

**PRISCILLA RODRIGUES VALADARES CAMPANA**

**FITOQUÍMICA E ATIVIDADE VASODILATADORA *in vitro* DE  
*Mansoa hirsuta* D.C.**

**Belo Horizonte  
Faculdade de Farmácia - UFMG  
2008**

**PRISCILLA RODRIGUES VALADARES CAMPANA**

**FITOQUÍMICA E ATIVIDADE VASODILATADORA *in vitro* DE  
*Mansoa hirsuta* D.C.**

Dissertação 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 título de mestre em Ciências Farmacêuticas.

Área de concentração: Fármacos e medicamentos

Orientador: Prof. Fernão Castro Braga, FAFAR, UFMG

Co-orientador: Prof. Steyner de França Côrtes, ICB, UFMG

**Belo Horizonte  
Faculdade de Farmácia - UFMG  
2008**

C186f Campana, Priscilla Rodrigues Valadares  
Fitoquímica e atividade vasodilatadora *in vitro* de *Mansoa hirsuta* D.C./ Priscilla Rodrigues Valadares Campana. – 2008.  
127f. : il.

Orientador: Prof Dr. Fernão Castro Braga.

Co-Orientador: Prof. Dr. Steyner de França Côrtes.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Farmácia. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas.

1. Produtos naturais - Química - Teses. 2. *Mansoa hirsuta* D.C. - Teses. 3. Hipertensão - Tratamento – Teses. I. Braga, Fernão Castro. II. Côrtes, Steyner de França III. Universidade Federal de Minas Gerais. Faculdade de Farmácia.

CDD: 615

---

Priscilla Rodrigues Valadares Campana  
Mestranda

---

Prof. Dr. Fernão Castro Braga  
Orientador

---

Prof. Dr. Steyner de França Côrtes  
Co-orientadora

Linha de Pesquisa:

Linha II: Fármacos e Medicamentos

Área de conhecimento:

Fitoquímica  
Farmacognosia

Locais de realização

Laboratório de Fitoquímica, Departamento de Produtos Farmacêuticos, Faculdade de farmácia, UFMG.

Laboratório Farmacologia Cardiovascular, Departamento de Farmacologia, Instituto de Ciências Biológicas, UFMG

À minha família e a meu marido.  
Amo vocês!

## AGRADECIMENTOS

A Deus, por tudo.

Ao Professor Fernão Castro Braga, responsável pelo meu crescimento profissional, pela dedicação, apoio e incentivo durante toda a realização desse trabalho, e por ser esse grande exemplo de competência, sabedoria, e eficiência.

Ao Professor Steyner de França Côrtes, pela orientação nos testes biológicos e por compartilhar conhecimentos.

Ao professor José Dias pela obtenção dos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$  e pelas valiosas contribuições na elucidação estrutural.

Ao professor Cláudio Luis Donnici, por ter fomentado em mim o espírito da pesquisa científica.

A todos os meus professores, que tanto contribuíram para minha formação acadêmica.

A meus pais, a quem tudo devo, pelo amor e apoio incondicionais, por me incentivarem a lutar pelos meus sonhos e objetivos e por acreditarem que sou capaz.

Ao meu marido, Rodrigo, por todo amor, carinho, paciência e dedicação, por estar ao meu lado em todos os momentos, fáceis e difíceis e, principalmente por ser o apoio necessário para que eu chegasse até aqui.

Às minhas irmãs, Alê e Van, minhas maiores amigas, pelo carinho, apoio e incentivo.

Aos funcionários da FAFAR-UFMG pelo auxílio sempre que necessário.

Aos amigos do laboratório de Fitoquímica, Marcela, Jussara, Suzan, Patrícia, Cris, Denise, Ydia, Celinho, Milton, Eliana, Fabíola, Jamile, Priscila, Soninha, Ritinha, Fabiana, Luciana Mota, Luciana Gomes, Ana Bárbara, Bruna, Raquel, Natália, Clarice e Graça, pelas valiosas contribuições, pela amizade e por proporcionarem momentos tão agradáveis.

Aos amigos dos laboratórios de Química Farmacêutica e Controle de Qualidade, que muito contribuíram para a realização desse trabalho.

Aos amigos, em especial Marildinha, Paulinha, Míryan, Cris, Nadica, Michele, Maria Amélia, Rafaela, Adriana, André, Fernando, Silvânia, pelo constante apoio e momentos memoráveis de descontração.

A todos os meus familiares que sempre apoiaram e souberam compreender as ausências.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização desse trabalho.

Muito Obrigado!

*"É melhor tentar e falhar,  
que preocupar-se e ver a vida passar;  
é melhor tentar, ainda que em vão,  
que sentar-se fazendo nada até o final.  
Eu prefiro na chuva caminhar,  
que em dias tristes em casa me esconder.  
Prefiro ser feliz, embora louco,  
que em conformidade viver ..."*

Martin Luther King

## RESUMO

A planta *Mansoa hirsuta* DC (Bignoniaceae) é uma liana encontrada na mata Atlântica, sem uso etnomédico registrado. Recentemente, a atividade inibitória da enzima conversora de angiotensina (ECA) foi relatada para as folhas desta espécie. O presente trabalho teve por objetivo avaliar a potencial atividade anti-hipertensiva da espécie em modelos *in vitro* e isolar os constituintes bioativos. O extrato de folhas de *M. hirsuta* (EEF), preparado por percolação exaustiva com etanol 96%, apresentou atividade vasodilatadora dependente da concentração e do endotélio ( $CI_{50} = 8,5 \pm 0,6 \mu\text{g/mL}$ ), em preparações de anéis de aorta de ratos. Esse efeito foi suprimido na presença do L-NAME (100  $\mu\text{mol/L}$ ), um inibidor da óxido nítrico (NO) sintase, indicando a participação do NO na resposta de EEF. A indometacina (10  $\mu\text{mol/L}$ ), um inibidor da ciclooxigenase, não alterou significativamente a resposta vasodilatadora de EEF ( $CI_{50} 12,0 \pm 0,8 \mu\text{g/mL}$ ). A incubação dos anéis com superóxido dismutase (SOD; 300 U/mL) não alterou a curva concentração-resposta (CCR) obtida para o EEF, enquanto a CCR obtida para SIN-1 ( $CI_{50} = 2,75 \pm 0,73 \mu\text{mol/L}$ ), um doador de NO, foi significativamente deslocada para a esquerda na presença de EEF (50  $\mu\text{g/mL}$ ;  $CI_{50} = 0,67 \pm 0,11 \mu\text{mol/L}$ ), efeito semelhante ao obtido com a incubação com SOD (300 U/mL;  $CI_{50} = 0,8 \pm 0,11 \mu\text{mol/L}$ ). Esses resultados indicam que a vasodilatação induzida por EEF é, em alguma extensão, promovida pelo aumento da biodisponibilidade de NO, resultante da atividade antioxidante do extrato. O EEF foi submetido a fracionamento por técnicas cromatográficas variadas (coluna de sílica gel, Sephadex LH20, RP-HPLC e cromatografia em contracorrente de alta velocidade – HSCCC) e/ou partição entre solventes imiscíveis, resultando no isolamento de três substâncias denominadas PP1, PP2 e PP3. A análise dos espectros de massas desses compostos possibilitou caracterizá-los como proantocianidinas tetraméricas, constituídas por duas unidades de afzelequina e duas unidades de catequina, ou seus epímeros correspondentes, e um resíduo de açúcar. A natureza das unidades de flavan-3-ol constituintes de PP1 foi confirmada por experimentos de RMN de  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$  mono e bidimensionais. A ocorrência de proantocianidinas em uma espécie de Bignoniaceae é relatada pela primeira vez neste trabalho. A atividade inibitória da ECA das substâncias isoladas foi avaliada *in vitro*, sendo apenas PP1 ativa, com inibição de  $76 \pm 2,7 \%$ , na concentração de 100  $\mu\text{g/mL}$ . PP1 também apresentou atividade vasodilatadora concentração- e NO-dependente, com  $CI_{50}$  de  $0,25 \pm 0,10 \mu\text{mol/L}$ . Esses resultados corroboram a potencial atividade anti-hipertensiva de *M. hirsuta* e indicam PP1 como uma das substâncias bioativas da espécie.

## ABSTRACT

*Mansoa hirsuta* DC (Bignoniaceae) is a liana found in the Atlantic forest. There is no record of ethnomedical use for this species, although its leaves have been reported to inhibit *in vitro* the angiotensin-converting enzyme (ACE). The goal of the present study was to evaluate the potential antihypertensive effect of this species and to isolate the bioactive compounds. The vasodilator effect of the ethanolic extract of *M. hirsuta* leaves (EEF) was assayed in rat aortic rings. EEF produced a concentration-dependent vasodilatation ( $IC_{50} = 8.5 \pm 0.6 \mu\text{g/mL}$ ), which was absent in endothelium-denuded vessels. The endothelium-dependent vasodilatation induced by EEF was abolished by L-NAME (100  $\mu\text{mol/L}$ ), a nitric oxide (NO) synthase inhibitor, but not by indomethacin (10  $\mu\text{mol/L}$ ;  $IC_{50} = 12.0 \pm 0.8 \mu\text{g/mL}$ ), a cyclooxygenase inhibitor, suggesting a role for NO in the vasorelaxant response. The concentration–response curve of EEF was not modified by the addition of superoxide dismutase (SOD; 300 U/mL). In addition, the concentration–response curve of 3-morpholinosydnonimine (SIN-1;  $IC_{50} = 2.75 \pm 0.73 \mu\text{mol/L}$ ) was displaced to the left ( $p < 0.05$ ) by EEF (50  $\mu\text{g/mL}$ ;  $IC_{50} = 0.8 \pm 0.11 \mu\text{mol/L}$ ) and by SOD (300 U/mL;  $IC_{50} = 0.67 \pm 0.11 \mu\text{mol/L}$ ). These findings led us to conclude that EEF induces a NO- and endothelium-dependent vasodilatation in rat aortic preparations, and that this effect is, at least in some extent, due to an increase on the NO bioavailability as consequence of its antioxidant activity. EEF was submitted to fractionation by different chromatographic techniques (silica gel and Sephadex LH20 columns, RP-HPLC, HSCC) and/or partition between immiscible solvents, resulting in the isolation of three compounds, named PP1, PP2 and PP3. Mass spectra analysis of these constituents allowed their characterization as tetrameric proanthocyanidins, composed of two monomers of catechin and two units of afzelechin, or their corresponding epimers, along with a sugar residue. Identification of the flavan-3-ol units was confirmed for PP1 by mono and bidimensional  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR experiments. This is the first report on the occurrence of proanthocyanidins in a Bignoniaceae species. The ACE inhibitory activity of the isolated compounds was assayed and only PP1 was active, producing  $76 \pm 2.7\%$  of inhibition (100  $\mu\text{g/mL}$ ). PP1 also produced a concentration- and NO-dependent vasorelaxant effect in aortic rings, with  $IC_{50}$  of  $0.25 \pm 0.1 \mu\text{mol/L}$ . These results corroborate the potential antihypertensive activity of *M. hirsuta* and disclose PP1 as one of active compounds of the species.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Esquema da síntese, liberação e ação do NO. ....	29
Figura 2: Sistema renina-angiotensina-aldosterona .....	31
Figura 3: <i>Mansoa hirsuta</i> D.C. ....	34
Figura 4: Fluxograma do fracionamento de EEF por partição seqüencial.....	49
Figura 5: Curva concentração-resposta obtida para EEF em anéis de aorta pré-contraídos com fenilefrina, na presença (E+) e ausência (E-) de endotélio funcional. Cada ponto representa média ± E.P.M. de 5 replicatas. * Significativamente distintos, $p < 0,0001$ .....	70
Figura 6: Curva concentração-resposta obtida para EEF em anéis de aorta pré-contraídos com fenilefrina, incubados com indometacina (A) e com L-NAME (B). Cada ponto representa média ± E.P.M. de 5 replicatas. * Significativamente distintos, $p < 0,05$ ; ** $p < 0,001$ .....	71
Figura 7: Efeito da indometacina (10 $\mu\text{mol/L}$ ) na contração induzida pelo ácido araquidônico. * Significativamente distintos, $p < 0,01$ .....	72
Figura 8: Curva concentração-resposta obtida para EEF em anéis de aorta pré-contraídos com fenilefrina, incubados com superóxido dismutase (SOD). Cada ponto representa média ± E.P.M. de 5 replicatas. ....	73
Figura 9: Curva concentração-resposta obtida para a 3-morfolinossidnonimina (SIN-1) em anéis de aorta pré-contraídos com fenilefrina, na presença e na ausência de EEF (50 $\mu\text{g/mL}$ ) ou SOD (300 U/mL). Cada ponto representa média ± E.P.M. de 5 replicatas. * Significativamente distintos, $p < 0,0001$ (comparado com a curva controle SIN-1). ....	74
Figura 10: Cromatograma, obtido por RP-HPLC, para o extrato etanólico de folhas de <i>Mansoa hirsuta</i> e espectros no U.V. obtidos <i>on line</i> para os picos majoritários (pico 1, TR= 17,24 min; pico 2, TR = 18,27 min; pico 3, TR = 19,49 min e pico 4, TR = 20,70 min). Condições cromatográficas: vide Parte Experimental, item 2.7.2.....	77
Figura 11: Fluxograma do Fracionamento de EEF. ....	78
Figura 12: Perfis cromatográficos, obtidos por RP-HPLC, para as frações MHF24 (A); MHF25 (B); MHF27 (C); MHF31 (D); MHF37 (E); MHF39 (F); MHF40 (G). Condições cromatográficas: vide Parte Experimental, item 2.7.2.....	79
Figura 13: Perfil cromatográfico, obtido por CCD de sílica gel, para o extrato bruto (1. EEF) e frações (2. MHF27; 3. MHF31; 4. MHF37; 5. MHF39; 6. MHF40) de folhas de <i>Mansoa hirsuta</i> . Eluente: EtOAc:HCOOH:HOAc:H <sub>2</sub> O (70:8:8:30). Revelador: Vanilina/H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> .....	80
Figura 14: Perfis cromatográficos obtidos por RP-HPLC para as frações F27A (A) e F27B (B). Condições cromatográficas: vide Parte Experimental, item 2.7.2 .....	81
Figura 15: Curvas de concentração-resposta obtidas para as frações F27A (A) e F27B (B) em anéis de aorta com endotélio funcional, pré-contraídos com fenilefrina. Cada ponto representa média ± E.P.M. de 5 replicatas. ....	83
Figura 16: Curvas de concentração-resposta obtidas para as frações F31 (A) e F40 (B) em anéis de aorta com endotélio funcional, pré-contraídos com fenilefrina. Cada ponto representa média ± E.P.M. de 5 replicatas. ....	84
Figura 17: Perfis cromatográficos, obtidos por RP-HPLC, para as frações F27A10 (A) e F27B7 (B) Condições cromatográficas: vide Parte Experimental, item 2.7.2 .....	85

Figura 18: Perfis cromatográficos, obtidos por RP-HPLC, para as frações F31R (A) e F40H5 (B) e para as substâncias PP1 (C) e PP2 (D), com os respectivos espectros no UV obtidos on line. Condições cromatográficas: item 2.7.2.....	86
Figura 19: Perfis cromatográficos, obtidos por RP-HPLC, para EEF (A) e para as frações MHA (B) e MHM (C). Condições cromatográficas: vide Parte Experimental, item 2.7.2.....	87
Figura 20: Perfis cromatográficos, obtidos por RP-HPLC, para a fração MHM5 e para as substâncias isoladas, PP1 e PP2. Condições cromatográficas: vide Parte Experimental, item 2.7.2. ....	88
Figura 21: Perfis cromatográficos, obtidos por RP-HPLC, para a fração MHA2 (A) e para a substância PP3 (B) com espectro no UV obtido <i>on line</i> . Condições cromatográficas: vide Parte Experimental, item 2.7.2.....	89
Figura 22: Espectros no infravermelho obtidos para PP1 (A), PP2 (B) e PP3 (C).....	91
Figura 23: Espectro de massas MALDI-TOF positivo obtido para PP1.....	93
Figura 24: Espectro de massas MALDI-TOF positivo obtido para PP2.....	93
Figura 25: Espectro de massas MALDI-TOF positivo obtido para PP3.....	94
Figura 26: Espectro de RMN de <sup>13</sup> C obtido para PP1 (100 MHz, DMSO).....	102
Figura 27: Espectro de RMN de <sup>13</sup> C obtido para PP1 - Expansão (100 MHz, DMSO).....	103
Figura 28: Espectro de RMN de <sup>13</sup> C obtido para PP1 - Expansão (100 MHz, DMSO).....	103
Figura 29: Experimento DEPT-135 obtido para PP1 (100 MHz, DMSO).....	104
Figura 30: Espectro de RMN de <sup>1</sup> H obtido para PP1 (400 MHz, DMSO).....	104
Figura 31: Espectro de RMN de <sup>1</sup> H obtido para PP1 - Expansão (400 MHz, DMSO).....	105
Figura 32: Espectro de RMN de <sup>1</sup> H obtido para PP1 - Expansão (400 MHz, DMSO).....	105
Figura 33: Mapa de correlação HSQC obtido para PP1.....	106
Figura 34: Mapa de correlação HSQC obtido para PP1(Expansão).....	106
Figura 35: Mapa de correlação HMBC obtido para PP1.....	107
Figura 36: Mapa de correlação HMBC obtido para PP1.....	107
Figura 37: Espectro de RMN de <sup>13</sup> C obtido para PP2 - (100 MHz, DMSO).....	109
Figura 38: Experimento DEPT-135 obtido para PP2 (100 MHz, DMSO).....	109
Figura 39: Espectro de RMN de <sup>1</sup> H obtido para PP2 - (400 MHz, DMSO).....	110
Figura 40: Espectro de RMN de <sup>13</sup> C obtido para PP3 - (100 MHz, DMSO).....	110
Figura 41: : Espectro de RMN de <sup>13</sup> C obtido para PP3 - Expansão (100 MHz, DMSO).....	111
Figura 42: Experimento DEPT-135 obtido para PP3 (100 MHz, DMSO).....	111
Figura 43: Espectro de RMN de <sup>1</sup> H obtido para PP3 - (400 MHz, DMSO).....	112

Figura 44: Curva concentração-resposta obtida para PP1 em anéis de aorta pré-contraídos com fenilefrina, na presença (E+) e ausência (E-) de endotélio funcional. Cada ponto representa média  $\pm$  E.P.M. de 5 replicatas. \* Significativamente distintos,  $p < 0,0001$  .....114

Figura 45: Curva concentração-resposta obtida para PP1 em anéis de aorta pré-contraídos com fenilefrina, incubados com L-NAME (100  $\mu$ M). Cada ponto representa média  $\pm$  E.P.M. de 5 replicatas. \* Significativamente distintos,  $p < 0,0001$  .....114

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Fracionamento preliminar do extrato etanólico (EEF) de folhas <i>Mansoa hirsuta</i> .....	48
Tabela 2: Refracionamento de MHF27 por cromatografia em coluna de sílica gel.....	50
Tabela 3: Fracionamento de MHF27B em coluna de Sephadex® LH-20 .....	51
Tabela 4: Fracionamento de F27A em coluna de Sephadex® LH-20.....	51
Tabela 5: Refracionamento de MHF31 por cromatografia em coluna de Sephadex® LH 20 .....	52
Tabela 6: Refracionamento de F31A por cromatografia em coluna de Sephadex® LH 20 .....	53
Tabela 7: Refracionamento de F31B por cromatografia em coluna de Sephadex® LH 20 .....	53
Tabela 8: Refracionamento de F31C por cromatografia em coluna de Sephadex® LH 20 .....	54
Tabela 9: Refracionamento de F31D por cromatografia em coluna de Sephadex® LH 20 .....	54
Tabela 10: Refracionamento de MHF40 por cromatografia em coluna de Sephadex® LH 20. ....	55
Tabela 11: Refracionamento de F40SA por HSCCC.....	57
Tabela 12: Refracionamento de MHM por HSCCC .....	58
Tabela 13: Refracionamento de MHA por HSCCC.....	59
Tabela 14: Gradiente de eluição empregado na obtenção dos perfis cromatográficos por RP-HPLC. ....	60
Tabela 15: Atividade inibidora da ECA <i>in vitro</i> obtida para frações provenientes do extrato etanólico de folhas de <i>Mansoa hirsuta</i> (EEF), avaliadas pelo método colorimétrico.....	81
Tabela 16: Percentual de relaxamento obtido para EEF e frações na concentração de 100 µg/mL em anéis de aorta pré-contraídos com fenilefrina (0,1 µmol/L) .....	82
Tabela 17: Comparação dos dados de RMN de <sup>1</sup> H e <sup>13</sup> C para o anel B das unidades flavan-3-ol de PP1 e de <i>ent</i> -epiafzelequina-(4 $\alpha$ →8, 2 $\alpha$ →O→7)-(-)epicatequina .....	97
Tabela 18: Correlações heteronucleares <sup>1</sup> H- <sup>13</sup> C observadas para PP1 nos experimentos de RMN bidimensional HSQC e HMBC. ....	98
Tabela 19: Atividade inibidora da ECA determinada para as substâncias isoladas das folhas de <i>M. hirsuta</i> , avaliada pelo método colorimétrico.....	112

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

Ang I	Angiotensina I
Ang II	Angiotensina II
AT1	Receptor de angiotensina tipo 1
AT2	Receptor de angiotensina tipo 2
CC	Cromatografia em coluna
CCD	Cromatografia em camada delgada
CCR	Curva concentração-resposta
CI <sub>50</sub>	Concentração inibitória 50%
cm	Centímetros
COX	Ciclooxigenase
d.i.	Diâmetro interno
$\delta$	Deslocamento químico
DCM	Diclorometano
DEPT	<i>Distortionless enhancement by polarization transfer</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
DPM	Desvio padrão da média
ECA	Enzima conversora de angiotensina
ECA2	Enzima conversora de angiotensina tipo 2
EEF	Extrato etanólico de folhas de <i>M. hirsuta</i>
EPM	Erro padrão da média
EtOAc	Acetato de etila
g	Gramas
HMBC	<i>Heteronuclear correlation through multiple quantum coherence</i>
HPLC	High Performance Liquid Chromatography (cromatografia líquida de alta eficiência)
HSQC	<i>Heteronuclear single bond coherence</i>
Hx	Hexano
Hz	Hertz
IV	Infravermelho
<i>J</i>	Constante de acoplamento escalar
$\lambda$	Comprimento de onda
L	Litros

MALDI-TOF	<i>Matrix-associated Laser Desorption Ionization Time of Flight</i>
MeOH	Metanol
mg	Miligramas
MHz	Megahertz
min	Minutos
mL	Mililitros
μg	Microgramas
μL	Microlitros
n-BuOH	n-butanol
nm	Nanometros
NO	Óxido nítrico
OMS	Organização Mundial de Saúde
p.a.	Pró-análise
p/v	Peso por volume
ppm	Partes por milhão
Rf	Fator de retenção
RMN <sup>13</sup> C	Ressonância magnética nuclear de carbono 13
RMN <sup>1</sup> H	Ressonância magnética nuclear de hidrogênio
RP	Fase reversa
rpm	Rotações por minuto
SNA	Sistema nervoso autônomo
SNC	Sistema nervoso central
SRAA	Sistema renina-angiotensina-aldosterona
TMS	Tetrametilsilano
TNBS	Ácido trinitro-benzenosulfônico
TR	Tempo de retenção
U	Unidades
UV	Ultravioleta
v/v	Volume por volume

## LISTA DE ESTRUTURAS QUÍMICAS

1	(+)-turbocurarina.....	21
2	Ácido salicílico.....	21
3	Ácido acetilsalicílico.....	21
4	Morfina.....	21
5	Quinina.....	21
6	Cloroquina.....	21
7	Primaquina.....	21
8	Vimblastina.....	21
9	Vincristina.....	21
10	Paclitaxel.....	21
11	Camptotecina.....	21
12	Palitoxina.....	22
13	Reserpina .....	23
14	Ácido ursólico.....	34
15	$\beta$ -sitosterol.....	34
16	Estigmasterol.....	34
17	Lupeol.....	34
18	9-metoxi- $\alpha$ -lapachona.....	35
19	4-hidroxi-9-metoxi- $\alpha$ -lapachona.....	35
20	Captopril.....	36
21	Phe-Ala-Pro.....	36
22	Proantocianidina B2.....	38
23	Proantocianidina C1.....	38
24	Ácido clorogênico.....	38
25	(+)-catequina.....	38
26	(-)-epicatequina.....	38
27	Isovitexina.....	38
28	Isoquercetina.....	38
29	Quercetina-3-O- $\alpha$ -(6-cafeoilglicosil- $\beta$ -1,2-ramnosídeo).....	39
30	Cafeato de etila.....	39
31	Ácido rosmarínico.....	40

<b>32</b>	Rosmarinato de etila.....	40
<b>33</b>	Apigenina.....	40
<b>34</b>	Luteolina.....	40
<b>35</b>	Canferol-3-O- $\alpha$ -arabinopiranosídeo.....	40
<b>36</b>	Canferol-3-O- $\beta$ -galatopiranosídeo.....	40
<b>37</b>	Quercetina-3-O- $\alpha$ -arabinopiranosídeo.....	40
<b>38</b>	Luteolina-7-O- $\beta$ -glicopiranosídeo.....	40
<b>39</b>	(+)-mesquitol.....	40
<b>40</b>	Teracacidina.....	40
<b>41</b>	Florofucofuroeckol.....	40
<b>42</b>	Dieckol.....	40
<b>43</b>	Eckol.....	40
<b>44</b>	$\gamma$ -L-glutamil-(+)S-alil-S-cisteína.....	41
<b>45</b>	Gly-Pro-Pro.....	41
<b>46</b>	Gly-Glu-Pro.....	41
<b>47</b>	Diocleína.....	42
<b>48</b>	Floranol.....	42
<b>49</b>	Proantocianidina A2.....	76
<b>50</b>	Proantocianidina A6.....	76
<b>51</b>	Proantocianidina RP-2.....	76
<b>52</b>	Afzelequina/epiafzelequina.....	94
<b>53</b>	Catequina/epicatequina.....	94
<b>54</b>	Galocatequina/epigalocatequina.....	94
<b>55</b>	Cátion quinona-metídeo da afzelequina/epiafzelequina.....	95
<b>56</b>	Radical catiônico quinona-metídeo da catequina/epicatequina.....	95
<b>57</b>	Proantocianidina B5.....	96
<b>58</b>	Proantocianidina A1.....	96
<b>59</b>	<i>ent</i> -epiafzelequina-(4 $\alpha$ $\rightarrow$ 8, 2 $\alpha$ $\rightarrow$ O $\rightarrow$ 7)-(-)epicatequina.....	97
<b>60</b>	Estrutura hipotética de PP1 .....	101
<b>61</b>	Estrutura hipotética de PP1.....	102
<b>62</b>	epicatequina-(4- $\beta$ -8)-epicatequina-(4- $\beta$ -8)-epicatequina-3-O-galato.....	115

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO .....	18
1.1 OBJETIVOS.....	24
1.1.1 Objetivo geral .....	24
1.1.2 Objetivos específicos .....	24
1.2 REVISÃO DA LITERATURA.....	24
1.2.1 Hipertensão arterial.....	24
1.2.2 Química e atividades biológicas de <i>Mansoa</i> .....	33
1.2.3 Produtos naturais com potencial atividade anti-hipertensiva .....	36
2 PARTE EXPERIMENTAL.....	44
2.1 Aparelhos, reagentes e materiais de consumo .....	44
2.2 Reveladores para CCD.....	46
2.3 Material vegetal .....	47
2.4 Preparo do extrato etanólico (EEF) .....	47
2.5 Fracionamento do extrato etanólico (EEF) .....	48
2.5.1 Cromatografica em coluna de sílica gel .....	48
2.5.2 Partição líquido-líquido.....	49
2.6 Refracionamento das frações provenientes de EEF.....	49
2.6.1 Refracionamento de MHF27 .....	50
2.6.2 Refracionamento de MHF31 .....	52
2.6.3 Refracionamento de MHF40 .....	55
2.6.4 Fracionamento de MHM.....	57
2.6.5 Fracionamento de MHA .....	59
2.7 Perfis cromatográficos por RP-HPLC .....	59

2.7.1 Preparo das amostras .....	59
2.7.2 Condições cromatográficas .....	60
2.8 Elucidação estrutural das substâncias isoladas.....	60
2.9 Ensaios farmacológicos .....	61
2.9.1 Avaliação da atividade inibitória da ECA <i>in vitro</i> , pelo método colorimétrico.....	61
2.9.2 Avaliação da atividade vasodilatadora <i>in vitro</i> em preparações isoladas de aorta de ratos .....	64
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	69
3.1 Avaliação de atividades biológicas de EEF .....	69
3.1.1 Avaliação da atividade vasodilatadora em anéis de aorta de ratos.....	69
3.1.2 Avaliação da atividade inibitória da ECA pelo método colorimétrico.....	74
3.2 Estudo fitoquímico de EEF .....	75
3.2.1 Fracionamento de EEF .....	77
3.2.1.1 Por cromatografia em coluna de sílica gel .....	77
3.2.2 Fracionamento de EEF por partição líquido-líquido. ....	87
3.3 Elucidação estrutural das substâncias isoladas.....	90
3.4 Avaliação das atividades biológicas das substâncias isoladas.....	112
4 CONCLUSÕES .....	116
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	117

## 1 INTRODUÇÃO

Uma grande diversidade de organismos e de substâncias químicas desenvolveu-se na natureza ao longo dos bilhões de anos de evolução, entre elas os metabólitos secundários. Esses são substâncias consideradas não essenciais para os organismos que as produzem, mas que estão envolvidas em várias interações ecológicas que contribuem para a manutenção das espécies (VEEPORT, 1998).

O homem utiliza a diversidade química dessas substâncias para o tratamento de condições patológicas desde os primórdios da medicina, remontando há, pelo menos, 3.000 a 6.000 anos, segundo registros escritos dos egípcios. Eles foram os primeiros a utilizar drogas provenientes de fontes naturais, cuja eficácia foi comprovada pela ciência moderna (HALBERSTEIN, 2005; KOEHN; CARTER, 2005).

De acordo com dados da Organização Mundial de Saúde (OMS), o uso de plantas medicinais é a principal estratégia para os cuidados primários de saúde de 65 a 80% da população mundial, principalmente daquela de países em desenvolvimento, seja pela dificuldade ao acesso às terapias farmacológicas ou a seus custos. Por outro lado, em países da Europa, América do Norte e outras nações industrializadas, 50% da população tem utilizado a medicina complementar ou alternativa, incluindo plantas medicinais (CALIXTO, 2005).

Segundo a OMS, o mercado mundial de fitoterápicos tem crescido consideravelmente nos últimos anos, movimentando atualmente mais de US\$ 60 bilhões anualmente. Não existem estatísticas oficiais, mas de acordo com a Associação Brasileira de Indústrias de Fitoterápicos (Abifito), o mercado de fitoterápicos brasileiro movimenta cerca de US\$ 400 milhões e cresce cerca de 10 a 15 % ao ano, enquanto o mercado de produtos sintéticos cresce apenas 3 a 4% (EMBRAPA, 2007; WHO, 2007).

Por outro lado, apesar da extensa utilização das plantas medicinais, um número relativamente pequeno de espécies já foi avaliado cientificamente visando a assegurar sua qualidade, eficácia e segurança. Também existe carência de dados sobre a composição química de diversas espécies medicinais. Dentre as 400.000 espécies de plantas superiores estimadas no mundo, apenas cerca de 10% já foram objeto de algum estudo químico. Quando se considera o número de plantas submetido a testes biológicos ou farmacológicos este percentual é ainda menor.

Portanto, é enorme o potencial ainda inexplorado de plantas como fonte de novos compostos bioativos (SOEJARTO, 1996; BASSO et al, 2005; CALIXTO, 2005).

Estudos químicos, farmacológicos e clínicos de plantas medicinais e de seus constituintes foram a base para o desenvolvimento de diversos medicamentos utilizados na terapêutica atual. O conhecimento do potencial terapêutico das plantas pelos povos primitivos e pelos indígenas pode ser considerado fator fundamental para o descobrimento de substâncias tóxicas e medicamentosas ao longo do tempo (HALBERSTEIN, 2005; VIEGAS et al, 2006).

Os povos indígenas utilizavam os curares, drogas obtidas de diversas espécies de *Strychnos* e *Chondodendron*, para produzir flechas envenenadas para caça e pesca. Somente no século XIX Boehm isolou o principal constituinte ativo do curare americano (*Chondrodendron tomentosum* Ruiz & Pav), a (+)-tubocurarina (**1**), cujo mecanismo de ação foi posteriormente caracterizado como bloqueador neuromuscular (BARREIRO, 1990; VIEGAS et al., 2006).

Talvez o marco mais importante para o desenvolvimento dos fármacos a partir de produtos naturais de plantas tenha sido o descobrimento dos salicilatos obtidos de *Salix alba* L., principalmente o ácido salicílico (**2**) que originou o fármaco sintético ácido acetilsalicílico (**3**, AAS), um analgésico que mesmo após 100 anos de sua descoberta ainda é alvo de pesquisas pela indústria farmacêutica (YUNES et. al., 2001).

O isolamento da morfina (**4**), ou principium somniferum, em 1806 por Friedrich Wilhelm Sertürner, é considerado o início do estudo dos metabólitos secundários das plantas. A morfina é um alcalóide com potente atividade analgésica, a partir do ópio, preparado dos bulbos de *Papaver somniferum* L., cujas propriedades soporíferas e analgésicas são conhecidas há séculos (HARTMANN, 2007).

Outro alcalóide de grande importância terapêutica é a quinina (**5**), isolada das cascas secas de espécies de *Cinchona* em 1820 por Pelletier e Caventou, que durante quase trezentos anos foi o único princípio ativo eficaz contra a malária. Esta substância é considerada a responsável pelo desenvolvimento dos antimaláricos sintéticos do grupo dos 4- e 8-aminoquinolínicos, do qual fazem parte a cloroquina (**6**) e a primaquina (**7**) (ROBERT; MEUNIER, 1998).

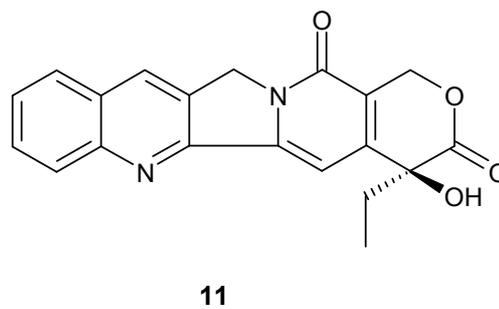
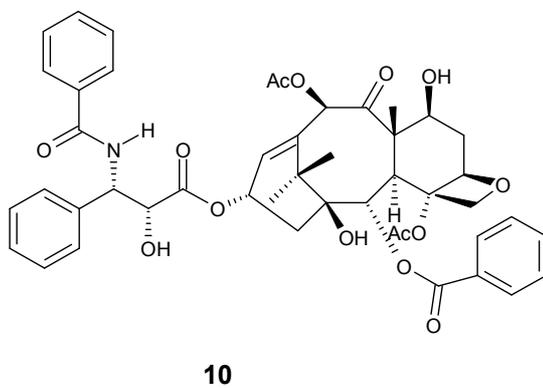
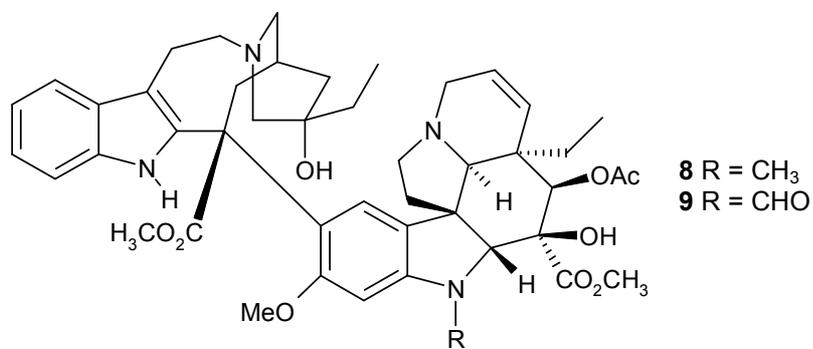
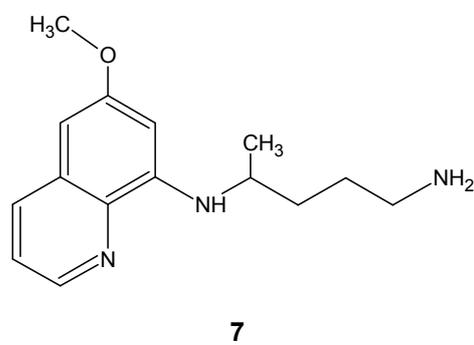
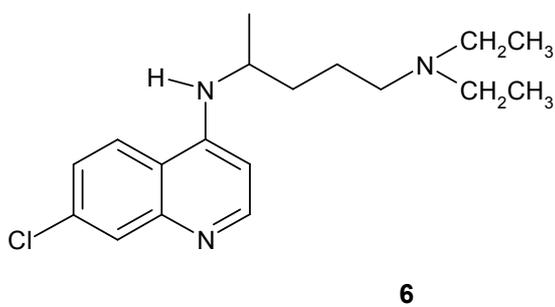
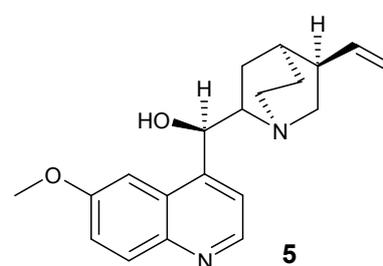
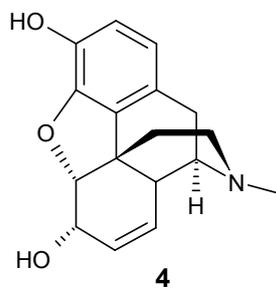
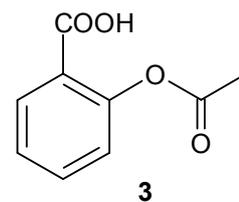
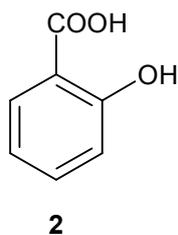
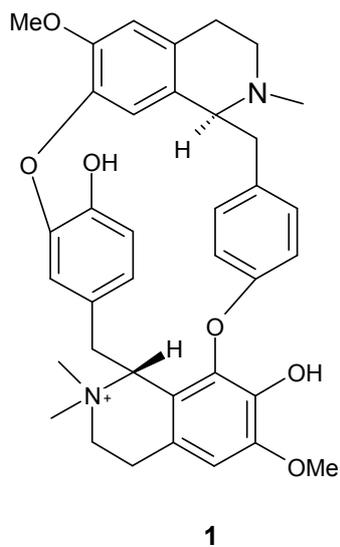
Com o advento da química combinatorial as indústrias farmacêuticas reduziram seus esforços na pesquisa de produtos naturais (KOEHN; CARTER, 2005). No entanto, a introdução de importantes fármacos de origem natural na

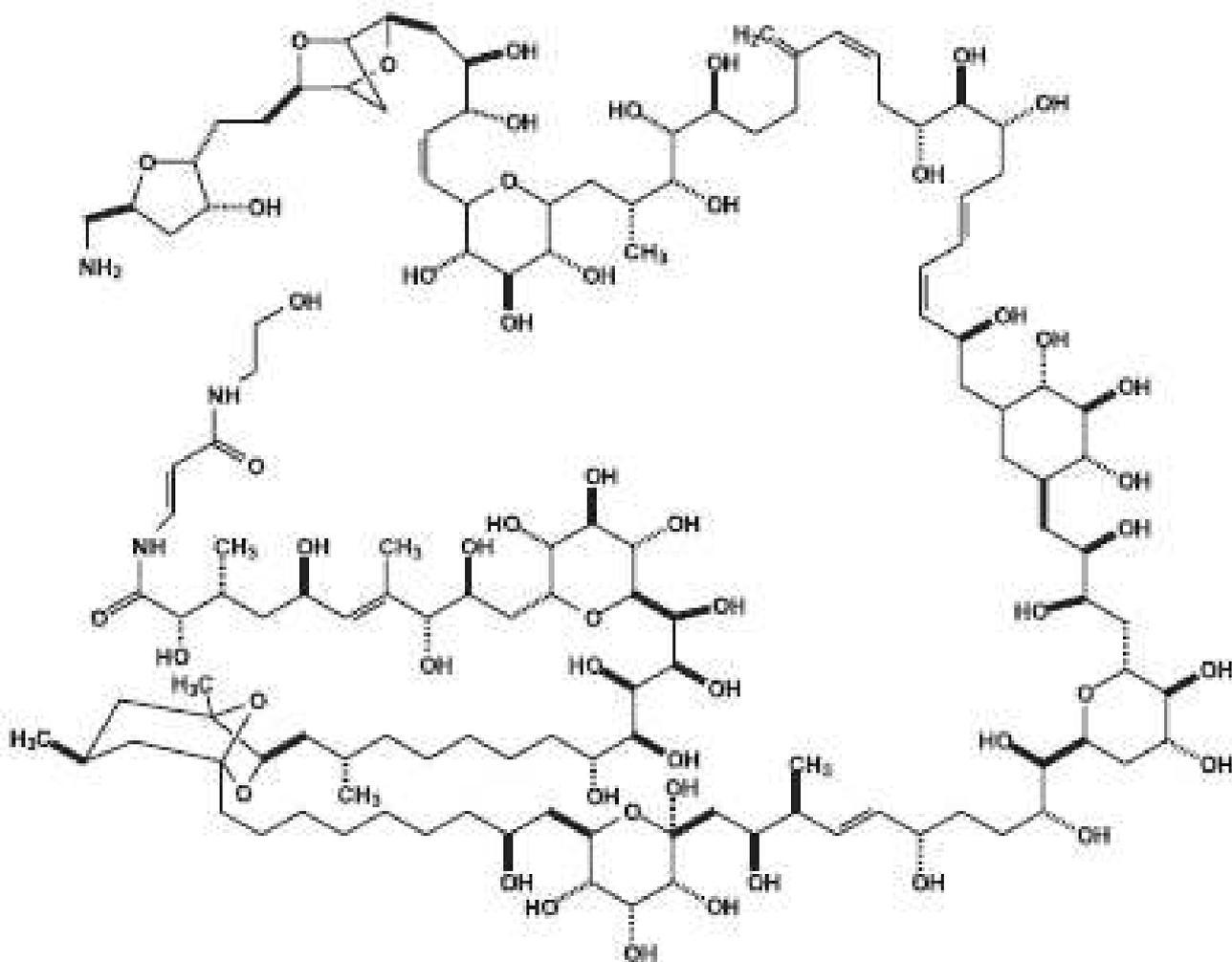
terapêutica nos últimos 30 anos, contribuiu significativamente para a reafirmação da importância dos produtos naturais no desenvolvimento de novos fármacos, sobretudo na busca de substâncias com estruturas moleculares complexas, difíceis de serem obtidas por um processo sintético de custo racional.

Entre esses, merecem destaque os fármacos utilizados na quimioterapia do câncer, como a vimblastina (**8**) e a vincristina (**9**), extraídas de *Catharanthus roseus* (L.) G. D, o paclitaxel (**10**), extraído das cascas de *Taxus brevifolia* Nutt. e a camptotecina (**11**) obtida a partir da espécie *Camptotheca acuminata* Decne. (WALL et al, 1966; OBERLIES; KROLL, 2004).

Além de sua utilização como fármacos, os produtos naturais são empregados pela indústria farmacêutica como protótipos moleculares para o desenvolvimento de novas entidades químicas (NEQ), visando aprimorar suas propriedades farmacológicas e reduzir a toxicidade (RASKIN et al, 2002). Essas moléculas apresentam maior complexidade estrutural e maior número de centros quirais que substâncias obtidas por síntese clássica ou química combinatorial. Essas moléculas foram selecionadas por pressões evolutivas para interagir com uma ampla variedade de proteínas e outros alvos biológicos, com objetivos específicos, tornando-as efetivas para tratar diversas condições patológicas (KOEHN; CARTER, 2005).

Uma excelente ilustração da extraordinária capacidade sintética da natureza e de sua estereoespecificidade é a palitoxina (**12**), um produto natural não-protéico obtido a partir de corais do gênero *Palythoa* que possui 64 centros estereogênicos, 129 átomos de C, 227 de H, 3 de N e 54 átomos de O, além de 8 ligações duplas C=C. Esta toxina é considerada a molécula biologicamente ativa mais potente de origem marinha e a mais tóxica conhecida, sendo apenas menos tóxica que a proteína botulínica (SOARES et al, 2006).





