v.50, n.3, p.439-440, 2002.

FUSI, F.; SAPONARA, S.; PESSINA, F.; GORELLI, B.; SGARAGLI, G.. Effects of quercetin and rutin on vascular preparations. A comparison between mechanical and electrophysiological phenomena. *European Journal of Nutrition*, v.42, p.10–17, 2003.

GAD, H.A.; EL-AHMADY, S.H.; ABOU-SHOERB, M.I.; AL-AZIZIA, M.M. Application of chemometrics in authentication of herbal medicines: a review. *Phytochemical Analysis*, v.24, p.1–24, 2013.

GAO, H.; HUANG, Y-N.; GAO, B.; XU, P-Y.; INAGAKI, C.; KAWABATA, J. α -glucosidase inhibitory effect by the flower buds of *Tussilago farfara* L. *Food Chemistry*, v.106, p.1195-1201, 2008.

GARCIA, E.F.; OLIVEIRA, M.A.; GODIN, A.M.; FERREIRA, W.C.; BASTOS, L.F.S.; COELHO, M.M.; BRAGA, F.C. Antiedematogenic activity and phytochemical composition of preparations from *Echinodorus grandiflorus* leaves. *Phytomedicine*, v.18, p.80–86, 2010.

GELLER, F.C.; TEIXEIRA, M.R.; PEREIRA, A.B.D.; DOURADO, L.P.A.; SOUZA, D.G.; BRAGA, F.C.; SIMÕES, C.M.O. Evaluation of the wound healing properties of *Hancornia speciosa* leaves. *Phytotherapy Research*, v.29, n.12, p.1887-1893, 2015.

GEMPERLINE P. *Practical Guide to Chemometrics*. CRC/Taylor & Francis: Boca Raton, 2006.

GIULIETTI, A.M.; HARLEY, R.M.; QUEIROZ, L.P.; WANDERLEY, M.G.L. e BERG, C.D.V. Biodiversidade e conservação das plantas no Brasil. *Megadiversidade*, v.1, 2005.

GLOSTER, T.M. Development of inhibitors as research tools for carbohydrate-processing enzymes. *Biochemical Society Transactions*, v.40, p.913–928, 2012.

GUERREIRO, L.R.; CARREIRO, E.P.; FERNANDES, L.; CARDOTE, T.A.F.; MOREIRA, R.; CALDEIRA, A.T.; GUEDES, R.C.; BURKE, A.J. Five-membered iminocyclitol α -glucosidase inhibitors: synthetic, biological screening and *in silico* studies. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, v.21, p.1911–1917, 2013.

GUPTA, R.; SHARMA, A.K.; SHARMA, M.C.; DOBHAL, M.P.; GUPTA, R.S. Evaluation of antidiabetic and antioxidant potential of lupeol in experimental hyperglycaemia. *Natural Products Research*, v.26, p.1125-1129, 2012.

HATTORI, H.; OKUDA, K.; MURASE, T.; SHIGETSURA, Y.; NARISE, K.; SEMENZA, G.L.; NAGASAWA, H. Isolation, identification, and biological evaluation of HIF-1-modulating compounds from Brazilian green propolis. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, v.19, p.5392–5401, 2011.

HELOU, J. H. Preparações farmacêuticas obtidas por extração. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v.2-3-4, p.106-169, 1989.

HEO, S.J.; HWANG, J.Y.; CHOI, J.I.; HAN, J.S.; KIM, H.J.; JEON, Y.J.; Diphloretohydroxycarmalol isolated from *Ishige okamurae*, a brown algae, a potent α -glucosidase and α -amylase inhibitor, alleviates postprandial hyperglycemia in diabetic mice. *European Journal of Pharmacology*, v.615, p;252–256, 2009.

HONG, H.C.; LI, S.L.; ZHANG, X.Q.; YE, W.C.; ZHANG, Q.W. Flavonoids with α -glucosidase inhibitory activities and their contents in the leaves of *Morus atropurpurea*. *Chinese Medicine*, v.8, p.1-19, 2013.

HOSOE, T.; IIZUKA, T.; CHIBA, Y.; ITABASHI, T.; MORITA, H.; ISHIZAKI, T.; KAWAI, K-I. Relaxing effects of *Phellinus gilvus* extract and purified ebricoic acid on rat aortic rings. *Journal of Natural Medicines*, v.60, p.130–134, 2006.

IBARRA-ALVARADO, C.; LÓPEZ-VALLEJO, F.; SOLÍS-GUTIÉRREZ, M.; LUNA-VÁZQUEZ, F.J.; ROJAS-MOLINA, A. P76 Vasorelaxation induced by naturally occurring triterpenes involves NO and H₂S releasing: *ex vivo* and *in silico* studies. *Abstracts/ Nitric Oxide*, v.39, p.S38–S39, 2014.