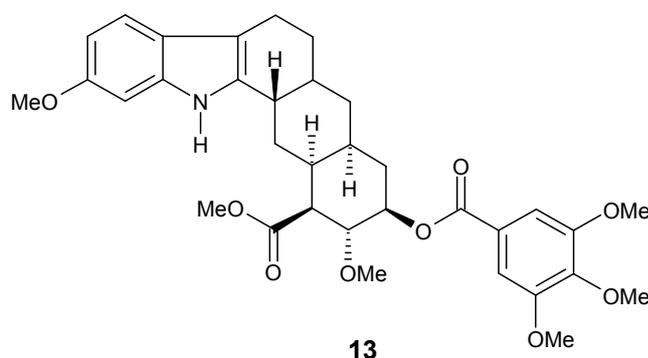
12

A contribuição da natureza como fonte de novas estruturas é notória. Os produtos naturais desempenham papel importante no desenvolvimento de novos fármacos ainda que grande parte dessas estruturas não resulte diretamente em fármacos. Dentre as 1.010 NEQ introduzidas no mercado no período entre 1981 e 2006, mais de 50% eram produtos naturais ou derivados desses ou, ainda, produtos sintéticos baseados em farmacóforos de produtos naturais (BALUNAS; KINGHORN, 2005; NEWMAN; CRAGG, 2007). Entre as áreas com grande contribuição dos produtos naturais destacam-se os fármacos antimicrobianos e antitumorais. Dentre todos os antitumorais em uso clínico, 47% são produtos naturais ou derivados originados desses (NEWMAN; CRAGG, 2007).

Embora as técnicas de química combinatorial venham sendo amplamente utilizadas nos últimos anos, os produtos naturais ainda ocupam posição de destaque no desenvolvimento de novas drogas, sendo responsáveis por cerca de 50% das NEQ no período de 2000 a 2006 (NEWMAN; CRAGG, 2007).

As principais patologias pesquisadas pela indústria farmacêutica são as doenças infecciosas, câncer, hipertensão e processos inflamatórios, com mais de 50 fármacos aprovados para cada uma dessas patologias nos últimos 25 anos (BALUNAS; KINGHORN, 2005; NEWMAN; CRAGG, 2007).

No campo dos anti-hipertensivos, os produtos naturais também desempenham papel considerável, sendo que aproximadamente 50% das 77 drogas lançadas nos últimos 25 anos estão diretamente relacionadas aos produtos naturais (NEWMAN; CRAGG, 2007; KOEHN; CARTER, 2005). Dentre esses, a reserpina (**13**), um alcalóide indólico extraído de *Rauwolfia serpentina* (L.) Benth. Ex Kurz (Apocynaceae) com ação anti-hipertensiva, e que foi utilizado por muito tempo no tratamento de hipertensão leve a moderada (GILANI et al, 2005). No entanto, devido aos numerosos efeitos colaterais, o uso da reserpina foi descontinuado, estando disponível apenas em alguns países, inclusive no Brasil, em doses entre 0,05 e 0,1 mg, e em associação com diuréticos ou vasodilatadores (PAVAN et al, 2003; MILNE; PINKNEY-ATKINSON, 2004; ANVISA, 2008).



Outro exemplo da utilidade dos produtos naturais no tratamento da hipertensão arterial é o extrato padronizado de *Crataegus oxyacantha* L., cujos frutos, folhas e flores constituem uma droga vegetal citada em várias farmacopéias, como, a farmacopéia alemã. Essa espécie possui atividade vasodilatadora periférica, aumenta o metabolismo no músculo cardíaco, dilata os vasos coronarianos e melhora o fluxo sanguíneo para o coração, ajudando, portanto, no tratamento das doenças cardiovasculares (VERMA et al, 2007).

Neste contexto se insere o presente trabalho, no qual se descreve o estudo químico e de atividade vasodilatadora e inibitória da ECA de *Mansoa hirsuta* DC.

## 1.1 OBJETIVOS

### 1.1.1 Objetivo geral

Estudo fitoquímico e da potencial atividade hipotensiva da espécie *Mansoa hirsuta* D.C. (Bignoniaceae).

### 1.1.2 Objetivos específicos

1. Avaliar a potencial atividade hipotensiva do extrato bruto de folhas de *M. hirsuta* em ensaios *in vitro* de inibição da ECA e vasodilatação em preparações isoladas de aorta de ratos.
2. Realizar o fracionamento do extrato bruto de *M. hirsuta*, visando obter frações enriquecidas em flavonóides e proantocianidinas.
3. Avaliar a potencial atividade hipotensiva das frações, utilizando os ensaios descritos em 1.
4. Selecionar uma das frações ativas para isolamento dos constituintes bioativos.
5. Elucidar a estrutura química dos constituintes isolados por métodos espectrométricos usuais.
6. Avaliar a potencial atividade hipotensiva das substâncias isoladas, utilizando os ensaios descritos em 1

## 1.2 REVISÃO DA LITERATURA

### 1.2.1 Hipertensão arterial

A hipertensão arterial é definida como a elevação crônica da pressão arterial. Segundo o sétimo relatório do *Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure* (JNC), considera-se hipertensão valores de pressão arterial sistólica maior ou igual a 140 mmHg e/ou pressão arterial diastólica maior ou igual a 90 mmHg. Pressão arterial sistólica entre 130 e 139 mmHg e/ou pressão arterial diastólica entre 80 e 89 mmHg são consideradas valores limítrofes (JOINT, 2003).

Apesar dos grandes avanços no diagnóstico e na terapêutica, as doenças cardiovasculares ainda constituem a principal causa de morte em todo o mundo, principalmente nos países industrializados. Segundo dados da OMS, doenças cardiovasculares são responsáveis por cerca de um terço dos óbitos globais, totalizando 17,5 milhões em 2005 (WHO, 2007). No Brasil, as doenças do aparelho circulatório representam a principal causa de mortalidade, correspondendo a mais de 30% em todas as regiões. Considerando-se apenas as doenças crônicas não transmissíveis, as doenças cardiovasculares representam mais de 50% dos óbitos (BRASIL, 2008).

Além da alta taxa de mortalidade, a hipertensão arterial e suas complicações também acarretam altos custos ao sistema de saúde devido à elevada frequência de internações. Em 2004, essas doenças foram a causa de aproximadamente 1.200.000 internações (10,4% do total), correspondendo a um custo de aproximadamente 700 milhões de reais (BRASIL, 2008). Atualmente, a prevalência estimada para a hipertensão no Brasil é de 35% da população acima de 40 anos. Isso representa, em números absolutos, um total de 17 milhões de portadores da doença, segundo estimativa de 2004 do Instituto Brasileiro de Geografia Estatística (IBGE) (BRASIL, 2008).

A hipertensão não se manifesta apenas pela elevação da pressão arterial, estando associada a alterações estruturais e funcionais complexas em vários órgãos-alvo. É também considerada um dos principais fatores de risco de morbimortalidade cardiovascular, desempenhando papel crucial na etiologia de doenças cerebrovasculares, doença isquêmica do miocárdio e insuficiência cardíaca e renal.

Em um estudo conduzido no Rio Grande do Sul, constatou-se a prevalência de hipertensão arterial sistêmica de 33,7% (n=309), sendo que 49,2% desconheciam ser hipertensos; 10,4% tinham conhecimento de ser hipertensos, mas não seguiam o tratamento; 30,1% seguiam o tratamento, mas não apresentavam controle adequado e apenas 10,4% seguiam tratamento anti-hipertensivo com bom controle (GUS et al, 2004). O tratamento da hipertensão resulta em uma redução de cerca de 40% no risco de acidente vascular cerebral (AVC) e ainda é considerado inadequado em vários países, desenvolvidos e subdesenvolvidos (WHO, 2003)

A pressão arterial (PA) é o produto do débito cardíaco pela resistência vascular periférica. Uma das características da hipertensão arterial é a elevação da resistência vascular periférica, a qual é geralmente atribuída ao aumento no tônus

vascular. A PA pode ser controlada essencialmente por dois mecanismos: regulação neural, que é feita primariamente pelo sistema nervoso autônomo (associado aos barorreceptores e quimiorreceptores), e regulação humoral, realizada por diversas substâncias liberadas por diferentes tipos celulares, como as células endoteliais e as células justaglomerulares. Alterações em um ou ambos os mecanismos de controle da PA (neural e/ou humoral), poderão resultar em elevação dos níveis pressóricos, instalando-se assim um quadro de HA.

O controle humoral é feito por diversos tipos celulares, entre eles as células justaglomerulares e as células endoteliais. Furchgott e Zawadzki (1980) foram os primeiros pesquisadores a demonstrar a importância do endotélio no controle do tônus vascular. Os autores relataram que a vasodilatação induzida pela acetilcolina era dependente da presença de um endotélio íntegro, e que as células endoteliais liberavam um fator de relaxamento, denominado fator de relaxamento derivado do endotélio (EDRF), que foi posteriormente identificado como óxido nítrico.

São numerosas as substâncias produzidas pelas células endoteliais que podem induzir tanto relaxamento, caso do óxido nítrico (NO), da prostaciclina (PGI<sub>2</sub>) e do fator hiperpolarizante derivado do endotélio (EDHF), quanto constrição dos vasos sanguíneos, como a endotelina e o tromboxano, resultando em diversos efeitos fisiológicos que em equilíbrio contribuem para manter a dinâmica vascular (MONCADA et al, 1991; COHEN, VANHOUTTE, 1995).

O NO é a substância relaxante produzida pelas células endoteliais mais amplamente estudada. Essa substância desempenha um papel fundamental no sistema cardiovascular, tanto no controle da resistência vascular periférica como na agregação plaquetária. O NO é um gás de meia vida bastante curta (aproximadamente 2 a 5 segundos), liberado em resposta a estímulos físicos ou estimulação de diferentes receptores para uma variedade de mediadores neurohumorais, entre eles a acetilcolina, bradicinina e ATP (MONCADA et al, 1991).

O estímulo físico é feito pela força que o sangue exerce sobre a parede das artérias, denominada estresse de cisalhamento. O estresse de cisalhamento laminar aumenta a produção de NO por ativação da sintase do óxido nítrico endotelial (eNOS), uma enzima expressa constitutivamente, responsável pela oxidação da L-arginina em L-citrulina com liberação de NO (MONCADA, 1997; ZIEGLER et al, 1998; GIMBRONE, 1999). O estresse de cisalhamento também altera a distribuição

da eNOS entre os compartimentos celulares (DAVIS et al, 2001; CHENG et al, 2005).

A atividade da eNOS é regulada por inúmeras modificações pós-translacionais, incluindo interações proteína-proteína, fosforilação e localização subcelular (FLEMING; BUSSE, 2003).

Em geral, após a miristoilação e palmitoilação da eNOS, essa se localiza na membrana plasmática, onde em células em repouso essa enzima está ligada à caveolina e permanece inativa. Vários agonistas que aumentam a concentração intracelular de cálcio promovem a ativação da eNOS. O cálcio é um importante sinalizador citoplasmático, atuando a partir de ligações com proteínas intracelulares específicas, como a calmodulina. Quando o cálcio se liga à calmodulina forma-se o complexo cálcio-calmodulina, que participa da regulação de algumas enzimas, incluindo a eNOS. A ligação do complexo cálcio-calmodulina ao sítio de ligação na enzima desloca um *loop* autoinibitório na eNOS, facilitando o fluxo de elétrons NADPH dependente do domínio redutase da proteína para o domínio oxigenase. Quando a concentração de cálcio intracelular é reduzida, desfaz-se esse complexo e a atividade da enzima é desativada (FLORA-FILHO; ZILBERSTEIN, 2000; GOVERS et al, 2001; FLEMING; BUSSE, 2003; OESS et al, 2006).

A fosforilação desempenha papel importante na regulação da atividade da eNOS, especialmente a fosforilação do resíduo de serina 1177, localizado dentro do domínio redutase, o que aumenta a atividade da enzima por aumentar a atividade redutase e a sensibilidade ao cálcio (DIMMELER et al, 1999; FLEMING; BUSSE, 2003; TAKAHASHI; MENDELSON, 2003).

Em culturas de células não estimuladas, o resíduo ser1177 é rapidamente fosforilado em consequência de uma variedade de estímulos: estresse de cisalhamento, insulina, estrogênio, fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) ou bradicinina. As quinases envolvidas nesse processo dependem do estímulo aplicado. O estresse de cisalhamento ativa as proteínas cinases Akt ou A (PKA), enquanto a insulina ativa a Akt e proteína cinase ativada por monofosfato de adenosina (AMP) (AMPK), já o estrogênio e VEGF ativa principalmente a Akt e a bradicinina promove fosforilação da ser1177 mediada por uma proteína cinase dependente do complexo  $Ca^{2+}$ /calmodulina (CaMKII). Quando esse resíduo de serina é fosforilado a produção de NO é aumentada várias vezes acima dos níveis

basais (FONTANA et al, 2002; FLEMING; BUSSE, 2003; TAKAHASHI; MENDELSON, 2003).

A fosforilação de um resíduo de treonina (thr495), localizado no domínio de ligação do complexo cálcio-calmodulina (CaM), é associada com redução na atividade da eNOS. Quando esse resíduo é desfosforilado, quantidade substancialmente maior de CaM se liga a eNOS e eleva a atividade da enzima. Estímulos associados com a desfosforilação do resíduo thr495 (bradicinina, histamina, e ionóforos de  $Ca^{2+}$ ) também aumentam a concentração de  $Ca^{2+}$  resultando em fosforilação do resíduo ser1177 (FLEMING; BUSSE, 2003; TAKAHASHI; MENDELSON, 2003; GOVERS et al, 2001).

O NO formado difunde-se rapidamente das células endoteliais para o tecido muscular liso vascular. Na musculatura lisa vascular, o NO ativa a forma solúvel da guanilato ciclase, uma enzima catalítica, formando o monofosfato de guanosina cíclico (GMPc) a partir do trifosfato de guanosina (GTP). A formação de GMPc ativa a bomba de cálcio no interior da célula muscular lisa, reduzindo a concentração de cálcio intracelular, inibindo sua contração (Figura 1). Outros mecanismos pelos quais a via NO/GMPc induz vasodilatação incluem inibição da geração de trifosfato de inositol (IP3) (na musculatura lisa), desfosforilação da cadeia leve de miosina, inibição do influxo de  $Ca^{2+}$ , ativação de proteínas quinases, estimulação da  $Ca^{2+}$ -ATPase de membrana e abertura de canais de K (MONCADA, 1997; FISHER et al, 2001; FLEMING; BUSSE, 2003).

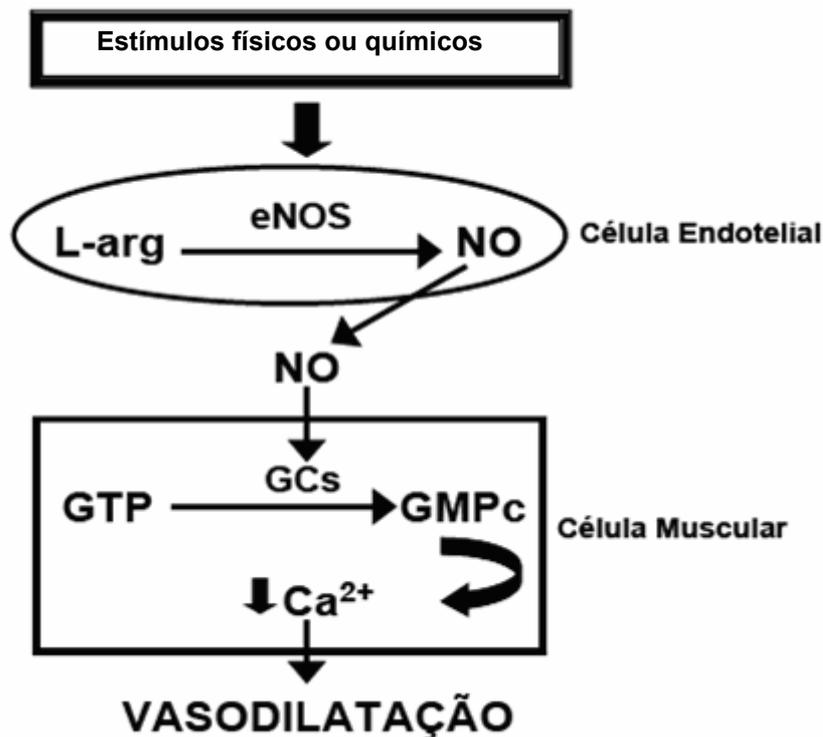


Figura 1: Esquema da síntese, liberação e ação do NO.

A relevância fisiológica da produção de NO endotelial é evidenciada pela vasoconstrição observada na maioria dos leitos vasculares e conseqüente aumento da pressão arterial sistêmica após infusão de inibidores da NOS (MONCADA, et al, 1991; REES, et al, 1992; ZAGO, ZANESCO, 2006). O papel do NO no sistema cardiovascular foi extensamente estudado, sendo atribuído a ele uma função protetora na hipertensão arterial, aterosclerose, doença arterial coronariana e doenças tromboembólicas. Numerosos estudos indicam que essas doenças têm sua etiologia relacionada a alterações da função endotelial. A disfunção endotelial, caracterizada pela redução na produção e/ou biodisponibilidade de NO é um fator que contribui para o aparecimento de doenças cardiovasculares.

Espécies reativas de oxigênio (ROS) estão entre os principais responsáveis pelo surgimento da disfunção endotelial. ROS são produzidas por uma série de sistemas enzimáticos no organismo, podendo desempenhar tanto papéis fisiológicos quanto patofisiológicos. Quando são formadas quantidades excessivas de ROS, superando a capacidade dos sistemas antioxidantes endógenos, tem-se um estado denominado de estresse oxidativo, associado ao surgimento de diversas doenças cardiovasculares. A vasodilatação dependente de endotélio é reduzida na presença de quantidades excessivas de ROS devido à diminuição da bioatividade do NO na

parede vascular. As ROS, principalmente o radical superóxido, reagem com o NO promovendo sua inativação e formando radicais ainda mais tóxicos. Além disso, ROS parecem promover a contração das células musculares lisas vasculares (CAI; HARRISON, 2000; TANIYAMA; GRIENGLING, 2003).

Outro mecanismo importante de regulação humoral da pressão arterial é o sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA) (Figura 2). Esse sistema exerce papel importante na preservação da estabilidade hemodinâmica nos seres humanos, sendo responsável pela regulação do volume de fluidos extracelulares, do balanço de sódio e da função cardiovascular através de efeitos diretos e indiretos em múltiplos sistemas e órgãos (PERAZELLA; SETARO, 2003).

O SRAA é composto por uma cascata de hormônios, inicialmente desencadeada pela liberação de renina pelos rins, sendo esta sintetizada pelas células do aparelho justaglomerular renal. A renina é uma enzima proteolítica que atua localmente no rim e na circulação (renina plasmática) sobre o substrato angiotensinogênio. O angiotensinogênio é uma proteína precursora produzida no fígado e secretada primariamente por esse órgão. Este é clivado pela renina formando o decapeptídeo biologicamente inativo angiotensina I (Ang I). A enzima conversora de angiotensina (ECA) é a enzima chave do SRAA, responsável pela conversão da Ang I no octapeptídeo angiotensina II (Ang II), o qual responde pela maior parte dos efeitos fisiológicos e patofisiológicos do SRAA. Essa enzima é uma dipeptilcarboxipeptidase com dois domínios homólogos, cada um deles com um sítio catalítico e com uma região específica para ligação do  $Zn^{2+}$ , sendo, portanto, uma metaloprotease. É uma enzima inespecífica, hidrolisando peptídeos pela remoção de um dipeptídeo da porção C-terminal (COATES, 2003; BURRELL, et al, 2004).

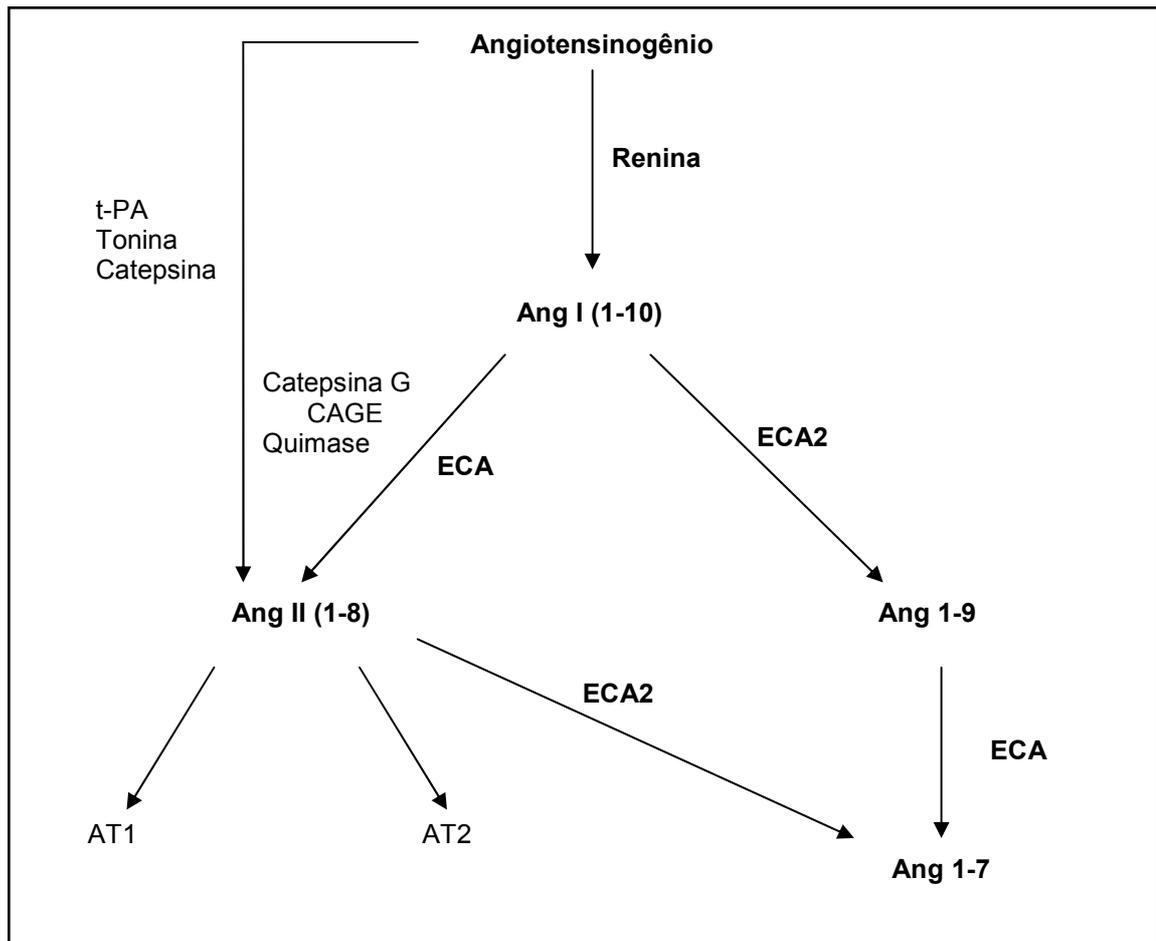


Figura 2: Sistema renina-angiotensina-aldosterona

Existem dois subtipos de receptores de Ang II bem caracterizados, o receptor de angiotensina tipo 1 (AT1) e o tipo 2 (AT2). Esses receptores possuem distribuição e sinalização distintas e levam a diferentes atividades da Ang II. Em adultos, os receptores AT1 estão largamente distribuídos, ocorrendo na vasculatura, rins, glândula adrenal, coração, fígado e cérebro. Os receptores AT2 estão presentes apenas na medula da adrenal, no útero, ovário, endotélio vascular e em algumas áreas distintas do cérebro. A Ang II, ao atuar pelo receptor AT1, provoca vasoconstrição, estimula a produção de aldosterona, aumenta a reabsorção de sódio, promove crescimento da musculatura lisa vascular e promove disfunção endotelial, entre outras atividades. Atuando pelo receptor AT2, promove vasodilatação, redução da reabsorção renal de sódio, da hipertrofia miocítica e da fibrose cardíaca (PERAZELLA; SETARO, 2003).

Um homólogo da ECA, a ECA2, também exerce papel importante no SRAA. Essa enzima é uma carboxipeptidase que foi primariamente descrita por sua atividade sobre a Ang I, removendo um único resíduo de aminoácido, gerando a Ang

1-9. No entanto, a principal função da ECA2 é a degradação da Ang II, gerando o peptídeo biologicamente ativo Ang 1-7 que possui atividade vasodilatadora. A ECA2 possui atividade catalítica para Ang II cerca de 400 vezes maior que para Ang I, o que sugere que a ECA2 possa funcionar como um contra-regulador dos efeitos da Ang II, através da degradação desta, e da produção de um peptídeo de atividade oposta (BURRELL; et al, 2004; COATES, 2003)

O hormônio esteroide aldosterona é sintetizado na zona glomerulosa da glândula adrenal após a ativação dos receptores de angiotensina pela Ang II. A aldosterona atua, então, através da ligação ao seu receptor esteróide, regulando a volemia através do controle da excreção de sódio e potássio (PERAZELLA, SETARO, 2003).

O papel da Ang II no desenvolvimento e progressão da doença cardiovascular e renal não é atribuído apenas aos seus efeitos hemodinâmicos. A ativação da Ang II medeia a lesão tecidual pela promoção de fatores de crescimento, citocinas inflamatórias e fibrose intersticial. O balanço das interações entre a Ang II e o óxido nítrico (NO) é o fator chave determinante se ocorrerá lesão ou proteção de órgãos-alvo (RAIJ, 2005).

Agentes bloqueadores do SRAA desempenham papel importante no balanço de Ang II e NO. Inibidores da ECA reduzem a síntese de Ang II e também impedem a degradação da bradicinina, que é uma molécula fisiológica importante na liberação de NO (MONCADA, 1997). No entanto, Ang II pode também ser gerada por outras vias independentes da ECA, como, por exemplo, pela ação da catepsina G (PERAZELLA; SETARO, 2003).

Os inibidores da ECA são considerados drogas de escolha para o tratamento da hipertensão leve a moderada. O uso de inibidores da ECA no tratamento da hipertensão arterial induz efeitos benéficos como otimização do volume extracelular, vasodilatação e redução da pós-carga, com o retorno da pressão arterial para níveis normais. (JOINT, 2003)

Diversos ensaios clínicos foram realizados visando comprovar que a terapia anti-hipertensiva baseada no uso de inibidores da ECA, como monoterapia ou em associação com diuréticos, promove redução da mortalidade e morbidade cardiovascular. Esses estudos demonstraram que o uso de inibidores da ECA reduz o risco de AVC, reverte a hipertrofia ventricular esquerda, melhora a função cardíaca em pacientes com disfunção ventricular esquerda e previne a progressão da

nefropatia diabética (HANSEN et al, 1995; WAEBER; BRUNNER, 1997; HANSON et al, 1999; SOWERS et al, 2001; WHITE, 2005). Por isso, as diretrizes do JNC7 recomendam o uso de medicamentos dessa classe para o tratamento da hipertensão, em pacientes que possuem risco aumentado de doenças cardiovasculares (JOINT, 2003).

### 1.2.2 Química e atividades biológicas de *Mansoa*

A família Bignoniaceae é constituída por 113 gêneros e 800 espécies, predominantemente lianas e, também, por plantas arbustivas e arbóreas. Entre as arbóreas podemos citar os ipês do Brasil, espécies do gênero *Tabebuia*. As espécies deste táxon encontram-se distribuídas nas regiões tropicais de todo o mundo, sendo de ocorrência freqüente no continente americano. No Brasil, plantas desta família ocorrem desde a Amazônia até o Rio Grande do Sul, não possuindo um hábitat único, sendo encontradas no cerrado, mata atlântica e floresta amazônica (GENTRY, 1980).

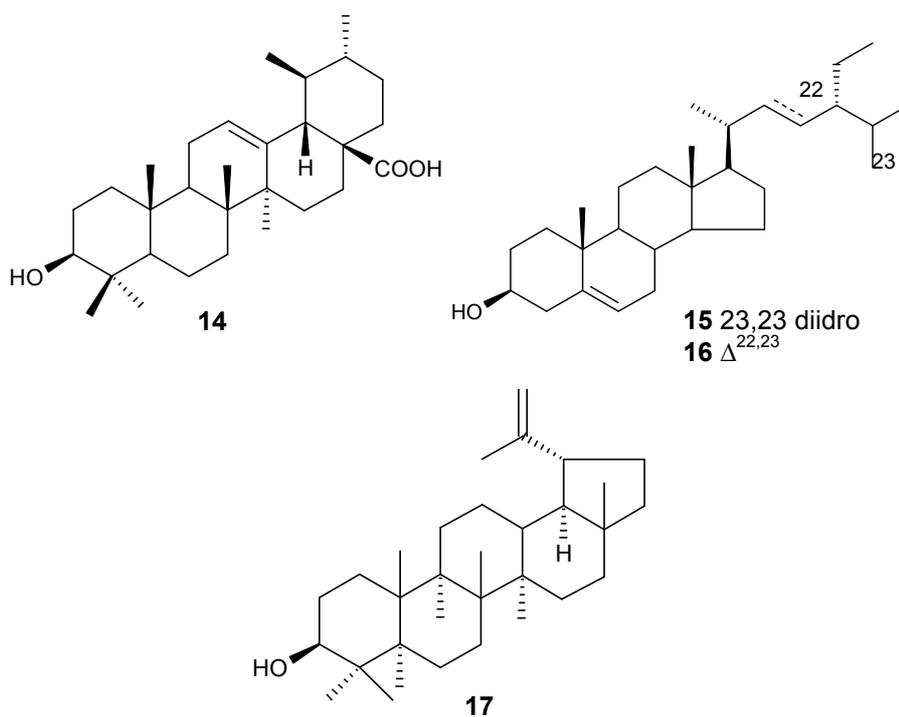
Estudos químicos de espécies de Bignoniaceae resultaram no isolamento de substâncias pertencentes a diferentes classes de produtos naturais, tais como naftoquinonas, triterpenos, flavonóides, iridóides, lignanas e alcalóides, entre outras (PAULETTI et al, 2003; KANCHANAPOOM, et al., 2006; LEITE, et al., 2006; LENTA, et al., 2007; MORAIS, et al., 2007)

*Mansoa hirsuta* (Figura 3) é uma liana que ocorre em toda a extensão da mata atlântica. Não foram encontrados registros de nomes populares ou usos etnofarmacológicos para a espécie.



Figura 3: *Mansoa hirsuta* D.C.

O estudo químico de *M. hirsuta* por Silva (2006) levou ao isolamento do ácido ursólico (**14**) a partir da fração acetato de etila, enquanto da fração diclorometânica foram isolados os esteróides  $\beta$ -sitosterol (**15**) e estigmasterol (**16**), além do triterpeno lupeol (**17**).



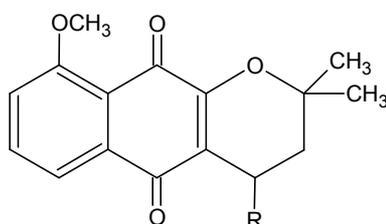
Nesse estudo também foram relatadas algumas atividades biológicas para a espécie, como a atividade imunossupressora de 99% para a fração em acetato de etila, avaliada em modelo de inibição de linfoproliferação, e a atividade tripanocida

das frações diclorometânica (66%) e em acetato de etila (65%) (SILVA, 2006). No entanto, nesse trabalho a espécie estudada é descrita como possuindo forte odor de alho, o que não é característico de *M. hirsuta*, mas sim de *M. alliaceae*. De acordo com a bibliografia consultada existe uma confusão entre as espécies, mas segundo descrição da Flora Brasiliensis, *M. hirsuta* não possui odor característico de alho (LOHMANN et al, 2007).

Braga et. al. (2000) avaliaram a potencial atividade anti-hipertensiva da espécie em ensaio *in vitro* de inibição da ECA utilizando método cromatográfico (CLAE). O extrato etanólico bruto das folhas produziu 54% de inibição na concentração de 0,33 mg/mL.

Também já foi relatada para a espécie a atividade antifúngica *in vitro* frente aos microorganismos *Aspergillus niger* e *Fusarium oxysporum*. Nesse estudo, as frações ativas de *M. hirsuta* foram as de baixa e média polaridade, das quais onze compostos foram identificados por cromatografia em fase gasosa com detector de massas (CG-EM), sendo esses 2,5-dimetil-3,4-hexanodiol, 1-etoxi-4-metil-2-pentanona, 5-hexen-2-ol, 7-metil-4-octanol, 2,3,3-trimetil-1-penteno, 4-metil-3-hexanol, 3-hexanol, 4-metil-2-pentanol, 5-metil-2-hexanona, 2-hexen-1-ol, 1-hexin-3-ol, os quais foram sugeridos como responsáveis pelas propriedades antifúngicas da espécie (ROCHA et al, 2004).

O levantamento bibliográfico realizado indicou ausência de dados sobre a química e atividades biológicas de outras espécies do gênero, à exceção de *M. alliaceae*. Esta espécie é popularmente utilizada na Amazônia peruana como anti-reumática, e seu estudo fitoquímico forneceu as naftoquinonas 9-metoxi- $\alpha$ -lapachona (**18**) e 4-hidroxi-9-metoxi- $\alpha$ -lapachona (**19**), ambas ativas *in vitro* contra células tumorais (ITOKAWA et al, 1992).



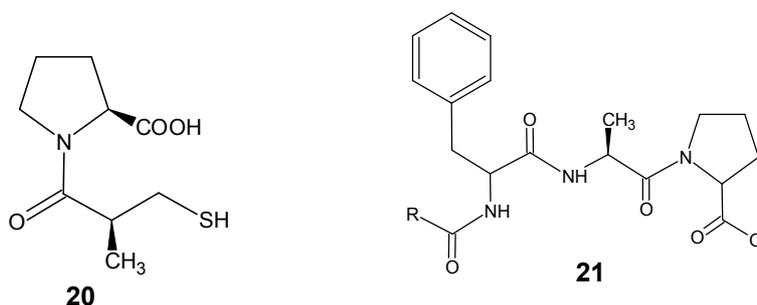
**18** R = H

**19** R = OH

### 1.2.3 Produtos naturais com potencial atividade anti-hipertensiva

Diversos produtos naturais apresentam potencial atividade anti-hipertensiva, sendo aqui revistos aqueles com atividade inibidora da ECA e com atividade vasodilatadora.

O primeiro fármaco inibidor da ECA comercialmente disponível para o tratamento da hipertensão arterial foi o captopril (**20**). Esse fármaco foi desenvolvido com base em um tripeptídeo, Phe-Ala-Pro (**21**) isolado de uma fração do veneno da serpente brasileira *Bothrops jararaca* (FERREIRA, 1965; FERREIRA, 2000).



Os produtos naturais constituem uma fonte relevante de substâncias com atividade inibidora da ECA. Diversas espécies vegetais incorporadas à dieta humana ou empregadas popularmente com finalidades medicinais mostraram-se ativas em ensaios *in vitro* de inibição da ECA.

Extratos de diversas espécies vegetais que apresentaram inibição igual ou superior a 50% em triagens *in vitro* para atividade inibitória da ECA foram submetidos a fracionamento visando o isolamento dos constituintes bioativos. As principais classes de produtos naturais ativos identificados foram proantocianidinas (WAGNER et al, 1991; LACAILLE-DUBOIS et al, 2001; LIU et al, 2003), flavonóides (WAGNER et al, 1991; OH et al, 2004; BARBOSA-FILHO et al, 2006), xantonas (CHEN et al, 1992), peptídeos e análogos de peptídeos (WAGNER, et. al. 1991; BARBOSA-FILHO et al, 2006; MA et al, 2006; AOYAGI, 2006), e terpenóides (HANSEN, et. al., 1996; BARBOSA-FILHO et al, 2006).

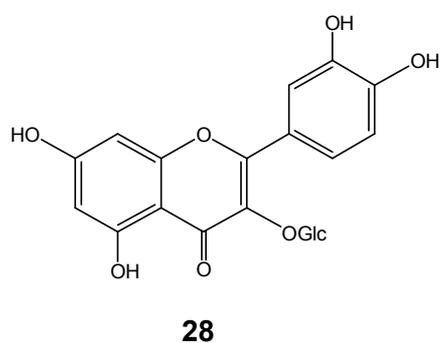
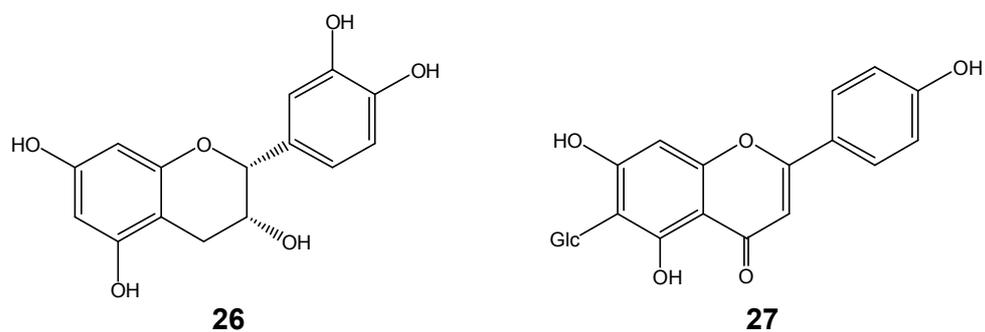
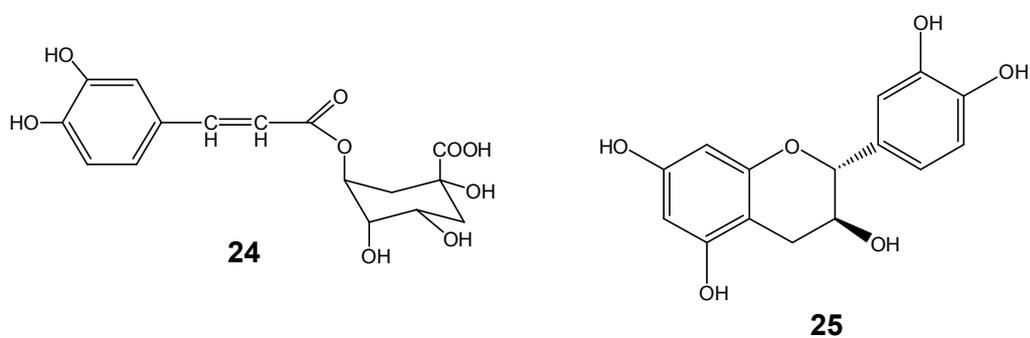
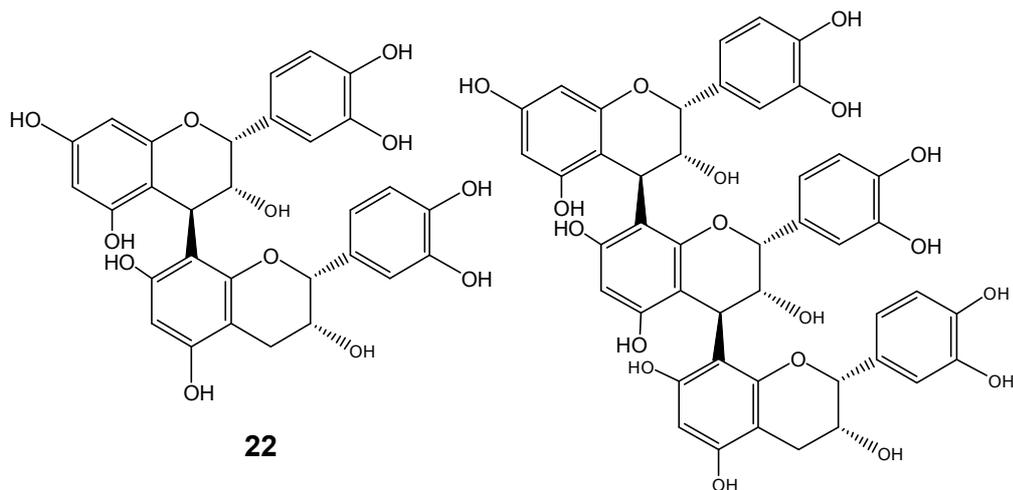
Segundo levantamento realizado por Barbosa-Filho e colaboradores (2006), cerca de 157 produtos naturais foram avaliados quanto à atividade inibitória da ECA, no período de 1980 e 2000, sendo 126 ativos (80 %), dentre os quais, 32% eram compostos polifenólicos. Excluindo-se os peptídeos, o percentual de polifenólicos ativos sobe para 43%, destacando-se entre eles os flavonóides e proantocianidinas (70% desses).

LACAILLE-DUBOIS e colaboradores (2001) avaliaram a atividade inibidora da ECA das espécies *Cecopria glaziovii*, *Musanga cecropioides* e *Crataegus oxycanta*. O estudo dessas espécies revelou que as frações mais ativas possuíam alto teor de proantocianidinas (11 a 13%). Nesse estudo, foram isolados alguns compostos com atividade inibidora da ECA, entre eles as proantocianidinas B<sub>2</sub> (**22**) e C<sub>1</sub> (**23**) que apresentaram, respectivamente, 25 ± 5% e 45 ± 2% de inibição (LACAILLE-DUBOIS et al, 2001).

Algumas espécies com atividade inibidora da ECA também apresentam atividade vasodilatadora, como é o caso das espécies de *Crataegus*. Kim e cols. (2000) avaliaram o efeito do extrato de *Crataegus* e de proantocianidinas isoladas no tônus vascular. O extrato apresentou efeito vasodilatador dependente de endotélio e frações contendo 45,7% de proantocianidinas produziram relaxamento superior a 70%. Cabe destacar que o conteúdo de flavonóides nessas frações era inferior ao limite de detecção do método (0,1 ng) (KIM et al, 2000).

O fracionamento do extrato metanólico de folhas de *Musanga cecropioides*, biomonitorado pelo ensaio *in vitro* de inibição da ECA, resultou no isolamento de ácido clorogênico (**24**, 4,1 ± 1,0% de inibição da ECA), (+)-catequina (**25**, 16,0 ± 3,0%), (-)-epicatequina (**26**, 34,0 ± 1,0%), isovitexina (**27**, 46,0 ± 1,0%), isoquercetina (**28**, 32,2 ± 2,0%) e das proantocianidinas B<sub>2</sub> (**22**, 25,0 ± 5,0%) e C<sub>1</sub> (**23**, 45,0 ± 2,0%) (LACAILLE-DUBOIS et al, 2001).

Existem vários relatos de proantocianidinas com atividade inibitória da ECA, sendo essa atividade relacionada à estrutura e ao grau de polimerização das moléculas. Actis-Goretta e colaboradores (2003), relataram aumento da atividade inibitória da ECA de acordo com o aumento do grau de polimerização de proantocianidinas, sendo avaliadas epicatequina, catequina, dímero, trímero, tetrâmero, pentâmero e hexâmero, com valores de CI<sub>50</sub> de 1781 ± 381; 1593 ± 443; 267 ± 24; 126 ± 11; 12 ± 1; 25 ± 3 e 10 ± 1 µM, respectivamente (ACTIS-GORETTA et al, 2003). Essa correlação é reforçada pelo trabalho de OTTAVIANI e colaboradores (2006) onde proantocianidinas dimérica, tetramérica e hexamérica apresentaram CI<sub>50</sub> igua a 97,0; 4,4 e 8.2 µM, respectivamente, quando avaliadas em ECA isolada de pulmão de coelhos.



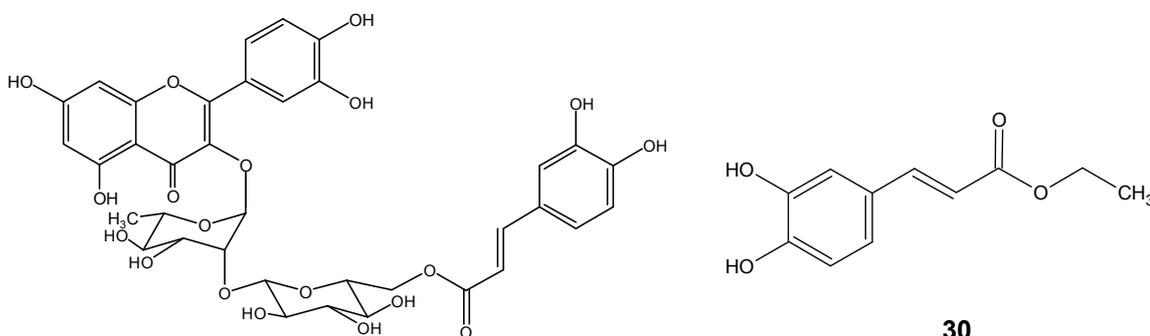
OH et al. (2004) isolaram cinco flavonóides do extrato metanólico de partes aéreas de *Sedum sarmentosum* (Crassulaceae), sendo a quercetina-3-O- $\alpha$ -(6-cafeoilglicosil- $\beta$ -1,2-ramnosídeo) (**29**) o mais ativo no ensaio in vitro de inibição da ECA, com  $CI_{50}$  de  $158,9 \pm 11,1 \mu M$ .

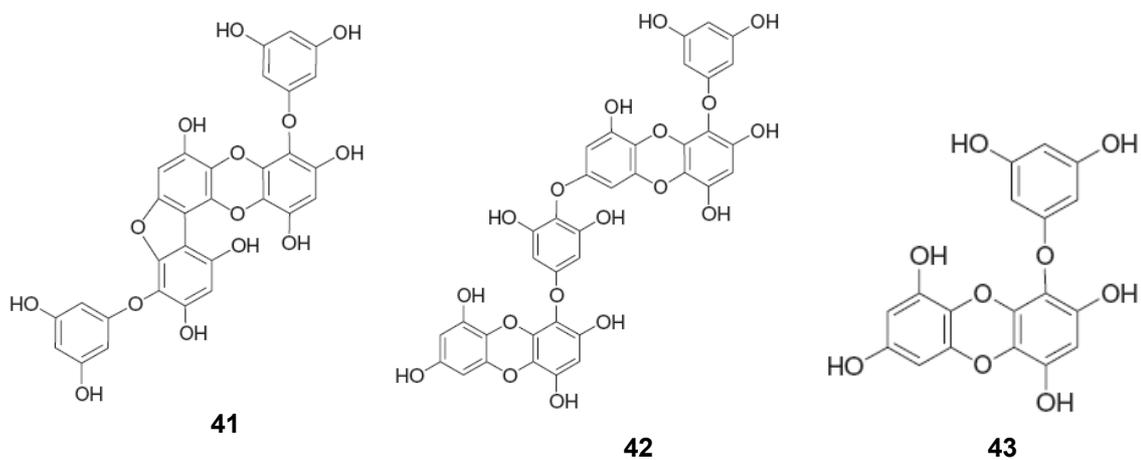
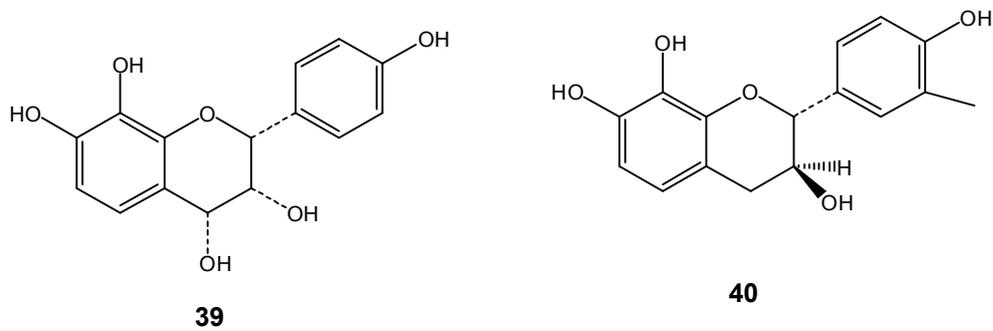
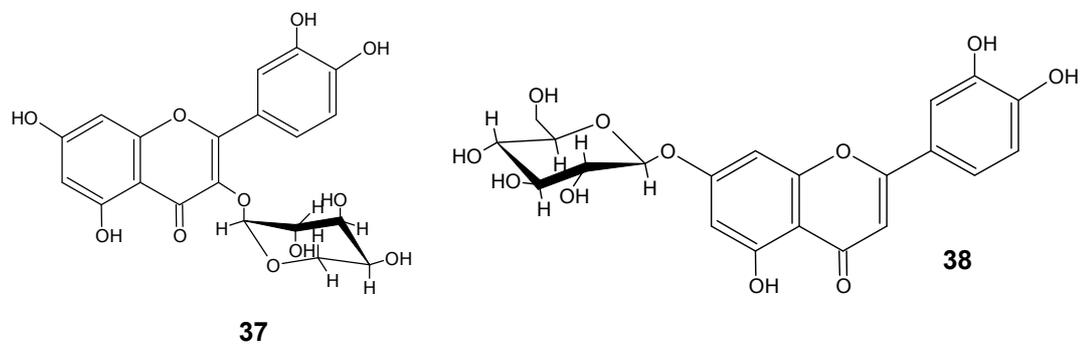
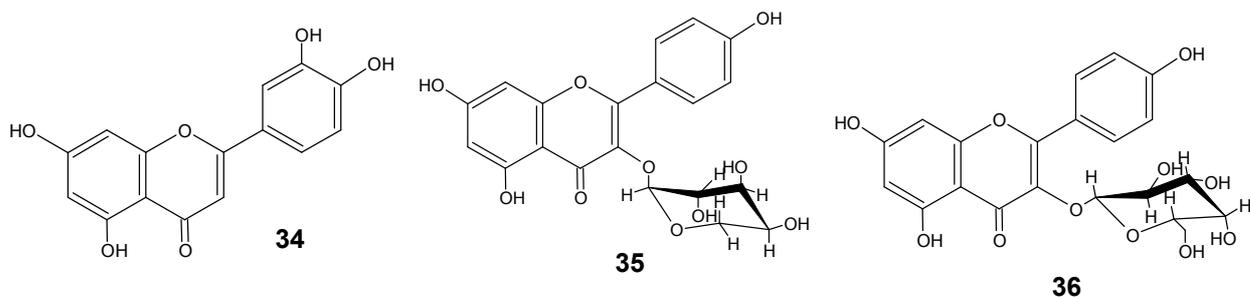
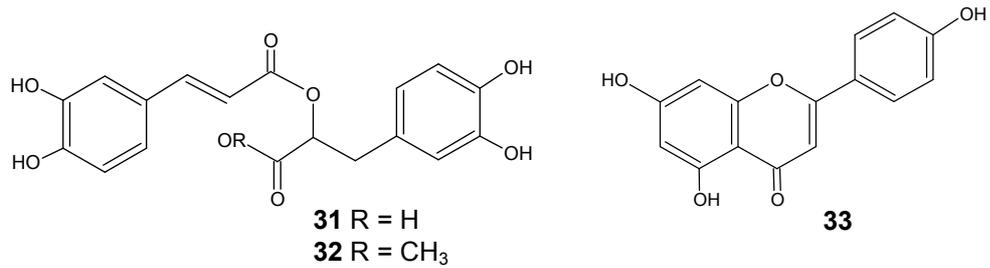
O extrato etanólico de *Rabdosia coetsa* (Labiatae) apresentou atividade inibitória da ECA de 71,0 % enquanto na fração em acetato de etila essa atividade foi superior a 80%, ambos avaliados na concentração de 10 mg/mL. A fração em EtOAc foi submetida a fracionamento biomonitorado levando ao isolamento de cafeato de etila (**30**), ácido rosmarínico (**31**) e rosmarinato de metila (**32**), que inibiram a atividade da ECA em 32,4%, 55,2% e 39,5%, respectivamente, na concentração de 10 µg/mL (LI et al, 2008).

Das folhas de *Ailanthus excelsa* Roxb (Simaroubaceae), seis flavonóides foram isolados, apigenina (**33**), luteolina (**34**), canferol-3-O- $\alpha$ -arabinopiranosídeo (**35**), canferol-3-O- $\beta$ -galactopiranosídeo (**36**), quercetina-3-O- $\alpha$ -arabinopiranosídeo (**37**) e luteolina-7-O- $\beta$ -glicopiranosídeo (**38**), todos com atividade inibitória da ECA, sendo o canferol-3-O- $\beta$ -galactopiranosídeo (**36**) o mais ativo, com  $CI_{50}$  de 260 µM (LOIZZO et al, 2007).

WAGNER et al. (1991) também relataram a atividade inibidora da ECA de flavonóides em estudos *in vitro*, entre eles o (+)-mesquitol (**39**) e a (-)-teracacidina (**40**) que apresentaram, respectivamente,  $77,6 \pm 2,7$  % e  $69,4 \pm 1,3$  % de inibição, na concentração de 0,33 mg/mL.

Outros compostos fenólicos, como os florotaninos presentes em algas marrons, também apresentaram atividade inibitória da ECA. Cinco florotaninos de *Ecklonia stolonifera* foram avaliados, sendo o florofucofuroeckol (**41**), dieckol (**42**) e eckol (**43**) os mais ativos, com  $CI_{50}$  de  $12,7 \pm 0,2$ ;  $34,3 \pm 3,6$  e  $70,8 \pm 0,3$  µmol/L, respectivamente (JUNG et al, 2006).

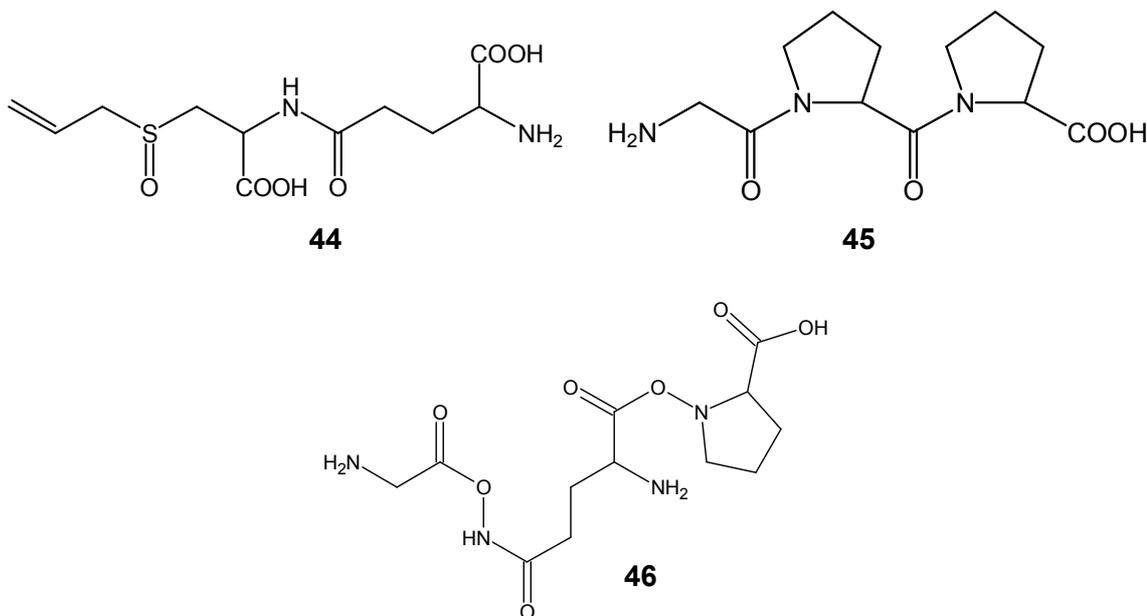




Compostos peptídicos também apresentam atividade inibitória da ECA, como o peptídeo sulfóxido  $\gamma$ -L-glutamil-(+)-S-alil-L-cisteína (**44**), constituinte da espécie *Allium ursinum* L., que apresentou  $48,7 \pm 1,4\%$  de inibição, na concentração de 0,03 mg/mL (WAGNER et al, 1991).

O peptídeo, Gly-Pro-Pro (**45**), isolado do extrato protéico de *Fagopyrum esculentum* Moench também apresentou atividade inibidora da ECA *in vitro*, com valor de  $Cl_{50}$  de 6,25  $\mu$ g/ml (MA et al, 2006).

De *Tricholoma giganteum* foi isolado um peptídeo inibidor da ECA, Gly-Glu-Pro (**46**), com  $Cl_{50}$  de 3,2 mM, cuja atividade foi apenas levemente reduzida após incubação com proteases, indicando que ele poderia permanecer íntegro após administração oral. Esse peptídeo apresentou também efeito anti-hipertensivo em ratos espontaneamente hipertensos em dose de 1 mg/kg (LEE et al, 2004).



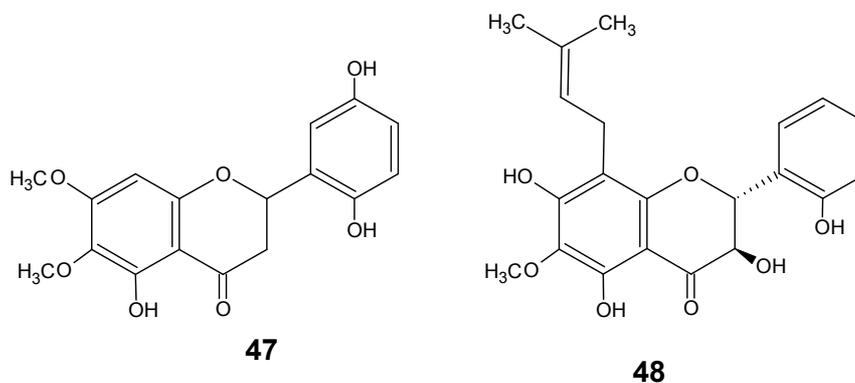
Outra espécie com atividade inibidora da ECA é *Ouratea semiserrata*. O extrato em diclorometano:metanol (1:1) de caules da espécie produziu 68% de inibição em ensaio *in vitro* (BRAGA et al., 2000). A fração em acetato de etila, proveniente desse extrato, com elevado teor de proantocianidinas ( $21,8 \pm 1,5\%$ ), apresentou potente atividade vasodilatadora, com  $Cl_{50}$  de  $3,5 \pm 0,8 \mu$ g/mL (CORTES et al, 2002).

Freqüentemente, extratos com atividade inibidora da ECA *in vitro* apresentam efeito vasodilatador em ensaios com preparações isoladas, conforme relatado para *O. semiserrata*. Outros exemplos descritos na literatura incluem *Hancornia speciosa*

(SERRA et al, 2005; FERREIRA et al, 2006), *Cecropia glaziovii* (LACAILLE-DUBOIS et al, 2001; SERRA et al, 2005) e espécies de *Crataegus* (KIM et al, 2000; LACAILLE-DUBOIS et al, 2001;).

Os compostos polifenólicos apresentam atividade vasodilatadora relatada em uma série de estudos. O flavonóide diocleína (**47**) apresentou potente atividade vasodilatadora em anéis de aorta de ratos pré-contraídos com fenilefrina, com  $Cl_{50}$  de  $1,3 \pm 0,3 \mu\text{M}$  (LEMOS et al, 1999).

Floranol (**48**), um flavonóide prenilado isolado das raízes de *Dioclea grandiflora* (Fabaceae) apresentou atividade vasodilatadora, independente de endotélio em anéis de aorta de ratos pré-contraídos com fenilefrina, com  $Cl_{50}$  de  $19,9 \pm 2,4 \mu\text{mol/L}$  (LEMOS, 2006).



Polifenóis presentes no vinho tinto também foram avaliados quanto à atividade vasodilatadora. Frações enriquecidas em antocianidinas e taninos condensados oligoméricos exibiram atividade vasorelaxadora na faixa de 59 a 77%, enquanto os taninos condensados poliméricos apresentaram atividade inferior, com vasodilatação máxima entre 20 e 47%. Ainda, compostos fenólicos como os ácidos benzóico, vanílico, gálico, hidroxicinâmico e a (-) epicatequina não apresentaram efeito vasodilatador (ANDRIAMBELOSON et al, 1998).

O extrato aquoso de folhas e casca de *Eucommia ulmoides* Oliv., utilizada como anti-hipertensiva na medicina tradicional Chinesa, apresentou efeito vasodilatador endotélio- e NO-dependente quando avaliado em anéis de aorta de ratos. Os autores sugerem que essa atividade pode estar relacionada aos compostos polifenólicos, por exemplo flavonóides, e glicosídeos (saponinas e glicosídeos de lignanas) presentes na espécie (KWAN et al, 2004).

Uma fração rica em proantocianidinas, obtida das cascas de *Croton celtidifolius*, induziu vasodilatação concentração- e endotélio-dependente de 73%

em leito arterial mesentérico de ratos e em artéria mesentérica isolada, pré-contráidos com fenilefrina. O efeito foi caracterizado como sendo via NO-cGMP e hiperpolarização induzida por ativação de canais de  $K^+$  dependentes de  $Ca^{2+}$  (DALBÓ et al, 2008).

Essa revisão da literatura demonstra a atualidade do tema e a potencialidade de produtos naturais derivados de espécies vegetais e outros organismos no desenvolvimento de novos agentes anti-hipertensivos, atestada em diversos ensaios de inibição da ECA e vasodilatação.

## 2 PARTE EXPERIMENTAL

### 2. 1 Aparelhos, reagentes e materiais de consumo

#### Aparelhos

- Agitador de tubos PHOENIX<sup>®</sup>, modelo AD 56.
- Balança analítica Mettler toledo, modelo AB204.
- Balança analítica Mettler toledo, modelo AT201.
- Banho-maria Fanem, modelo 120/4.
- Banho de ultra-som Thornton, modelo T14.
- Centrífuga Excelsa 2, Fanem.
- Coletor de frações Pharmacia, modelo FRAC-100.
- Cromatógrafo em contracorrente de alta velocidade (HSCCC), PC Inc. modelo MKII CCC, composto de injetor manual e bomba Dynamax modelo SD-200.
- Cromatógrafo líquido de alta eficiência Merck-hitachi, composto de injetor automático modelo AS-2000A, detector UV-VIS modelo L-4250, bomba modelo L-6200A e integrador modelo D-2500.
- Cromatógrafo líquido de alta eficiência Shimadzu, composto de sistema de controle de bomba modelo SCL-8 A, detector UV-VIS modelo SPD-6AV, bombas modelo LC-8 A e integrador modelo C-R4A.
- Micropipetas automáticas monocanais ajustáveis de 5–20 e 20–200  $\mu\text{L}$ , Brand.
- Micropipeta automática multicanal, de 1–10  $\mu\text{L}$ , e monocanal de 200–1000  $\mu\text{L}$ , Eppendorf.
- Aparelho de secagem Habderhalden.
- Potenciômetro Marconi, modelo PA200.
- Sistema de filtração de água Milli-Q, Milli-q plus.
- Soprador serigráfico Starnel, modelo HL 500.
- Transdutores isométricos Fort10<sup>®</sup> com amplificador TBM4<sup>®</sup> e sistema de aquisição computadorizado de dados CVMS<sup>®</sup>.

**Reagentes e material de consumo**

- Acetato de etila P.A. Quimex.
- Acetilcolina, Sigma.
- Acetona P.A., Quimex.
- Acetonitrila, grau HPLC, Merck.
- Ácido acético glacial P.A., Merck.
- Ácido sulfúrico P.A., Quimex.
- Álcool etílico 96°GL e absoluto, Quimex.
- Álcool butílico normal, grau HPLC, Tedia.
- Álcool isopropílico P.A., Quimex.
- Anisaldeído, Merck.
- Atropina, Sigma.
- Bicarbonato de sódio, VETEC.
- Bobina de teflon para HSCCC, d.i. 1,7 mm, volume total 310 mL.
- Captopril, Calbiochem.
- Cloreto de alumínio, Riedel.
- Cloreto de cálcio diidratado, LabSynth.
- Cloreto de potássio, VETEC.
- Cloreto de sódio, Sigma.
- Cloreto férrico, Ecibra.
- Clorofórmio P.A., Quimex.
- Coluna para HPLC LiChrospher®100, RP-18, com partículas de 5µm, LiChorCART®, 125 × 4 mm d.i., Merck.
- Coluna semi-preparativa para HPLC Zorbax SB C-18, 250 × 9,4 mm, 5 µm, Agilent.
- Cromatofolhas (Al) de sílica gel 60, Merck.
- *d*-Glicose anidra, LabSynth.
- Diclorometano P.A., Quimex.
- Fenilefrina, Sigma
- Fosfato de potássio monobásico anidro, Merck.
- HEPES, Sigma
- Hidróxido de amônio, P.A., Merck
- Hidróxido de sódio P.A., Merck

- Hipuril-glicil-glicina,
- Indometacina, Calbiochem.
- Metanol, grau HPLC, Merck.
- Metil éster N $\omega$ -Nitro-L-Arginina (L-NAME), Sigma.
- Tubo de plástico tipo safe-lock, Eppendorf.
- Mistura carbogênica O<sub>2</sub>:CO<sub>2</sub> (95:05), White Martins.
- Placa de 96 poços, Brand.
- Pulmão de coelho em pó desidratado por acetona, Continental Produtos Biológicos.
- Sílica gel 60G (0,063 – 0,200 mm), Merck.
- Sílica gel 60G para CCD, Merck.
- Sílica gel para coluna (70-230 mesh), Merck.
- Sulfato de magnésio, LabSynth.
- Sulfato de sódio, Merck.
- Tungstato de sódio, Sigma.
- Vials de vidro para HPLC com tampas e septos de silicone e politetrafluoretileno, Merck.

## 2.2 Reveladores para CCD

### Reagente Vanilina – H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (WAGNER et al., 1984)

A solução de ácido sulfúrico foi preparada pela adição de 5,0 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 98% p/p a 100 mL de etanol P.A. A solução foi armazenada, até o momento de uso, a 20°C.

Para a solução de vanilina, dissolveu-se 1,0 g de vanilina em 100 mL de etanol P.A. A solução foi armazenada, até o momento de uso, a 20°C.

### Solução de anisaldeído (WAGNER et al., 1984)

Misturaram-se 0,5 mL de anisaldeído, 10 mL de ácido acético glacial, 85 mL de metanol e 5 mL de ácido sulfúrico a 98% p/v, nesta ordem, sob resfriamento. A solução foi armazenada, até o momento de uso, a 20°C.

**Solução de cloreto de alumínio a 1% (DUARTE, 2001)**

Dissolveu-se 1 g de cloreto de alumínio em 100 mL de álcool etílico, sob resfriamento. A solução foi armazenada, até o momento de uso, a 20°C.

**Reagente de produtos naturais NP/PEG (WAGNER et al., 1984)**

Para o preparo da solução de NP dissolve-se 0,1 g de difenilboriloxietilamina (NP) em 10 mL de metanol. Essa solução foi armazenada, até o momento de uso, a 20°C. A solução de polietilenoglicol é preparada por meio da dissolução de 0,5 g de polietilenoglicol 4000 (PEG) em 10 mL de etanol e armazenada à temperatura ambiente até o momento do uso.

**2.3 Material vegetal**

As folhas de *Mansoa hirsuta* (Bignoniaceae) foram coletadas na Estação Biológica de Caratinga, em Caratinga, MG. O material foi coletado e identificado pelo Prof. Dr. Julio Antônio Lombardi, e uma exsicata da espécie foi depositada no herbário do Departamento de Botânica do ICB, UFMG, sob nº BHCB 23.862.

Após a coleta, o material vegetal foi lavado em água corrente, sendo selecionadas as folhas íntegras. As folhas foram, então, secas em estufa ventilada a 40°C, por 48 horas.

**2.4 Preparo do extrato etanólico (EEF)**

O material vegetal seco (40 g) foi pulverizado em moinho de facas, pesado e, em seguida, submetido à percolação exaustiva com etanol a 96%. O extrato etanólico (EEF) foi concentrado em evaporador rotatório a 50°C, sob pressão reduzida, até resíduo. O extrato obtido (11,6 g) foi mantido em dessecador, sob vácuo, até completa eliminação do solvente residual.

## 2.5 Fracionamento do extrato etanólico (EEF)

### 2.5.1 Cromatografica em coluna de sílica gel

Uma porção de EEF (9,0 g) foi fracionada em coluna aberta de sílica gel (0,063-0,200 mm), utilizando-se eluentes de polaridades crescentes, gerando 41 frações que foram agrupadas de acordo com seus perfis cromatográficos em CCD de sílica gel (Tabela 1).

Tabela 1: Fracionamento preliminar do extrato etanólico (EEF) de folhas *Mansoa hirsuta*

Fração	Massa (g)	Rendimento (%)	Volume (L)	Solvente
MHF1	0,1015	1,13	0,3	Hex
MHF2	0,0789	0,88	0,3	Hex:DCM (9:1)
MHF3	0,0387	0,43	0,3	Hex:DCM (8:2)
MHF4	0,0437	0,49	0,3	Hex:DCM (4:6)
MHF5	0,445	4,94	0,3	DCM
MHF6	0,1138	1,26	0,3	DCM:EtOAc (7:3)
MHF7	0,0874	0,97	0,6	DCM:EtOAc (7:3)
MHF9	0,0149	0,17	0,3	DCM:EtOAc (7:3)
MHF10	0,0227	0,25	0,6	DCM:EtOAc (7:3)
MHF12	0,1104	1,23	0,6	DCM:EtOAc (1:1)
MHF14	0,0696	0,77	0,3	DCM:EtOAc (1:1)
MHF15	0,0524	0,58	0,3	DCM:EtOAc (1:1)
MHF16	0,0384	0,43	0,3	DCM:EtOAc (1:1)
MHF17	0,0592	0,66	0,3	DCM:EtOAc (3:7)
MHF18	0,0963	1,07	0,3	DCM:EtOAc (3:7)
MHF19	0,0373	0,41	0,3	DCM:EtOAc (3:7)
MHF20	0,0255	0,28	0,3	DCM:EtOAc (3:7)
MHF21	0,0434	0,48	0,3	EtOAc
MHF22	0,0234	0,26	0,3	EtOAc
MHF23	0,0920	0,10	0,3	EtOAc:MeOH (95:05)
MHF24	0,3399	3,78	0,3	EtOAc:MeOH (95:05)
MHF25	0,3965	4,40	0,6	EtOAc:MeOH (95:05)
MHF27	0,5431	6,03	0,6	EtOAc:MeOH (95:05)
MHF29	0,0612	0,68	0,3	EtOAc:MeOH (95:05)
MHF30	0,1131	1,26	0,3	EtOAc:MeOH (9:1)
MHF31	0,5599	6,22	0,9	EtOAc:MeOH (9:1)
MHF37	0,4201	4,67	1,2	EtOAc:MeOH (9:1)
MHF38	0,1268	1,41	0,3	MeOH
MHF39	0,499	5,54	0,3	MeOH
MHF40	2,0377	22,64	0,3	MeOH
MHF41	0,1235	1,37	0,3	MeOH
<b>TOTAL</b>	<b>6,8145</b>	<b>75,41</b>	<b>12,3</b>	

### 2.5.2 Partição líquido-líquido

Uma alíquota de EEF (2,0 g) foi solubilizada em 120 mL de solução metanol:água (1:1) e submetida à partição seqüencial entre solventes imiscíveis, empregando-se *n*-hexano, diclorometano e acetato de etila (Figura 4). Após a remoção dos solventes foram obtidas as frações hexânica (MHH; 94,3 mg), diclorometânica (MHD; 89,8 mg), acetato de etila (MHA; 376,2 mg) e hidrometanólica (MHM; 1304,5 mg).

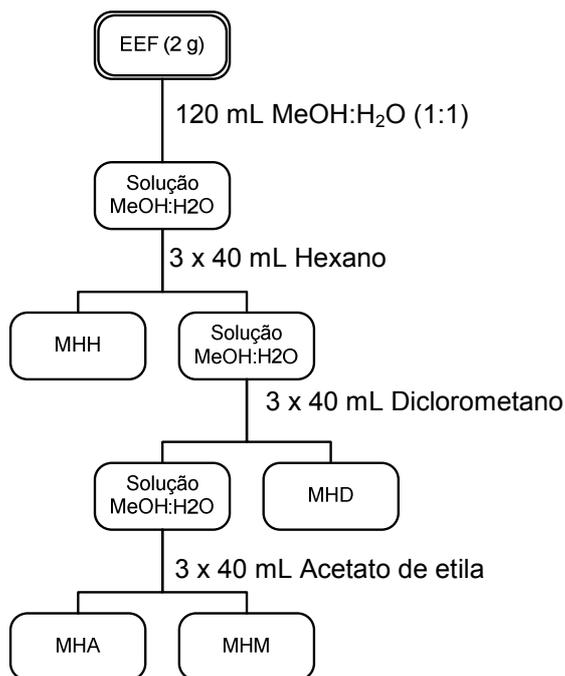


Figura 4: Fluxograma do fracionamento de EEF por partição seqüencial.

### 2.6 Refracionamento das frações provenientes de EEF

Frações provenientes de EEF, tanto por cromatografia em coluna de sílica gel quanto por partição entre solventes imiscíveis, foram refracionadas visando isolar seus constituintes. Algumas dessas frações foram avaliadas nos ensaios de inibição da ECA e vasodilatação em preparações de aorta. As frações MHF27 e MHF31 mostraram-se ativas no ensaio de inibição da ECA e vasodilatação, enquanto MHF40 foi ativa somente no último. Essas frações foram submetidas à refracionamento, visando isolar os constituintes ativos. As frações provenientes da partição líquido-líquido não foram avaliadas nos ensaios biológicos, mas também foram refracionadas.

### 2.6.1 Refracionamento de MHF27

MHF27 (530,0 mg), obtida do extrato etanólico de folhas de *M. hirsuta* (item 2.3), foi aplicada no topo de uma coluna de vidro preenchida com sílica gel (0,063-0,200 mm/70-230 mesh). Procedeu-se à eluição com solventes de polaridades crescentes, recolhendo-se frações equivalentes a 15 mL. Após análise por CCD de sílica gel, as frações obtidas foram agrupadas segundo semelhança de seus perfis, transferidas para frascos previamente tarados e mantidas em dessecador, sob vácuo, para completa eliminação do solvente por, no mínimo, 48 horas (

Tabela 2).

Tabela 2: Refracionamento de MHF27 por cromatografia em coluna de sílica gel

Grupo	Massa (mg)	Rendimento(%)	Volume (mL)	Eluentes
MHF27_1	5,30	1,00	60	EtOAc
MHF27_2	1,40	0,26	15	EtOAc
MHF27_3	11,70	2,21	225	EtOAc
MHF27_4	1,50	0,28	75	EtOAc/ MeOH 95:05
MHF27_5	2,20	0,42	75	EtOAc/ MeOH 95:05
MHF27_6	2,10	0,40	90	EtOAc/ MeOH 95:05
MHF27_7	3,10	0,58	75	EtOAc/ MeOH 90:10
MHF27_8	2,80	0,53	60	EtOAc/ MeOH 90:10
MHF27_9	4,20	0,79	15	EtOAc/ MeOH 90:10
MHF27_10	8,00	1,51	45	EtOAc/ MeOH 90:10
MHF27_11	22,80	4,30	75	EtOAc/ MeOH 90:10
MHF27_12	66,70	12,58	420	EtOAc/ MeOH 90:10
MHF27_13	65,10	12,28	885	EtOAc/ MeOH 80:20
MHF27_14	12,00	2,26	105	EtOAc/ MeOH 80:20
MHF27_15	16,90	3,19	195	EtOAc/ MeOH 80:20 a EtOAc/MeOH 50:50
MHF27_16	38,80	7,32	150	MeOH 100% a MeOH:H <sub>2</sub> O 50:50
MHF27_17	19,90	3,75	60	MeOH:H <sub>2</sub> O 50:50 a H <sub>2</sub> O
<b>TOTAL</b>	<b>284,50</b>	<b>53,68</b>	<b>2625</b>	

As frações de maior massa resultantes dessa coluna foram MHF27\_12 e MHF27\_13 (

Tabela 2), sendo denominadas, respectivamente, F27A e F27B.

Os fracionamentos posteriores foram realizados em coluna de Sephadex<sup>®</sup> LH-20. Para tal as amostras a serem fracionadas foram solubilizadas em metanol, a solução resultante filtrada em membrana de microfibras de vidro millipore<sup>®</sup> anteriormente à aplicação na coluna. As frações obtidas foram mantidas à

temperatura ambiente até evaporação do solvente e reunidas de acordo com seus perfis cromatográficos obtidos por CCD de sílica gel.

Assim, F27B (45 mg) foi aplicada a uma coluna de Sephadex<sup>®</sup> LH-20 (2 x 24,5 cm, d.i.). Procedeu-se, então, à eluição com metanol, a uma vazão de 2,0 mL/min, sendo recolhidas frações de 2,0 mL. Foram obtidas 51 frações, gerando 10 grupos de frações reunidas (Tabela 3). A análise do perfil cromatográfico por CCD de sílica gel foi realizada empregando-se eluente e revelador descritos anteriormente.

Tabela 3: Fracionamento de MHF27B em coluna de Sephadex<sup>®</sup> LH-20

Grupo	Massa (mg)	Rendimento(%)	volume (ml)	Eluente
27B1	0,5	1,11	6	MeOH
27B2	1,6	3,56	4	MeOH
27B3	5,6	12,44	14	MeOH
27B4	3,8	8,44	12	MeOH
27B5	1,8	4,00	8	MeOH
27B6	2,5	5,56	8	MeOH
27B7	10,0	22,22	22	MeOH
27B8	8,0	17,78	14	MeOH
27B9	2,7	6,00	8	MeOH
27B10	2,3	5,11	8	MeOH
<b>TOTAL</b>	<b>38,8</b>	<b>86,22</b>	<b>104</b>	

A fração F27A (40 mg) também foi refractionada em coluna de Sephadex LH20 (2 x 24,5 cm, d.i.), como descrito acima. Foram obtidas 63 frações, gerando 8 grupos de frações reunidas (Tabela 4). A análise do perfil cromatográfico por CCD de sílica gel foi realizada empregando-se eluente e revelador descritos anteriormente.

Tabela 4: Fracionamento de F27A em coluna de Sephadex<sup>®</sup> LH-20

Grupo	Massa (mg)	Rendimento(%)	Volume (mL)	Eluente
27A1	2,70	6,75	12,00	MeOH
27A2	2,80	7,00	10,00	MeOH
27A3	1,70	4,25	8,00	MeOH
27A4	4,30	10,75	12,00	MeOH
27A5	3,50	8,75	8,00	MeOH
27A6	2,50	6,25	12,00	MeOH
27A7	3,40	8,50	14,00	MeOH
27A8	14,20	35,50	22,00	MeOH
<b>TOTAL</b>	<b>35,10</b>	<b>87,75</b>	<b>98,00</b>	

### 2.6.2 Refracionamento de MHF31

A fração MHF31 (520,0 mg), obtida do extrato etanólico de folhas de *M. hirsuta* (item 2.3), foi depositada no topo de coluna de Sephadex® LH-20 (3 x 21 cm, d.i.). Procedeu-se à eluição com metanol, (3,5 mL/min), e frações de 5 mL foram coletadas. Foram obtidas 103 frações, gerando 19 grupos de frações reunidas (Tabela 5). A análise do perfil cromatográfico por CCD de sílica gel foi realizada empregando-se o eluente descrito no item 2.4.1.

Tabela 5: Refracionamento de MHF31 por cromatografia em coluna de Sephadex® LH 20

<b>Grupo</b>	<b>Massa (mg)</b>	<b>Rendimento(%)</b>	<b>volume (mL)</b>	<b>Eluente</b>
F31S1	12,4	2,38	120	MeOH
F31S2	2,8	0,54	25	MeOH
F31S3	3,9	0,75	15	MeOH
F31S4	10	1,92	25	MeOH
F31S5	3,3	0,63	5	MeOH
F31S6	10,5	2,02	5	MeOH
F31S7	16,2	3,12	15	MeOH
F31S8	16,6	3,19	5	MeOH
F31S9	7,7	1,48	5	MeOH
F31S10	40,1	7,71	35	MeOH
F31S11	17,8	3,42	10	MeOH
F31S12	15,1	2,90	20	MeOH
F31S13	134	25,77	65	MeOH
F31S14	49,3	9,48	25	MeOH
F31S15	51,3	9,87	20	MeOH
F31S16	32,7	6,29	25	MeOH
F31S17	28	5,38	40	MeOH
F31S18	5,8	1,12	30	MeOH
F31S19	4,7	0,90	25	MeOH
<b>TOTAL</b>	<b>462,2</b>	<b>88,88</b>	<b>515</b>	

As frações F31S13, F31S14, F31S15 e F31S16, denominadas respectivamente de F31A, F31B, F31C e F31D, foram selecionadas para refracionamento. A escolha dessas frações baseou-se na maior massa disponível e nos perfis cromatográficos menos complexos por CCD e HPLC.

A fração F31A (120 mg) foi refracionada em coluna de Sephadex® LH-20 (2 x 24,5 cm, d.i.), como descrito acima. Foram obtidas 51 frações, resultando em 11 grupos de frações reunidas (Tabela 6).

Tabela 6: Refracionamento de F31A por cromatografia em coluna de Sephadex® LH 20

Grupo	Massa (mg)	Rendimento(%)	volume (mL)	Eluente
F31A1	5,00	4,17	25	MeOH
F31A2	7,20	6,00	25	MeOH
F31A3	4,00	3,33	10	MeOH
F31A4	3,40	2,83	10	MeOH
F31A5	4,10	3,42	25	MeOH
F31A6	9,20	7,67	20	MeOH
F31A7	16,60	13,83	20	MeOH
F31A8	35,90	29,92	30	MeOH
F31A9	13,50	11,25	35	MeOH
F31A10	2,70	2,25	10	MeOH
F31A11	4,20	3,50	20	MeOH
<b>TOTAL</b>	<b>105,80</b>	<b>88,17</b>	<b>230</b>	

A fração F31B (46 mg) também foi refractionada em coluna de Sephadex® LH-20 (2,0 x 24,0 cm, d.i.), utilizando-se metanol como eluente (2,5 mL/min). Foram recolhidas 45 frações de 2,0 mL, gerando 6 grupos de frações reunidas (Tabela 7).

Tabela 7: Refracionamento de F31B por cromatografia em coluna de Sephadex® LH 20

Grupo	Massa (mg)	Rendimento(%)	volume (mL)	Eluente
F31B1	2	4,35	18	MeOH
F31B2	1	2,17	6	MeOH
F31B3	2,5	5,43	8	MeOH
F31B4	6	13,04	6	MeOH
F31B5	17,3	37,61	28	MeOH
F31B6	11,5	25,00	56	MeOH
<b>TOTAL</b>	<b>40,3</b>	<b>87,61</b>	<b>122</b>	

O fracionamento de F31C (51 mg) foi realizado utilizando as mesmas condições anteriores e resultou em 46 frações de 2,0 mL. Essas foram agrupadas segundo seus perfis em CCD de sílica gel em 6 grupos de frações reunidas (Tabela 8).

Tabela 8: Refracionamento de F31C por cromatografia em coluna de Sephadex® LH 20

<b>Grupo</b>	<b>Massa (mg)</b>	<b>Rendimento(%)</b>	<b>volume (mL)</b>	<b>Eluente</b>
F31C1	10,00	19,61	65	MeOH
F31C2	3,00	5,88	25	MeOH
F31C3	4,10	8,04	40	MeOH
F31C4	5,60	10,98	20	MeOH
F31C5	11,40	22,35	30	MeOH
F31C6	12,70	24,90	50	MeOH
<b>TOTAL</b>	<b>46,80</b>	<b>91,76</b>	<b>230</b>	

Por último, o refração da fração F31D em coluna de Sephadex LH20 resultou em 52 frações, que foram reunidas em 9 grupos de frações (Tabela 9).

Tabela 9: Refracionamento de F31D por cromatografia em coluna de Sephadex® LH 20

<b>Grupo</b>	<b>Massa (mg)</b>	<b>Rendimento(%)</b>	<b>volume (mL)</b>	<b>Eluente</b>
F31D1	1,70	5,67	10,0	MeOH
F31D2	0,80	2,67	8,0	MeOH
F31D3	1,90	6,33	8,0	MeOH
F31D4	1,80	6,00	12,0	MeOH
F31D5	0,80	2,67	2,0	MeOH
F31D6	11,6	38,67	28,0	MeOH
F31D7	2,00	6,67	6,0	MeOH
F31D8	0,60	2,00	12,0	MeOH
F31D9	4,70	15,67	20,0	MeOH
<b>TOTAL</b>	<b>25,90</b>	<b>86,33</b>	<b>106,0</b>	

A análise dos perfis cromatográficos por CCD de sílica gel foi realizada empregando-se eluente e revelador descritos no item 2.4.1.

Devido a semelhanças nos perfis cromatográficos, as frações F31B5, F31D6 foram reunidas com a fração F27B7, totalizando 38,9 mg, que foram purificados por RP-HPLC em escala semi-preparativa.

Para tanto, porções de 20 mg foram dissolvidas em 1,0 mL de MeOH:H<sub>2</sub>O (60:40), a solução foi centrifugada a 10.000 rpm, durante 10 min, e então injetada manualmente no cromatógrafo. Empregou-se coluna Agilent Zorbax SB-C18, detecção no UV<sub>220nm</sub>, fluxo de 3,5 mL/min e eluição isocrática de metanol: água (60:40).

O procedimento foi realizado duas vezes, resultando em 10 mg de um sólido amorfo, denominado PP1. A análise de PP1 por CCD de sílica gel, utilizando-se acetato de etila: ácido fórmico: ácido acético: água (100:11:11:27) como eluente, e anisaldeído como revelador, indicou a presença de uma mancha única de coloração avermelhada, atestando a pureza de PP1. Foram então obtidos espectros de RMN de  $^1\text{H}$ , e de  $^{13}\text{C}$  e IV para sua elucidação estrutural.

### 2.6.3 Refracionamento de MHF40

A fração MHF40, obtida do extrato etanólico de folhas de *M. hirsuta* (item 2.3), apresentou atividade inibitória da ECA *in vitro*, e induziu vasorelaxação em anéis de aorta, sendo selecionada para refração.

MHF40 foi dividida em quatro porções de 500 mg e aplicada a uma coluna de Sephadex LH-20 (3,0 x 21 cm, d.i.). A eluição foi realizada com MeOH e foram coletadas frações de 5 mL.

Foram obtidas 83 frações, gerando 12 grupos de frações reunidas (Tabela 10). A análise por CCD foi realizada empregando-se como eluente a fase superior da mistura *n*-butanol:ácido acético:água (40:10:50) e como revelador anisaldeído.

A cromatografia em Sephadex não foi eficiente para a separação dos constituintes de MHF 40. Sendo assim, as frações 40S6, 40S7 e 40S8, de perfil semelhante, foram reunidas originando a fração 40SA (725 mg), que foi submetida a cromatografia em contracorrente de alta velocidade (HSCCC).

Tabela 10: Refracionamento de MHF40 por cromatografia em coluna de Sephadex<sup>®</sup> LH 20.

Fração	Massa (g)	Rendimento (%)	Volume (mL)	Solvente
40S1	96,7	4,835	72,525	MeOH
40S2	79,4	3,97	59,55	MeOH
40S3	108,1	5,405	81,075	MeOH
40S4	162,8	8,14	122,1	MeOH
40S5	175,1	8,755	131,325	MeOH
40S6	265,3	13,265	198,975	MeOH
40S7	165	8,25	123,75	MeOH
40S8	294,9	14,745	221,175	MeOH
40S9	106,1	5,305	79,575	MeOH
40S10	62,7	3,135	47,025	MeOH
40S11	50,3	2,515	37,725	MeOH
40S12	18,3	0,915	13,725	MeOH
<b>TOTAL</b>	<b>1584,7</b>	<b>79,235</b>	<b>1188,525</b>	

As amostras foram preparadas pela solubilização de porções de 100 mg da fração em 1,0 mL de mistura da fase móvel:fase estacionária (1:1), seguida de centrifugação a 10.000 rpm durante 10 min.

O sistema de solventes utilizado foi *n*-butanol:ácido acético:água (42:5:53 v/v/v), empregando-se a fase superior (orgânica) como fase móvel e a fase inferior (aquosa) como fase estacionária. O sistema de solventes bifásico foi preparado e transferido para funil de separação, realizando-se a separação das fases após agitação vigorosa. Anteriormente ao uso, as fases móvel e estacionária foram deaeradas por sonicação, durante 20 min, com auxílio de vácuo.

Os experimentos foram realizados em um equipamento de HSCCC da marca P.C. Inc., equipado com uma bobina de teflon (diâmetro interno: 1,7 mm; volume total: 310 mL), *loop* de 1 mL de capacidade e coletor de frações Pharmacia, FRAC-100. Inicialmente a bobina foi preenchida com a fase estacionária. Em seguida, o equipamento foi submetido à rotação de 850 rpm (*forward*), enquanto a fase móvel foi bombeada para a coluna a um fluxo de 2,0 mL/min, no sentido cauda-cabeça. A retenção da fase estacionária na coluna foi de 80%.