IBARRA-ALVARADO, C.; SOLÍS-GUTIÉRREZ, M.; ROJAS-MOLINA, A.; LUNA-VÁZQUEZ, F.J. Involvement of gasotransmitters in the endothelium-dependent

vasorelaxation induced by naturally occurring triterpenes. *Nitric Oxide*, v.31, p.S43 P20, 2013.

ICH - International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceutical for Human Use - ICH Harmonised Tripartite Guideline. Validation of Analytical Procedures: Methodology, Q2B (CPMP/ICH/281/96). London: European Agency for the Evaluation of Medicinal Products, 1996.

WHITING, D.R.; GUARIGUATA, L.; WEIL, C.; SHAW, J. IDF Diabetes Atlas: Global estimates of the prevalence of diabetes for 2011 and 2030. *Diabetes Research and Clinical Practice*, v. 94, p. 311-321, 2011.

ISHIKAWA, A.; YAMASHITA, H.; HIEMORI, M.; INAGAKI, E.; KIMOTO, M.; OKAMOTO, M.; TSUJI, H.; MEMON, A.N.; MOHAMMADIO, A.; NATORI, Y. Characterization of inhibitors of postprandial hyperglycemia from the leaves of *Nerium indicum*. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology*, v.53, p.166-173, 2007.

JAMES, P.A.; OPARIL, S.; CARTER, B.L. et al. 2014 Evidence-Based Guideline for the Management of High Blood Pressure in Adults Report From the Panel Members Appointed to the Eighth Joint National Committee (JNC 8). *JAMA*, v.311, p.507-520, 2014.

JARALD E, JOSHI SB, JAIN DC. Biochemical study on the hypoglycaemic effects of extract and fraction of *Acacia catechu* wild in alloxan-induced diabetic rats. *International Journal of Diabetes & Metabolism*, v.17, p.63-69, 2009.

JO, S-H.; KA, E-H.; LEE, H-S.; APOSTOLIDIS, E.; JANG, H-D.; KWON, Y-I. Comparison of antioxidant potential and rat intestinal α -glucosidases inhibitory activities of quercetin, rutin, and isoquercetin. *International Journal of Applied Research in Natural Products*, v.2, p.52-60, 2009-2010.

KAWAMORI, R.; TAJIMA, N.; IWAMOTO, Y.; KASHIWAGI, A.; SHIMAMOTO, K.; KAKU, K. Voglibose for prevention of type 2 diabetes mellitus: a randomised, double-blind trial in Japanese individuals with impaired glucose tolerance. *Lancet*, v.373, p.1607-14, 2009.

KHAN, M.F.; MAURYA, C.K.; DEV, K.; ARHA, D.; RAI, A.K.; TAMRAKAR, A.K.; MAURYA, R. Design and synthesis of lupeol analogues and their glucose uptake stimulatory effect in L6 skeletal muscle cells. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, v.24, p.2674-2679, 2014.

KIM, K.Y.; NAM, K.A.; KURIHARA, H.; KIM, S.M. Potent α -glucosidase inhibitors purified from the red alga *Grateloupia elliptica* *Phytochemistry*, v.69, n.16, p.2820-2825, 2008.

KIM, J.-I.; KIM, J.C.; KANG, M.-J.; LEE, M.-S.; KIM, J.-J.; CHA, I.-J. Effects of pinitol isolated from soybeans on glycaemic control and cardiovascular risk factors in Korean patients with type II diabetes mellitus: a randomized controlled study. *European Journal of Clinical Nutrition*, v.59, p.456-458, 2005.

KIM, S.H.; KANG, K.W.; KIM, K.W.; KIM, N.D. Procyanidins in *Crataegus* extract evoke endothelium-dependent vasorelaxation in rat aorta. *Life Sciences*, v.67, p.121-131, 2000.

KLEIN, A. Ação hipoglicemiante da *Hancornia* SP em diabetes induzido por aloxana. In: *SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL*, 14, Florianópolis. Resumos...Florianópolis: Universidade Federal do Paraná, p. 133, 1993 *apud* ENDRINGER, D. C. *Química e atividades biológicas de Hancornia speciosa* Gomes (Apocynaceae): inibição da enzima conversora de angiotensina (ECA) e efeito na quimioprevenção de câncer. Belo Horizonte: Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais, 2007. 260 p.

KONG, W.-J.; ZHAO, Y.-L.; XIAO, X.-H.; JIN, C.; LI, Z.-L. Quantitative and chemical fingerprint analysis for quality control of *Rhizoma Coptidis chinensis* based on UPLC-PAD combined with chemometrics methods. *Phytomedicine*, v.16, p.950–959, 2009.

KORECOVA, M.; HLADIKOVA, M.; Treatment of mild and moderate type-2 diabetes: open prospective trial with *Hintonia latiflora* extract. *European Journal of Medical Research*, p.19:16, 2014.