A amostra foi injetada e o experimento foi conduzido a 850 rpm, fluxo de 2,0 mL/min, originando 46 frações de 2,0 mL cada, reunidas em 11 frações de acordo com seus perfis por CCD (Tabela 11). Ao final, o sistema eluente foi removido da bobina, sendo as fases separadas e evaporadas em evaporador rotatório para obtenção dos resíduos da fase móvel (RFM) e da fase estacionária (RFE).

A análise por CCD foi realizada empregando-se como eluente uma mistura de acetato de etila: ácido acético: ácido fórmico: água (100:11:11:27) e como revelador anisaldeído sulfúrico.

A fração 40H5 continha uma mistura de duas substâncias principais e foi então submetida à purificação por RP-HPLC em escala semi-preparativa.

Tabela 11: Refracionamento de F40SA por HSCCC

<b>Fração</b>	<b>Massa (mg)</b>	<b>Rendimento (%)</b>	<b>Volume (mL)</b>
40H1	31,20	5,20	70
40H2	34,80	5,80	42
40H3	36,00	6,00	42
40H4	16,80	2,80	56
40H5	68,40	10,40	112
40H6	18,00	3,00	28
40H7	67,20	11,20	140
40H8	37,20	6,20	42
40H9	24,00	4,00	28
40H10	30,00	5,00	42
40H11	27,60	4,60	42
RFM	56,40	9,40	490
RFE	147,60	24,60	1680
<b>TOTAL</b>	<b>595,20</b>	<b>98,20</b>	<b>2814</b>

Porções de 25 mg da fração 40H5 foram dissolvidas em 1,0 mL de MeOH:H<sub>2</sub>O (60:40), a solução foi centrifugada a 10.000 rpm, durante 10 min, e então injetada manualmente no cromatógrafo. Empregou-se coluna Agilent Zorbax SB-C18, detecção no UV<sub>220nm</sub>, fluxo de 3,5 mL/min e eluição isocrática de metanol: água (60:40).

O procedimento foi realizado três vezes, resultando na obtenção de 6 mg de PP1 e 3 mg de um sólido amorfo, de coloração amarelo pálida, denominado PP2. A análise de PP2 por CCD de sílica gel, utilizando-se acetato de etila: ácido fórmico: ácido acético: água (100:11:11:27) como eluente e revelador anisaldeído, indicou a presença de uma mancha única de coloração avermelhada, atestando a pureza de PP2.

#### 2.6.4 Fracionamento de MHM

A fração hidrometanólica proveniente da partição líquido-líquido de EEF (MHM) também foi fracionada por HSCCC. As amostras foram preparadas pela solubilização de porções de 100 mg da fração em 1,0 mL da mistura fase móvel:fase estacionária (1:1), seguida de centrifugação a 10.000 rpm, durante 10 min.

A amostra foi injetada e o fracionamento foi realizado a 850 rpm, fluxo de 2,0 mL/min, originando 42 frações de 2,0 mL cada, que foram reunidas em 11 grupos de acordo com seus perfis por CCD (Tabela 12).

A análise por CCD foi realizada empregando-se como eluente uma mistura de acetato de etila: ácido acético: ácido fórmico: água (100:11:11:27) e como revelador anisaldeído sulfúrico.

Tabela 12: Refracionamento de MHM por HSCCC

<b>Fração</b>	<b>Massa (mg)</b>	<b>Rendimento (%)</b>	<b>Volume (mL)</b>
MHM1	19,20	2,40	64
MHM2	37,60	4,70	80
MHM3	21,60	2,70	32
MHM4	32,80	4,10	48
MHM5	132,80	16,60	112
MHM6	66,40	8,30	80
MHM7	59,20	7,40	80
MHM8	47,20	5,90	48
MHM9	38,40	4,80	80
MHM10	53,60	6,70	80
MHM11	30,40	3,80	48
RFM	39,20	4,90	560
RFE	215,20	26,90	1920
<b>TOTAL</b>	<b>793,60</b>	<b>99,20</b>	<b>3232</b>

A fração MHM5, composta por uma substância principal, foi então submetida à purificação por RP-HPLC em escala semi-preparativa.

Porções de 25 mg de MHM5 foram dissolvidas em 1,0 mL de MeOH:H<sub>2</sub>O (60:40), a solução foi centrifugada a 10.000 rpm, durante 10 min, e então injetada manualmente no cromatógrafo. Empregou-se coluna Agilent Zorbax SB-C18, detecção no UV<sub>220nm</sub>, fluxo de 3,5 mL/min e eluição isocrática de metanol: água (60:40).

O procedimento foi realizado cinco vezes, resultando na obtenção de 45 mg de PP1 e 10 mg de PP2. A análise dessas substâncias por CCD de sílica gel, utilizando-se acetato de etila: ácido fórmico: ácido acético: água (100:11:11:27) como eluente, revelador anisaldeído, indicou a presença de uma mancha única de coloração avermelhada, atestando a pureza dessas. Foram então obtidos espectros de RMN de <sup>1</sup>H, e de <sup>13</sup>C e IV para a elucidação estrutural de PP2.

### 2.6.5 Fracionamento de MHA

Uma porção de MHA (200 mg) também foi fracionada por HSCCC, utilizando as mesmas condições experimentais descritas em 2.6.4, gerando 5 grupos de frações reunidas (Tabela 13), além dos resíduos das fases móvel (RFM) e estacionária (RFE).

Tabela 13: Refracionamento de MHA por HSCCC

<b>Fração</b>	<b>Massa (g)</b>	<b>Rendimento (%)</b>	<b>Volume (mL)</b>
MHA1	22,30	11,15	44,6
MHA2	76,10	38,05	152,2
MHA3	29,80	14,90	59,6
MHA4	34,50	17,25	69,0
MHA5	11,30	5,65	22,6
RFM	15,80	7,90	140,0
RFE	8,10	4,05	610,0
<b>TOTAL</b>	<b>197,90</b>	<b>98,95</b>	<b>1098,0</b>

A fração MHA2 apresentou uma substância majoritária e foi, então, purificada por RP-HPLC em escala semi-preparativa. Para tanto, porções de 25 mg foram dissolvidas em 1,0 mL de MeOH:H<sub>2</sub>O (65:35), a solução foi centrifugada a 10.000 rpm, durante 10 min, e então injetada manualmente no cromatógrafo. Empregou-se coluna Agilent Zorbax SB-C18, detecção no UV<sub>220nm</sub>, fluxo de 3,5 mL/min e eluição isocrática de metanol: água (65:35).

O procedimento foi realizado três vezes, resultando na obtenção de 25 mg de um sólido amorfo, de coloração amarelo pálida, denominado PP3. A análise de PP3 por CCD de sílica gel, utilizando-se acetato de etila: ácido fórmico: ácido acético: água (100:11:11:27) como eluente e revelador anisaldeído, indicou a presença de uma mancha única de coloração avermelhada, atestando a pureza de PP3. Foram então obtidos espectros de RMN de <sup>1</sup>H, de <sup>13</sup>C e IV para sua elucidação estrutural.

## 2.7 Perfis cromatográficos por RP-HPLC

### 2.7.1 Preparo das amostras

As amostras foram pesadas diretamente em frascos ependorff e solubilizadas em acetonitrila ou MeOH grau HPLC. Foram empregadas concentrações de 10

mg/mL para o extrato, 5mg/mL para as frações e 1 mg/mL para as substâncias isoladas. Todas as amostras foram solubilizadas com auxílio de banho de ultra-som, durante 15 min, e em seguida foram centrifugadas a 10.000 rpm, por 10 min. Os cromatogramas foram obtidos a partir dos sobrenadantes resultantes, dos quais 10µl foram injetados de forma automática em equipamento de HPLC.

### 2.7.2 Condições cromatográficas

Para a obtenção dos perfis cromatográficos empregou-se coluna LiChrospher 100 RP-18 (5 µm, 250 x 4 mm, d.i.), detecção no UV<sub>210nm</sub>, fluxo de 1 mL/min e temperatura de 40°C. Utilizou-se a eluição em gradiente linear de acetonitrila: água (Tabela 14). Ambos os eluentes foram acidificados com H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> na proporção de 0,1%. Foi guardado um intervalo de 15 minutos entre cada injeção, para reequilibrar a coluna.

Tabela 14: Gradiente de eluição empregado na obtenção dos perfis cromatográficos por RP-HPLC.

Tempo (min)	H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> 0,1% em água (%)	H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> 0,1% em acetonitrila(%)
0	95	05
30	50	50
35	05	95
40	05	95
45	95	05

Foram empregados solventes grau HPLC e água destilada, filtrada em sistema Milli-Q. O ar dos solventes foi retirado por sonicação, durante 20 min, com auxílio de vácuo.

### 2.8 Elucidação estrutural das substâncias isoladas

A pureza das substâncias isoladas foi avaliada a partir dos perfis em CCD e RP-HPLC, bem como pelos valores dos pontos de fusão.

Os espectros de RMN de <sup>1</sup>H e de <sup>13</sup>C foram obtidos no Departamento de Química, ICEX, UFMG, em equipamento Bruker Avance DRX400, a 25° C,

utilizando-se tetrametilsilano (TMS) como referência interna para ambos os núcleos. Dimetilsulfóxido deuterado (DMSO-d6) foi utilizado como solvente.

Os espectros no IV foram registrados em espectrofotômetro Perkin Elmer FT-IR.

Os espectros de massas foram gentilmente obtidos pelo Prof. José Maria del Corral, da Faculdade de Farmácia da Universidade de Salamanca, Espanha.

## **2.9 Ensaios farmacológicos**

### **2.9.1 Avaliação da atividade inibitória da ECA *in vitro*, pelo método colorimétrico**

#### **2.9.1.1 Soluções utilizadas no ensaio**

##### **Tampão fosfato pH 8,30**

A um balão volumétrico de 25,00 mL foram adicionados 170,1 mg de fosfato de potássio monobásico anidro. Após completa solubilização com 20 mL de água Mili-Q, o pH da solução foi ajustado para 8,3 com solução de NaOH a 10%. Essa solução, na concentração de 50 mmol/L, foi preparada no dia da realização do ensaio.

##### **Solução de pulmão de coelho em pó desidratado por acetona**

A solução de pulmão de coelho foi preparada segundo Vermeirssen et al (2002). Dois gramas do pó de pulmão de coelho (Continental Produtos Biológicos, Brasil) foram misturados com 10 mL de tampão fosfato (50 mmol/L, pH 8,3). A mistura foi centrifugada a 10.000 rpm, por 40 min. O sobrenadante de coloração vermelho clara, com alta atividade de ECA, foi retirado, transferido para tubos *safe-lock*, e novamente centrifugado a 2.000 rpm, por 10 min. O sobrenadante foi transferido para novos tubos *safe-lock* e armazenado a 5°C, correspondendo a uma solução estoque na concentração de 200 mg/mL. No momento da realização do ensaio, a solução estoque foi diluída com solução tampão fosfato (50 mmol/L, pH 8,3) até a concentração de trabalho, de 100 mg/mL.

**Solução do substrato Hipuril-glicil-glicina (Hip-Gly-Gly)**

A um balão volumétrico de 5 mL foram adicionados 146,7 mg de Hip-Gly-Gly, e 1,250 mL de solução de hidróxido de amônio 0,20 mol/L. Após total solubilização, o volume foi completado com água Mili-Q, obtendo-se uma solução 100 mmol/L. Essa solução foi alíquotada e armazenada a -20°C em frascos do tipo *safe-lock* (2 mL).

**Solução de ácido picrilsulfônico (TNBS)**

Para o preparo da solução a 69.24 mmol/L foram transferidos 2.030 µL de solução aquosa de TNBS a 5% (p/v) para balão volumétrico de 5,00 mL, completando-se o volume com água Mili-Q. Após completa homogeneização, a solução foi alíquotada e armazenada a -20°C em frascos do tipo *safe-lock*.

**Solução tampão Hepes-NaCl pH 8,15**

A um balão volumétrico de 25 mL foram adicionados 297,5 mg de HEPES (concentração final 50 mmol/L), 438,8 mg de NaCl (concentração final 300 mmol/L), e 1420 mg de Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (concentração final 400 mmol/L). Após completa solubilização com 20 mL de água Mili-Q e 50 µL de solução saturada de NaOH, o pH da solução foi ajustado para 8,15 com solução de NaOH a 10%. O volume final foi então completado com água Mili-Q. A solução foi alíquotada e armazenada a -20°C.

**Solução tampão fostato para a reação de acoplamento**

A um balão volumétrico de 25,00 mL foram adicionados 340,2 mg de fosfato de potássio monobásico anidro. Após completa solubilização com 20 mL de água Mili-Q, o pH da solução foi ajustado para 8,5 com solução de NaOH a 10%. Essa solução, na concentração de 100 mmol/L, foi preparada no dia da realização do ensaio.

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

A um balão volumétrico de 10,00 mL foram adicionados 1 g de tungstato de sódio e o volume foi completado com água Mili-Q. Essa solução, na concentração de 100 g/L, foi preparada no dia da realização do ensaio.

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

A um balão volumétrico de 100,00 mL foram adicionados 875  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (98% p/p) e o volume completado com água Mili-Q. A solução foi armazenada em frasco âmbar, à temperatura ambiente.

**Solução de tampão Hepes-NaCl pH 8,00**

A um balão volumétrico de 250,00 mL foram adicionados 2975 mg de HEPES (concentração final 50 mmol/L), e 4388 mg de NaCl (concentração final 300 mmol/L). Após completa solubilização com 200 mL de água Mili-Q, o pH da solução foi ajustado para 8,00 com solução de NaOH a 10%. O volume final foi, então, completado com água Mili-Q. A solução foi aliqotada e armazenada a  $-20^\circ\text{C}$ .

**Solução do controle positivo (captopril)**

A um balão volumétrico de 5,00 mL foram adicionados 69,6 mg de captopril e o volume foi completado com água Mili-Q. Essa solução, na concentração de 64 nmol/L, foi aliqotada e armazenada a  $-20^\circ\text{C}$  em frascos do tipo *safe-lock* (2 mL).

**Solução amostra**

Pesou-se 1,1 mg da amostra e solubilizou-se em 1,00 mL de solução metanol:HEPES pH 8,00 (20:80). Essa solução foi mantida em banho de ultra-som por 15 min, seguindo-se centrifugação a 10.000 rpm, durante 10 min.

**2.9.1.2 Protocolo experimental**

A um frasco *safe-lock* contendo 10  $\mu\text{L}$  da solução amostra (1,1 mg/mL) a ser ensaiada foram adicionados 10  $\mu\text{L}$  de solução de pulmão de coelho (1 g/10 mL). O controle negativo foi preparado substituindo-se a solução amostra por 10  $\mu\text{L}$  de solução tampão fosfato pH 8,3, e, como controle positivo, foi utilizado 10  $\mu\text{L}$  de solução de captopril a 64 nmol/L. A mistura foi homogeneizada e pré-incubada a  $37^\circ\text{C}$ , por 5 min. A reação enzimática foi iniciada com a adição de 60  $\mu\text{L}$  de solução tampão HEPES-NaCl pH 8,15 e 30  $\mu\text{L}$  de solução do substrato Hipuril-glicil-glicina. Após homogeneização, a mistura foi incubada a  $37^\circ\text{C}$ , por 35 min. A reação foi interrompida pela adição de 100  $\mu\text{L}$  de solução de tungstato de sódio (100 g/mL) e 100  $\mu\text{L}$  de solução de ácido sulfúrico (0,33 mol/L). Cada frasco *safe-lock* foi agitado

durante dez segundos, seguindo-se a adição de 1.000  $\mu\text{L}$  de água Mili-Q. Agitou-se novamente por dez segundos. A mistura foi centrifugada a 2.000 r.p.m, durante 10 min.

Uma alíquota do sobrenadante (75  $\mu\text{L}$ ) foi transferida para um poço de placa de microtitulação contendo 100  $\mu\text{L}$  de solução tampão fosfato pH 8,50 (100 mmol/L). Adicionaram-se, então, 5  $\mu\text{L}$  de TNBS 69 mmol/L. A microplaca foi mantida em repouso, em ausência de luz, à temperatura ambiente, por 20 min. Em seguida, a absorvância foi lida em leitor de microplacas a 415 nm, contra um branco preparado de maneira semelhante, exceto pela adição dos agentes de desproteíntização (tungstato de sódio e ácido sulfúrico) antes da solução de pulmão de coelho. O esquema de distribuição das amostras na microplaca está representado na figura 2.

Para o cálculo da porcentagem de inibição no ensaio colorimétrico foi utilizada a equação abaixo. Para o controle negativo (sem inibidor), foi considerado o máximo de atividade da enzima.

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

$A_1$  = absorvância da solução na presença do inibidor ( $A_{\text{amostra}} - A_{\text{branco}}$ )

$A_c$  = absorvância da solução do controle negativo ( $A_{\text{cont}} - A_{\text{branco}}$ )

## **2.9.2 Avaliação da atividade vasodilatadora *in vitro* em preparações isoladas de aorta de ratos**

### **2.9.2.1 Soluções utilizadas no ensaio**

#### **Solução de Krebs-Henseleit**

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

**Solução de fenilefrina**

Uma solução estoque de fenilefrina, na concentração de 10 mmol/L, foi preparada em água destilada. Diluições seriadas dessa solução resultaram nas concentrações de 0,1 e 1 mmol/L, sendo essas mantidas em banho de gelo até o momento do uso.

**Solução de acetilcolina**

Uma solução estoque de acetilcolina, na concentração de 100 mmol/L, foi preparada em água destilada. Diluições seriadas dessa solução resultaram nas concentrações de 0,0001 a 10 mmol/L, sendo essas mantidas em banho de gelo até o momento do uso.

**Solução de indometacina**

A solução estoque de indometacina, na concentração 100 mmol/L, foi preparada em solução de bicarbonato de sódio a 0,5%. Essa solução foi mantida em banho de gelo e ao abrigo da luz.

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

A solução de L-NAME, na concentração de 100 mmol/L, foi preparada em água destilada e mantida em banho de gelo até o momento do uso.

**Solução de superóxido dismutase (SOD)**

A solução de SOD, na concentração de 10 mmol/L, foi preparada em água destilada e mantida em banho de gelo e ao abrigo da luz até o momento do uso.

**Solução de 3-morfolinossidnonimina (SIN-1)**

A solução estoque de SIN-1, na concentração de 10 mmol/L, foi preparada em água destilada. Diluições seriadas dessa solução resultaram nas concentrações de 0,001 a 1 mmol/L, as quais foram mantidas em banho de gelo e ao abrigo da luz até o momento do uso.

**Solução da amostra**

As amostras a serem testadas foram solubilizadas em água destilada, com auxílio de cremofor quando necessário, e sonicadas por 10 minutos.

### **2.9.2.2 Animais**

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

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

Os animais de experimentação foram sacrificados por decapitação e a aorta torácica foi cuidadosamente dissecada e colocada em solução de Krebs-Henseleit a 4 °C. Os tecidos adiposo e conectivo foram totalmente removidos. Anéis de 4-5 mm de comprimento foram cortados e fixados em cubas de órgãos isolados contendo 10 mL de solução de Krebs-Henseleit, mantida à temperatura de 37 °C e aerada com carbogênio (mistura de O<sub>2</sub> e CO<sub>2</sub> na proporção de 95:05 v/v). Os anéis de aorta foram mantidos sob tensão de 1 grama-força por um período de estabilização de 60 min, antes de realizar os protocolos experimentais. Durante esse período, o meio de incubação foi trocado a cada 15 min.

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

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

### **2.9.2.4 Protocolo experimental para avaliar o efeito do extrato e frações sobre a concentração máxima induzida por fenilefrina**

A avaliação do efeito produzido pelo extrato e frações sobre a contração máxima induzida por fenilefrina foi realizada através de uma curva concentração-resposta (CCR) obtida pela adição de concentrações cumulativas de cada extrato em anéis de aorta pré-contraídos com fenilefrina (0,1 mmol/L), após estabilização da

resposta contrátil. As concentrações finais do extrato e frações na cuba de ensaio foram 0,1; 0,3; 1,0; 3,0; 10,0; 30,0; 100 e 300  $\mu\text{g/mL}$ . Os dados são apresentados como média  $\pm$  EPM, com  $n = 5$  para o extrato e  $n = 3$  para as frações, e correspondem às porcentagens de relaxamento, em relação à contração máxima induzida por fenilefrina. A concentração do extrato e das frações que produziu redução de 50% na contração máxima induzida pela fenilefrina ( $CI_{50}$ ) foi definida a partir de análise de regressão não linear da CCR obtida, empregando-se o programa Prism Graph Pad 4.0 (Graph Pad Software, Inc.).

#### **2.9.2.5 Protocolo experimental para avaliar o efeito de EEF sobre a concentração máxima induzida por fenilefrina, na presença de indometacina e L-NAME**

Para verificar a participação de produtos derivados do endotélio no relaxamento produzido por EEF, foi construída uma CCR obtida pela adição de concentrações cumulativas do extrato, de 0,1 a 100  $\mu\text{g/mL}$ , em anéis de aorta pré-contraídos com solução de fenilefrina (0,1  $\mu\text{mol/L}$ ), na presença de indometacina (10  $\mu\text{mol/L}$ ) e de L-NAME (100  $\mu\text{mol/L}$ ), adicionados à cubeta de ensaio 15 min antes da fenilefrina. O extrato foi adicionado após estabilização da resposta contrátil máxima induzida por fenilefrina. Os dados são apresentados como média  $\pm$  EPM ( $n = 5$ ), correspondendo às porcentagens de relaxamento em relação à contração induzida pela fenilefrina.

#### **2.9.2.6 Protocolo experimental para avaliar o efeito de EEF sobre a concentração máxima induzida por fenilefrina, na presença de superóxido dismutase (SOD)**

Para verificar o efeito de EEF sobre a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), foi construída uma CCR obtida pela adição de concentrações cumulativas do extrato, de 0,1 a 100  $\mu\text{g/mL}$ , em anéis de aorta pré-contraídos com solução de fenilefrina (0,1  $\mu\text{mol/L}$ ), na presença de superóxido dismutase (300 U/mL), adicionada à cubeta de ensaio 15 min antes da fenilefrina. O extrato foi adicionado após estabilização da resposta contrátil máxima induzida por fenilefrina. Os dados são apresentados como média  $\pm$  EPM ( $n = 5$ ) e correspondem às porcentagens de relaxamento, em relação à contração induzida pela fenilefrina.

### **2.9.2.7 Protocolo experimental para avaliar o efeito de EEF sobre a contração induzida por 3-morfolinossidnonimina (SIN-1)**

Para avaliar o efeito de EEF sobre a produção de espécies reativas de oxigênio foi construída uma CCR obtida pela adição de concentrações cumulativas de SIN-1, de 0,001 a 1,0  $\mu\text{mol/L}$ , em anéis de aorta desprovidos de endotélio, pré-contraídos com solução de fenilefrina (0,1  $\mu\text{mol/L}$ ), na presença de EEF (50  $\mu\text{g/mL}$ ), adicionado à cubeta de ensaio 15 min antes da fenilefrina. O SIN-1 foi adicionado após estabilização da resposta contrátil máxima induzida por fenilefrina. Os dados são apresentados como média  $\pm$  EPM ( $n = 5$ ), correspondendo às porcentagens de relaxamento, em relação à contração induzida pela fenilefrina.

### **2.9.2.8 Análise estatística**

A  $CI_{50}$ , concentração da amostra que produziu 50% de redução da contração induzida pelo agonista, foi determinada através de regressão não linear das curvas concentração-resposta (CCR) obtidas nos experimentos, utilizando-se o programa *Prism GraphPad 4.0* (GraphPad Software Inc., USA). As análises estatísticas foram realizadas com teste  $t$  de Student não-pareado. As CCR foram comparadas por análise de variância *two-way* ANOVA e pós-teste Bonferroni. Resultados foram considerados significativamente distintos quando  $P < 0,05$ .

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 Avaliação de atividades biológicas de EEF

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

O efeito vasodilatador do extrato etanólico de folhas de *M. hirsuta* (EEF) foi avaliado em anéis de aorta de ratos pré-contraídos com fenilefrina. EEF induziu relaxamento concentração-dependente em presença de endotélio funcional, com  $CI_{50} = 8,5 \pm 0,6 \mu\text{g/mL}$  (Figura 5). Esse efeito foi completamente abolido na ausência de endotélio funcional, indicando que a atividade vasodilatadora de EEF é dependente de fatores relaxantes derivados do endotélio.

A vasodilatação produzida em anéis de aorta de rato pré-contraídos com fenilefrina é uma metodologia bastante utilizada na investigação da atividade anti-hipertensiva de produtos naturais. Espécies amplamente utilizadas na prática popular como anti-hipertensivas foram avaliadas por esse método como, por exemplo, o extrato padronizado de *Crataegus* (WS<sup>®</sup> 1442; Dr. Willmar Schwabe Pharmaceuticals, Alemanha), que foi avaliado em preparações isoladas de aorta de rato, produzindo vasodilatação concentração-dependente, dependente de endotélio, com  $CI_{50}$  de  $15,1 \pm 0,6 \mu\text{g/mL}$ . Nesse mesmo estudo, esse extrato também foi avaliado em preparação isolada de artéria mamária humana, resultando em vasodilatação semelhante à obtida em aorta de ratos, com  $CI_{50}$  de  $19,3 \pm 3,4 \mu\text{g/mL}$  (BRIXIUS et al, 2006).

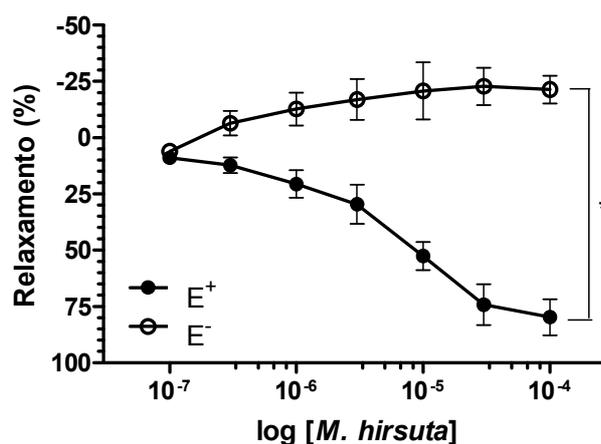


Figura 5: Curva concentração-resposta obtida para EEF em anéis de aorta pré-contraídos com fenilefrina, na presença (E+) e ausência (E-) de endotélio funcional. Cada ponto representa média  $\pm$  E.P.M. de 5 replicatas. \* Significativamente distintos,  $p < 0,0001$

O endotélio vascular é reconhecido não apenas como uma barreira física entre o sangue e a parede vascular, mas, também, como um importante órgão com múltiplas funções endócrinas e parácrinas. São numerosas as substâncias produzidas pelo endotélio vascular que podem induzir tanto relaxamento quanto constrição dos vasos sanguíneos, resultando em diversos efeitos fisiológicos que em equilíbrio contribuem para manter a dinâmica vascular (MONCADA et al, 1991).

Para investigar a participação de prostanóides no efeito vasodilatador induzido por EEF, os anéis de aorta foram incubados com indometacina, um inibidor da ciclooxigenase (COX) (Figura 6). A COX é uma enzima envolvida no metabolismo do ácido araquidônico. No sistema cardiovascular, prostanóides vasoativos derivados da COX (prostaglandina E<sub>2</sub>, D, F<sub>2a</sub>, prostaciclina e tromboxano A<sub>2</sub>) regulam o tônus vascular, sendo a prostaciclina o vasodilatador predominante e o tromboxano A<sub>2</sub> o principal vasoconstritor (BISHOP-BAILEY et al, 1997; KANG et al, 2007). Nesse experimento, utilizando-se concentração de indometacina capaz de inibir a contração induzida pelo ácido araquidônico (Figura 7), houve apenas uma pequena variação em relação à curva controle ( $CI_{50}$  de  $8,5 \pm 0,6$  e  $12,0 \pm 0,8$   $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente), sugerindo que prostanóides contribuem pouco para a resposta relaxante induzida por EEF (Figura 6).

Visando investigar a participação do NO no efeito vasodilatador induzido por EEF, os anéis de aorta foram incubados com L-NAME, um inibidor da NO sintase.

No endotélio vascular ocorre liberação continuada de NO, responsável pela manutenção do fluxo sanguíneo tecidual e controle do extravasamento tecidual. O NO produzido no endotélio tem função vasodilatadora fisiológica, e exerce importantes funções na homeostase vascular em órgãos-alvo importantes, como os rins, cérebro e, também, no sistema bronco-pulmonar. (FLORA-FILHO; ZILBERSTEIN, 2000; RUBIO; MORALES-SEGURA, 2004).

Em vasos incubados com L-NAME, a vasodilatação induzida por EEF foi completamente abolida (Figura 6), de maneira similar à obtida com anéis desprovidos de endotélio funcional.

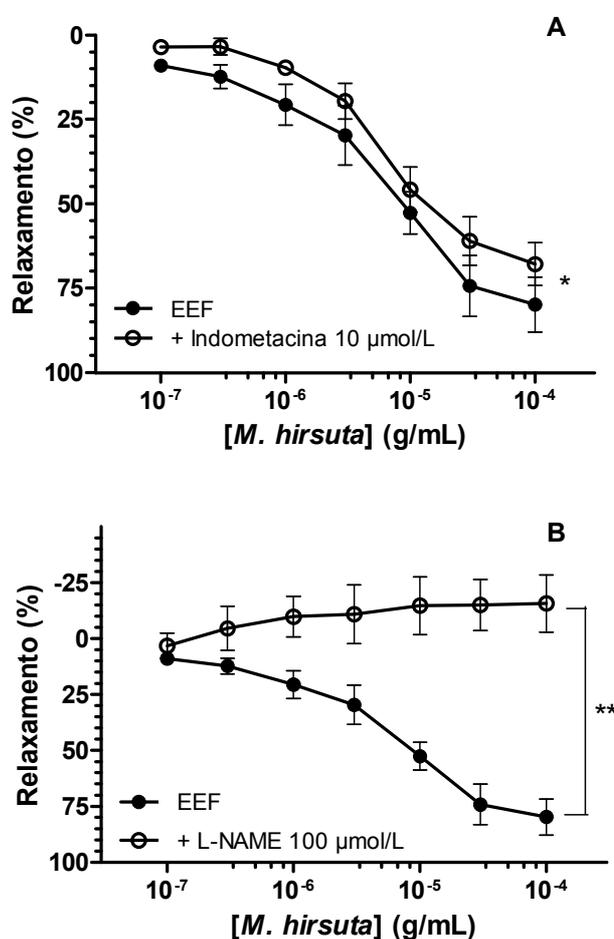


Figura 6: Curva concentração-resposta obtida para EEF em anéis de aorta pré-contraídos com fenilefrina, incubados com indometacina (A) e com L-NAME (B). Cada ponto representa média  $\pm$  E.P.M. de 5 replicatas. \* Significativamente distintos, \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,001$

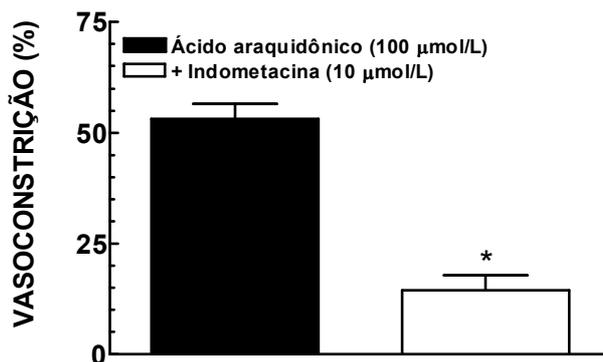


Figura 7: Efeito da indometacina (10 μmol/L) na contração induzida pelo ácido araquidônico. \* Significativamente distintos,  $p < 0,01$ .

É bastante conhecido o papel do NO derivado de endotélio no controle da homeostase vascular. O NO modula o tônus vascular, o crescimento de células musculares lisas vasculares, e reduz a adesão e agregação plaquetária (MONCADA et al., 1991; SCOTT-BURDEN; VANHOUTTE, 1994).

Diversas doenças, como as dislipidemias, a aterosclerose e a hipertensão arterial, apresentam em sua gênese e/ou em seus mecanismos alterações na função endotelial, sendo atribuído ao NO um papel protetor nessas doenças (ZAGO; ZANESCO, 2006). Assim, a disfunção endotelial, caracterizada pela menor produção e/ou biodisponibilidade de NO, é um dos fatores que contribuem para o aparecimento das doenças cardiovasculares (LUSCHER, 1994; BUSSE; FLEMING, 1996; ZAGO; ZANESCO, 2006).

Foi anteriormente demonstrado, em modelos animais, que a disfunção endotelial ocorre em associação com o aumento na produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) em inúmeras condições patológicas, incluindo as citadas anteriormente (FARRÉ; CASADO, 2001; TANIYAMA; GRIENGLING, 2003; TEPEL, 2003). ROS também causam apoptose das células endoteliais, aumentam a adesão de monócitos e desempenham importante papel na angiogênese (TANIYAMA; GRIENGLING, 2003)

A vasodilatação dependente de endotélio é prejudicada pelo aumento da produção de ROS devido à perda de bioatividade do NO na parede vascular. O NO é molécula lábil, cujo tempo de meia vida é da ordem de segundos, e espécies reativas de oxigênio (ROS) interagem diretamente com ele, inativando-o, formando peroxinitrito e outras espécies citotóxicas que podem atacar e modificar várias outras moléculas (FARRÉ; CASADO, 2001; TANIYAMA; GRIENGLING, 2003; TEPEL,

2003). Nesse contexto, substâncias que reduzem a formação de ROS, ou que seqüestram essas espécies, podem aumentar a biodisponibilidade do NO, sendo benéficas no tratamento e prevenção de doenças cardiovasculares.

Para avaliar o papel da produção de ROS na atividade vasodilatadora de EEF foram obtidas CCR para EEF em presença e ausência da superóxido dismutase (SOD, 300 U/mL), enzima que reage com o radical superóxido convertendo-o em peróxido de hidrogênio. Não houve alteração estatisticamente significativa nas CCR obtidas na presença e na ausência de SOD (Figura 8). Esse resultado sugere que na presença de EEF não são produzidas quantidades significativas de ROS, ou que essas espécies são seqüestradas por constituintes do extrato. Assim, o efeito vasodilatador de EEF pode ser devido, em parte, à sua atividade antioxidante. Se ROS fossem formadas em quantidades significativas na presença de EEF, a CCR obtida em anéis incubados com SOD estaria significativamente deslocada para a esquerda, como relatado para o extrato de *H. speciosa* (FERREIRA et al., 2007).

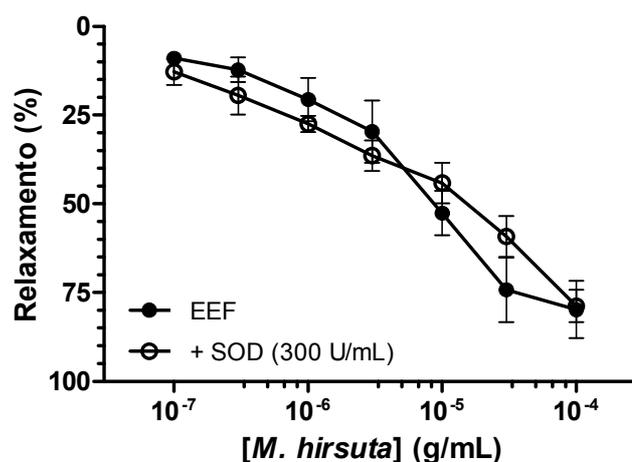


Figura 8: Curva concentração-resposta obtida para EEF em anéis de aorta pré-contraídos com fenilefrina, incubados com superóxido dismutase (SOD). Cada ponto representa média  $\pm$  E.P.M. de 5 replicatas.

Com o objetivo de investigar o provável efeito antioxidante de EEF, foram obtidas CCR para 3-morfolinossidnonimina (SIN-1), um doador de NO independente do endotélio, na presença e na ausência de EEF (Figura 9). O extrato foi capaz de deslocar a curva do SIN-1 para a esquerda ( $CI_{50} = 2,75 \pm 0,73 \mu\text{mol/L}$  e  $0,67 \pm 0,11 \mu\text{mol/L}$ , respectivamente na ausência e na presença de EEF), efeito semelhante ao observado com a adição de SOD (300/mL,  $CI_{50} = 0,8 \pm 0,11 \mu\text{mol/L}$ ; Figura 9). O

aumento do efeito vasodilatador de SIN-1 na presença de EEF é resultado do aumento da biodisponibilidade do óxido nítrico, já que nesse experimento não se observa os efeitos de outros mediadores derivados do endotélio e o NO disponível é apenas aquele proveniente do SIN-1 adicionado. Assim, considerando que ROS são os principais responsáveis pela inativação do NO, esse resultado reforça a atividade antioxidante do extrato.

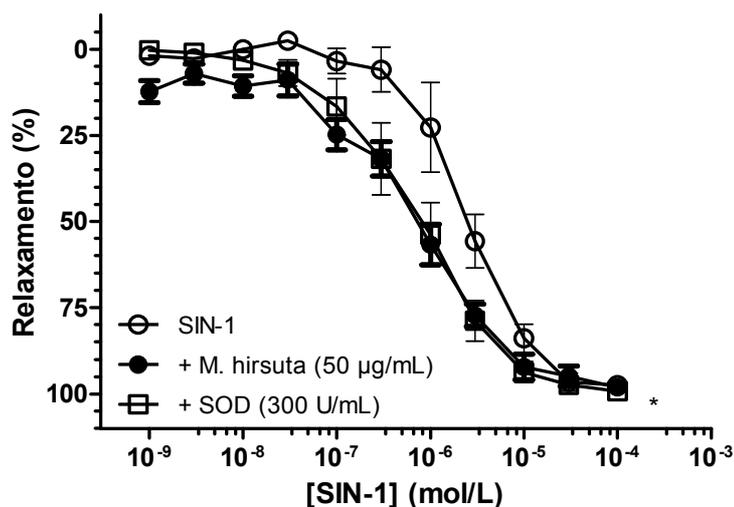


Figura 9: Curva concentração-resposta obtida para a 3-morfolinidnonimina (SIN-1) em anéis de aorta pré-contraídos com fenilefrina, na presença e na ausência de EEF (50 µg/mL) ou SOD (300 U/mL). Cada ponto representa média ± E.P.M. de 5 replicatas. \* Significativamente distintos,  $p < 0,0001$  (comparado com a curva controle SIN-1).

### 3.1.2 Avaliação da atividade inibitória da ECA pelo método colorimétrico

Braga e cols (2000) relataram atividade inibitória da ECA de 54% para o extrato etanólico de folhas de *M. hirsuta*, avaliada em ensaio cromatográfico *in vitro* desenvolvido por ELBL e WAGNER (1991). No presente trabalho, EEF foi avaliada quanto à atividade inibitória da ECA pelo método colorimétrico desenvolvido por Serra e cols (2004). No entanto, não foi obtido resultado semelhante àquele relatado por Braga e cols (2000): EEF produziu inibição da ECA de apenas  $6,6 \pm 13,2\%$ , quando avaliado na concentração de  $100,0 \mu\text{g/mL}$ . Nesse experimento utilizou-se como controle positivo o captopril que promoveu inibição da ECA com  $CI_{50}$  de  $25,2 \text{ nmol/L}$ . Esse resultado poderia ser justificado por uma possível degradação dos constituintes responsáveis pela atividade inibitória da ECA do extrato de *M. hirsuta*,

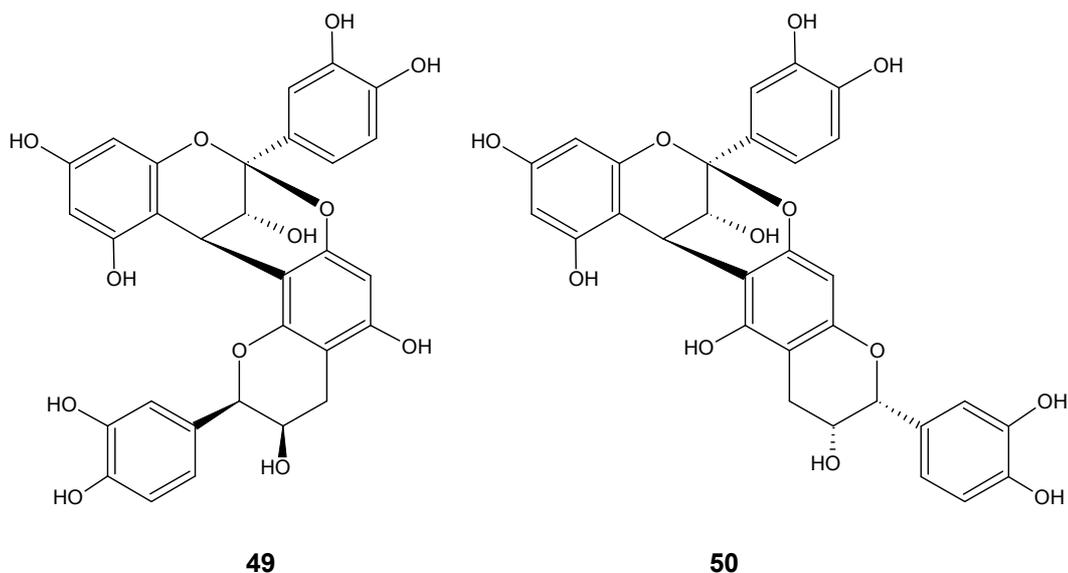
já que esse extrato fora preparado anteriormente. Ressalta-se, no entanto, que o extrato foi armazenado a  $-20^{\circ}\text{C}$ , o que reduz a possibilidade de degradação. Outra hipótese possível para explicar a ausência de atividade é que o método colorimétrico empregado no presente trabalho não apresenta 100% de correlação com o método cromatográfico utilizado por Braga et al. (2000) Segundo Serra (2004), os percentuais de inibição da ECA de extratos vegetais avaliados pelos dois métodos apresentam coeficiente de correlação de 0,6021.

### 3.2 Estudo fitoquímico de EEF

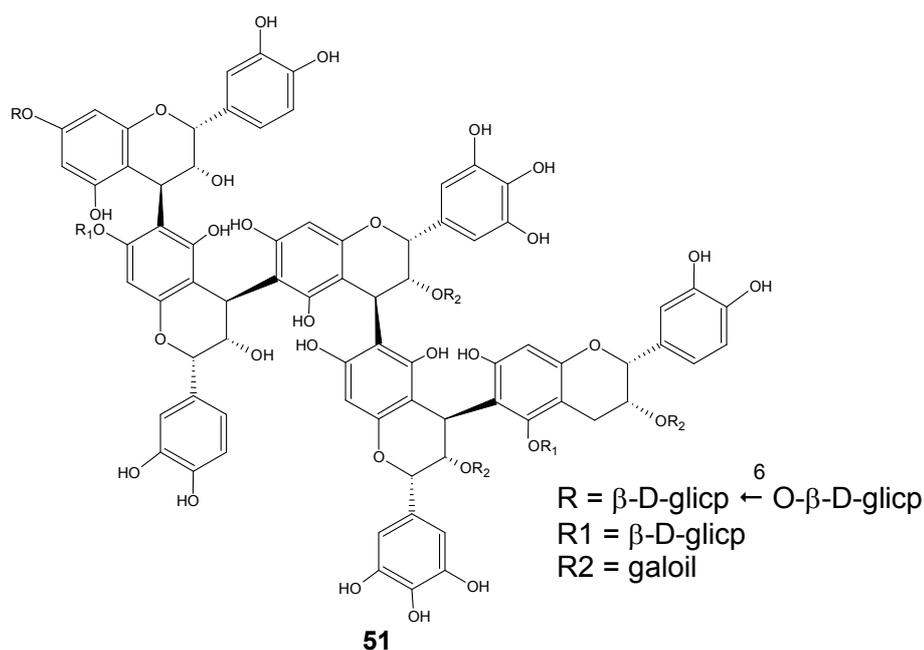
Com base nos resultados obtidos nos ensaios biológicos, que indicam uma potencial atividade anti-hipertensiva para EEF, e no relato anterior de atividade inibitória da enzima conversora de angiotensina (ECA) para a espécie (Braga et al., 2000), foi realizado seu estudo fitoquímico visando isolar os constituintes majoritários, e então avaliar suas atividades biológicas.

O estudo iniciou-se pela obtenção do perfil cromatográfico de EEF por CCD de sílica gel e RP-HPLC. O perfil cromatográfico do extrato fornece informações relevantes sobre sua composição, como polaridade dos constituintes, e funciona como impressão digital da espécie em estudo, o que é útil para comparação com amostras de outras coletas.

O perfil obtido por RP-HPLC (Figura 10) indica o predomínio de substâncias de polaridade média a alta. Os espectros de absorção no U.V. obtidos *on line* para os picos majoritários do extrato (TR = 17,24; 18,27; 19,49 e 20,70 min) são compatíveis com comprimentos de onda dos máximos de absorção ( $\lambda_{\text{max}}$ ) de proantocianinas. Kamiya e cols. (2001) relataram valores de  $\lambda_{\text{max}}$  para a proantocianidina A-2 (**49**) em 209, 225 e 280 nm e para proantocianidina A-6 (**50**) em 223 e 280 nm.



Ismailov e cols (1998) relataram valores de  $\lambda_{\max}$  para a proantocianidina RP-2 (**51**), um glicosídeo pentamérico isolado das raízes de *Rhodiola pamiroalaica*, em 209, 246, 275 e 309 nm.



Svedstrom e cols (2006) obtiveram espectros de U.V. *on line* para várias proantocianidinas oligoméricas que exibiram máximos de absorção em 235 e 280 nm. Esses valores são semelhantes aos valores obtidos para os picos majoritários de EEF, indicando a presença de proantocianidinas no extrato. A presença de flavonóides e compostos polifenólicos no extrato de *M. hirsuta* foi relatada anteriormente, a partir de testes de prospecção fitoquímica por CCD de sílica gel (Rocha, 2002).

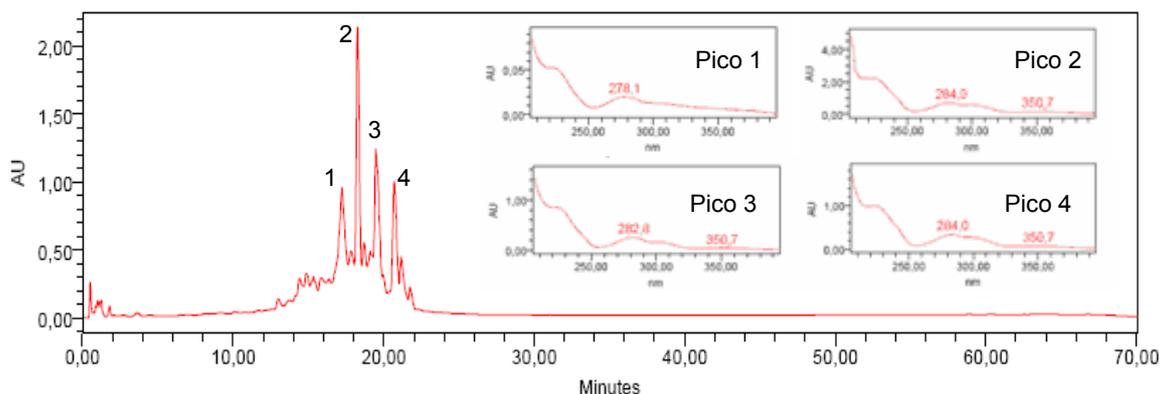


Figura 10: Cromatograma, obtido por RP-HPLC, para o extrato etanólico de folhas de *Mansoa hirsuta* e espectros no U.V. obtidos *on line* para os picos majoritários (pico 1, TR= 17,24 min; pico 2, TR = 18,27 min; pico 3, TR = 19,49 min e pico 4, TR = 20,70 min). Condições cromatográficas: vide Parte Experimental, item 2.7.2.

Ao se comparar os espectros no U.V. dos picos principais de EEF percebe-se que eles apresentam valores de  $\lambda_{max}$  próximos, sugerindo tratar-se de proantocianidinas estruturalmente relacionadas.

### 3.2.1 Fracionamento de EEF

Para o fracionamento de EEF foram empregadas duas abordagens, utilizando técnicas cromatográficas distintas. Os ensaios biológicos das frações obtidas serão descritos ao longo dessas seções

#### 3.2.1.1 Por cromatografia em coluna de sílica gel

EEF foi fracionado por cromatografia em coluna de sílica gel e algumas das frações originadas foram trabalhadas das utilizando-se técnicas cromatográficas diversas, como apresentado no fluxograma da Figura 11.

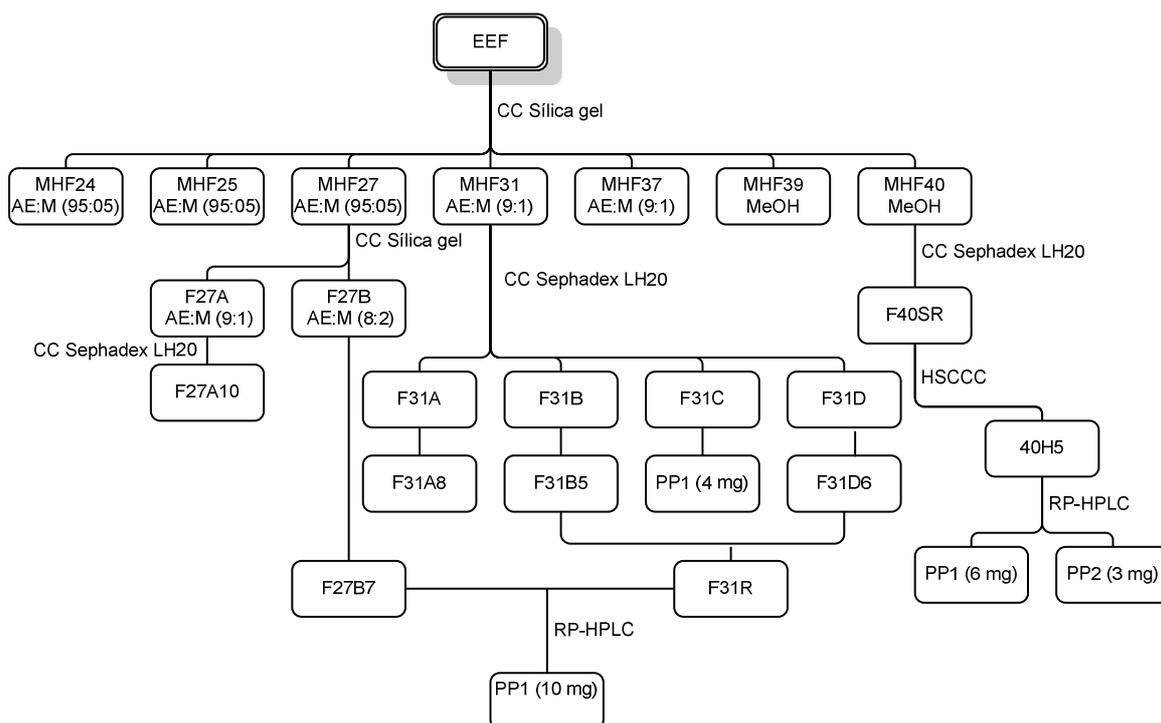


Figura 11: Fluxograma do Fracionamento de EEF.

O fracionamento de EEF por cromatografia em coluna de sílica gel resultou em 32 grupos de frações reunidas, conforme descrito no item 2.5.1. Foram obtidos os perfis por RP-HPLC para as frações de maior massa.

Os perfis das frações MHF24, MHF25, MHF27, MHF31, MHF37, MHF39 e MHF40, provenientes do fracionamento do extrato bruto de EEF, obtidos por RP-HPLC e por CCD de sílica gel estão representados nas Figuras 12 e 13, respectivamente. A análise de EEF por CCD de sílica gel indica a presença de quatro manchas principais, de coloração avermelhada quando revelada com vanilina (Figura 13). Essa coloração é semelhante à relatada por Svedström e cols (2006) para proantocianidinas oligoméricas.

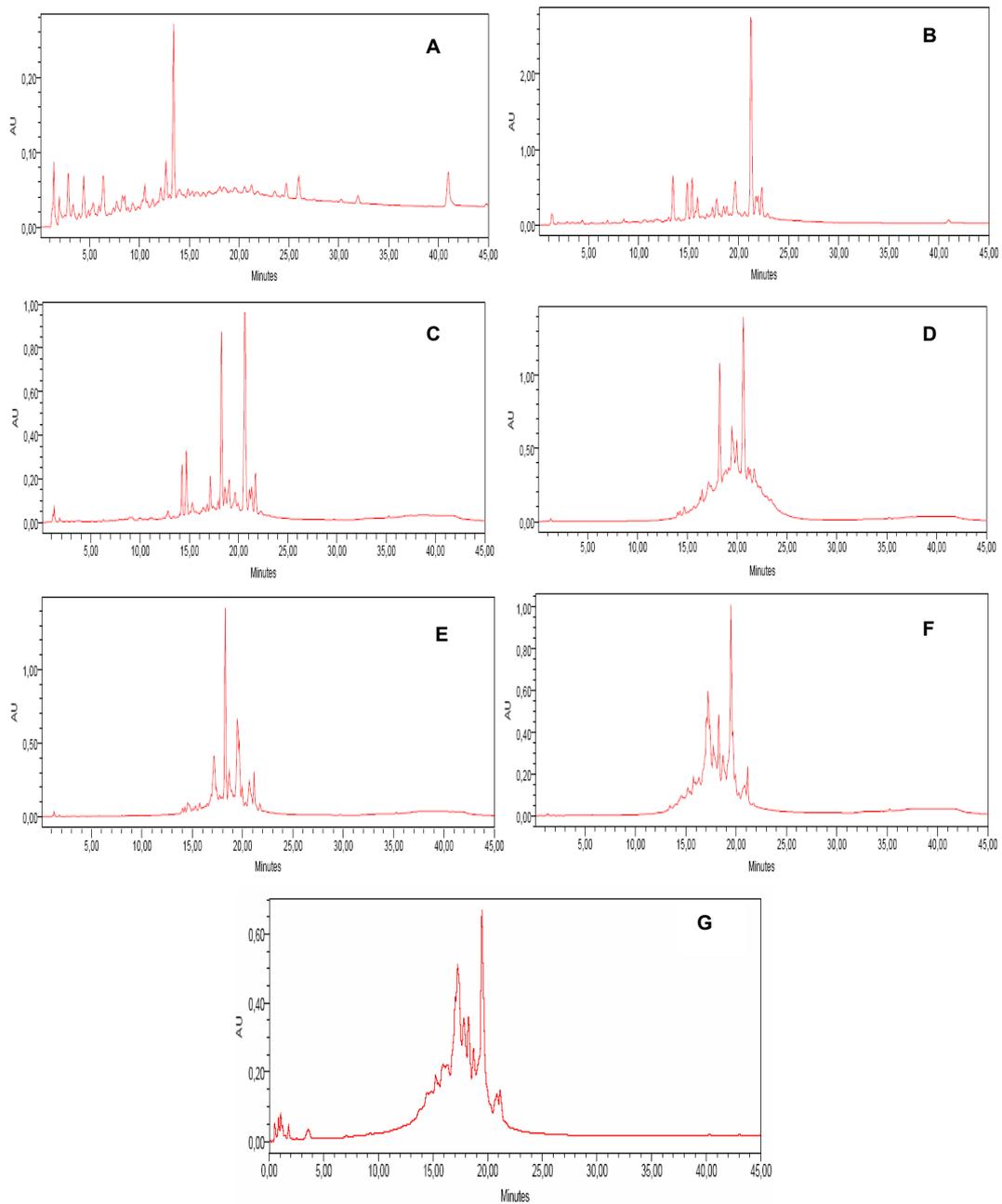


Figura 12: Perfis cromatográficos, obtidos por RP-HPLC, para as frações MHF24 (A); MHF25 (B); MHF27 (C); MHF31 (D); MHF37 (E); MHF39 (F); MHF40 (G). Condições cromatográficas: vide Parte Experimental, item 2.7.2.

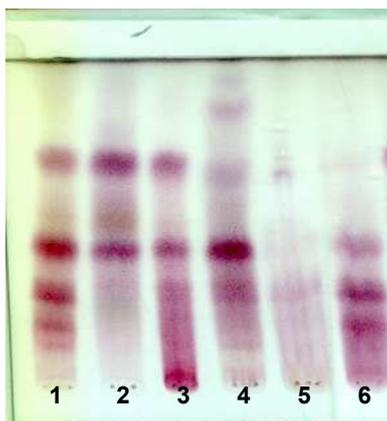


Figura 13: Perfil cromatográfico, obtido por CCD de sílica gel, para o extrato bruto (1. EEF) e frações (2. MHF27; 3. MHF31; 4. MHF37; 5. MHF39; 6. MHF40) de folhas de *Mansoa hirsuta*. Eluente: EtOAc:HCOOH:HOAc:H<sub>2</sub>O (70:8:8:30). Revelador: Vanilina/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

Existem vários relatos na literatura de compostos polifenólicos com atividade inibidora da ECA e vasodilatadora *in vitro*, como os constituintes dos extratos de *Cecopria glaziovii*, *Musanga cecropioides* e *Crataegus oxycanta*, cujas frações ativas possuem alto teor de proantocianidinas (11 a 13%), entre elas as proantocianidinas B<sub>2</sub> (**22**) e C<sub>1</sub> (**23**) (LACAILLE-DUBOIS et al, 2001). Outro exemplo é a fração em acetato de etila de *Ouratea semiserrata*, que produziu significativa vasodilatação e possui elevado teor de proantocianidinas (21,8 ± 1,5%) (CORTES et al, 2002).

Assim, algumas frações provenientes do fracionamento inicial de EEF por cromatografia em coluna de sílica gel foram selecionadas para avaliação nos ensaios *in vitro* de inibição da ECA e vasodilatação em anéis de aorta de rato. A seleção baseou-se em sua complexidade, avaliada pelos perfis cromatográficos, e massa disponível. Os resultados dos ensaios de inibição da ECA dessas frações estão representados na Tabela 15.

Nos ensaios *in vitro* de inibição da ECA considera-se ativa a fração / extrato que produz inibição igual ou superior a 50% na concentração de 110 µg/mL, empregada no teste (Serra et al., 2005). As frações MHF27 e MHF31 apresentaram atividade inibitória da ECA superior a 90% e foram selecionadas para refractionamento. A fração MHF40, que apresentou atividade inibitória da ECA de 46,5 ± 9,4%, também foi selecionada para refractionamento visando isolar os constituintes bioativos.

Tabela 15: Atividade inibidora da ECA *in vitro* obtida para frações provenientes do extrato etanólico de folhas de *Mansoa hirsuta* (EEF), avaliadas pelo método colorimétrico

AMOSTRA	% INIBIÇÃO	DESCRIÇÃO
MHF17	3,1 ± 16,7	Fração diclorometano:acetato de etila (3:7)
MHF18	37,0 ± 1,3	Fração diclorometano:acetato de etila (3:7)
MHF24	25,9 ± 6,5	Fração acetato de etila:metanol (95:05)
MHF25	21,6 ± 11,0	Fração acetato de etila:metanol (95:05)
MHF27	95,9 ± 11,4	Fração acetato de etila:metanol (95:05)
MHF31	94,1 ± 12,4	Fração acetato de etila:metanol (9:1)
MHF37	-4,4 ± 9,1	Fração acetato de etila:metanol (9:1)
MHF39	19,9 ± 10,5	Fração 100% metanol
MHF40	46,5 ± 9,4	Fração 100% metanol

Valores representam média ± d.p.m, n = 3.

O refraçãoamento de MHF27 por cromatografia em coluna de sílica gel resultou em duas frações principais, denominadas F27A e F27B. A análise dessas frações por CCD de sílica gel empregando a fase superior da mistura *n*-butanol/ácido acético/água (40:10:50) como eluente, e anisaldeído sulfúrico como revelador, indicou a presença de manchas de coloração avermelhada com  $R_f \sim 0,50$ , resultado esse que sugere a presença de proantocianidinas.

O método empregado para o fracionamento de MHF27, apesar de ter resultado na separação de seus constituintes majoritários (Figura 14), não foi o método mais apropriado, haja visto o baixo rendimento obtido (53,7% em relação à massa aplicada na coluna), devido à adsorção irreversível de alguns de seus constituintes.

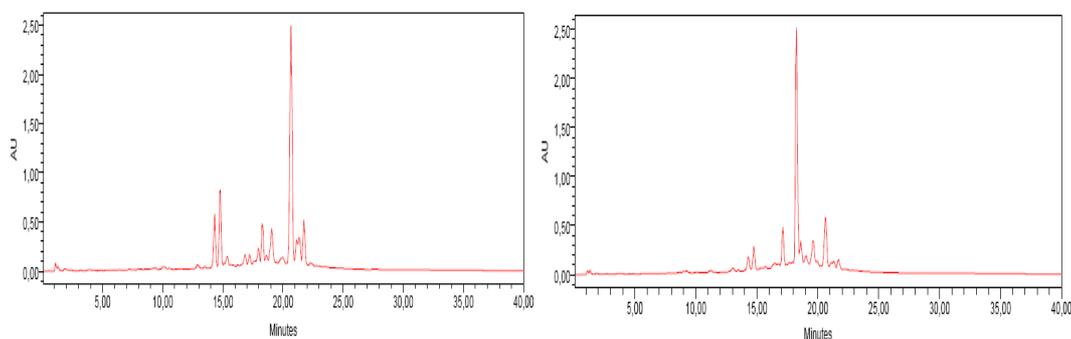


Figura 14: Perfis cromatográficos obtidos por RP-HPLC para as frações F27A (A) e F27B (B). Condições cromatográficas: vide Parte Experimental, item 2.7.2

Algumas das frações obtidas nos fracionamentos iniciais de EEF foram selecionadas para avaliação da atividade vasodilatadora em anéis de aorta de ratos. Para a seleção foram considerados os mesmos critérios para inclusão no ensaio de inibição da ECA (massa disponível, complexidade dos perfis cromatográficos), bem como resultado positivo nesse ensaio. Assim, foram avaliadas as frações F27A e F27B, provenientes do fracionamento de MHF27, juntamente com as frações MHF31 e MHF40.

Todas as frações avaliadas apresentaram atividade vasodilatadora superior a 50% no teste inicial, empregando-se a concentração máxima utilizada para construção da CCR do extrato (Tabela 16). Foi, então, obtida uma CCR para cada fração visando sua comparação com a CCR do extrato.

Tabela 16: Percentual de relaxamento obtido para EEF e frações na concentração de 100 µg/mL em anéis de aorta pré-contraídos com fenilefrina (0,1 µmol/L)

<b>FRAÇÕES</b>	<b>Efeito máximo (% Relaxamento)</b>
EEF	75,2± 10,8
F27A	57,5 ± 8,3
F27B	80,5 ± 4,0
MHF31	70,3 ± 10,2
MHF40	55,0 ± 3,8

Valores representam média ± E.P.M, n = 5.

Apesar de todas as frações analisadas apresentarem efeito vasodilatador acima de 50%, observou-se variação no percentual de relaxamento máximo induzido por cada uma das frações, sendo que as frações F27A e MHF40 apresentaram percentual de relaxamento máximo inferior à do extrato, enquanto para as frações F27B e MHF31 não se observa essa diferença (Tabela 16). Esse resultado é uma evidência de que não existe apenas uma substância bioativa no extrato, mas um conjunto de substâncias que contribuem para o efeito vasodilatador de EEF.

Ao compararmos a atividade das frações provenientes de MHF27, observamos que a CCR obtida para F27B se assemelha mais àquela do extrato que a CCR observada para F27A (Figura 15). A fração F27B, na concentração de 100 µg/mL, apresenta efeito semelhante ao obtido com o extrato; porém, a curva se encontra ligeiramente deslocada para a direita, sugerindo perda de potência devido ao fracionamento ( $CI_{50}$  maior que a do extrato). Já a fração 27A, na concentração de 100 µg/mL, apresenta percentual de relaxamento máximo inferior ao extrato, e sua

CCR está deslocada para a direita (Figura 14), mostrando que a fração 27A apresenta uma potencia relativa menor.

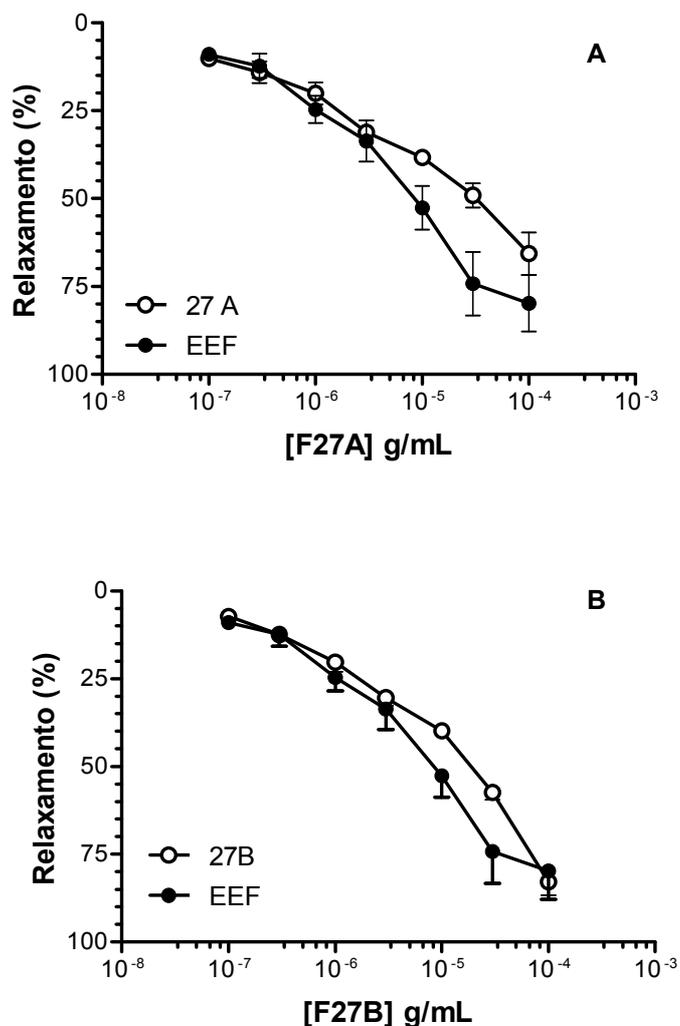


Figura 15: Curvas de concentração-resposta obtidas para as frações F27A (A) e F27B (B) em anéis de aorta com endotélio funcional, pré-contraídos com fenilefrina. Cada ponto representa média ± E.P.M. de 5 replicatas.

As frações MHF31 e MHF40 também apresentaram atividade vasodilatadora em anéis de aorta de ratos, estando as CCR correspondentes deslocadas para a direita em comparação com a curva obtida para o extrato (Figura 16), de maneira semelhante à observada para F27A e F27B (Figura 15).

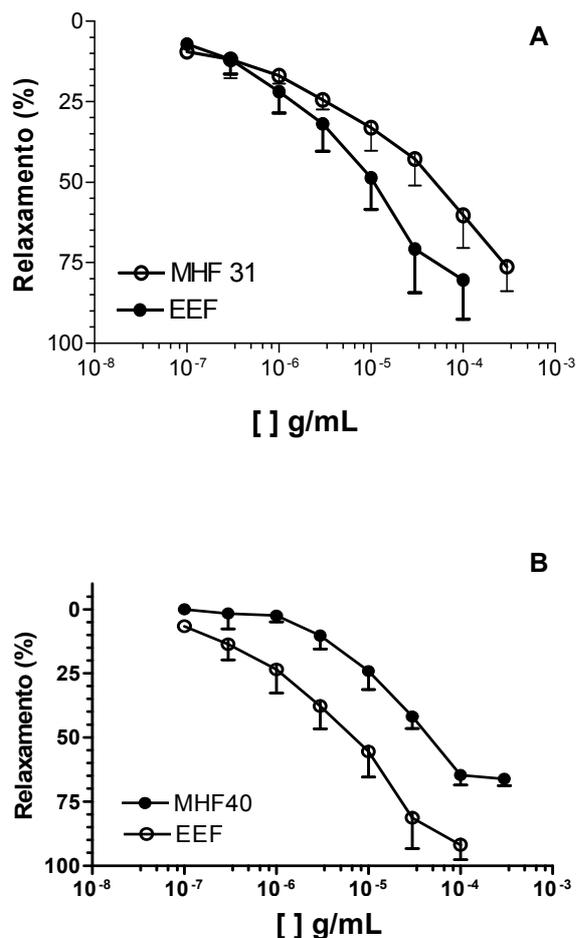


Figura 16: Curvas de concentração-resposta obtidas para as frações F31 (A) e F40 (B) em anéis de aorta com endotélio funcional, pré-contraídos com fenilefrina. Cada ponto representa média  $\pm$  E.P.M. de 5 replicatas.

Os resultados obtidos permitem inferir que existe mais de uma substância responsável pelo efeito vasodilatador observado para o extrato de *M. hirsuta*. Além disso, podemos também supor que a substância com TR = 18,3 min, pico majoritário de F27B, possui maior atividade vasodilatadora que aquela com TR = 20,7 min, pico majoritário de F27A, considerando os resultados dos ensaios biológicos obtidos para essas frações. No entanto, essa suposição deve ser feita com cautela, visto que outros constituintes minoritários podem ser os responsáveis pelos efeitos biológicos observados.

Com base nos resultados dos ensaios biológicos, as frações foram trabalhadas visando isolar seus constituintes majoritários, principalmente aqueles responsáveis pela atividade observada.

Assim, F27A e F27B foram refractionados em coluna de Sephadex LH20, resultando na obtenção das duas substâncias (14,2 e 10 mg, respectivamente), para as quais foram obtidos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  (Figura 17). No entanto, a análise espectral foi dificultada devido ao grau de pureza das substâncias e a pequena massa disponível. Tendo em vista que essas substâncias são de natureza polimérica (proantocianidinas), e provavelmente possuem estruturas bastante próximas, como evidenciado pelos espectros no U.V. e pelos tempos de retenção por RP-HPLC, seriam necessárias maiores massas para realizar a elucidação estrutural.

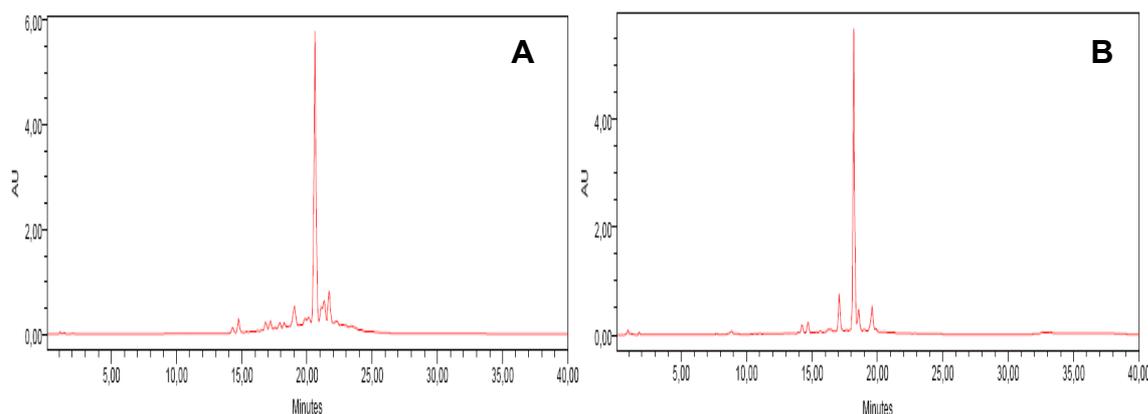


Figura 17: Perfis cromatográficos, obtidos por RP-HPLC, para as frações F27A10 (A) e F27B7 (B) Condições cromatográficas: vide Parte Experimental, item 2.7.2

Visando obter maior massa dessas substâncias, foram realizadas várias tentativas de isolamento utilizando técnicas cromatográficas variadas, com as frações MHF31 e MHF40, conforme descrito na parte experimental (itens 2.6.2 e 2.6.3) e representado no fluxograma da Figura 11. As tentativas com a fração MHF31 resultaram na obtenção de misturas ou de sólidos puros, porém com massa insuficiente para a elucidação estrutural (Figura 11, pag 78). Os cromatogramas dos sólidos isolados assim como de suas frações de origem estão representados na Figura 18.

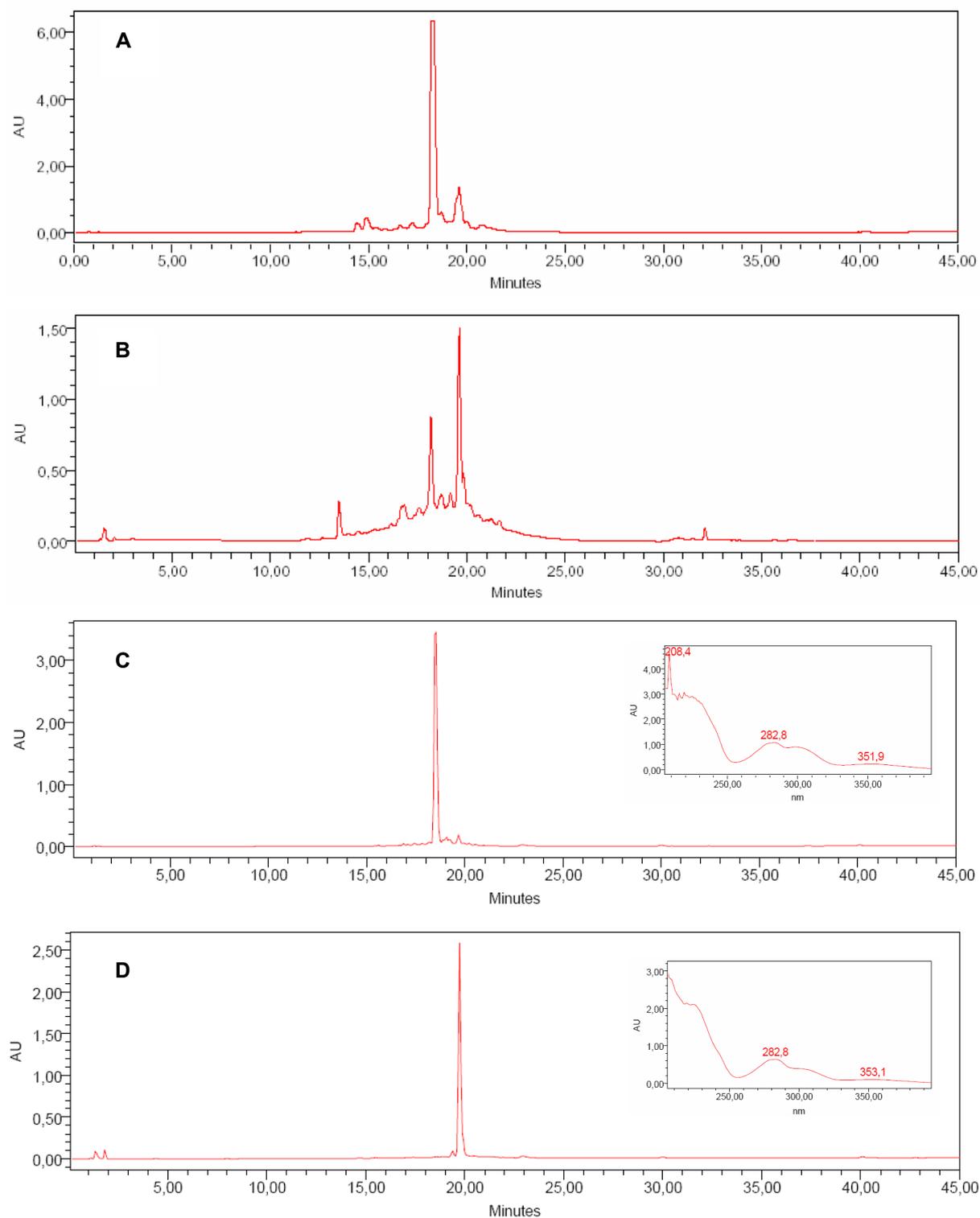


Figura 18: Perfis cromatográficos, obtidos por RP-HPLC, para as frações F31R (A) e F40H5 (B) e para as substâncias PP1 (C) e PP2 (D), com os respectivos espectros no UV obtidos on line. Condições cromatográficas: item 2.7.2.

Após as diversas tentativas de refractionamento e purificação das frações do extrato etanólico de folhas de *M. Hirsuta*, resultantes do fracionamento inicial de EEF por CC de sílica gel, foi possível isolar duas substâncias, PP1 (16 mg) e PP2 (3 mg).

O isolamento dos constituintes de EEF pelas técnicas utilizadas, cromatografia inicial em coluna de sílica gel seguida de refração em Sephadex e HSCCC, e purificação por RP-HPLC em escala semi preparativa, não foi adequada, resultando na obtenção de pequenas quantidades das substâncias puras, o que dificulta a elucidação estrutural, como mencionado anteriormente, e inviabiliza a avaliação das atividades biológicas.

Sendo assim, outras técnicas de fracionamento e purificação foram utilizadas (item 3.2.2) visando o isolamento de quantidades que possibilitassem não apenas a elucidação estrutural das substâncias, mas, também, a avaliação das atividades biológicas.

### 3.2.2 Fracionamento de EEF por partição líquido-líquido.

O fracionamento de EEF por partição entre solventes imiscíveis foi realizado de acordo com o fluxograma da Figura 4, pag. 49. A partição líquido-líquido de EEF (2,0 g) resultou em 4 grupos de frações, a saber, *n*-hexânica (MHH), diclorometânica (MHD), em acetato de etila (MHA) e hidrometanólica (MHM). Dessas, MHA e MHM apresentaram maior massa e seus perfis por RP-HPLC estão representados na Figura 19.

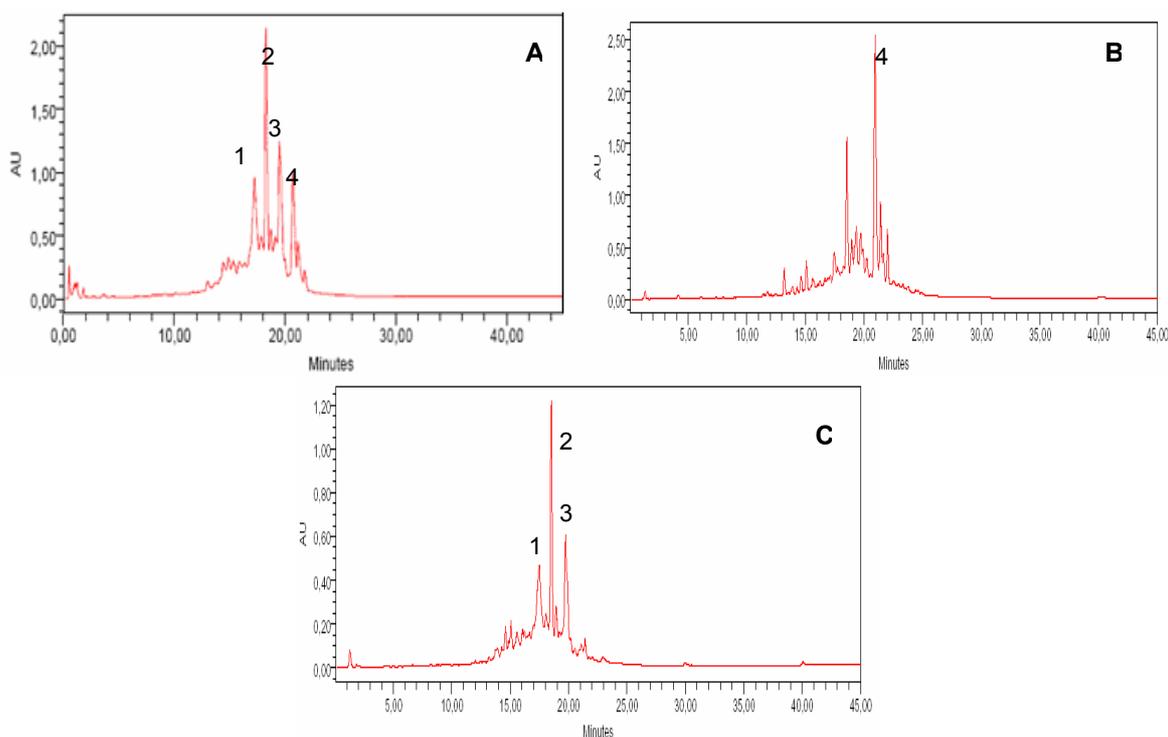


Figura 19: Perfis cromatográficos, obtidos por RP-HPLC, para EEF (A) e para as frações MHA (B) e MHM (C). Condições cromatográficas: vide Parte Experimental, item 2.7.2.

Observa-se que a fração hidrometanólica (MHM) tem perfil muito semelhante ao perfil do extrato (EEF), com relação às substâncias majoritárias, à exceção da substância com TR = 20,9 min (pico 4), que não aparece em MHM. Por outro lado, essa substância é o constituinte majoritário de MHA.

A fração MHM foi submetida a fracionamento por HSCCC (item 2.6.4), sendo obtidos 11 grupos de frações, entre elas MHM5 (130 mg), cujo perfil por RP-HPLC está representado na Figura 20.

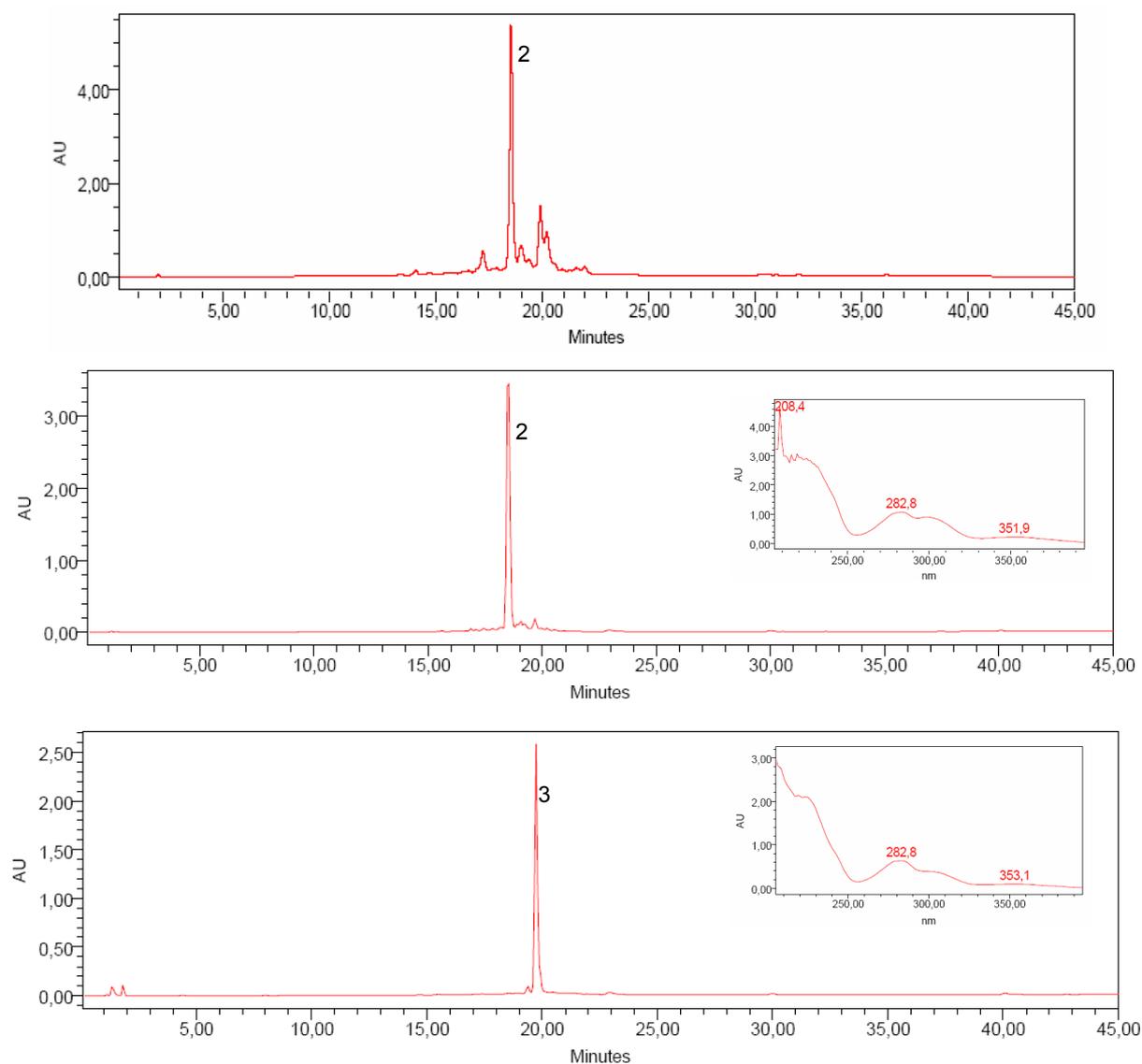


Figura 20: Perfis cromatográficos, obtidos por RP-HPLC, para a fração MHM5 e para as substâncias isoladas, PP1 e PP2. Condições cromatográficas: vide Parte Experimental, item 2.7.2.

Na seqüência, essa fração foi submetida à purificação por RP-HPLC em escala semi-preparativa, resultando no isolamento de 45 mg de PP1 (TR = 18,6 min, pico 2) e 10 mg de PP2 (TR = 19,5 min, pico 3) (Figura 21).

O refractionamento de MHA também foi realizado, visando isolar seu constituinte majoritário, com TR = 20,7 min. Para tanto, MHA foi submetida a HSCCC (item 2.6.5), originando 5 grupos de frações, incluindo a fração MHA2, na qual se identificou a presença majoritária da substância de interesse. MHA2 foi, então, purificada por RP-HPLC em escala semi-preparativa, resultando na obtenção de 25 mg de um sólido amorfo, de coloração amarelo pálido, denominado PP3, cujo perfil por RP-HPLC está representado na Figura 21.

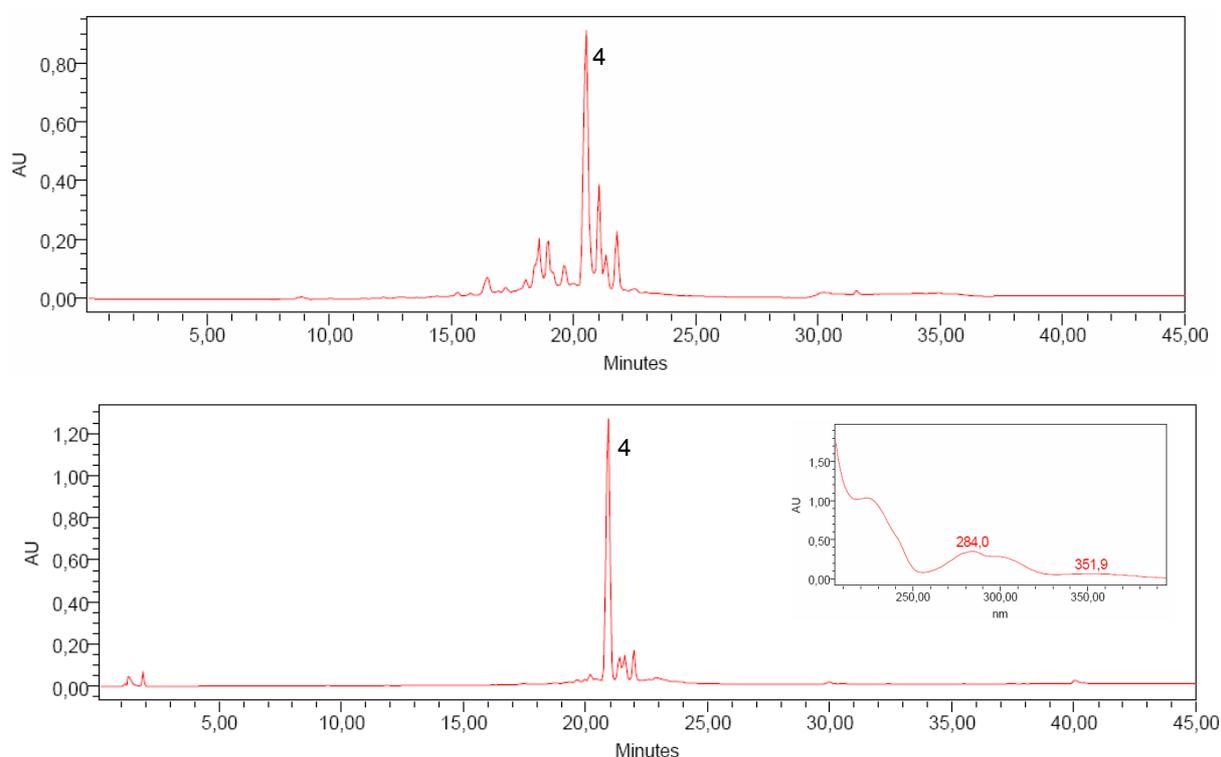


Figura 21: Perfis cromatográficos, obtidos por RP-HPLC, para a fração MHA2 (A) e para a substância PP3 (B) com espectro no UV obtido *on line*. Condições cromatográficas: vide Parte Experimental, item 2.7.2.