KOZUMA, K.; TSUCHIYA, S.; KOHORI, J.; HASE, T.; TOKIMITSU, I. Antihypertensive effect of green coffee bean extract on mildly hypertensive subjects. *Hypertension Research*, v.28, n.9, p.711-718, 2005.

KRUGER, M.J. DAVIES, N.; MYBURGH, K.H.; LECOUR, S. Proanthocyanidins, anthocyanins and cardiovascular diseases. *Food Research International*, v.59, p.41–52, 2014.

KULAKOWSKIA, D.M.; WUA, S.-B.; BALICKB, M.J.; KENNELLY, E.J. Merging bioactivity with liquid chromatography-mass spectrometry-based chemometrics to identify minor immunomodulatory compounds from a Micronesian adaptogen, *Phaleria nisidai*. *Journal of Chromatography A*, v.1364, p.74–82, 2014.

KUMAR, S.; NARWAL, S.; KUMAR, V.; PRAKASH, O. α -glucosidase inhibitors from plants: a natural approach to treat diabetes. *Pharmacognosy Reviews*, v.5, n.9, p.19–29, 2011.

KVALHEIM, O.M.; CHAN, H.; BENZIE, I.F.F.; SZETO, Y.; TZANG, A.H.; MOK, D.K.; CHAU, F. Chromatographic profiling and multivariate analysis for screening and quantifying the contributions from individual components to the bioactive signature in

natural products. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, v.107, p.98-105, 2011.

Lebovitz, H.E. Alpha-glucosidase inhibitors. *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America*, v.26, n.3, p.539-551, 1997.

LEE, S.-J.; AHMED, A.A.; WOOD, A; MABRY, T.J. New Lupane Triterpene Fatty Acid Ester from Leaves of *Maclura pomifera*. *Natural Product Research*, v.10, n.4, p.313-317, 1997.

LI, J.-Y.; WANG, X.-B.; LUO, J.-G.; KONG, L.-Y. Seasonal variation of alkaloid contents and anti-inflammatory activity of *Rhizoma coptidis* based on fingerprints combined with chemometrics methods. *Journal of Chromatographic Science*, v.53, p.1131–1139, 2015.

LI, Y.Q.; ZHOU, F.C.; GAO, F.; BIAN, J.S.; SHAN, F. Comparative evaluation of quercetin, isoquercetin and rutin as inhibitors of alpha-glucosidase. *J Agric Food Chem.*, v.57, p.11463-8, 2009a.

LI, H.; SONG, F.; XING, J.; TSAO, R.; LIU, Z.; LIU, S. Screening and structural characterization of α -glucosidase inhibitors from hawthorn leaf flavonoids extract by ultrafiltration LC-DAD-MSn and SORI-CID FTICR MS. *Journal of the American Society Mass Spectrometry*, v.20, p.1496-1503, 2009b.

LIMA, J.C.S.; MARTINS, D.T. *Screening farmacológico de plantas medicinais utilizadas popularmente como antiinflamatória. In: SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL*, 14, Florianópolis. Resumos...Florianópolis: Universidade Federal do Paraná, p.89, 1993 *apud* ENDRINGER, D. C. *Química e atividades biológicas de Hancornia speciosa Gomes (Apocynaceae): inibição da enzima conversora de angiotensina (ECA) e efeito na quimioprevenção de câncer*. Belo Horizonte: Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais, 2007. 260 p.

MACÍAS, F.A.; GALINDO, J.L.G.; GALINDO, J.C.G. Evolution and current status of ecological phytochemistry. *Phytochemistry*, v.68, p.2917-2936, 2007.

MAHATO, S.B.; KUNDU, A.P. ^{13}C NMR spectra of pentacyclic triterpenoids - a compilation and some salient features. *Phytochemistry*, v.37, n.6, p.1517-1575, 1994.

MALMONGE, J.A.; CAMILLO, E.C.; MORENO, R.M.B.; MATTOSO, L.H.C.; MCMAHAN, C.M. Comparative Study on the Technological Properties of Latex and Natural Rubber from *Hancornia speciosa* Gomes and *Hevea brasiliensis*. *Journal of Applied Polymer Science*, v.111, p.2986-2991, 2009.

MANCIA, G.; FAGARD, R.; NARKIEWICZ, K.; REDÓN, J.; ZANCHETTI, A.; BÖHM, M.; CHRISTIAENS, T.; CIFKOVA, R.; DE BACKER, G.; DOMINICZAK, A.; GALDERISI, M.; GROBBEE, D.E.; JAARSMA, T.; KIRCHHOF, P.; KJELDSSEN, S.E.; LAURENT, S.; MANOLIS, A.J.; NILSSON, P.M.; RUILOPE, L.M.; SCHMIEDER, R.E.; SIRNES, P.A.; SLEIGHT, P.; VIIGIMAA, M.; WAEBER, B.; ZANNAD, F. 2013 ESH/ESC guidelines for the management of arterial hypertension: the task force for the management of arterial hypertension of the European Society of Hypertension (ESH) and of the European Society of Cardiology (ESC). *Journal of Hypertension*, v.31, n.7, p.1281-357, 2013.