Essa substância não foi obtida nas tentativas de fracionamento de EEF por CCS de sílica gel e Sephadex com pureza suficiente para a elucidação estrutural.

O fracionamento de EEF por partição entre solventes imiscíveis, seguido de refractionamento por HSCCC, e posterior purificação por RP-HPLC, mostrou-se um método eficaz para isolar os três constituintes principais de EEF, com rendimento consideravelmente superior àquele obtido nas tentativas por CCS/Sephadex.

### 3.3 Elucidação estrutural das substâncias isoladas

A avaliação das substâncias isoladas, PP1, PP2 e PP3, por CCD de sílica gel indicou manchas únicas, de coloração avermelhada após revelação com vanilina/ácido sulfúrico, o que é característico de proantocianidinas, como descrito anteriormente (Svedstrom et al, 2006).

Essa indicação foi reforçada pelos espectros de ultravioleta (UV) obtidos *on line*, cujos máximos de absorção de 282,8, 282,8 e 284 nm, registrados para PP1, PP2 e PP3, respectivamente, são característicos de proantocianidinas (Svedstrom, 2006). As proantocianidinas são formadas pela ligação de unidades de flavan-3-ol, variando de dímeros a polímeros, podendo esses serem homogêneos ou heterogêneos. Proantocianidinas homogêneas apresentam uma única banda de absorção no UV na região de 280 nm, enquanto para as heterogêneas essa banda apresenta-se com um máximo em torno de 280 nm, seguido de um ombro de absorção em cerca de 300 nm (Svedstrom, 2006). A análise dos espectros no U.V. de PP1, PP2 e PP3 sugere tratar-se de proantocianidinas heterogêneas, devido ao perfil das bandas de absorção (Figuras 20 e 21).

Os espectros de I.V. obtidos para essas substâncias foram bastante semelhantes (Figura 22). A presença de uma banda larga em torno de  $3200\text{ cm}^{-1}$ , típica de deformação axial de O-H, confirma a presença de hidroxilas, também evidenciada por bandas na região de  $1300\text{ cm}^{-1}$  (deformação angular de O-H), e de  $1021\text{-}1052\text{ cm}^{-1}$  (deformação axial da ligação C-OH). O caráter aromático dessas substâncias foi evidenciado pela presença de bandas de deformação axial C=C na região entre  $1600\text{ e }1400\text{ cm}^{-1}$ .

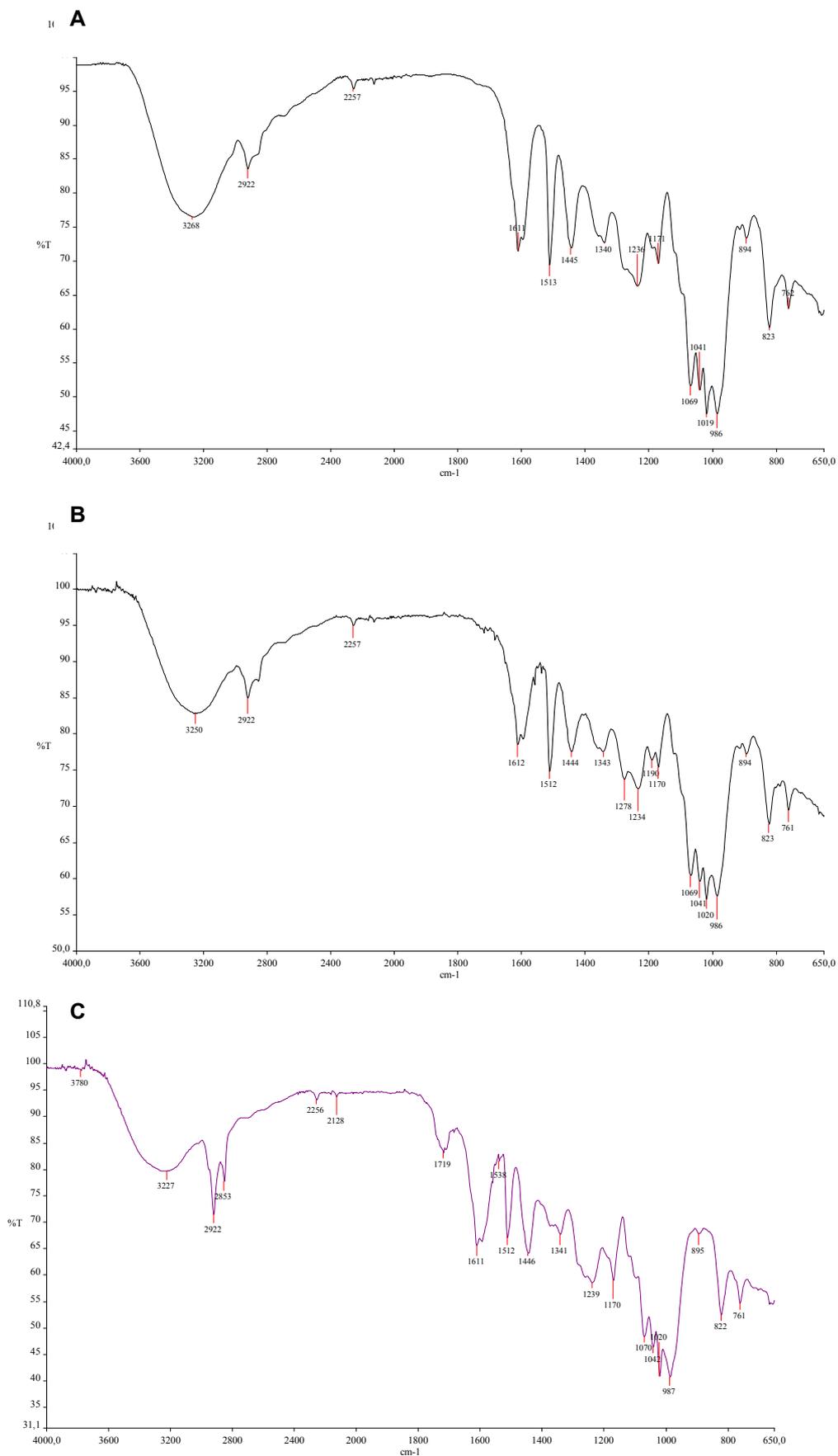


Figura 22: Espectros no infravermelho obtidos para PP1 (A), PP2 (B) e PP3 (C)

A elucidação estrutural de proantocianidinas não é uma tarefa simples, sendo realizada em diversas etapas, compreendendo: (a) a determinação do grau de polimerização, (b) identificação das unidades formadoras, (c) estabelecimento da natureza e posição de ligação das unidades e (d) determinação da estereoquímica dos carbonos assimétricos.

Dependendo da complexidade estrutural da proantocianidina em análise, e da massa disponível, é usual a determinação estrutural se restringir às etapas a e b anteriormente citadas, podendo também incluir a etapa c. Um número reduzido de proantocianidinas teve suas estruturas químicas determinadas inequivocamente, incluindo a definição da estereoquímica absoluta (BARREIROS et al, 2000; PRASAD, 2000; ZHANG et al, 2003; FITZPATRICK et al, 2004).

A ordem de grandeza das massas obtidas no presente trabalho (PP1, 45 mg; PP2, 10 mg e PP3, 25 mg) inviabilizou a realização de experimentos adicionais para a elucidação completa da estrutura química das substâncias isoladas. Assim, a caracterização estrutural se restringiu à determinação do grau de polimerização e à identificação das unidades formadoras.

A espectrometria de massas é uma ferramenta útil para a elucidação estrutural de proantocianidinas por fornecer a massa molecular da substância, o que auxilia na identificação do grau de polimerização. MALDI-TOF (*matrix-assisted desorption time of flight*) é o método de escolha para a análise de proantocianidinas por sua maior capacidade de detecção de íons intactos (íons *quasi*-moleculares) (HANTON, 2001). A partir dos espectros de massa (MALDI-TOF positivo) foi possível obter a massa molecular das substâncias isoladas, pela identificação do pico do íon *quasi*-molecular  $[M+H]^+$  em  $m/z$  1281,4094 para PP1, 1281,3997 para PP2 e 1119,3504 para PP3, conforme demonstrado nas Figura 23 a Figura 25. Esse resultado nos permite inferir tratar-se de proantocianidinas tetraméricas, sendo que o íon *quasi*-molecular obtido para PP3 apresentou uma diferença de 162 unidades de massa em relação às demais, correspondente à massa de um resíduo de açúcar ( $C_6H_{10}O_5$ ).

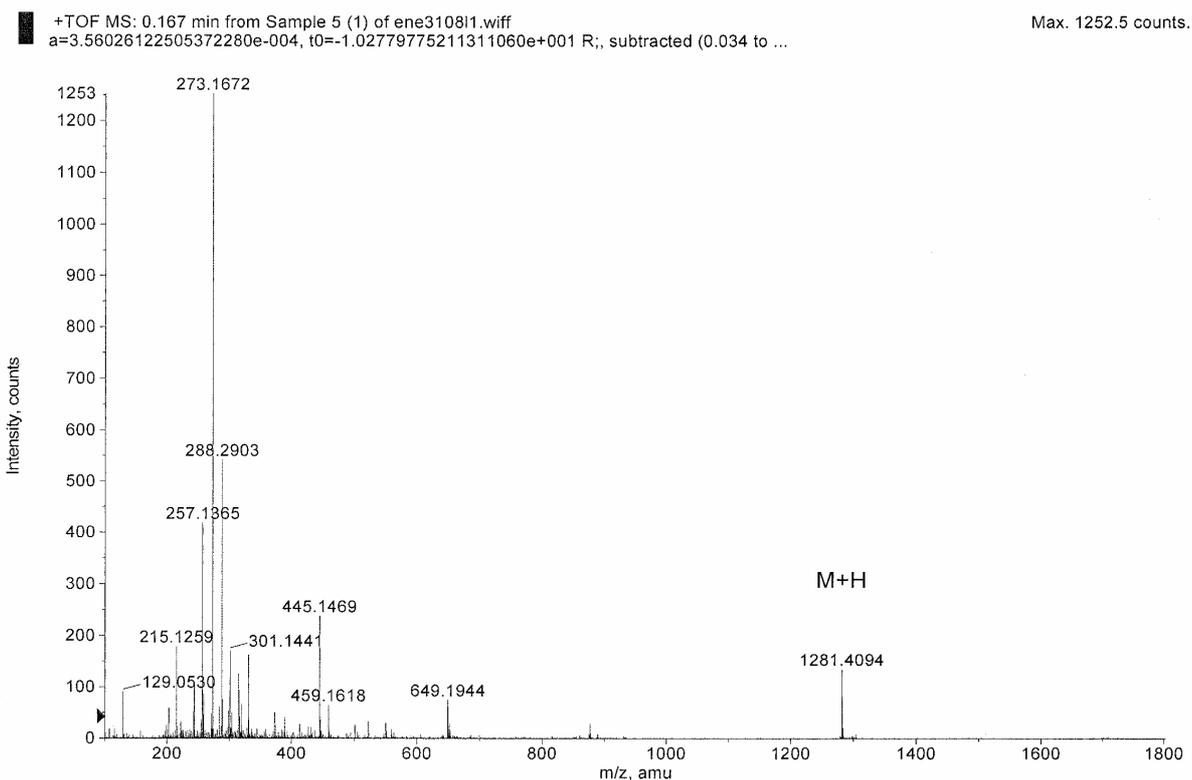


Figura 23: Espectro de massas MALDI-TOF positivo obtido para PP1

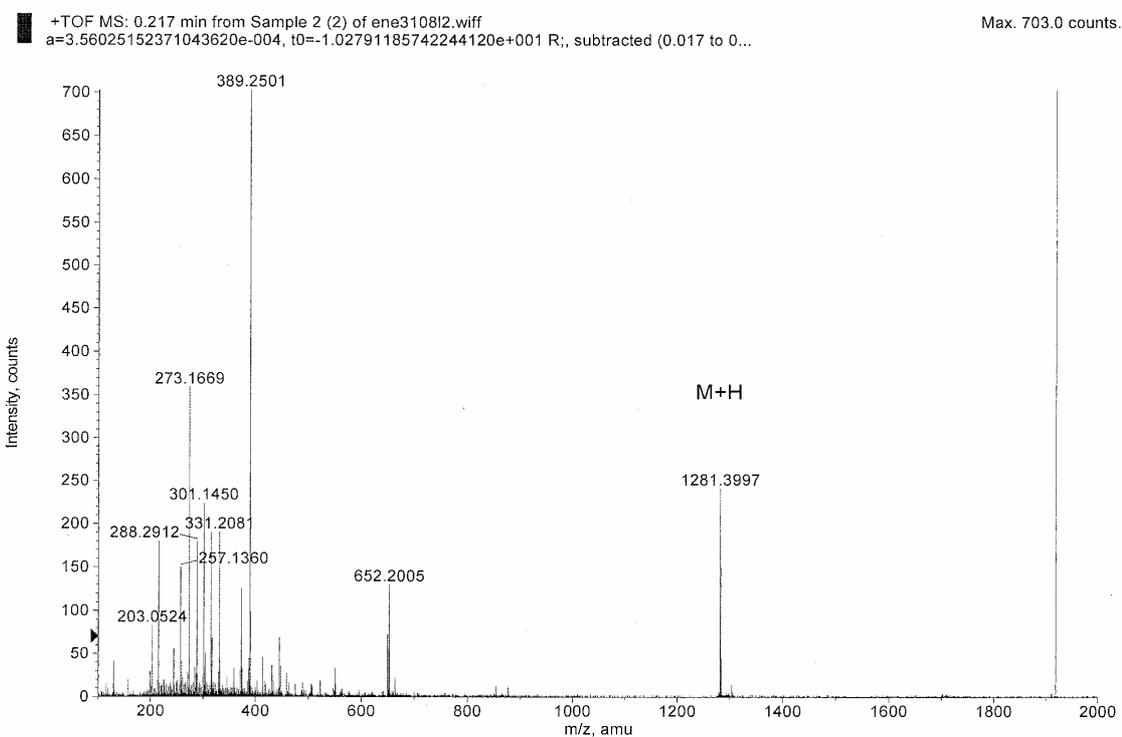


Figura 24: Espectro de massas MALDI-TOF positivo obtido para PP2

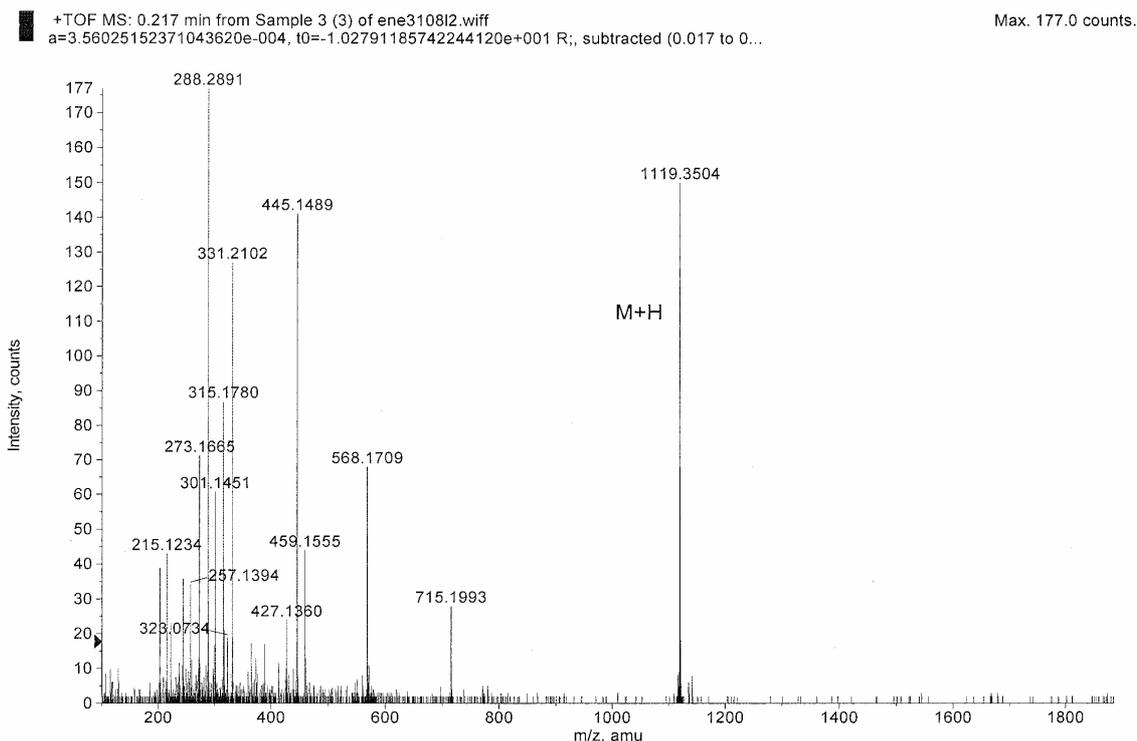
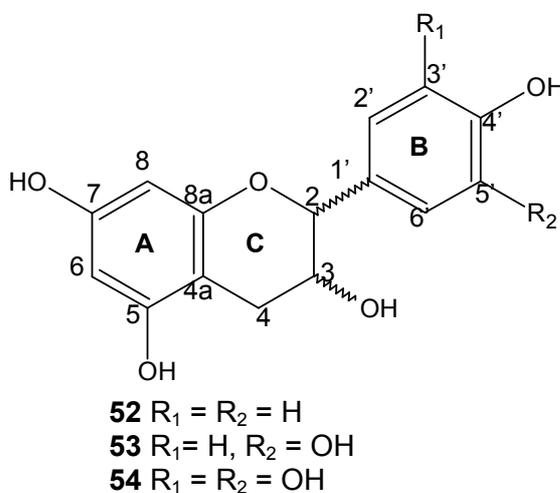


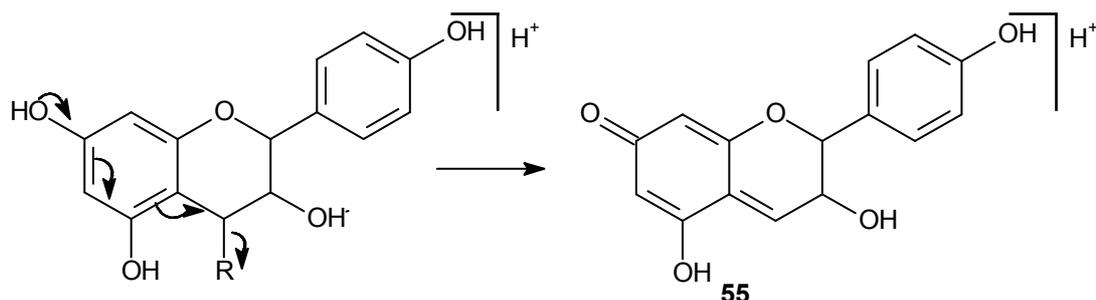
Figura 25: Espectro de massas MALDI-TOF positivo obtido para PP3

A diversidade de proantocianidinas é dada pela variabilidade estrutural das unidades monoméricas, com diferentes padrões de hidroxilação dos anéis A e B, e diferentes configurações dos centros quirais C2 e C3, além de variações na posição e na estereoquímica da ligação interflavonóide.

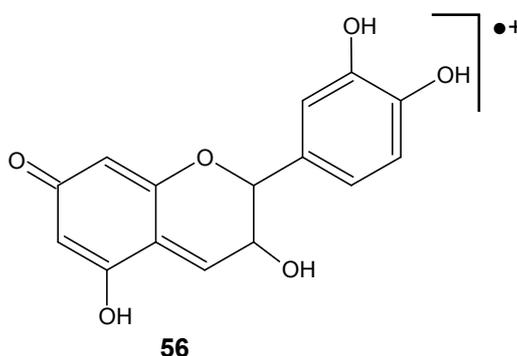
As unidades de flavan-3-ol mais comumente encontradas nas proantocianidinas são afzelequina/epiafzelequina (**52**), catequina/epicatequina (**53**) e galocatequina/epigalocatequina (**54**).



Os espectros de massas obtidos para as proantocianidinas isoladas (Figuras 23 a 25) registram a presença de fragmentos em  $m/z$  273,17 e  $m/z$  288,29, com intensidades variadas para cada uma das substâncias. A massa desses fragmentos sugere que afzelequina e catequina (ou seus respectivos epímeros) sejam os monômeros constituintes das estruturas de PP1, PP2 e PP3. O fragmento em  $m/z$  273,17 pode ser atribuído ao íon **(55)**, formado por fissão do tipo quinona-metídeo da afzelequina (LI; DEINZER, 2007).

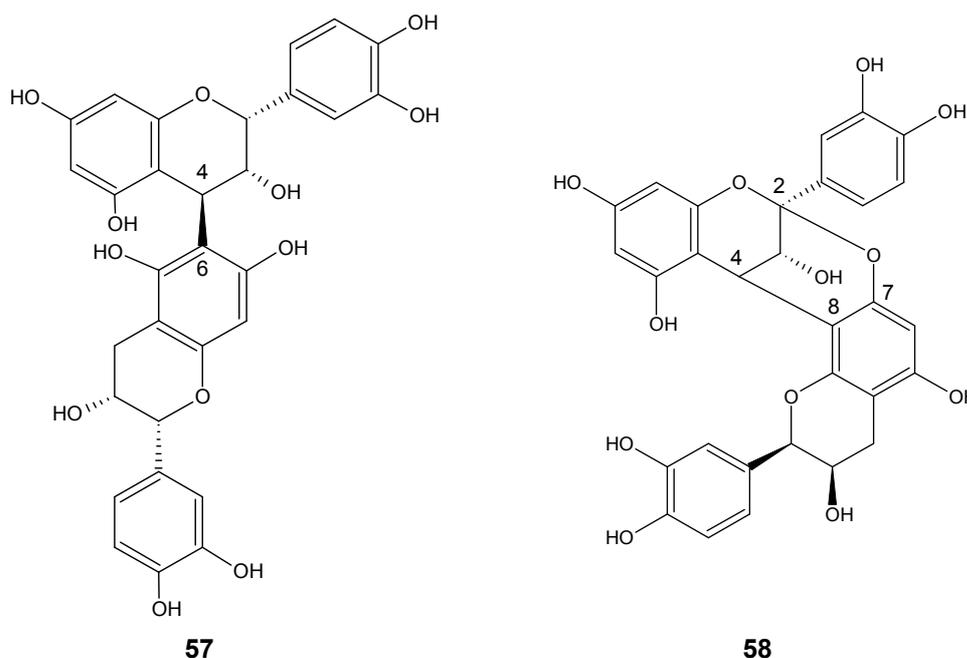


Já o fragmento em  $m/z$  288,29 pode ser atribuído ao radical catiônico da catequina **(56)** formado por mecanismo semelhante ao descrito acima.



As unidades de flavan-3-ol constituintes das proantocianidinas são conectadas por ligações entre C4 e C6 ou entre C4 e C8. Quando as unidades estão conectadas apenas por ligações dessa natureza, a proantocianidina formada é classificada como sendo do **tipo B**, por exemplo, a proantocianidina B5 **(57)**. Em algumas moléculas, as unidades monoméricas estão unidas por duas ligações distintas, incluindo a ligação descrita anteriormente, e uma segunda ligação do tipo C-O, formada entre a hidroxila em C7-OH ou C5-OH e o carbono C2, sendo essas substâncias classificadas como proantocianidinas do **tipo A** (proantocianidina A1, **58**).

No presente trabalho, as massas dos íons *quasi*-moleculares obtidos para PP1 e PP2, em  $m/z$  1281,4, são compatíveis com proantocianidinas constituídas por duas unidades de afzelequina e duas unidades de catequina, conectadas por duas ligações do tipo A e uma do tipo B, além de um resíduo de açúcar ( $C_{66}H_{56}O_{27}$ ,  $[M+H]^+$  1282,03). A massa dessas duas substâncias difere de PP3 em 162 unidades de massa, correspondente a um resíduo de açúcar ( $C_6H_{10}O_5$ ).



A identificação das unidades constituintes das proantocianidinas isoladas foi confirmada pela análise dos espectros de RMN de  $^1H$  (Figura 30 a 32) e de  $^{13}C$  (Figura 26 a 28). Na faixa de deslocamentos químicos compatível com carbonos aromáticos, observamos a presença de sinais intensos em  $\delta$ 128,85 e 114,85 ppm, correspondentes a carbonos metínicos, de acordo com a análise do sub-espectro DEPT-135 (Tabela 18, Figura 29). A análise do mapa de contornos HSQC indicou a correlação desses sinais com os sinais de hidrogênio centrados em  $\delta$ 6,88 ppm (d,  $J = 8,4$  Hz, H2' ou H6') e 6,75 ppm (d,  $J = 8,4$  Hz, H2' ou H6'); 6,58 ppm (d,  $J = 8,4$  Hz, H3' ou H5') e 6,53 ppm (d,  $J = 8,4$  Hz, H3' ou H5'), respectivamente (Figuras 33 e 34), característicos de anel aromático 1,4-dissubstituído. Essa atribuição foi feita com base nos valores de deslocamento químico dos sinais de carbono e hidrogênio típicos de sistema aromático, da multiplicidade observada e dos valores das constantes de acoplamento, compatíveis com acoplamento *orto*. O sinal em  $\delta$ 155 ppm, cujo valor de deslocamento químico é característico de carbono aromático

oxigenado, apresentou correlação com os hidrogênios atribuídos a H3' e H5' no mapa de correlações HMBC (Tabela 18, Figura 35 e 36) e foi atribuído ao carbono hidroxilado C4' do anel B. Em conjunto, esses resultados confirmam a proposta anterior, feita a partir da análise dos espectros de massa, de que a afzelequina (ou seu epímero correspondente, epiafzelequina) (**52**) é um dos monômeros constituintes de PP1.

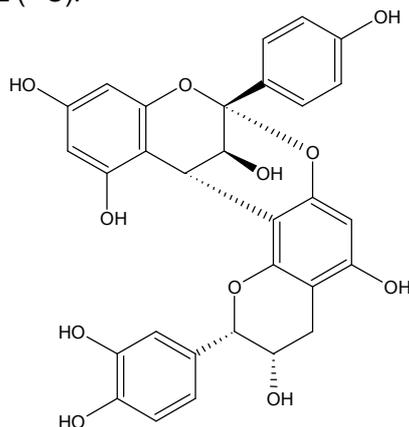
Para fins de comparação, na Tabela 17 estão listadas as atribuições do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$  do anel B de PP1 e dados relatados na literatura para a proantocianidina *ent*-epiafzelequina-(4 $\alpha$ →8, 2 $\alpha$ →O→7)-(-)epicatequina (**59**).

Tabela 17: Comparação dos dados de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  para o anel B das unidades flavan-3-ol de PP1 e de *ent*-epiafzelequina-(4 $\alpha$ →8, 2 $\alpha$ →O→7)-(-)epicatequina.

H/C	Afzelequina <sup>a</sup> m, J(Hz)		Afzelequina <sup>b</sup> m, J(Hz)		Catequina <sup>a</sup> m, J(Hz)		Catequina <sup>b</sup> m, J(Hz)	
	$\delta\text{H}$	$\delta\text{C}$	$\delta\text{H}$	$\delta\text{C}$	$\delta\text{H}$	$\delta\text{C}$	$\delta\text{H}$	$\delta\text{C}$
1'	-	133,0 e 133,3	-	130,1	-	n.d.	-	131,3
2'	6,58 ou 6,52 (d; 8,4)	128,8	7,57 (d; 8,7)	129,4	7,2 (sl)	114,3	7,21 (d; 1,4)	115,1
3'	6,75 ou 6,88 (d; 8,4)	114,9	6,88 (d; 8,7)	114,4	-	146,8	-	145,8
4'	-	154,9	-	156,8	-	145,0	-	145,7
5'	6,75 ou 6,88 (d; 8,4)	114,9	6,88 (d; 8,7)	114,4	6,78	115,3	6,87 (d; 7,4)	115,9
6'	6,58 ou 6,52 (d; 8,4)	128,8	7,57 (d; 8,7)	129,4	6,91	121,9	6,89 (dd; 7,4, 1,4)	119,3

<sup>a</sup>Dados obtidos no presente trabalho para PP1, em DMSO 400 MHz ( $^1\text{H}$ ) 100 MHz ( $^{13}\text{C}$ )

<sup>b</sup>Dados relatados por Prasad (2000) para *ent*-epiafzelequina-(4 $\alpha$ →8, 2 $\alpha$ →O→7)-(-)epicatequina em  $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$ , 500 MHz ( $^1\text{H}$ ) 125 MHz ( $^{13}\text{C}$ ).



**59**

No mapa de contornos HSQC obtido para PP1, podemos ainda observar a presença de sinais de carbono em  $\delta$ 121,86; 115,33 e 114,28 ppm que apresentam manchas de correlação com os sinais de hidrogênio em  $\delta$ 6,80 (d,  $J = 9,2$  Hz); 6,91

(m) e 7,2 ppm (sl), respectivamente (Tabela 18, Figuras 33 e 34). Os valores de deslocamento químico observados e a multiplicidade dos sinais são compatíveis com anel aromático 1,3,4-trissubstituído, sendo o sinal em  $\delta$  121,85 ppm atribuído ao carbono C6', aquele em 114,27 ppm à C2' e aquele em 115,33 ppm à C5' do anel B. Por sua vez, os sinais em  $\delta$  145,0 e 146,8 ppm, correspondentes a carbonos aromáticos oxigenados, apresentaram correlação com os hidrogênios H5' e H2', respectivamente, no mapa de correlações HMBC e foram atribuídos aos carbonos hidroxilados C4' e C3' do anel B. Esses dados possibilitaram confirmar que a catequina (ou a epicatequina) (**53**) também é unidade constituinte de PP1, confirmando os dados obtidos no espectro de massas. A presença de unidades de catequina e afzelequina (ou de seus epímeros) na estrutura confirma que PP1 é uma proantocianidina heterogênea, conforme sugerido pela análise do espectro de UV.

Tabela 18: Correlações heteronucleares  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  observadas para PP1 nos experimentos de RMN bidimensional HSQC e HMBC.

$\delta^{13}\text{C}$ (ppm)	$\delta^1\text{H}$ (ppm; J, Hz) HSQC	$\delta^1\text{H}$ (ppm; J, Hz) HMBC	DEPT-135	Atribuição C
33,9	2,27 (m)	-	CH <sub>2</sub>	C4 unidade terminal
60,8	3,72 (sl), 3,5 (m)	3,3	CH <sub>2</sub>	C6''
69,9	3,5	-	CH	C3 ou C4''
70,1	3,3	-	CH	C3 ou C4''
73,3	3,4	-	CH	C2''
75,9	3,4	-	CH	C3''
76,4	3,4	-	CH	C3 ou C5''
77,3	3,4	-	CH	C3 ou C5''
78,6	5,2	-	CH	C2
101,6	4,73 (m), 6,45 (sl)	3,4	CH	C1'', C8 e/ou C6
114,3	7,2 (sl)	6,91	CH	C2' Cat
114,9	6,58 (d, 8,4), 6,52 (d, 8,4)	6,75 e 6,88 (d, 8,4), 6,58 e 6,52 (d, 8,4)	CH	C3' e C5' Afz
115,33	6,78 (sl)	-	CH	C5' Cat
121,9	6,91	-	CH	C6' Cat
128,8	6,75 (d, 8,4), 6,88 (d, 8,4)	6,58 e 6,52 (d, 8,4), 6,75 e 6,88 (d, 8,4)	CH	C2' e C6' Afz
133,0 e 133,3	-	6,58 e 6,52 (d, 8,4), 6,75 (d, 8,4),	C	C1' Afz
145,0	-	6,75 (d, 8,4), 6,75 e 6,88 (d, 8,4),	C	C4' Cat
146,8	-	7,2 (sl)	C	C3' Cat
154,9	-	6,58 e 6,52 (d, 8,4), 6,75 e 6,88 (d, 8,4)	C	C4' Afz
155,5	-	-	C	C8a ou C5 ou C7
155,8	-	-	C	C8a ou C5 ou C7
158,9	-	-	C	C8a ou C5 ou C7

Nota: Cat, catequina; Afz, afzelequina

Os sinais em 133,26 e 133,03 ppm, correspondentes a carbonos aromáticos não hidrogenados, foram atribuídos aos carbonos C1' dos anéis B das unidades de afzelequina. Esses sinais apresentam correlação com os sinais dos hidrogênios H2'

e H6' em  $\delta$ 6,58 e 6,53 ppm no mapa de contornos HMBC (Tabela 18, Figuras 35 e 36). A presença de dois sinais atribuídos a C1' é evidência adicional de que PP1 contém duas unidades de afzelequina em sua estrutura. Os sinais correspondentes a C1' das duas unidades de catequina não foram identificados no espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  obtido para PP1.

Não foi possível confirmar o padrão de substituição do anel A (C5 e C7) das unidades monoméricas através da análise dos espectros de RMN de  $^{13}\text{C}$ , devido a ausência de sinais para a maioria dos carbonos constituintes desse sistema aromático. A não detecção dos sinais pode ser atribuída à maior rigidez do sistema, em comparação com o anel B, devido a presença de ligações do tipo A entre as unidades. A rigidez imposta aos anéis A e C poderia alterar o tempo de relaxação dos átomos de carbono do sistema, o que justificaria a ausência da maioria deles no espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$ , como por exemplo dos carbonos não-hidrogenados que participam da ligação interflavonóide (C6 ou C8, e C2), bem como de C5 e C7.

Os sinais dos carbonos alifáticos não oxigenados das proantocianidinas (C4) apresentam valores de deslocamento químico em torno de 30 ppm (PRASAD, 2000). No espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  obtido para PP1 (Figuras 26 a 28), observamos a presença de um sinal em  $\delta$ 33,93 ppm, que foi atribuído ao carbono metilênico C4 da unidade terminal da proantocianidina, atribuição esta confirmada pela análise do sub-espectro DEPT-135 (Figura 29). Como mencionado anteriormente, em proantocianidinas, a ligação entre as unidades de flavan-3-ol se dá pelos carbonos C4 e C6 ou C4 e C8, existindo, portanto, apenas um carbono metilênico no esqueleto da molécula, correspondente à unidade terminal. Os sinais referentes aos C4 das demais unidades, que participam da ligação interflavonóide (CH), não foram identificados no espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  obtido para PP1, provavelmente por estarem superpostos pelo sinal do solvente utilizado (DMSO,  $\delta$ 39,5 ppm).

Já os carbonos alifáticos oxigenados de uma proantocianidina (C2 e C3) apresentam deslocamento químico na faixa entre 60 e 80 ppm (PRASAD, 2000). No espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  obtido para PP1, a identificação inequívoca desses sinais foi dificultada pela presença da porção heterosídica da molécula, cujos carbonos também apresentam deslocamentos químicos nessa região.

A estereoquímica relativa dos carbonos C2 e C3 das unidades formadoras das proantocianidinas é usualmente definida com base no valor da constante de

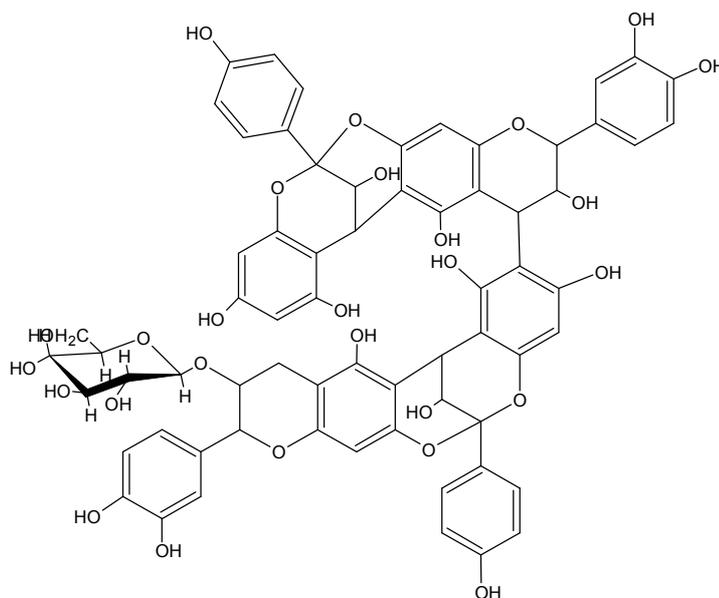
acoplamento escalar entre H2 e H3. No entanto, os sinais desses hidrogênios não foram inequivocamente identificados no espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de PP1. Alguns autores relatam a definição da estereoquímica relativa desses centros baseada no deslocamento químico do carbono C2, sendo o valor mais afastado do TMS (80-84 ppm) associado com a configuração 2,3-*trans*, enquanto o valor mais próximo do TMS (75-79 ppm) indicaria a configuração 2,3-*cis* (FOO et al, 2000; SIVAKUMARAN et al, 2004). No entanto, as faixas descritas são muito próximas e essa distinção só é viável em casos onde se observam sinais nas duas faixas. Assim, não foi possível identificar qual dos epímeros de afzelequina e catequina estão presentes na estrutura de PP1.

A presença de um resíduo de açúcar na estrutura de PP1, conforme indicada pelo espectro de massas, foi confirmada pelos sinais em  $\delta$  60,8 e 101,6 ppm, atribuídos ao carbono metilênico C-6'' do açúcar e ao carbono anomérico C-1'', respectivamente. O sinal correspondente ao hidrogênio anomérico H1'' ( $\delta$  4,73 ppm) não apresentou multiplicidade definida que possibilitasse definir sua estereoquímica relativa, a partir do acoplamento com H2'' e, portanto, não foi possível definir a natureza da ligação heterosídica como  $\alpha$  ou  $\beta$ . Os demais sinais dos carbonos da porção heterosídica de PP1 possuem correlação com sinais de hidrogênios em  $\delta$  3,3 a 3,5 ppm no mapa de correlações HSQC (tabela 18, figuras 33 e 34). No entanto, esses sinais apresentaram-se superpostos pelos sinais de hidrogênio da água residual do solvente utilizado (DMSO), inviabilizando a identificação do açúcar constituinte de PP1.

Devido à insuficiência de massa, e as limitações das técnicas espectrométricas empregadas, não foi possível estabelecer a estrutura final de PP1. Para tanto, faz-se necessário obter maiores massas e realizar estudos de degradação por tiólise (FITZPATRICK, et al, 2004; SIVAKUMARAN et al, 2004; FAN et al, 2007), para definir a posição das ligações interunidades, bem como hidrólise ácida para identificar inequivocamente o carboidrato constituinte. Além disso, outras condições experimentais de RMN devem ser avaliadas, empregando maiores massas nos experimentos e buscando contornar a questão do tempo de relaxação de alguns átomos de carbono dos anéis A e C. Por fim, deverá ser realizado um estudo para definir a estereoquímica absoluta de cada centro assimétrico da

molécula, empregando difração de raios X, na possibilidade de se obter cristais da molécula, e/ou dicroísmo circular.

Apesar de todas as limitações descritas, o uso de técnicas de RMN de  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$  mono e bidimensionais no presente trabalho, associadas à espectrometria de massas, IV e UV, permitiu identificar as unidades monoméricas de PP1 como sendo afzelequina e catequina, ou seus epímeros correspondentes, bem como a presença de um resíduo de açúcar. Para fins de ilustração, apresentam-se, a seguir, duas **estruturas hipotéticas** para PP1, formadas pela ligação interflavonóide do tipo B entre os carbonos C4 e C6 (**60**) e entre C4 e C8 (**61**), além de duas ligações do tipo A em cada estrutura, compatíveis com a massa obtida. A representação dessas estruturas dá uma idéia da complexidade da molécula e, conseqüentemente, da dificuldade para a elucidação estrutural.

**60**

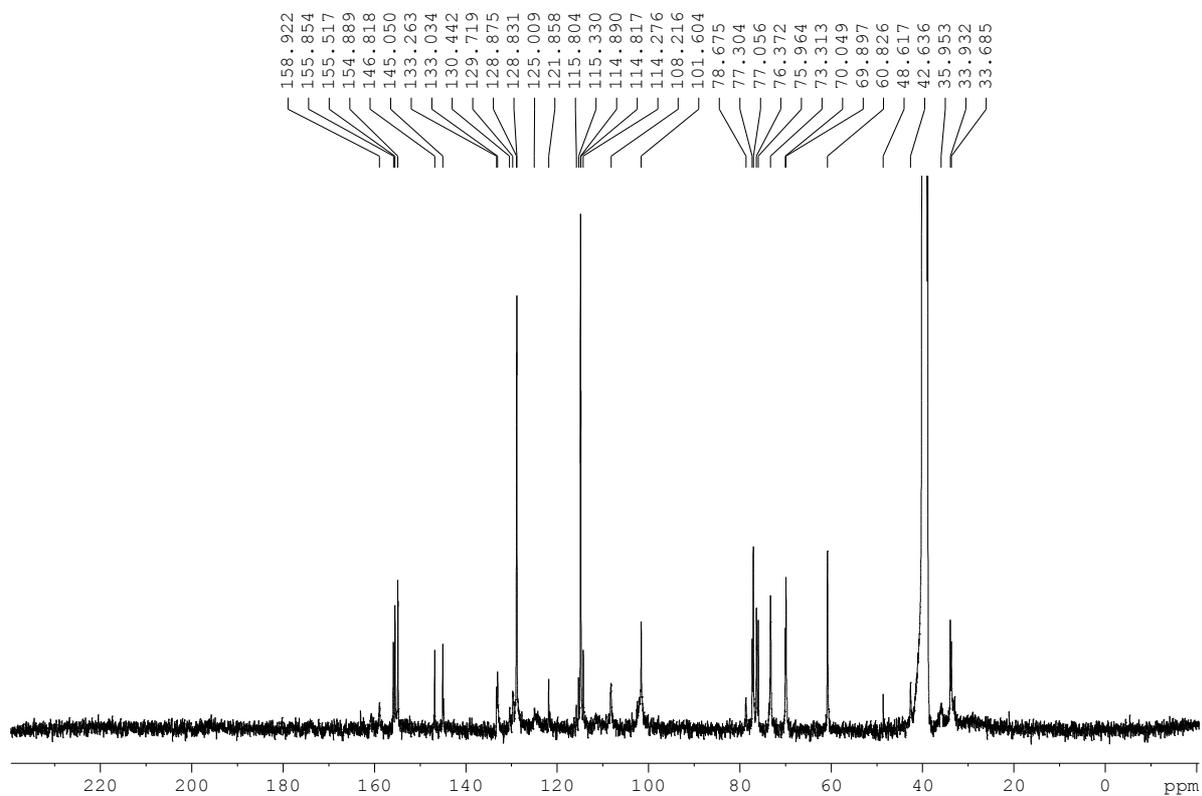
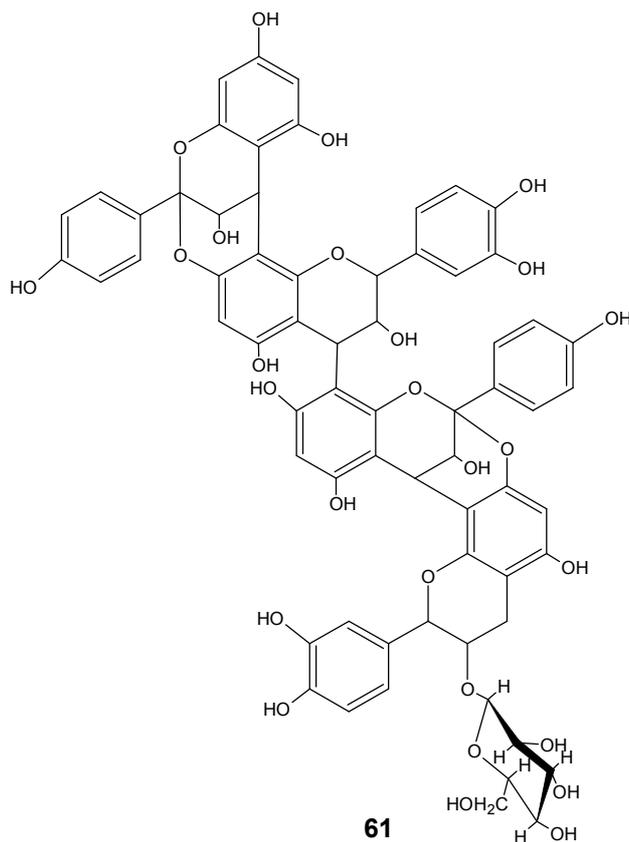


Figura 26: Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  obtido para PP1 (100 MHz, DMSO)

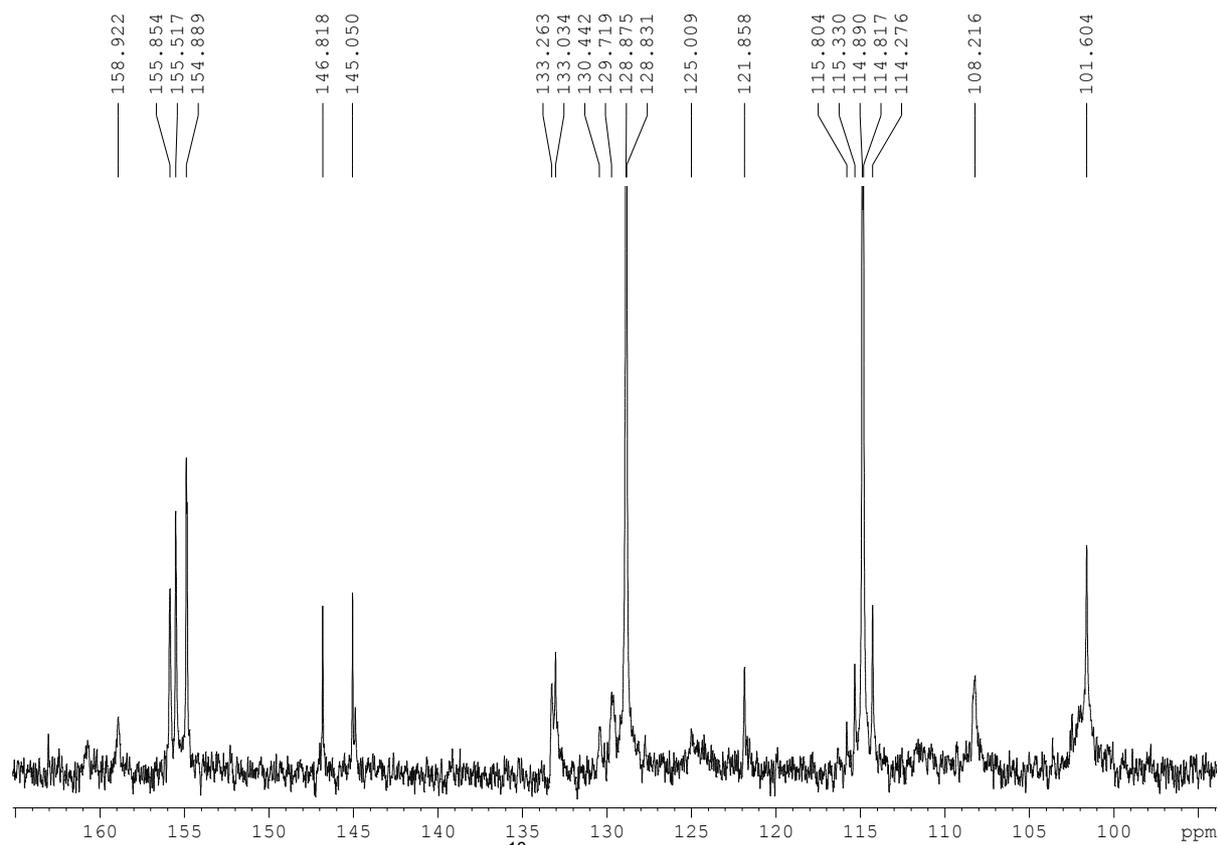


Figura 27: Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  obtido para PP1 - Expansão (100 MHz, DMSO)

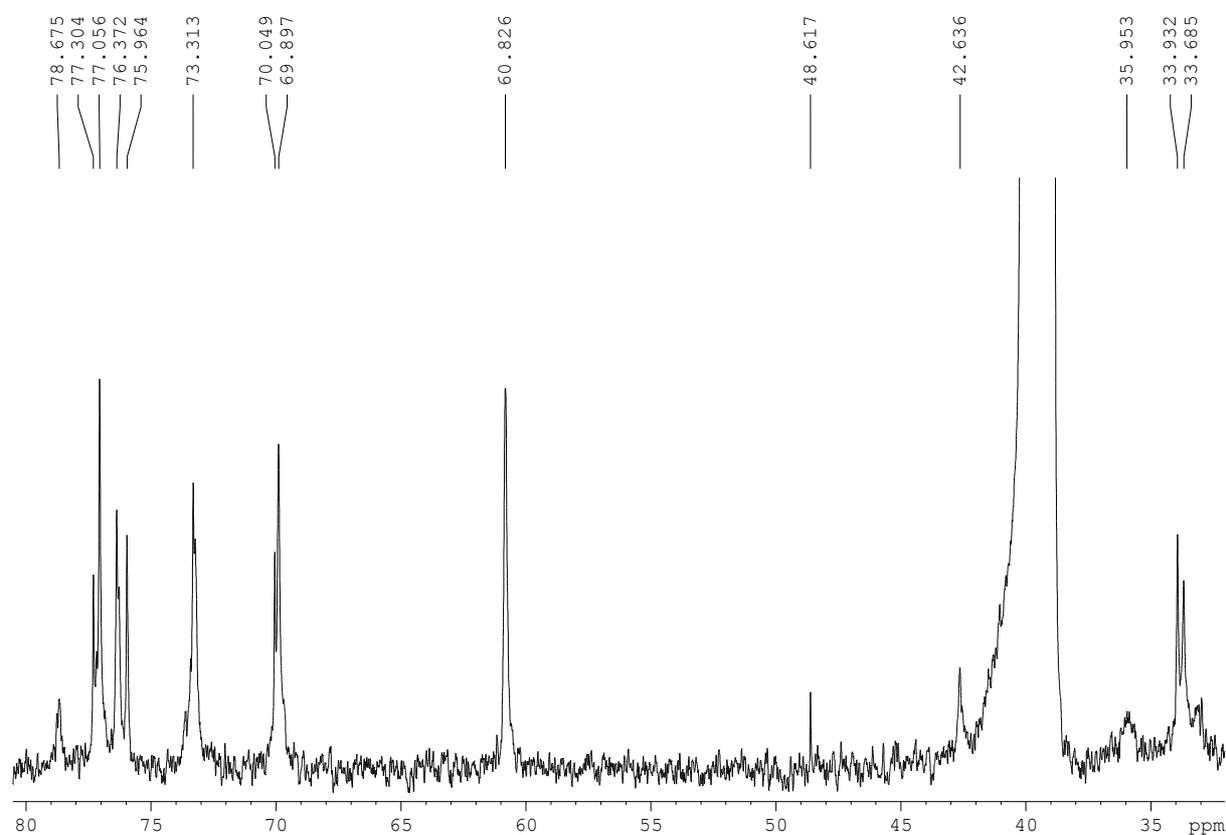


Figura 28: Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  obtido para PP1 - Expansão (100 MHz, DMSO)

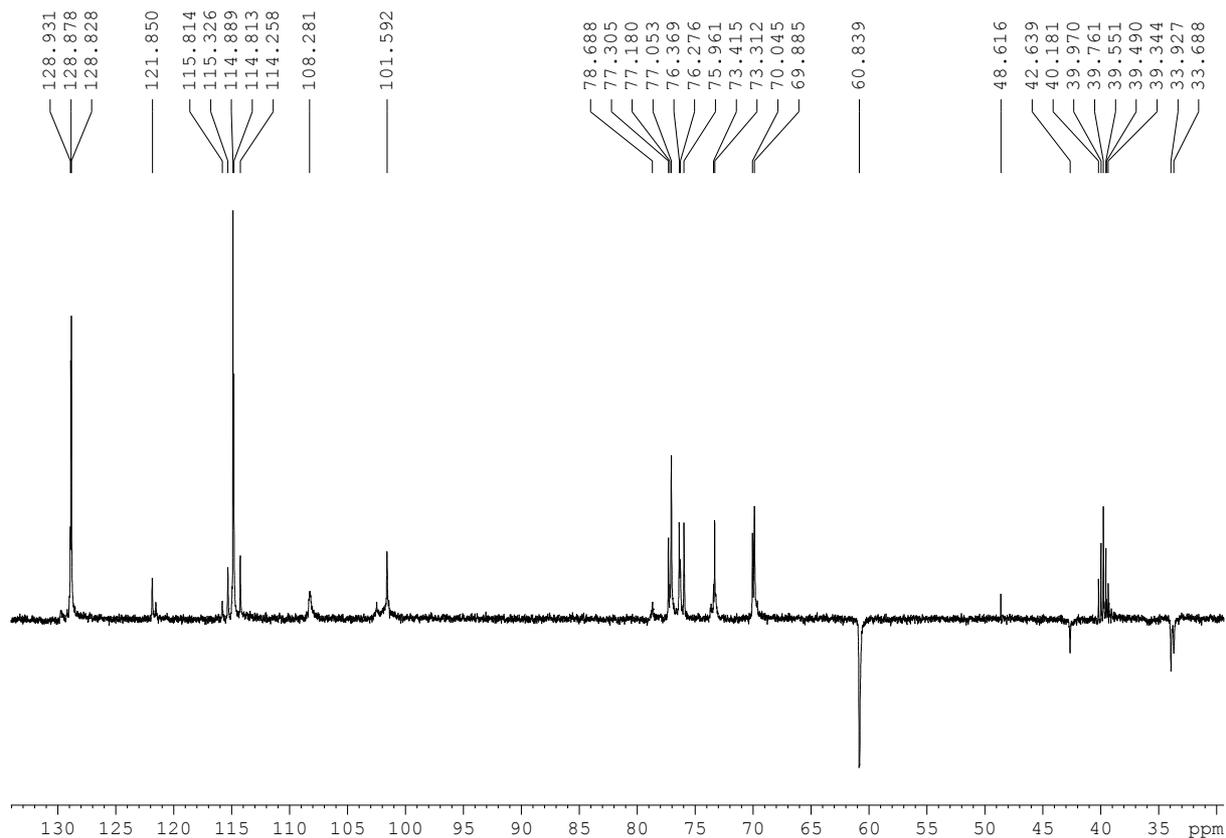


Figura 29: Experimento DEPT-135 obtido para PP1 (100 MHz, DMSO)

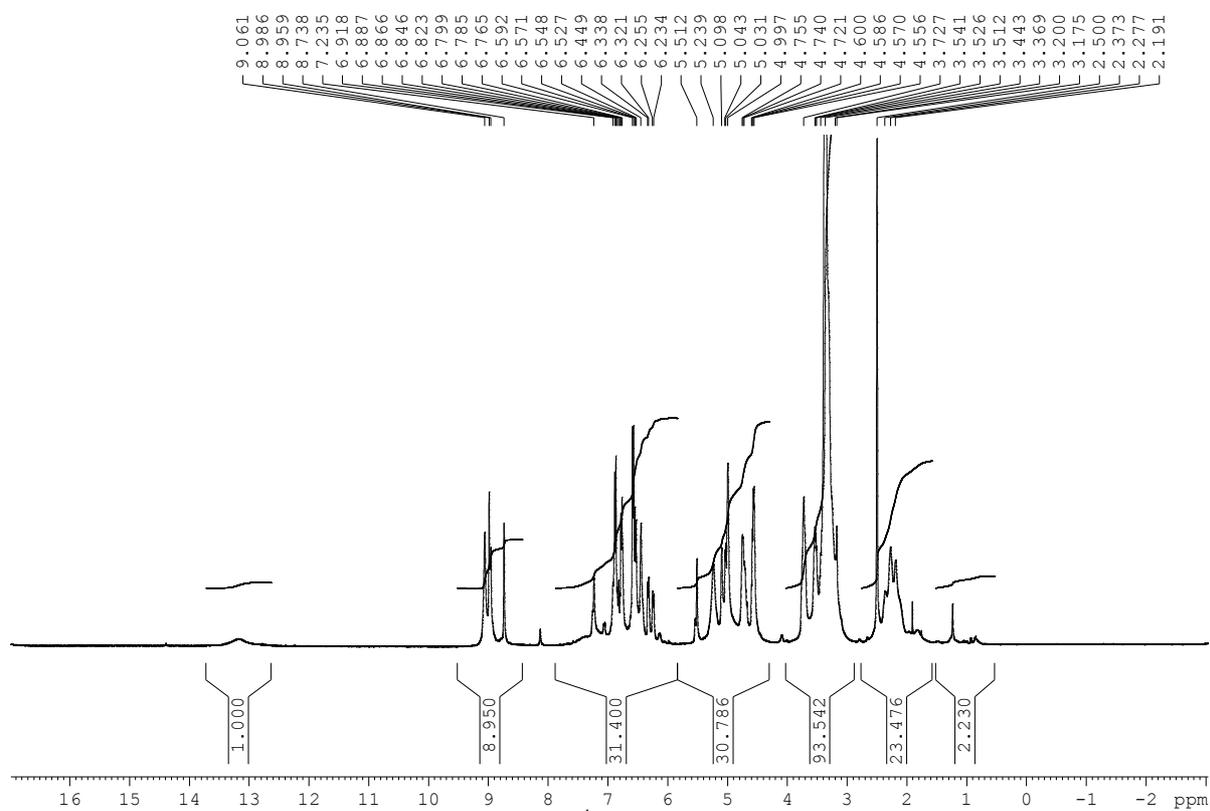


Figura 30: Espectro de RMN de <sup>1</sup>H obtido para PP1 (400 MHz, DMSO)

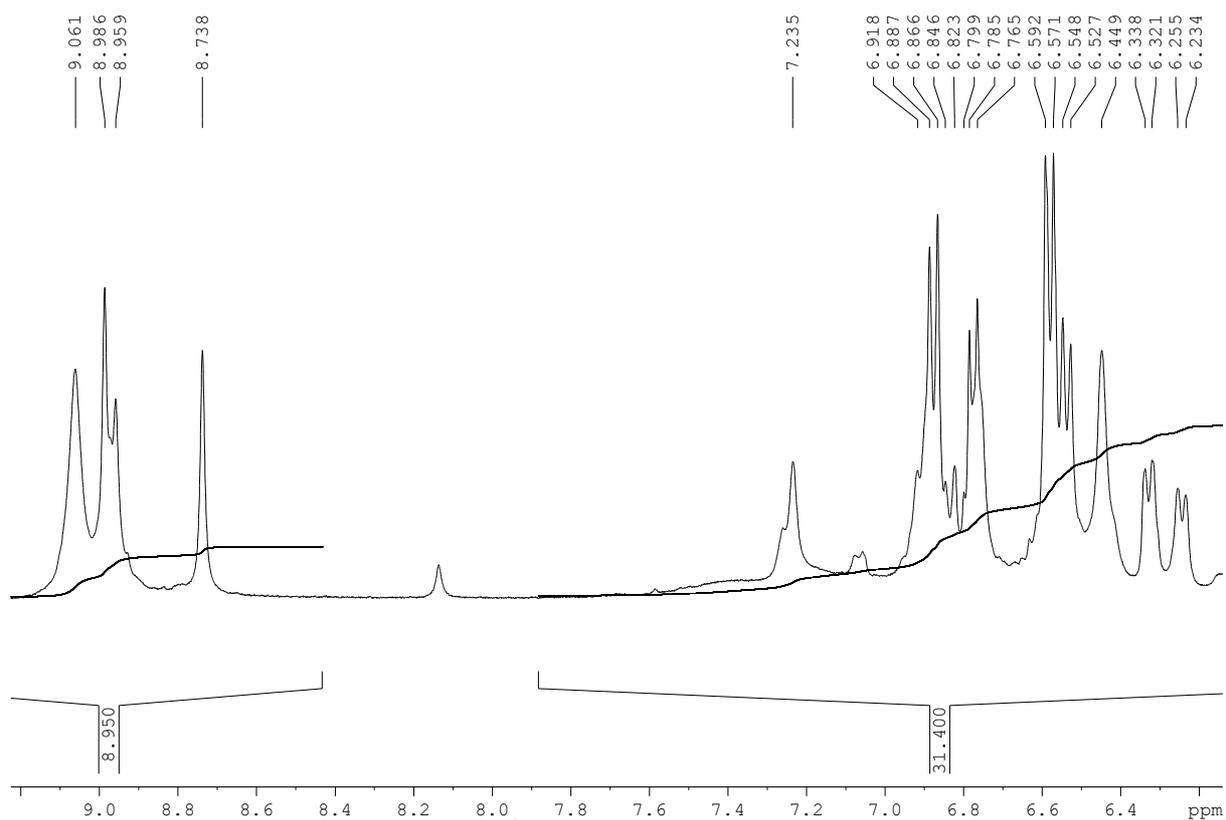


Figura 31: Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  obtido para PP1 - Expansão (400 MHz, DMSO)

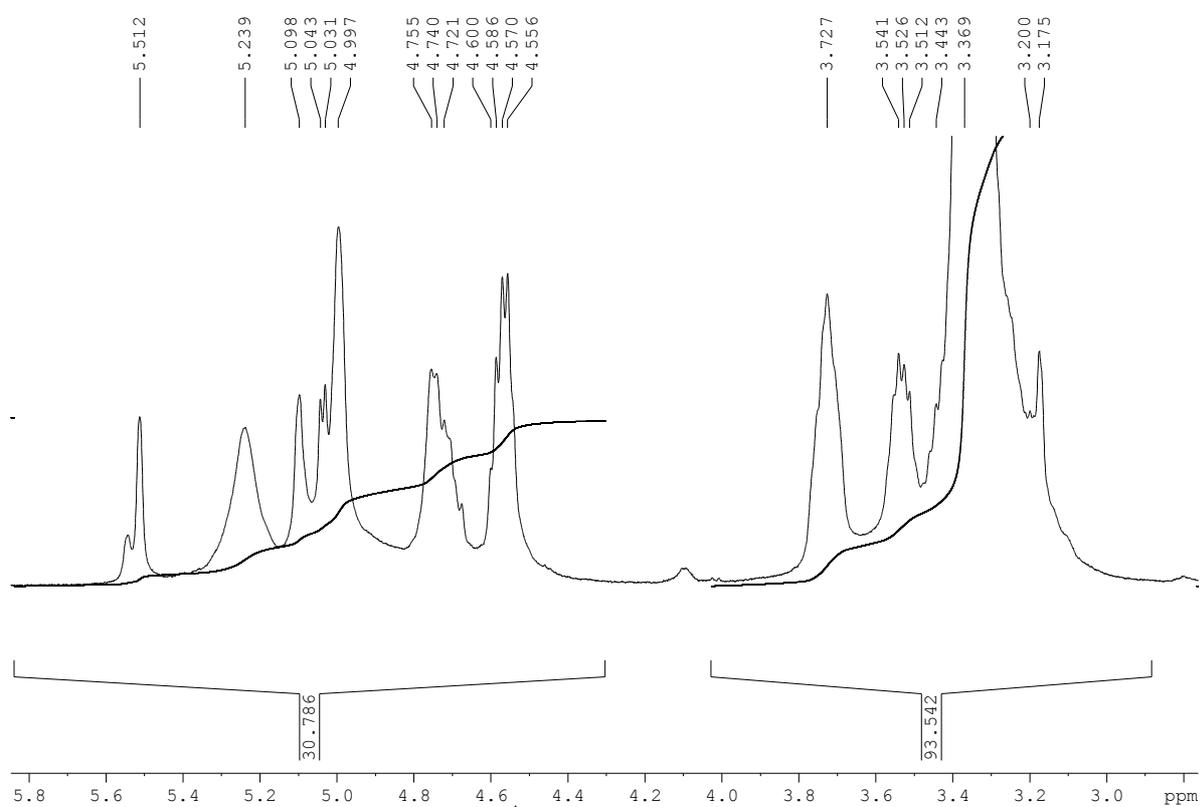


Figura 32: Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  obtido para PP1 - Expansão (400 MHz, DMSO)

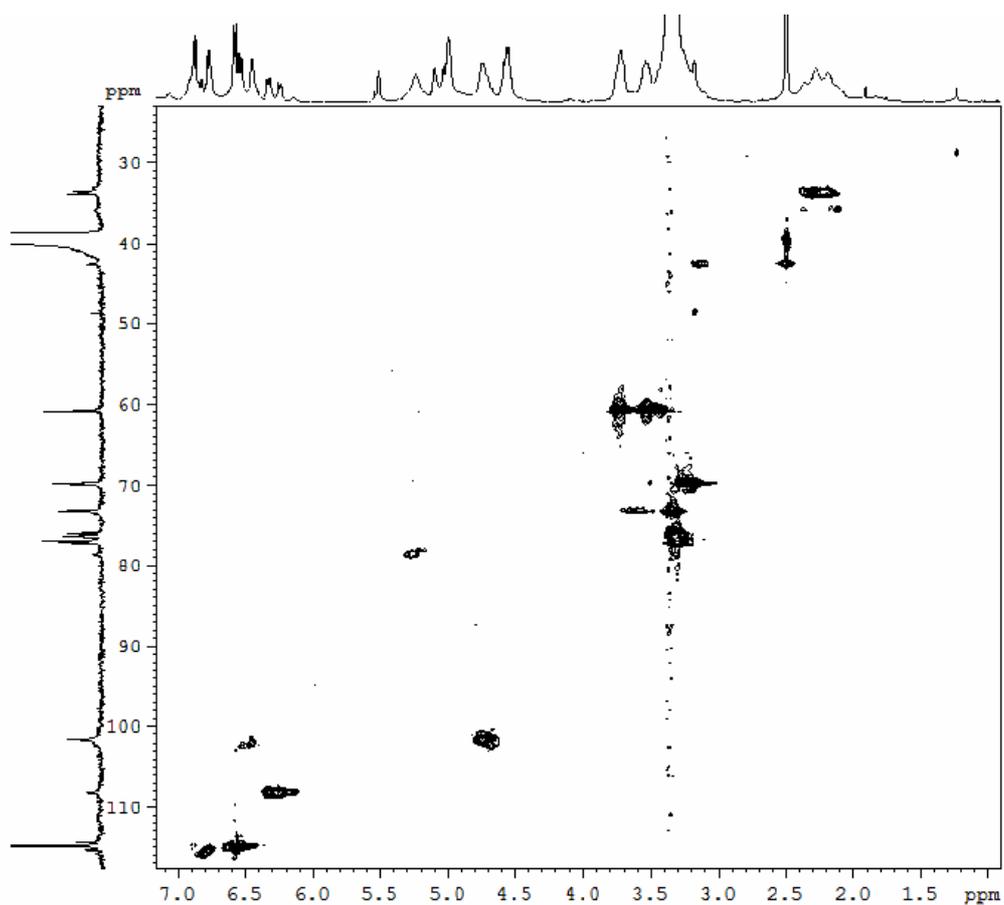


Figura 33: Mapa de correlação HSQC obtido para PP1

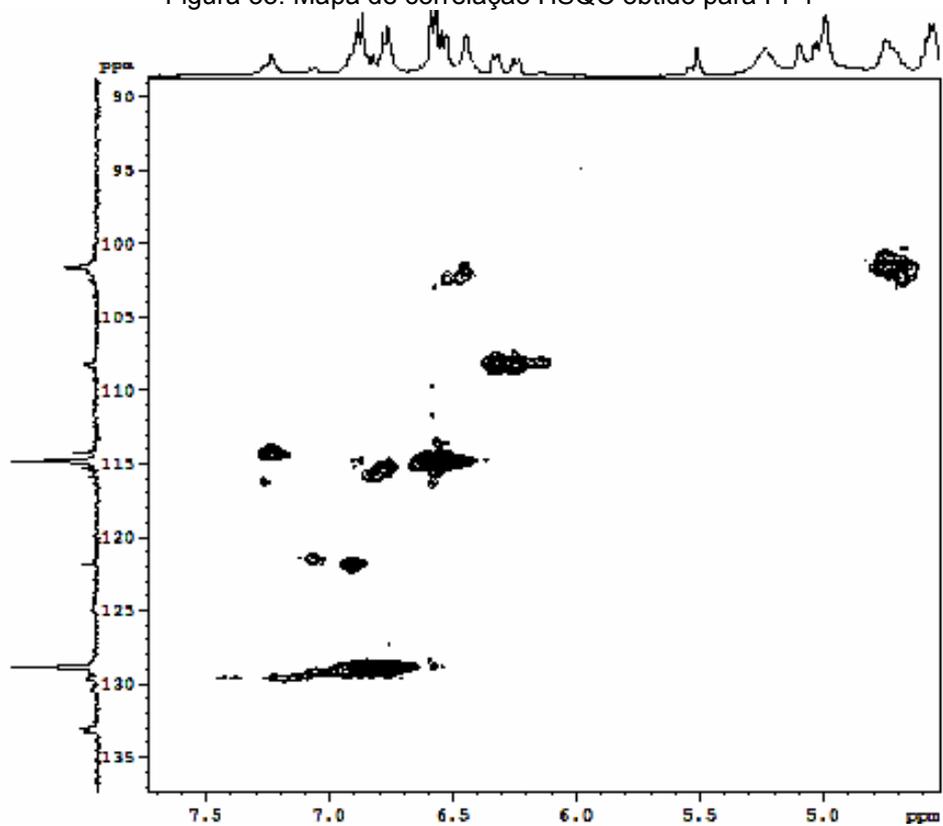


Figura 34: Mapa de correlação HSQC obtido para PP1(Expansão)

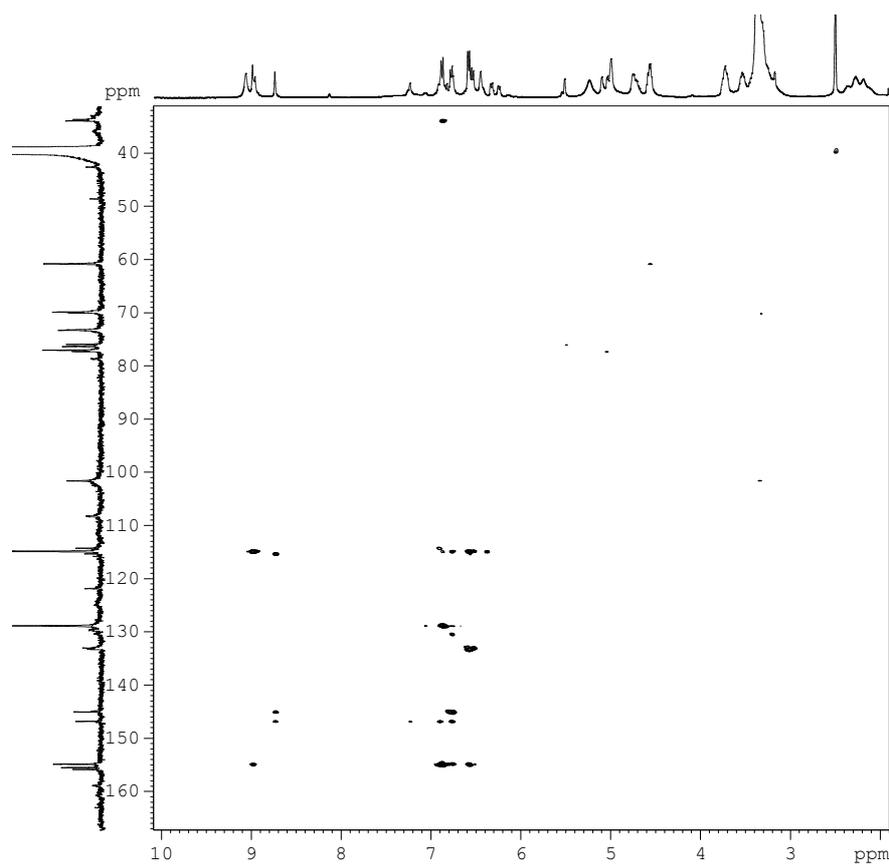


Figura 35: Mapa de correlação HMBC obtido para PP1

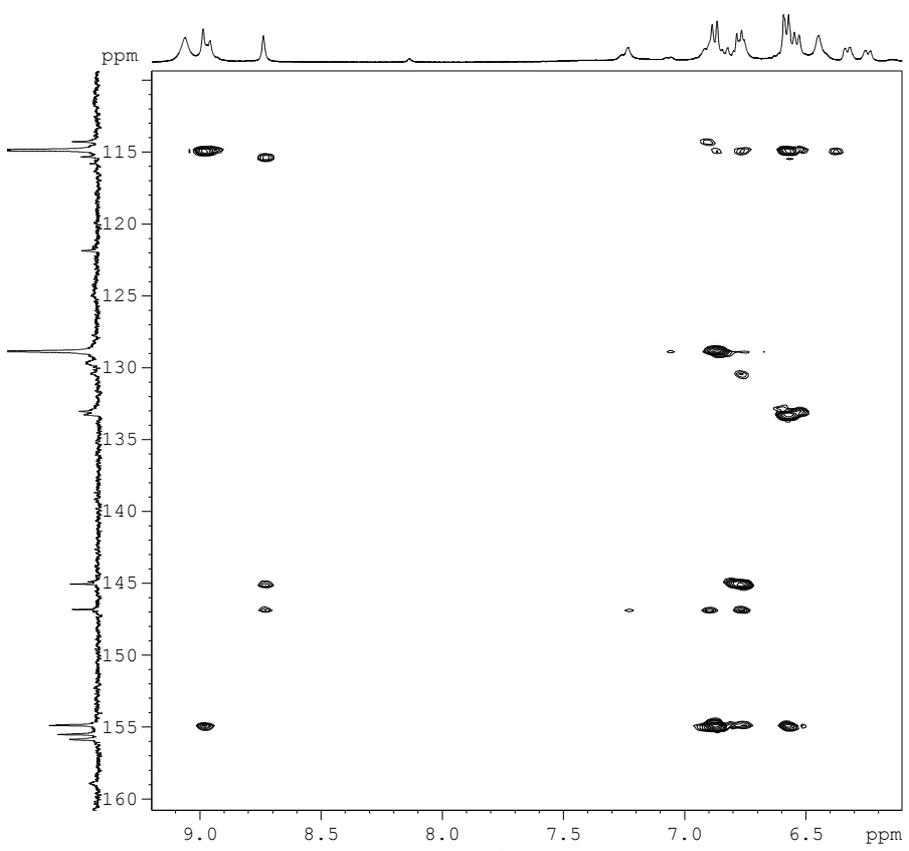


Figura 36: Mapa de correlação HMBC obtido para PP1 (expansão)

Os espectros das substâncias PP2 (Figura 37 a 49) e PP3 (Figuras 40 a 43) foram bastante semelhantes aos obtidos para PP1. Por isso, não foi possível identificar, a partir das técnicas espectrométricas utilizadas, as diferenças estruturais entre elas. A análise dos espectros no UV obtidos *on line* e dos espectros de massa sugerem que PP1, PP2 e PP3 são isômeros, já que apresentam máximos de absorção semelhantes e mesma massa molecular. Ressalta-se que o espectro de massas obtido para PP3 (Figura 25) apresentou uma diferença de 162 unidades de massa em relação a PP1 e PP2, o que sugeriria que PP3 não é um heterosídeo. No entanto, os sinais referentes aos carbonos da porção heterosídica, na região entre  $\delta$  60 a 105 ppm, estão presentes no espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  obtido para PP3 (Figura 40 a 42). Com isso, podemos inferir que o resíduo de açúcar em PP3 se localiza em uma posição na qual sua clivagem é facilitada e, portanto, não foi detectado o íon *quasi*-molecular  $[\text{M}+\text{H}]^+$ .

De maneira semelhante à descrita para PP1, para a elucidação estrutural de PP2 e PP3 deverão ser obtidas maiores massas e empregados outros experimentos de RMN e de degradação química.

Cabe destacar que a presença de proantocianidinas na família Bignoniaceae é relatada pela primeira vez nesse trabalho. Como descrito na revisão bibliográfica, o conhecimento sobre a química do gênero *Mansoa* é ainda bastante incipiente, restringindo-se a naftoquinonas isoladas de *M. alliaceae* e a triterpenos e esteróides isolados de *M. hirsuta*. Portanto, outras espécies de *Mansoa* deverão ser futuramente analisadas a fim de avaliar se essa classe de metabólitos é característica do gênero.

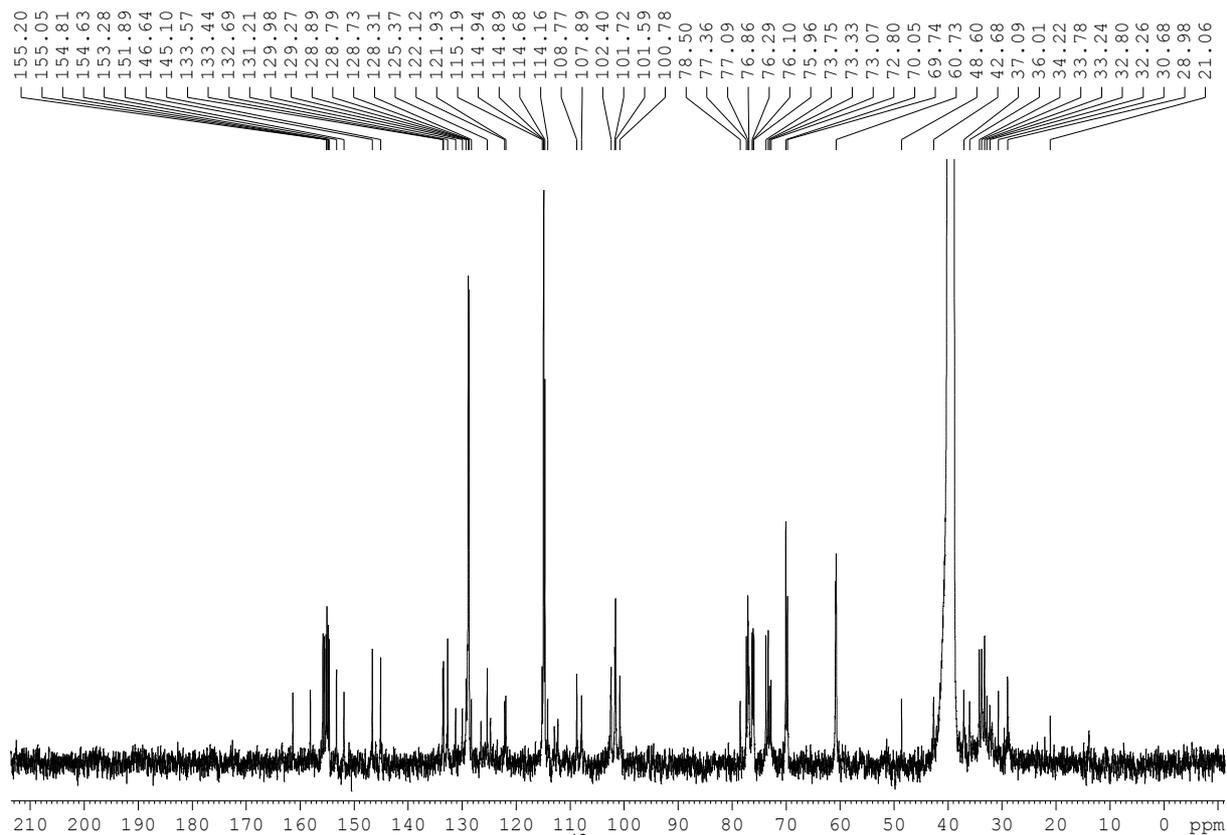


Figura 37: Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  obtido para PP2 - (100 MHz, DMSO)

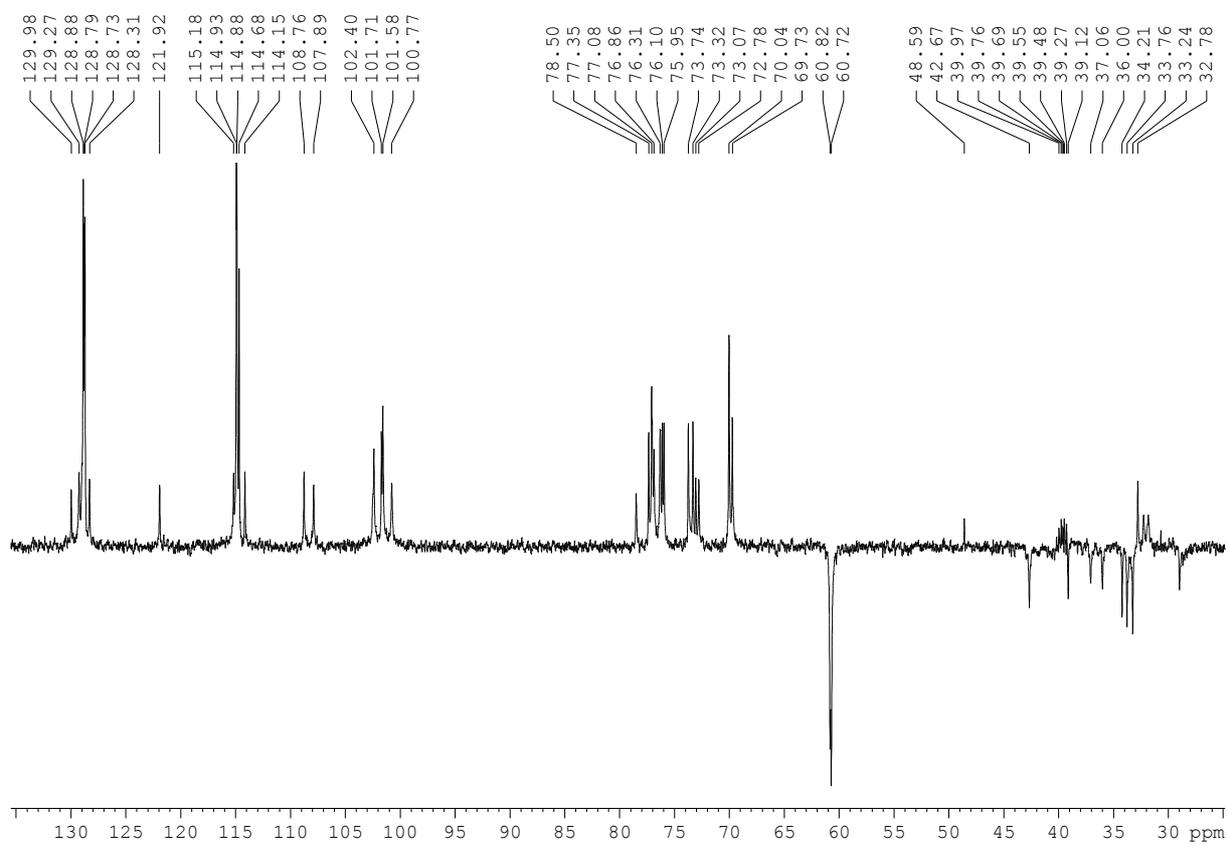


Figura 38: Experimento DEPT-135 obtido para PP2 (100 MHz, DMSO)

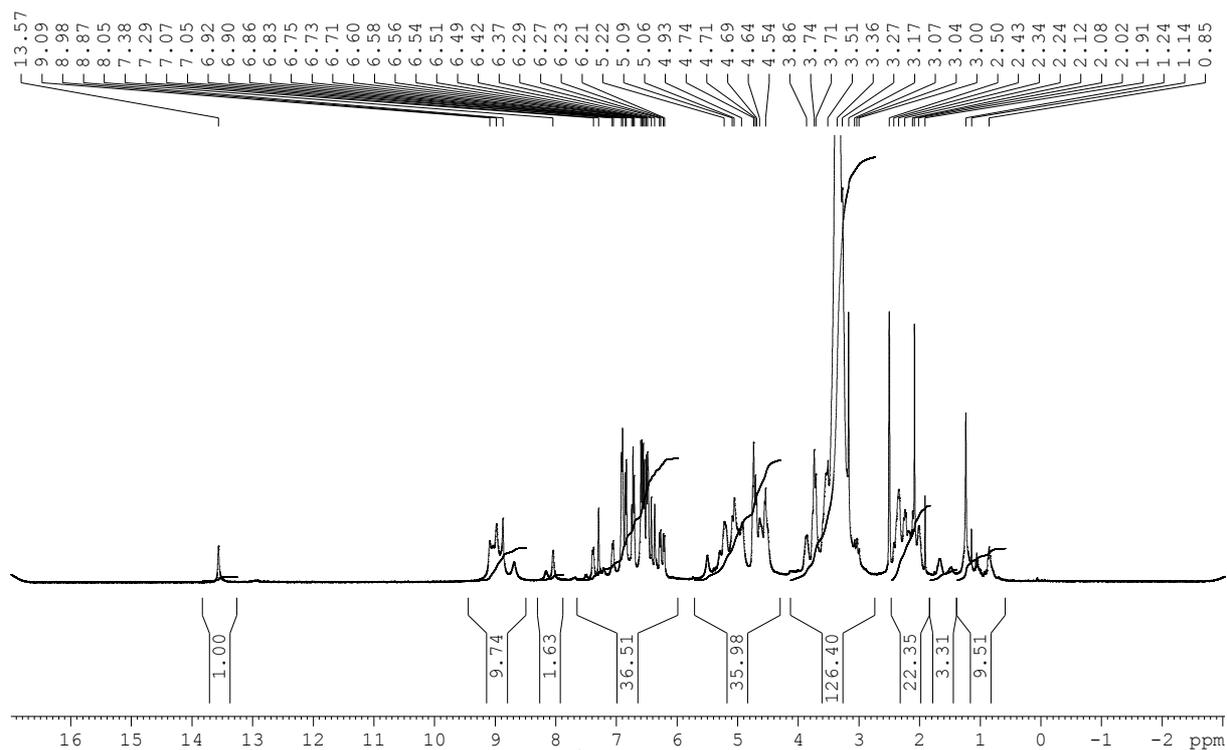


Figura 39: Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  obtido para PP2 - (400 MHz, DMSO)

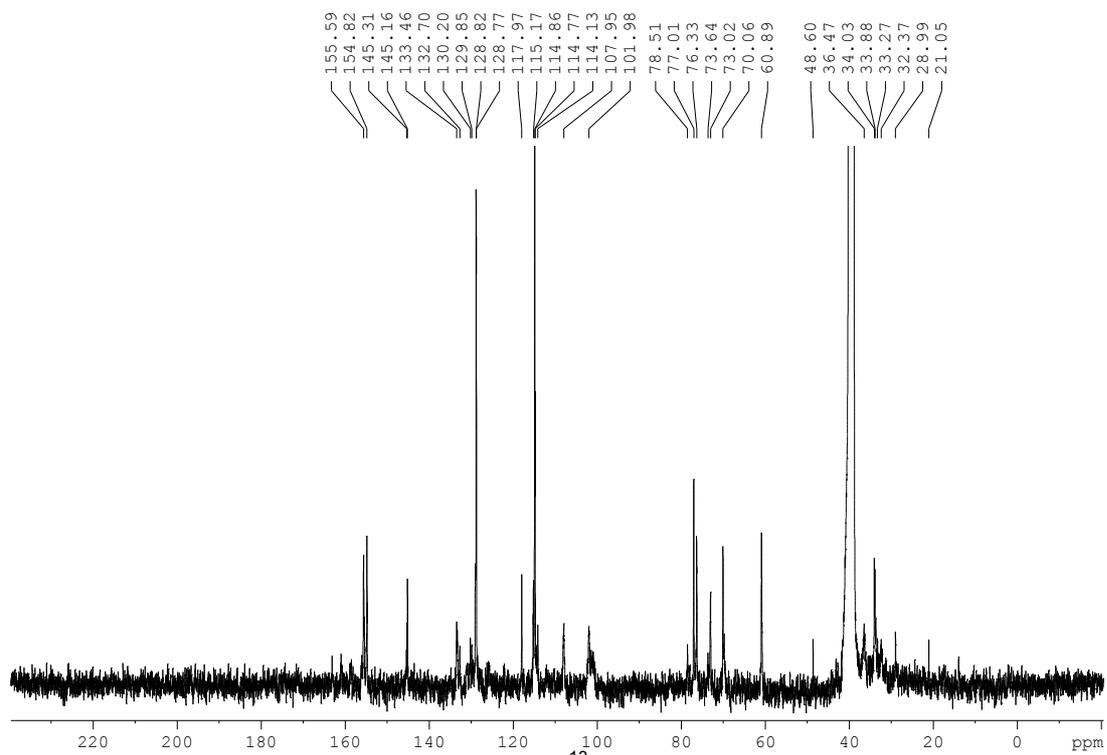


Figura 40: Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  obtido para PP3 - (100 MHz, DMSO)