MANCIA, G.; BACKER, G.; DOMINICZAK, A.; CIFKOVA, R.; FAGARD, R.; GERMANO, G.; GRASSI, G.; HEAGERTY, A.M.; KJELDSSEN, S.E.; LAURENT, S.; NARKIEWICZ, K.; RUILOPE, L.; RYNKIEWICZ, A.; SCHMIEDER, R.E.; BOUDIER, H.A.J.S.; ZANCHETTI, A. Guidelines for the Management of Arterial Hypertension. The Task Force for the Management of Arterial Hypertension of the European Society of Hypertension (ESH) and of the European Society of Cardiology (ESC). *Journal of Hypertension*, v.25, p.1105-1187, 2007.

MARINHO, D.G.; ALVIANO, D.S.; MATHEUS, M.E.; ALVIANO, C.S.; FERNANDES, P.D. The latex obtained from *Hancornia speciosa* Gomes possesses anti-inflammatory activity. *Journal of Ethnopharmacology*, v.135, p.530-537, 2011.

MARTINS, M.R., VIEIRA, A.K.G., SOUZA, E.P.G., MOURA, A.S. Early overnutrition impairs insulin signaling in the heart of adult Swiss mice. *Journal of Endocrinology*, v.198, p.591-598, 2008.

MATA, R.; CRISTIANS, S.; ESCANDON-RIVERA, S.; REZ-REYES, K.J.; RIVERO-CRUZ, I. Mexican Antidiabetic Herbs: Valuable Sources of Inhibitors of α -Glucosidases. *J. Nat. Prod.*, v.76, p.468-483, 2013.

MATHERS, C.D.; LONCAR, D. Projections of global mortality and burden of disease from 2002 to 2030. *PLoS Medicine*, v.3, e442, p.2011-2030, 2006.

MBAZE, L.M.; POUMALE, H.M.P.; WANSI, J.D.; LADO, J.A.; KHAN, S.N.; IQBAL, M.C.; NGADJUI, M.T.; LAATSCH, H.L. α -Glucosidase inhibitory pentacyclic triterpenes from the stem bark of *Fagara tessmannii* (Rutaceae). *Phytochemistry*, v.68, p.591-595, 2007.

MENDES, C. C.; CRUZ, F. G.; DAVID, J. M.; NASCIMENTO, I. P.; DAVID, J. P. Triterpenos esterificados com ácidos graxos e ácidos triterpênicos isolados de *Byrsonima microphylla*. *Química Nova*, v. 22, n. 2, 1999.

MONTELES, R.; PINHEIRO, C. U. B. Plantas medicinais em um quilombo maranhense: uma perspectiva etnobotânica *Revista de Biologia e Ciências da Terra*, v.7, 2007.

MORAES, T.M.; RODRIGUES, C.M.; KUSHIMAA, H.; BAUABC, T.M.; VILLEGAS, W.; PELLIZZON, C.H.; BRITO, A.R.M.S.; HIRUMA-LIMA, C.A. *Hancornia speciosa*: Indications of gastroprotective, healing and anti-*Helicobacter pylori* actions. *Journal of Ethnopharmacology*, v.120, p.161-168, 2008.

MOREIRA, Y.A. *As plantas que curam*. v.1, LI-BRA, 1984. 410p.

MORIYA, R.; SHIRAKURA, T.; ITO, J.; MASHIKO, S.; SEO, T. Activation of sodium-glucose cotransporter 1 ameliorates hyperglycemia by mediating incretin secretion in mice. *American Journal of Physiology Endocrinology and Metabolism*, v.297, p.E1358–E1364, 2009.

MUBARAK, A.; BONDONNO, C.P.; LIU, A.H.; CONSIDINE, M.J.; RICH, L.; MAS, E.; CROFT, K.D.; HODGSON, J.M. Acute effects of chlorogenic acid on nitric oxide status, endothelial function, and blood pressure in healthy volunteers: a randomized trial. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.60, p.9130-9136, 2012.

NA, M.; KIM, B.Y.; OSADA, H.; AHN, J.S. Inhibition of protein tyrosine phosphatase 1B by lupeol and lupenone isolated from *Sorbus commixta*. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, v.24, p.1056–1059, 2009.

NAIR, S.A.; SABULAL, B.; RADHIKA, J.; ARUNKUMAR, R.; SUBRAMONIAM, A. Promising anti-*diabetes mellitus* activity in rats of β -amyrin palmitate isolated from *Hemidesmus indicus* roots. *European Journal of Pharmacology*, v.734, p.77-82, 2014.

NAKANO, A.; HATTORI, Y.; AOKI, C.; JOJIMA, T.; KASAI, K. Telmisartan inhibits cytokine-induced nuclear factor-kappaB activation independently of the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma. *Hypertension Research*, v.32, p.765-769, 2009.