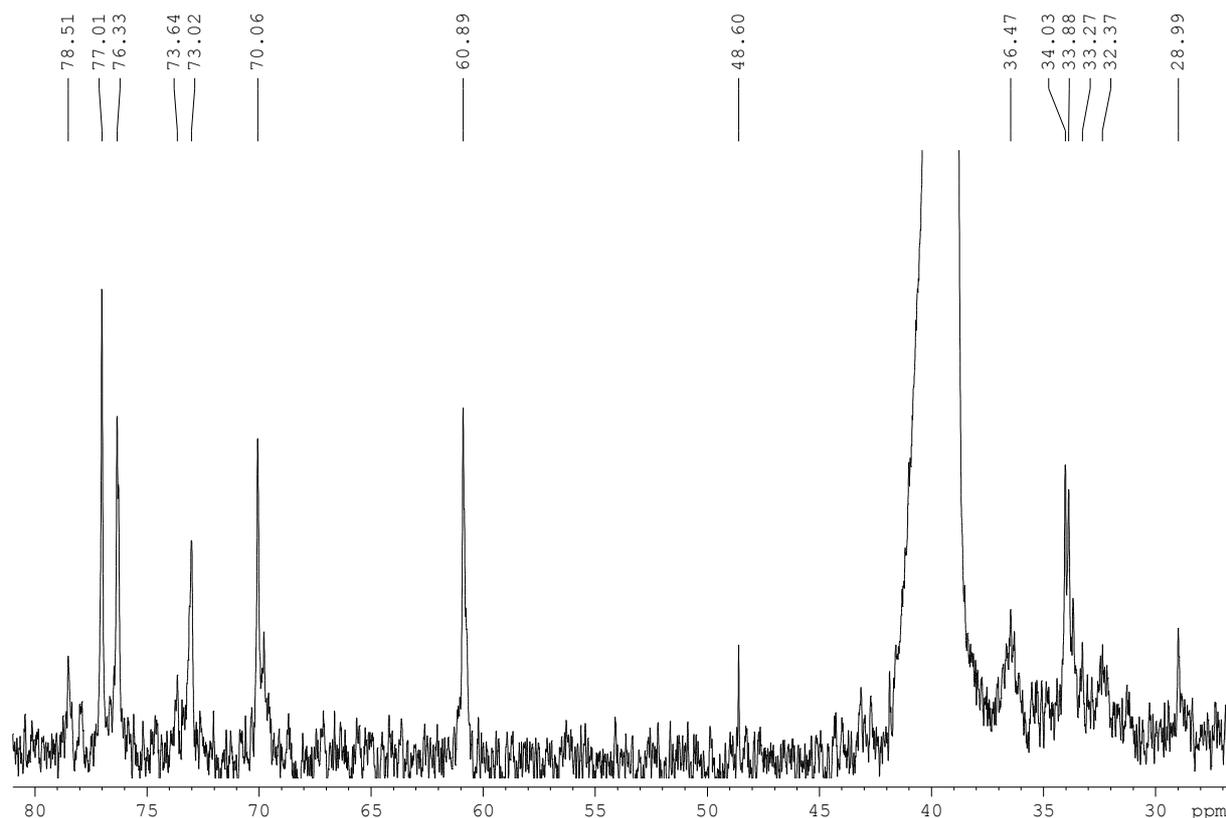


Figura 41: : Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  obtido para PP3 - Expansão (100 MHz, DMSO)

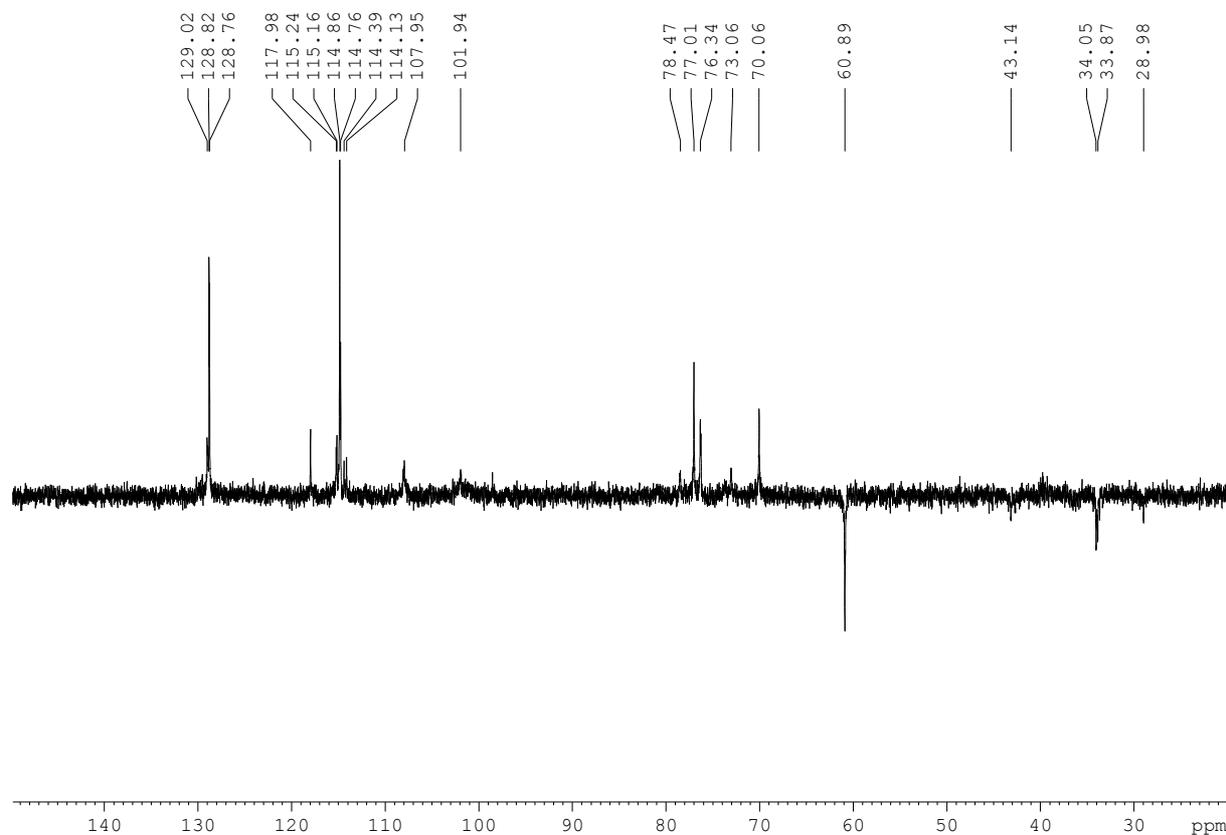


Figura 42: Experimento DEPT-135 obtido para PP3 (100 MHz, DMSO)

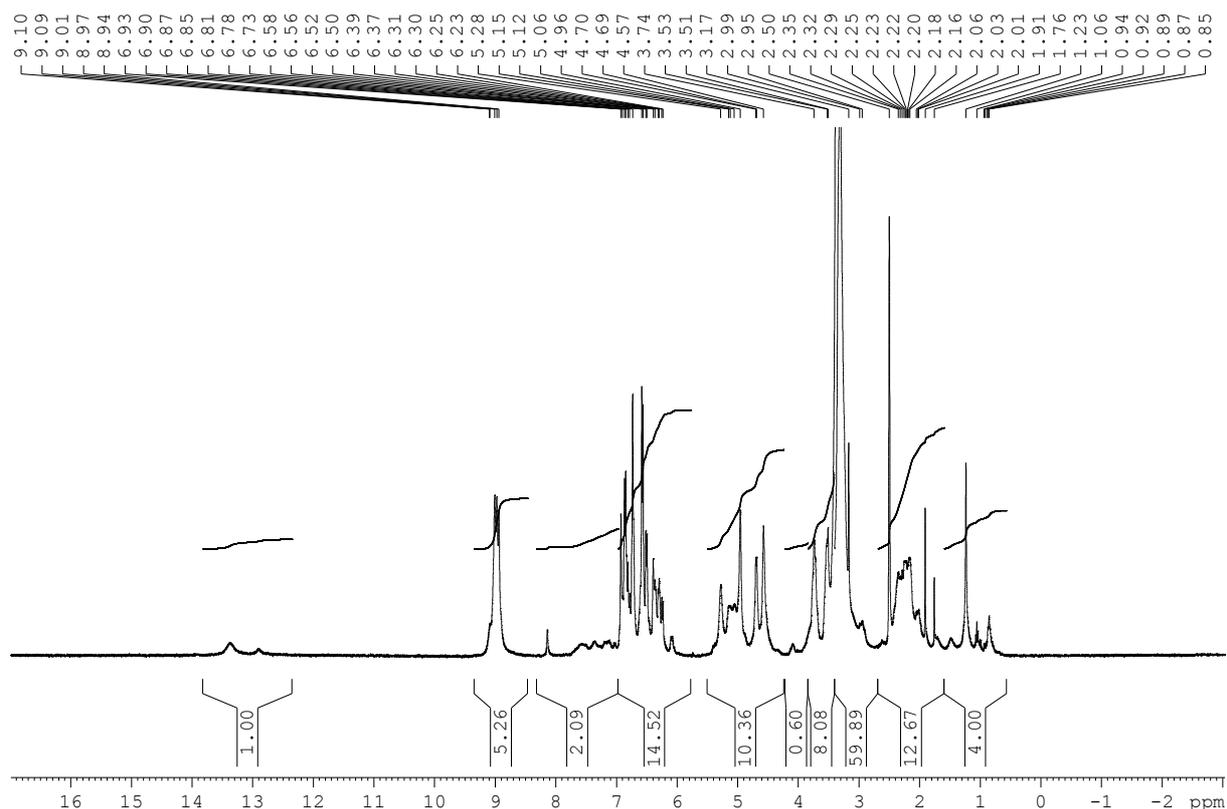


Figura 43: Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  obtido para PP3 - (400 MHz, DMSO)

### 3.4 Avaliação das atividades biológicas das substâncias isoladas

As substâncias isoladas, PP1, PP2 e PP3 foram avaliadas quanto à atividade inibitória da ECA, pelo método colorimétrico (SERRA et al, 2004). O ensaio foi realizado na concentração de 100  $\mu\text{g/mL}$  que corresponde a 86  $\mu\text{mol/L}$ . Os resultados estão apresentados na Tabela 19. Nesse experimento a  $\text{CI}_{50}$  obtida para o captopril, controle positivo, foi de  $22,21 \pm 4,03$  nmol/L. Nessa concentração, as substâncias PP1 e PP2 apresentaram-se ativas enquanto PP3 foi inativa.

Tabela 19: Atividade inibidora da ECA determinada para as substâncias isoladas das folhas de *M. hirsuta*, avaliada pelo método colorimétrico

AMOSTRA	% INIBIÇÃO
PP1	$76,6 \pm 2,7$
PP2	$41,52 \pm 8,7$
PP3	$17,72 \pm 3,4$

Valores representam a média  $\pm$  d.p.m de triplicatas.

Existem vários relatos de proantocianidinas com atividade inibitória da ECA, sendo essa atividade relacionada à estrutura e ao grau de polimerização das moléculas. Actis-Goretta e colaboradores (2003), relataram aumento da atividade inibitória da ECA de acordo com o aumento do grau de polimerização de proantocianidinas, sendo avaliadas epicatequina, catequina, dímero, trímero, tetrâmero, pentâmero e hexâmero, com valores de  $CI_{50}$  de  $1781 \pm 381$ ;  $1593 \pm 443$ ;  $267 \pm 24$ ;  $126 \pm 11$ ;  $12 \pm 1$ ;  $25 \pm 3$  e  $10 \pm 1$   $\mu\text{M}$ , respectivamente (ACTIS-GORETTA et al, 2003). Essa correlação é reforçada pelo trabalho de OTTAVIANI et al (2006) onde proantocianidinas dimérica, tetramérica e hexamérica apresentaram  $CI_{50}$  igua a 97,0; 4,4 e 8,2  $\mu\text{M}$ , respectivamente, quando avaliadas em ECA isolada de pulmão de coelhos. Em ambos estudos, o aumento do grau de polimerização acarretou em aumento da atividade até os tetrâmeros, sendo os pentâmeros menos ativos que esses. A atividade volta a aumentar em relação ao grau de polimerização quando observados o resultado obtido para pentâmeros e hexâmeros. Assim, os tetrâmeros foram os mais ativos dentre as moléculas avaliadas.

No presente trabalho as três substâncias isoladas possuem mesmo grau de polimerização, tetrâmeros, e mesma massa molecular, constituindo, portanto, substâncias isoméricas. Podemos inferir que pequenas variações na estrutura acarretaram em variação na bioatividade dessas substâncias sendo a substância PP1 a mais ativa. No entanto, com base nas informações obtidas através das análises espectrométricas não foi possível estabelecer as diferenças estruturais entre PP1, PP2 e PP3 que acarretaram a redução da atividade inibitória da ECA.

A substância PP1 também foi avaliada quanto à atividade vasodilatadora em anéis de aorta de ratos Wistar, conforme descrito no item 2.9.2. Essa foi a única substância avaliada visto que foi a única da qual se obteve massa suficiente para realização desse ensaio.

PP1 apresentou atividade vasodilatadora, concentração- e endotélio dependente, com  $CI_{50}$  de  $0,25 \pm 0,1$   $\mu\text{mol/L}$  (figura 37). A ausência de endotélio funcional suprimiu a atividade vasodilatadora de PP1, resultado similar ao obtido para o extrato de origem (EEF), o que sugere que a atividade vasodilatadora de PP1 é dependente dos compostos vasoativos produzidos pelo endotélio vascular.

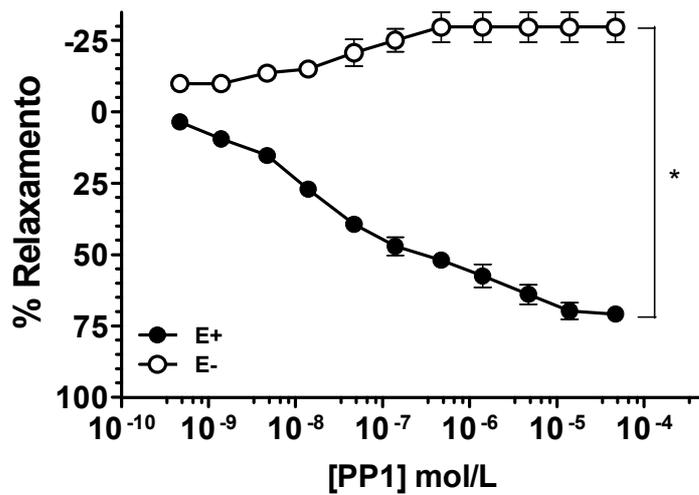


Figura 44: Curva concentração-resposta obtida para PP1 em anéis de aorta pré-contraídos com fenilefrina, na presença (E+) e ausência (E-) de endotélio funcional. Cada ponto representa média ± E.P.M. de 5 replicatas. \* Significativamente distintos,  $p < 0,0001$

Observou-se também, que o efeito vasodilatador de PP1 foi suprimido pela adição de L-NAME, um inibidor da sintase do NO (figura 38). Esse resultado indica que a ação vasodilatadora de PP1 é dependente do óxido nítrico endotelial, como descrito anteriormente para EEf.

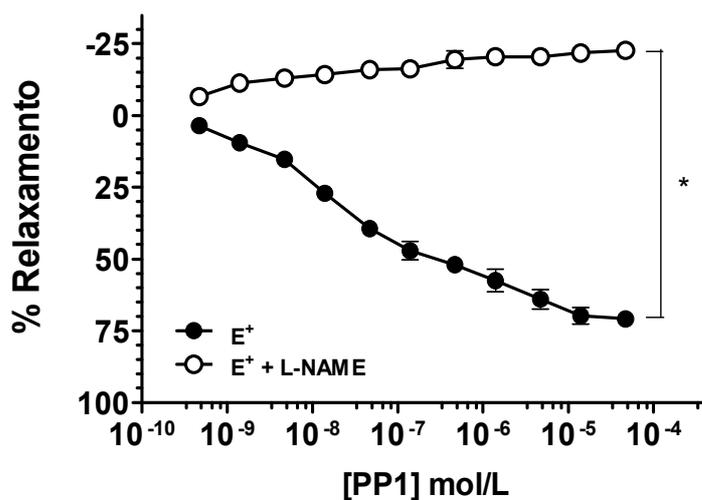
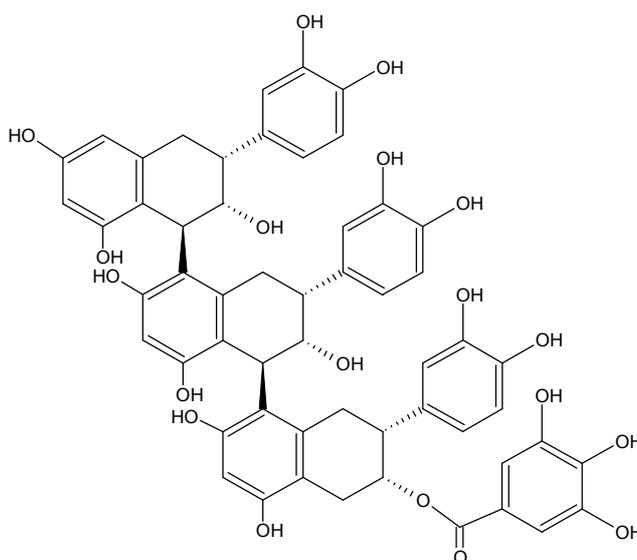


Figura 45: Curva concentração-resposta obtida para PP1 em anéis de aorta pré-contraídos com fenilefrina, incubados com L-NAME (100 μM). Cada ponto representa média ± E.P.M. de 5 replicatas. \* Significativamente distintos,  $p < 0,0001$

O efeito vasodilatador de proantocianidinas é bastante relatado na literatura, principalmente para as proantocianidinas constituintes de frutas e bebidas, como uva, maçã, vinhos, entre outros (NDIAYE et al, 2003; DELL'AGLI et al, 2004;). Alguns extratos ou frações enriquecidas em proantocianidinas também apresentaram atividade vasodilatadora proeminente, como o relatado para a fração de *Ouratea semisserrata* (CÔRTEZ et al, 2002) e para extratos de *Croton celtidifolius* (DALBÓ et al, 2008). No entanto, os relatos de atividades para proantocianidinas isoladas são ainda escassos. Fitzpatrick e colaboradores (2000) relataram atividade vasodilatadora para proantocianidinas isoladas de sementes de uva. Nesse estudo, o grau de polimerização das proantocianidinas isoladas foi avaliado por ES-ITMS (*electrospray-ion-trap mass spectrometry*). Essas substâncias eram constituídas predominantemente por epicatequina, sendo que os compostos mais ativos incluíam proantocianidinas maiores que dímeros, principalmente trímeros, tetrâmeros e pentâmeros. Além disso, houve diferença na atividade vasodilatadora entre substâncias com mesmo grau de polimerização, sugerindo que a constituição monomérica específica assim como a ordem dessas unidades monoméricas nos oligômeros são importantes para a atividade (FITZPATRICK et al, 2000). Dentre as proantocianidinas avaliadas, a mais ativa foi um trímero de epicatequina esterificado com uma molécula de ácido gálico, cuja estrutura foi completamente elucidada como epicatequina-(4-β-8)-epicatequina-(4-β-8)-epicatequina-3-O-galato (**62**), com  $CI_{50}$  de  $1,00 \pm 0,08 \mu\text{g}$  de equivalentes de catequina/mL (FITZPATRICK, 2004).

**62**

#### 4 CONCLUSÕES

Podemos concluir que o EEF possui atividade vasodilatadora em anéis de aorta de ratos normotensos, dependente do endotélio funcional e do aumento da síntese ou biodisponibilidade do NO. O estudo fitoquímico, biomonitorado pela atividade vasodilatadora em aorta de rato, resultou no isolamento de três proantocianidinas tetraméricas (PP1, PP2 e PP3), constituídas por duas unidades de afzelequina, duas unidades de catequina e um resíduo de açúcar. A ação inibidora da ECA e o efeito vasodilatador induzido por PP1, semelhante ao EEF, sugerem que esta substância é uma das principais responsáveis pelas ações cardiovasculares descritas para a espécie *Mansoa hirsuta*.

**REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

ACTIS-GORETTA, L.; OTTAVIANI, J.I.; KEEN, C.L. and FRAGA, C.G. Inhibition of angiotensin converting enzyme (ACE) activity by flavan-3-ols and procyanidins. *FEBS Letters*, v. 555, p. 597-600, 2003.

ANDRIAMBELOSON, E.; MAGNIER, C.; HAAN-ARCHIPOFF, G.; LOBSTEIN, A., ANTON; R. BERETZ, A.; STOCLET, J.C.; ANDRIANTSITOHAINA, R. Natural Dietary Polyphenolic Compounds Cause Endothelium-Dependent Vasorelaxation in Rat Thoracic Aorta. *Journal of Nutrition*, v. 128, n. 12, p. 2324-2333, 1998.

ANVISA, Consulta a base de dados de medicamentos. Disponível em <[http://www7.anvisa.gov.br/datavisa/Consulta\\_Produto/consulta\\_medicamento.a.sp](http://www7.anvisa.gov.br/datavisa/Consulta_Produto/consulta_medicamento.a.sp)>. Acesso em 02 de abril de 2008.

AOYAGI, Y. An angiotensin-I converting enzyme inhibitor from buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) flour. *Phytochemistry*, v. 67, p. 618-621, 2006.

BALUNAS, M.J.; KINGHORN, A.D. Drug discovery from medicinal plants. *Life Sciences*. v. 78, p. 431-441, 2005.

BARBOSA-FILHO, J.M; MARTINS, V.K.M; RABELO, L.A; MOURA, M.D; SILVA, M.S; CUNHA, E.V.L; SOUZA, M.F.V; ALMEIDA, R.N; MEDEIROS, I.A.. Natural products inhibitors of the angiotensin converting enzyme (ACE). A review between 1980-2000. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 16, p. 421-446, 2006.

BARREIRO, E.J. Produtos naturais bioativos de origem vegetal e o desenvolvimento de fármacos. *Química Nova*, v. 13, n. 01, p. 29-39, 1990.

BARREIROS, A.L.B.S; DAVID, J.P; QUEIROZ, L.P; DAVID, J.M. A-type proanthocyanidin antioxidant from *Dioclea lasiophylla*. *Phytochemistry*, v. 55, n. 7, p. 805-808, 2000.

BASSO, L. A.; SILVA, L.H.P; FETT-NETO, A.G. et. al. The use of biodiversity as source of new chemical entities against defined molecular targets for treatment of malaria, tuberculosis, and T-cell mediated diseases – A Review. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, v. 100, n. 06, p. 575-606, 2005.

BISHOP-BAILEY, D; LARKIN, S.W; WARNER, T.D; CHEN, G; MITCHELL, J.A. Characterization of the induction of nitric oxide synthase and cyclo-oxygenase in rat aorta in organ culture. *British Journal of Pharmacology*, v. 121, p. 125-133, 1997.

BRAGA, F.C.; WAGNER, H.; LOMBARDI, J.A.; OLIVEIRA, A.B. Screening the Brazilian flora for anti-hypertensive plant species for in vitro angiotensin-I-converting enzyme inhibiting activity. *Phytomedicine*, v. 7, p. 245-250, 2000.

BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE. Hipertensão Arterial. Disponível em <[http://portal.saude.gov.br/portal/saude/visualizar\\_texto.cfm?idtxt=23616&janela=1](http://portal.saude.gov.br/portal/saude/visualizar_texto.cfm?idtxt=23616&janela=1)>, acesso em 16 de março de 2008.

BRASILb, MINISTÉRIO DA SAÚDE. Informações de saúde. Disponível em <<http://w3.datasus.gov.br/datasus/datasus.php?area=359A1B0C0D0E0F359G3H01Jd1L2M0N&VInclude=../site/menuold.php>>, acesso em 16 de março de 2008.

BRIXIUS, K.; WILLMS, S.; NAPP, A.; TOSSIOS, P.; LADAGE, D.; BLOCH, W.; MEHLHORN, U.; SCHWINGER, R.H.G. Crataegus Special Extract WS<sup>®</sup>1442 Induces an Endothelium-Dependent, NO-mediated Vasorelaxation via eNOS-phosphorylation at Serine 1177. *Cardiovascular Drugs and Therapy*, v. 20, p. 177–184, 2006

BURRELL, L.M.; JOHNSTON, C.I.; TIKELLIS, C.; COOPER, M.E. ACE2, a new regulator of the renin–angiotensin system. *TRENDS in Endocrinology and Metabolism*, v. 15, n. 04, p.166-169, 2004.

BUSSE, R., FLEMING, I. Endothelium dysfunction in atherosclerosis. *Journal of Vascular Research*, v. 33, p. 181–194, 1996.

BUTLER, M.S. The role of natural product chemistry in drug discovery. *Journal of Natural Products*, v. 67, p. 2141-2153, 2004.

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

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

CHEN, C. H.; LIN, J. Y. Inhibition of angiotensin-I converting enzyme by tetrahydroxyxanthenes isolated from *Tripterospermum ianceolatum*. *Journal of Natural Products*, v. 55, p. 691-695, 1992.

CHOBANIAN A.V. Seventh report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure. *Hypertension*, v. 42, p. 1206-1252, 2003.

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

COHEN, R.A.; VANHOUTTE, P.M. Endothelium-Dependent Hyperpolarization Beyond Nitric Oxide and Cyclic GMP. *Circulation*, v. 92, p. 3337-3349, 1995.

CÔRTEZ, S.F.; VALADARES, Y.M.; OLIVEIRA, A.B.; LEMOS, V.S.; BARBOSA, M.P.T.; BRAGA, F.C. Mechanism of endothelium-dependent vasodilation induced by a proanthocyanidin-rich fraction from *Ouratea semisserata*. *Planta Medica*, v. 68, p. 412-415, 2002.

DALBÓ, S; MOREIRA, E.G; BRANDÃO, F.C; HORST, H; PIZZOLATTI, M.G.; MICKE, G.A; RIBEIRO-DO-VALLE, R.M. Mechanisms Underlying the Vasorelaxant Effect Induced by Proanthocyanidin-Rich Fraction From *Croton celtidifolius* in Rat Small Resistance Arteries. *Journal of Pharmacological Sciences*, v. 106, n. 2, p. 234-241, 2008.

DELL'AGLI, M; BUSCIALA, A; BOSISIO, E. Vascular effects of wine polyphenols *Cardiovascular Research*, v. 63, p. 593-602, 2004.

DIMMELER, S., FLEMING, I., FISSLTHALER, B., HERMANN, C., BUSSE, R., ZEIHNER, A.M. Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by Akt-dependent phosphorylation. *Nature*, v. 399, p. 601-605, 1999.

DUARTE, M.G.R. *Plantas invasoras medicinais: triagem de espécies dos gêneros Cuphea, Desmodium, Polygonum e Sida para a atividade antimicrobiana e estudo fitoquímico biomonitorado de Polygonum spectabile Mart.* 195 f. (Dissertação de mestrado em Ciências Farmacêuticas) -Faculdade de Farmácia- Universidade Federal de Minas Gerais, 2001.

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

EMBRAPA, Recursos Genéticos de Plantas Medicinais e Aromáticas: Estratégias para Conservação e Manejo Sustentável. Disponível em <<http://www.cenargen.embrapa.br/antec/plantasm.html>>, acesso em 20 de março de 2007.

FAN, J; DING, X; GU, W. Radical-scavenging proanthocyanidins from sea buckthorn seed. *Food Chemistry*, v. 102, p. 168-177, 2007.

FARRÉ, A.L.; CASADO, S. Heart failure, redox alterations, and endothelial dysfunction. *Hypertension*, v. 38, p. 1400-1405, 2001.

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

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

FERREIRA, S.H. Angiotensin converting enzyme: history and relevance. *Seminars in Perinatology*, v. 24, p. 7-10, 2000.

FISHER, A.B; CHIEN, S; BARAKAT, A.I; NEREM, R.N. Endothelial cellular response to altered shear stress. *American Journal of Physiology*, v. 281, p. L529-L533, 2001.

FITZPATRICK, D.F; - Vasodilating compound and method of use US Patent 6706756 , 16 de março de 2004.

FITZPATRICK, D.F; FLEMING, R.C; BING, B; MAGGI, D.A; O'MALLEY, R.M. Isolation and Characterization of Endothelium-Dependent Vasorelaxing Compounds from Grape Seeds. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, v. 48, p. 6384-6390, 2000.

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

FLORA-FILHO,R.; ZILBERSTEIN, B. Óxido nítrico: o simples mensageiro percorrendo a complexidade. *Metabolismo, síntese e funções. Revista da Associação Médica Brasileira*, v. 46, n. 03, p. 265-71, 2000.

FONTANA, J; FULTON, D; CHEN, Y; FAIRCHILD, T.A; MCCABE, T.J; FUJITA, N; TSURUO, T; SESSA, W.C. Domain mapping studies reveal that the M domain of hsp90 serves as a molecular scaffold to regulate Akt-dependent phosphorylation of endothelial nitric oxide synthase and NO release. *Circulation Research*, v. 90, n.8, p. 866-73, 2002.

FOO, L.Y; LU, Y; HOWELL, A.B; VORSA, N. The structure of cranberry proanthocyanidins which inhibit adherence of uropathogenic P-@mbriated *Escherichia coli* in vitro. *Phytochemistry*, v. 54, p. 173-181, 2000.

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

GILANI, A.H; RAHMAN, A.U. Trends in ethnopharmacology. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 100, n. 1-2, p. 43-49, 2005.

GIMBRONE-JR, M.A; TOPPER, J.N; NAGEL, T; ANDERSON, K.R; GARCIA-CARDEÑA, G. Endothelial dysfunction, hemodynamic forces, and

atherogenesis. *Annals of the New York Academy of Sciences*, v. 902, p. 230-239, 2000.

GOVERS, R; RABELINK, T.J. Cellular regulation of endothelial nitric oxide synthase. *American journal of physiology. Renal physiology*, v. 280, n.2, p. F193-206, 2001.

GUS, I.; HARZHEIM, E.; ZASLAVSKY, C.; MEDINA, C.; GUS, M. Prevalência, reconhecimento e controle da hipertensão arterial sistêmica no estado do Rio Grande do Sul. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*, v. 83, n. 05, p. 424-428, 2004.

HALBERSTEIN, R.A. Medicinal plants: historical and cross-cultural usage patterns. *Annals of Epidemiology*, v. 15, n. 09, p. 686-699, 2005.

HANSEN, K.; NYMAN, U.; SMITT, U.W.; ADSERSEN, A.; GUDIENSEN, L.; RAJASEKHARAN, S.; PUSHPANGADAN, P. *In vitro* screening of traditional medicines for anti-hypertensive effect based on inhibition of the angiotensin converting enzyme (ACE), *Journal of Ethnopharmacology*, v. 48, p. 43-51, 1995.

HANSON, L. Effect of angiotensin converting enzyme inhibition compared with conventional therapy on cardiovascular morbidity and mortality in hypertension: the captopril prevention project (CAPPP) randomized trial. *Lancet*, v. 353, p. 611-616, 1999.

HANTON, S.D. Mass spectrometry of polymers and polymer surfaces, *Chemical Reviews*, v.101, p. 527-569, 2001.

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

ISMAILOV, A.I.; KULIEV, Z.A.; VDOVIN, A.D.; ABDULLAEV, N.D.; MURZUBRAIMOV, B.M. Oligomeric proanthocyanidin glycosides of *Rhodiola pamirolaica*. *Chemistry of Natural Compounds*, v. 34, n. 4, p. 450-455, 1998.

ITOKAWA, H.; MATSUMOTO, K.; MORITA, H.; TAKEYA, K. Citotoxic naphthoquinones from *Mansoa alliaceae*. *Phytochemistry*, v. 31, n. 03, p. 1061-1062, 1992.

JUNG, H.A; HYUN, S.K; KIM, H.R; CHOI, J.S. Angiotensin-converting enzyme I inhibitory activity of phlorotannins from *Ecklonia stolonifera*. *Fisheries Science*, v. 72, p. 1292-1299, 2006.

KAMIYA, K.; WATANABE, C.; ENDANG, H.; UMAR, M.; SATAKE, T. Studies on the constituents of bark of *Parameria laevigata moldenke*. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, v. 49, n. 05, p. 551-557, 2001

KANG, K.B.; RAJANAVAGAM, M.A.S; VAN DER ZYPP, A.; MAJEWSKI, H. A role for cyclooxygenase in agin-related changes of b-adrenoceptor-mediated relaxation in rat aortas. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, v. 375, p. 273–281, 2007.

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.

KOEHN, F. E.; CARTER, G. T. The evolving role of natural products in drug discovery. *Nature Reviews. Drug Discovery*, England, v. 4, n. 3, p. 206-20, 2005.

KWAN, C.; CHENA, C.; DEYAMAB, T.; NISHIBEC, S. Endothelium-dependent vasorelaxant effects of the aqueous extracts of the *Eucommia ulmoides* Oliv. leaf and bark: implications on their antihypertensive action. *Vascular Pharmacology*, v. 40, p. 229– 235, 2004.

LACAILLE-DUBOIS, M.A.; FRANCK, U.; WAGNER, H. Search for potential angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitors from plants. *Phytomedicine*, v. 8, n. 01, p. 47-52, 2001.

LEE, K. Current development in the discovery and design of new drug candidates from plant natural product leads. *Journal of Natural Products*, v. 67, p. 273-283, 2004.

LEMO, V.S.; FREITAS, M.R.; MULLER, B.; LINO, Y.D.; QUEIROGA, C.E.G; CÔRTE, S.F. Dioclein, a new nitric oxide- and endothelium-dependent vasodilator flavonoid. *European Journal of Pharmacology*, v. 386, p. 41–46, 1999.

LEMO, V.S; CÔRTE, S.F; DOS SANTOS, M.H; ELLENA, J; MOREIRA, M.E; DORIGUETTO, A.C. Structure and vasorelaxant activity of floranol, a flavonoid isolated from the roots of *Dioclea grandiflora*. *Chemistry & biodiversity*, v.3, n. 6, p. 635-45, 2006.

LI, H; DEINZER, M.L. Tandem Mass Spectrometry for Sequencing Proanthocyanidins. *Analytical Chemistry*, v. 79, p. 1739-1748, 2007.

LI, Q.L; LI, B.G; ZHANG, Y; GAO, X.P; LI, G.P; ZHANG, G.L. Three angiotensin-converting enzyme inhibitors from *Rabdosia coetsa*. *Phytomedicine*, v. 15, n. 5, p. 386-8, 2008.

LIU, J.C.; HSU, F.L.; TSAI, J.C.; et.al. Antihypertensive effects of tannins isolated from traditional Chinese herbs as non-specific inhibitors of angiotensin converting enzyme. *Life Sciences*, v. 73, n. 12, p. 1543-1555, 2003.

LOHMANN, L.G., ALCÂNTARA S.F., SILVA F.G.. *Bignoniaceae in Flora brasiliensis* revisited. Disponível em <<http://flora.cria.org.br>>. Acesso em 15 de março de 2007

LOIZZO, M.R; SAID, A; TUNDIS, R; RASHED, K; STATTI, G.A; HUFNER, A; MENICHINI, F. Inhibition of angiotensin converting enzyme (ACE) by flavonoids isolated from *Ailanthus excelsa* (Roxb) (Simaroubaceae). *Phytotherapy Research*, v. 21, n. 1, p. 32-36, 2006.

LÜSCHER, T.F. The endothelium in hypertension: bystander, target or mediator? *Journal of Hypertension*, v. 12, p. S105–S116, 1994.

MA, M.S.; BAE, I.Y.; LEE, H. G.; YANG, C.B. Purification and identification of angiotensin-I-converting enzyme inhibitory peptide from buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench). *Food Chemistry*, v. 96, n. 01, p. 36- 42, 2006.

MILNE, F.J; PINKNEY-ATKINSON, V.J. Hypertension guideline 2003 update. *South African Medical Journal*, v. 94, p. 209–16, 218, 220–5, 2004.

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

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

NDIAYE, M.; CHATAIGNEAU, T.; ANDRIANTSITOHAINA R.; STOCLET J.; SCHINI-KERTH, V.B. Red wine polyphenols cause endothelium-dependent EDHF-mediated relaxations in porcine coronary arteries via a redox-sensitive mechanism. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 310, p. 371–377, 2003.

NEWMAN, D., J.; CRAGG, G.M. Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. *Journal of Natural Products*, v. 70, n. 03, p. 461-77, 2007

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

OESS, S; ICKING, A; FULTON, D; GOVERS, R; MULLER-ESTERL, W. Subcellular targeting and trafficking of nitric oxide synthases. *The Biochemical Journal* , v. 396, n. 3, p. 401-409, 2006.

OH, H.; KANG, D.G.; KWON, J.W.; et. al. Isolation of angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitory flavonoids from *Sedum sarmentosum*. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, v. 27, n. 12, p. 2035—2037, 2004

PAULETTI, P.M.; BOLZANI, V.S.; YOUNG, M.C.M. Constituintes químicos de *Arrabidaea samyoides* (Bignoniaceae). *Química Nova*, v. 26, n. 05, 2003.

PAVAN, M.V; GHINI, B; CASTRO, M; LOPES-DE-FARIA, J.B. Prevention of hypertension attenuates albuminuria and renal expression of fibronectin in diabetic spontaneously hypertensive rats. *American Journal of Nephrology*, v. 23, p. 422–428, 2003.

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

PRASAD, D. Two A-type proanthocyanidins from *Prunus armeniaca* roots *Fitoterapia*, v. 71, p. 245-253, 2000.

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

RASKIN, I.; RIBNICKY, D.M.; KOMARNYTSKY, S.; et. al. Plants and human health in the twenty-first century. *TRENDS in Biotechnology*, v. 20, n. 12, p. 522-531, 2002.

REED, J.D; KRUEGER, C.G; VESTLING, M.M.. MALDI-TOF mass spectrometry of oligomeric food polyphenols. *Phytochemistry*, v. 66, p. 2248–2263, 2005.

REES, D.D; PALMER, R.M.J; MONCADA, S. Role of endothelium-derived nitric oxide in the regulation of blood pressure. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 86, p. 3375-3378, 1989

ROBERT, A.; MEUNIER, B. Is alkylation the main mechanism of action of the antimalarial drug artemisin? *Chemical Society Reviews*, v. 27, p. 273-279, 1998.

ROCHA, A.D. *Estudo fitoquímico de Clytostoma ramentaceum Bureau & k. Schum. e Mansoa hirsuta D.C. (Bignoniaceae) biomonitorado por ensaios in vitro de atividade antifúngica.* 193f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2002.

ROCHA, A.D.; OLIVEIRA, A.B.; SOUZA FILHO, J.D.; LOMBARDI, J.A.; BRAGA, F.C. Antifungal constituents of *Clytostoma ramentaceum* and *Mansoa hirsuta*. *Phytotherapy Research*, v. 18, n. 06, p. 463-467, 2004.

RUBIO, A.R.; MORALES-SEGURA, M.A. Nitric Oxide, an Iceberg in Cardiovascular Physiology: Far Beyond Vessel Tone Control. *Archives of Medical Research*, v. 35, p. 1–11, 2004.

SCOTT-BURDEN, T., VANHOUTTE, P.M. Regulation of smooth muscle cell growth by endothelium-derived factors. *Texas Heart Institute Journal*, v. 21, p. 91–97, 1994.

SERRA, C.P. *Estudo de espécies vegetais com potencial atividade anti-hipertensiva: desenvolvimento e validação de ensaio in vitro de inibição da enzima conversora de angiotensina e avaliação da atividade vasodilatadora*. Tese (Doutorado) – Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2004.

SERRA, C.P.; CÔRTEZ, S.F.; LOMBARDI, 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.

SILVA, D.M. *Estudo químico e de atividades biológicas de Mansoa hirsuta D.C. (Bignoniaceae)*. 83f. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Alagoas, Maceió, Al. 2006.

SIVAKUMARAN, S; MOLAN, A.L; MEAGHER, L.P; BURKARD, K; FOO, L.Y; LANE, G.A; ATTWOOD, G.A; FRASER, K; TAVENDALE, M. Variation in antimicrobial action of proanthocyanidins from *Dorycnium rectum* against rumen bacteria. *Phytochemistry*, v. 65, n, 17, p. 2485-2497, 2004.

SOARES, C.L.S; PÉREZ, C.D; MAIA, M.B.S; SILVA, R.S; MELO, L.F.A. Avaliação da atividade antiinflamatória e analgésica do extrato bruto hidroalcoólico do zoantídeo *Palythoa caribaeorum* (Duchassaing & Michelotti, 1860). *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, v. 16, n. 4, p. 463-468, 2006

SOEJARTO, D. D. Biodiversity prospecting and benefit sharing: perspectives from the field. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 51, p. 15-21, 1996.

SOWERS, J.R.; EPSTEIN, M.; FROHLICH, E.D. Diabetes, hypertension and cardiovascular disease – an update. *Hypertension*, v. 37, p. 1053-1059, 2001.

SVEDSTROM, U.; VUORELA, H.; KOSTIAINEN, R.; LAAKSO, I.; HILTUNEN, R. Fractionation of polyphenols in hawthorn into polymeric procyanidins, phenolic acids and flavonoids prior to high-performance liquid chromatographic analysis. *Journal of Chromatography A*, v. 1112, n. 1-2, p. 103-11, 2006.

TAKAHASHI, S; MENDELSON, M.E. Synergistic activation of endothelial nitric-oxide synthase (eNOS) by HSP90 and Akt: calcium-independent eNOS activation involves formation of an HSP90-Akt-CaM-bound eNOS complex. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 278, n. 33, p. 30821-30827, 2003.

TANIYAMA, Y.; GRIENGLING, K.K. Reactive oxygen species in the vasculature: molecular and cellular mechanisms. *Hypertension*, v. 42, p. 1075-1081, 2003.

TEPEL, M. Oxidative stress: does it play a role in the genesis of essential hypertension and hypertension of uraemia? *Nephrology, dialysis, transplantation: official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association*, v. 18, p. 1439–1442, 2003.

VERMA, S.K; JAIN, V; VERMA, D; KHAMESRA, R. *Crataegus oxyacantha* – A cardioprotective herb. *Journal of Herbal Medicine and Toxicology*, v. 1, n.1, p. 65-71, 2007.

VERMEIRSEN, V; CAMP, J.V; VERSTRAETE, W. Optimisation and validation of an angiotensin-converting enzyme inhibition assay of the screening of bioactive peptides. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, v. 51, p. 76-87, 2002.

VERPOORTE, R. Exploration of nature's chemodiversity: the role of secondary metabolites as leads in drug development. *Drug Discovery Today*, England, v. 03, n. 05, p. 232-238, 1998.

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

WAEBER, B.; BRUNNER, H.R. The renin-angiotensin system: role in experimental and human hypertension, p. 842-852. In: ZANCHETTI, A. & MANCIA, G. (ed.), *Handbook of hypertension, vol. 17: pathophysiology of hypertension*, Elsevier Science:New York, 1997, 1122p

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

WAGNER, H.; ELBL, G.; LOTTER, H.; GUINEA, M. Evaluation of natural products as inhibitors of angiotensin I-converting enzyme (ACE). *Pharmaceutical and Pharmacological Letters*, v. 01, p. 15-18, 1991.

WALL, M.E.; WANI, M.C.; COOK, C.E.; PALMER, K.H.; McPHAIL, A.T.; SIM, G.A. Plant Antitumor Agents. I. The Isolation and Structure of Camptothecin, a Novel Alkaloidal Leukemia and Tumor Inhibitor from *Camptotheca acuminata*. *Journal of American Chemical Society*, v. 88, n. 16, p. 3888 – 3890, 1966.

WHITE, W.B. Update on the drug treatment of hypertension in patients with cardiovascular disease. *The American Journal of Medicine*, v. 118, p. 695-705, 2005.

WHO, Tradicional medicines. Disponível em <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs134/en/>>, acesso em 15 de março de 2007.

WHO, World health statistics 2006. Disponível em <<http://www.who.int/whosis/whostat2006.pdf>>, acesso em 15 de março de 2007.

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

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

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

ZHANG, F.C; SUN, Q.S; WANG, Z.T; HATTORI, M. One New A-type Proanthocyanidin Trimer from *Lindera aggregate* (Sims) Kosterm. *Chinese Chemical Letters*, v. 14, n. 10, p. 1033 –1036, 2003.

ZIEGLER, T.; SILACCI, P; HARRISON, V.J; HAYOZ, D. Nitric Oxide Synthase Expression in Endothelial Cells Exposed to Mechanical Forces. *Hypertension*, v. 32, p. 351-355, 1998.