NARENDER, T.; KHALIQ, T.; SINGH, A.B.; JOSHI, M.D.; MISHRA, P.; CHATURVEDI, J.P.; SRIVASTAVA, A.K.; MAURYA, R.; AGARWAL, S.C. Synthesis of alpha-amyrin derivatives and their in vivo antihyperglycemic activity. *European Journal of Medicinal Chemistry*, v.44, p.1215-1222, 2009.

NAZARUK, J.; BORZYM-KLUCZYK, M. The role of triterpenes in the management of *diabetes mellitus* and its complications. *Phytochem Review*, jun 2014.

NEJMA, A. B.; BESBES, M.; GUÉRINEAU, V.; TOUBOUL, D.; JANNET, H. B.; HAMZA, M. A. Isolation and structure elucidation of acetylcholinesterase lipophilic lupeol derivatives inhibitors from the latex of the Tunisian *Periploca laevigata*. *Arabian Journal of Chemistry*, 2013.

NEPOTE, V.; GROSSO, N.R.; GUZMAN, C.A. Optimization of extraction of phenolic antioxidants from peanut skins. *Journal of the Science Food Agriculture*, v.85, p.33-38, 2005.

NEWMAN, D.J.; CRAGG, G.M. Natural Products As Sources of New Drugs over the 30 Years from 1981 to 2010. *Journal of Natural Products*, v.75, p.311–335, 2012.

NEWMAN, D.J.; CRAGG, G.M.E; SNADER, K.M. The influence of natural products upon drug discovery. *Natural Products Report*, v.17, p.215-234, 2000.

NKOBOLE, N.; HOUGHTON, P.J.; HUSSEIN, A.; LALL, N. Antidiabetic activity of *Terminalia sericea* Burch. Ex DC constituents. *Natural Product Communications*, v.6, p.1-4, 2011.

OLEA, R.S.; ROQUE, N.F. Análise de misturas de triterpenos por RMN de ¹³C. *Quimica Nova*, v.13, n.4, 1990.

PAULA, L.A.; BARROS, D.A.; MENEZES, A.S.; AQUINO, G.L.B.; PEIXOTO, J.C.; VERDE, G.M.V. Chemical composition of the essential oil from *Hancornia speciosa* var. pubescens (Nees & C. Mart.) Müll. Arg. (Apocynaceae) leaves and Its soil characterization. *Journal of Health Science*, v.2, p.567-570, 2014.

PAVIA, D. L.; LAMPMAN, G. M.; KRIZ, G. S. *Introduction to spectroscopy*. 3. ed. USA: Thomson Learning, 2001. 579 p.

PEÑA-RODRÍGUEZ, L. M.; YAM-PUC, A; KNISPEL, N.; SCHRAMEK, N.; HUBER, C; GRAßBERGER, C.; RAMÍREZ-TORRES, F.G., ESCALANTE-EROSA, F.; GARCÍA-SOSA, K.; HIEBERT-GIESBRECHT, M.R.; CHAN-BACAB, M.J.; GODOY-HERNANDEZ, G.; BACHER, A.; EISENREICH, W. Isotopologue profiling of triterpene formation under physiological conditions. Biosynthesis of lupeol-3-(3'-R-hydroxy)-stearate in *Pentalinon andrieuxii*. *Journal of Organic Chemistry*, v.79, n.7, p.2864-2873, 2014.

PEREIRA, A.B.D. *Contribuição para a padronização química de Hancornia speciosa Gomes: desenvolvimento e validação de métodos analíticos para quantificação de marcadores químicos*. Belo Horizonte: Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais, 2012. 152p.

PEREIRA, A.B.D.; VERÍSSIMO, T.M.; OLIVEIRA, M.A.; ARAUJO, I.A.; ALVES, R.J.; BRAGA, F.C. Development and validation of an HPLC-DAD method for quantification of bornesitol in extracts from *Hancornia speciosa* leaves after derivatization with p-toluenesulfonyl chloride. *Journal of chromatography. B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences*, v.1, p.887-888:133-7, 2012a.

PEREIRA, A.C.; ARRUDA, M.S.P.; SILVA, E.A.S.; SILVA, M.N.; LEMOS, V.S.; CORTES, F.S. Inhibition of α -glucosidase and hypoglycemic effect of stilbenes from the amazonian plant *Deguelia rufescens* var. urucu (Ducke) A.M.G. Azevedo (Leguminosae). *Planta Medica*, v.78, p.36-38, 2012b.

PEREIRA, D.F.; CAZAROLLI, L.H.; LAVADO, C.; MENGATTO, V.; FIGUEIREDO, M.S.R.B.; GUEDES, A.; PIZZOLATTI, M.G.; SILVA, F.R.M.B. Effects of flavonoids on α -glucosidase activity: potential targets for glucose homeostasis. *Nutrition*, v.27, p. 1161–1167, 2011.

PINTO, A.C.; SILVA, D.H.S.; BOLZANI, V.S.; LOPES, N.P.; EPIFANIO, R.A. Produtos naturais: atualidade, desafios e perspectivas. *Química Nova*, v.25, p.45-61, 2002.

PONS, Z.; GUERRERO, L.; MARGALEF, M.; AROLA, L.; AROLA-ARNAL, A.; MUGUERZA, B. EFFECT of low molecular grape seed proanthocyanidins on blood pressure and lipid homeostasis in cafeteria diet-fed rats. *Journal of Physiology Biochemistry*, v. 70, p.629–637, 2014.

QIN, K.; WANG, B.; LI, W.; CAI, H.; CHEN, D.; LIU, X.; YIN, F.; CAI, B. Quality assessment of raw and processed *Arctium lappa* L. through multicomponent quantification, chromatographic fingerprint, and related chemometric analysis. *Journal of Separation Science*, v.38, p.1491–1498, 2015.

RAMÍREZ, G.; ZAVALA, M.; PEREZ, J.; ZAMILPA, A. *In vitro* screening of medicinal plants used in Mexico as antidiabetics with glucosidase and lipase inhibitory activities. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, ID 701261, 2012.

RANILLA, L.G.; KWON, Y.-I.; APOSTOLIDIS, E.; SHETTY, K. Phenolic compounds, antioxidant activity and *in vitro* inhibitory potential against key enzymes relevant for hyperglycemia and hypertension of commonly used medicinal plants, herbs and spices in Latin America. *Bioresource Technology*, v.101, p.4676-4689, 2010.

RAZDAN, T.K.; KACHROO, P.K.; QURISHI, M.A.; KALLAT, A.K.; WAIGHT, E.S. Unusual homologous long-chain alkanolic acid esters of lupeol from *Koelpinia linearis*. *Phytochemistry*, v.41, n.5, p.1437-1438, 1996.

RIGELSKI, J.M.; SWEET, B.V. Hawthorn: Pharmacology and therapeutic uses. *American Journal of Health-System Pharmacy*, v.59, p.417-422, 2002.

RODRIGUES, C.M. *Caracterização quali e quantitativa de metabólitos secundários em extratos vegetais*. Araraquara: Instituto de Química da Universidade Estadual Paulista, 2007. 199p.

RODRIGUES, C.M.; BRITO, A.R.M.S.; HIRUMA-LIMA, C.A.; VILEGAS, W. Constituintes químicos das cascas de *Hancornia speciosa* Gom. (Apocynaceae) *In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUÍMICA*, 29, Águas de Lindóia. Resumos...São Paulo, 2006.

RODRIGUES, C.M.; RINALDO, D.; SANTOS, L.C.; MONTORO, P.; PIACENTE, S.; PIZZA, C.; HIRUMA-LIMA, C.A.; BRITO, A.R.M.S.; VILEGAS, W. Metabolic fingerprinting using direct flow injection electrospray ionization tandem mass

spectrometry for the characterization of proanthocyanidins from the barks of *Hancornia speciosa*. *Rapid Communication Mass Spectrometry*, v.21, p.1907-1914, 2007.

RODRIGUES, V.E.G., CARVALHO, D.A. *Plantas Mediciniais no domínio dos Cerrados*. UFLA. 2001, 65p.

RONOWICZ, J.; KUPCEWICZ, B.; BUDZISZ, E. Chemometric analysis of antioxidant properties of herbal products containing *Ginkgo biloba* extract. *Cent. Eur. J. Biol.*, v.8, p.374-385, 2013.

RUFINO, M.S.M.; FERNANDES, F.A.N.; ALVES, R.E.; BRITO, E.S. Free radical-scavenging behaviour of some north-east Brazilian fruits in a DPPH system. *Food Chemistry*, v.114, p.693-695, 2009.

RUSAK, G.; KUSTRAK, D.; MALES, Z.; PLESE, N. The determination of the content of the polyphenols in aerial parts of species *Centaurea rupestris* L. and *C. fritschii* Hayek (Asteraceae). *Acta Pharmaceutica*, v.43, p.121-125, 1993.

SAMPAIO, T.S.; NOGUEIRA, P.C.L. Volatile components of mangaba fruit (*Hancornia speciosa* Gomes) at three stages of maturity. *Food Chemistry*, v.95, p.606-610, 2006.

SANTOS, E.A.; SAMPAIO, T.S.; FEITOSA, J.G.R.; RIBEIRO, A.O.; NOGUEIRA, P.C.L. Constituintes voláteis das folhas de *Hancornia speciosa* (Apocynaceae). In *REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUÍMICA*, 29, Águas de Lindóia. Resumos...São Paulo, 2006.

SANTOS, F.L.; FROTA, J.T.; ARRUDA, B.R.; MELO, T.S.; SILVA, A.A.C.A.; BRITO, G.A.C.; CHAVES, M.H.; RAO, V.S. Antihyperglycemic and hypolipidemic effects of α , β -amyrin, a triterpenoid mixture from *Protium heptaphyllum* in mice. *Lipids in Health and Disease*, 11:98, 2012.

SANTOS, P.O.; BARBOSA JUNIOR, A.M.; MÉLO, D.L.F.M.; TRINDADE, R.C. Investigação da atividade antimicrobiana do látex da mangabeira (*Hancornia speciosa* GOMES). *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, v.9, p.108-111, 2007.

SERRA, C.P.; CORTES, S.F.; LOMBARDID, J.A.; OLIVEIRA, A.B.; BRAGA, F.C. Validation of a colorimetric assay for the in vitro screening of inhibitors of angiotensin-converting enzyme (ACE) from plant extracts. *Phytomedicine*, v.12, p.424-432, 2005.

SHI, Y.; VANHOUTTE, P.M. Reactive oxygen-derived free radicals are key to the endothelial dysfunction of diabetes. *Journal of Diabetes*, v.1, p.151-162, 2009.

SHIN, J-A.; LEE, J-H.; KIM, H-S.; CHOI, Y-H.; CHO, J-H.; YOON, K-H. Prevention of diabetes: a strategic approach for individual patients. *Diabetes/Metab Research and Reviews*, v.28, p.79-84, 2012.

SILVA, G.C. *Efeito anti-hipertensivo, antienvhecimento e vasculoprotetor de uma fração padronizada das folhas de Hancornia speciosa (mangaba)*. Belo Horizonte: Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, 2014. 260p.

SILVA, G.C.; BRAGA, F.C.; LEMOS, V.S.; CÔRTEZ, S.F. Mechanisms involved on the antihypertensive effect from leaves of a standardized fraction from *Hancornia speciosa*. *Planta Médica*, v.78, p.PD59, 2012a.

SILVA, G.C.; BRAGA, F.C.; CAPETTINI, L.S.A.; LEMOS, V.S.; CÔRTEZ, S.F. Antihypertensive and vascular protective effects of subchronic treatment with a standardized fraction of *Hancornia Speciosa* Gomes. *Planta Médica*, v.78, p.1084-1084, 2012b.

SILVA, G.C.; BRAGA, F.C.; LIMA, M.P.; PESQUERO, J.L.; LEMOS, V.S.; CORTES, S.F. *Hancornia speciosa* Gomes induces hypotensive effect through inhibition of ACE and increase on NO. *Journal of Ethnopharmacology*, v.137, p.709-713, 2011.

SILVA, G.C. *Efeito Hipotensor e Vasodilatador de uma Fração Padronizada de Hancornia speciosa Gomes (mangaba) em Camundongos*. Belo Horizonte: Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, 2010. 87p.

SILVA, M.A.B.; MELO, L.V.L.; RIBEIRO, R.V.; SOUZA, J.P.M.; LIMA, J.C.S.; MARTINS, D.T.O.; SILVA, R.M. Levantamento etnobotânico de plantas utilizadas como anti-hiperlipidêmicas e anorexígenas pela população de Nova Xavantina-MT, Brasil. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v.20, p.549-562, 2010.

SILVERSTEIN, R. M; BASSLER, G. C.; MORRIL, T. C. *Spectrometric identification of organic compounds*. 5. New York: John Wiley & Sons, 1991.

SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.A. pesquisa e produção brasileira de medicamentos a partir de plantas medicinais: a necessária interação da indústria com a academia. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v.12, p.35-40, 2002.

SNYDER, L.R.; KIRKLAND, J.J.; GLAJCH, J.L. *Practical HPLC Method Development*, 2 Ed., New York: A Wiley-Interscience Publication, 1997. 765p.

SOUZA, C. D.; FELFILI, J.M. Uso de plantas medicinais na região de Alto Paraíso de Goiás, GO, Brasil. *Acta Botânica Brasileira*, v.20, p.135-142, 2006.

SOUZA, P.M.; ELIAS, S.T.; SIMEONI, L.A.; DE PAULA, J.E.; GOMES, S.M.; GUERRA, E.N.S.; FONSECA, Y.M.; SILVA, E.C.; SILVEIRA, D.; MAGALHÃES, P.O. Plants from Brazilian Cerrado with Potent Tyrosinase Inhibitory Activity. *PLoS ONE*, v.7, e48589, 2012a.

SOUZA, D.M.; MADARI, B.E.; SENA, M.M. Aplicação de métodos quimiométricos na otimização da extração de Ca, Mg, K, Fe, Zn, Cu e Mn em folhas de braquiária. *Química Nova*, v.35, p.175-179, 2012b.

SOUZA-SARTORI, J.A.; SCALISE, C.; BAPTISTA, A.S.; LIMA, R.B.; AGUIAR, C.L. Parâmetros de influência na extração de compostos fenólicos de partes aéreas da cana-de-açúcar com atividade antioxidante. *Bioscience Journal*, v.29, p.297-307, 2013.

SUN, Y.; XU, W.; ZHANG, W.; HU, Q.; ZENG, X. Optimizing the extraction of phenolic antioxidants from kudingcha made from *Ilex kudingcha* C.J. Tseng by using response surface methodology. *Separation and Purification Technology*, v.78, p.311-320, 2011.

SUZUKI, A.; KAGAWA, D.; OCHIAI, R.; TOKIMITSU, I.; SAITO, I. Green coffee bean extract and its metabolites have a hypotensive effect in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension Research*, v.25, p.99-107, 2002.

SUZUKI, A.; YAMAMOTO, N.; JOKURA, H.; YAMAMOTO, M.; FUJII, A.; TOKIMITSU, I.; SAITO, I. Chlorogenic acid attenuates hypertension and improves endothelial function in spontaneously hypertensive rats. *Journal of Hypertension*. v.24, p.1065-1073, 2006.

TADERA, K.; MINAMI, Y.; TAKAMATSU, K.; MATSUOKA, T. Inhibition of α -glucosidase and α -amylase by flavonoids. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology*, v.52, n.2, p.149-153, 2006.

TAN, C.; WANG, Q.; LUO, C.; CHEN, S.; LI, Q.; LI, P. Yeast α -glucosidase inhibitory phenolic compounds isolated from *Gynura medica* leaf. *International Journal of Molecular Sciences*, v.14, p.2551-2558, 2013.

TAUBERT, D.; BERKELS, R.; KLAUS, W.; ROESEN, R. Nitric oxide formation and corresponding relaxation of porcine coronary arteries induced by plant phenols: essential structural features. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, v.40, p.701-713, 2002.

TISTAERT, C.; DEJAEGHER, B.; HOAI, N.N.; CHATAIGNÉ, G.; RIVIÈRE, C.; HONG, V.N.T.; VAN, M.C.; QUETIN-LECLERCQ, J.; HEYDEN, Y.V. Potential antioxidant compounds in *Mallotus* species fingerprints. Part I: Indication, using linear multivariate calibration techniques. *Analytica Chimica Acta*, v.652, p.189-197, 2009.

TUNDIS, R.; LOIZZO, M.R.; MENICHINI, F. Natural products as α -amylase and α -glucosidase inhibitors and their hypoglycaemic potential in the treatment of diabetes: an update. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, v.10, p.315-331, 2010.

TUNTIWACHWUTTIKUL, P.; POOTAENG-ON, Y.; PHANSA, P.; LIMPACHAYAPORN, P.; CHAROENCHAI, P.; TAYLOR, W.C. Constituents of the leaves of *Holarrhena pubescens*. *Fitoterapia*, v.78, p.271–273, 2007.

VI DIRETRIZES BRASILEIRAS DE HIPERTENSÃO ARTERIAL. *Revista Hipertensão*, v.13, n°01, p.1-68, 2010.

WAGNER, H., BLADT, S. *Plant Drug Analysis: A Thin Layer Chromatography Atlas*. 2aEd. Berlin: Springer. 384p.

WAGNER, H. E ULRICH-MERZENICH, G. Synergy research: Approaching a new generation of phytopharmaceuticals *Phytomedicine*, v.16, p. 97-110, 2009.

WANG, J.; XIONG, X.; FENG, B. Effect of *Crataegus* Usage in Cardiovascular Disease Prevention: An Evidence-Based Approach. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, p.1-16, 2013.

WHO, World Health Organization. Global status report on noncommunicable diseases 2010. Geneva, 2011a.

WHO, World Health Organization. Global Atlas on Cardiovascular Diseases Prevention and Control, 2011b.

WHO, World Health Organization. World health statistics 2012, 2012.

WINK, M. Evolutionary advantage and molecular modes of action of multi-component mixtures used in phytochemistry. *Current Drug Metabolism*, v. 9, p.996-1009, 2008.

WORAWALAI, W.; RATTANANGKOOL, E.; VANITCHA, A.; PHUWAPRAISIRISAN, P.; WACHARASINDHU, S. Concise synthesis of (+)-conduritol F and inositol analogues from naturally available (+)-proto-quercitol and their glucosidase inhibitory activity. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, v.22, p.1538–1540, 2012.

XIE, P.; CHEN, S.; LIANG, Y.; WANG, X.; TIAN, R.; UPTON, R.. Chromatographic fingerprint analysis – a rational approach for quality assessment of traditional Chinese herbal medicine. *Journal of Chromatography A*, v.1112, p.171-180, 2006.

ZERBACK, R.; BOKEL, M.; GEIGER, H.; HESS, D. A kaempferol 3-glucosylgalactoside and further flavonoids from pollen of *Petunia hybrid*. *Phytochemistry*, v.28, p.897-899, 1989.