

ESTUDO FITOQUÍMICO BIOMONITORADO DA ESPÉCIE *Tapirira guianensis*  
(ANACARDIACEAE): UMA ESTRATÉGIA NA BUSCA DE NOVOS  
FÁRMACOS PARA O TRATAMENTO DE DOENÇAS CARDIOVASCULARES

**AMÉLIA MIRANDA GOMES RODRIGUES**

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY RIBEIRO –  
UENF

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ  
NOVEMBRO – 2016

ESTUDO FITOQUÍMICO BIOMONITORADO DA ESPÉCIE *Tapirira guianensis*  
(ANACARDIACEAE): UMA ESTRATÉGIA NA BUSCA DE NOVOS  
FÁRMACOS PARA O TRATAMENTO DE DOENÇAS CARDIOVASCULARES

**AMÉLIA MIRANDA GOMES RODRIGUES**

Tese apresentada ao Centro de  
Biotecnologia e Biociências da  
Universidade Estadual do Norte  
Fluminense Darcy Ribeiro, como parte  
das exigências para obtenção do título  
de Doutora em Biociências e  
Biotecnologia

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Michelle Frazão Muzitano

Co-orientadora: Prof<sup>a</sup>. Juliana Montani Raimundo

Co-orientadora no exterior: Prof<sup>a</sup>. Valérie Barbara Schini Kerth

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ  
NOVEMBRO – 2016



ESTUDO FITOQUÍMICO BIOMONITORADO DA ESPÉCIE *Tapirira guianensis*  
(ANACARDIACEAE): UMA ESTRATÉGIA NA BUSCA DE NOVOS  
FÁRMACOS PARA O TRATAMENTO DE DOENÇAS CARDIOVASCULARES

**AMÉLIA MIRANDA GOMES RODRIGUES**

Tese apresentada ao Centro de  
Biotecnologia e Biociências da  
Universidade Estadual do Norte  
Fluminense Darcy Ribeiro, como parte  
das exigências para obtenção do título  
de Doutora em Biociências e  
Biotecnologia

Aprovada em 25 de novembro de 2016

Comissão examinadora:

---

Prof<sup>a</sup>. Paula Lima do Carmo (Doutora em Farmacologia) – UFRJ /Macaé

---

Prof<sup>o</sup>. Rodrigo Rodrigues de Oliveira (Doutor em Química de Produtos  
Naturais) – UENF

---

Prof<sup>o</sup>. André de Oliveira Carvalho (Doutor em Biociências e Biotecnologia) –  
UENF

---

Prof<sup>a</sup>. Michelle Frazão Muzitano (Doutora em Química de Produtos Naturais) –  
UFRJ /Macaé (Orientadora)

---

Prof<sup>a</sup>. Juliana Montani Raimundo (Doutora em Farmacologia) – UFRJ/Macaé  
(Co-orientadora)

Pai, muito obrigada por ter feito parte de praticamente todas as etapas deste período. Humanamente, minha defesa será uma dor, porque não poderei ver seu rosto na plateia ou ao menos chegar em casa e comemorarmos juntos, fisicamente. Mas apenas em Deus e por Deus terei uma coragem que não me pertence, para ver sentido em algo e para cumprir o que o senhor pediu: “Não pare nada o que começamos.”

Nós nunca nos separamos e a morte é a porta que se abre para a vida eterna. A dor pertence apenas para quem ainda tem que ficar. Em Deus, com a Virgem Maria e nossos amigos do céu estaremos juntos novamente e bem em breve, porque Aquele que É, o Cristo Jesus, Aquele que renova todas as coisas nos prometeu. Eu te amo pai.

Dedico ao senhor meu trabalho.

A minha querida mãe Lana Rúbia pela alegria, coragem e dedicação transmitidos durante todo este tempo, no qual a vida fazia sentido quando via em seu rosto a Face do Cristo alegre, compassivo, amoroso, trabalhador, misericordioso e sofredor.

Ao meu amado esposo Brunno por seu amor, amizade, zelo e dedicação tão peculiares, característicos de um homem de grande coração, caráter e personalidade.

Obrigada por tudo o que fez, para que assim eu pudesse terminar da melhor forma possível.

Nossa família estará sempre em ótimos braços.

Eu te amo.

Meu querido Bento José, mamãe não tem palavras para você. Apenas lhe agradeço por estar comigo, ser meu companheiro durante os últimos 5 meses e ter me ajudado em momentos que foram só nossos. Eu lhe amo muito meu querido filho e amigo.

*A minha abençoada e alegre sobrinha Clara, o  
passarinho do vô e as minhas queridas e lindas  
irmãs Carly e Arlinda pelo grande amor e  
carinho. Eu amo muito vocês.*



*Agradeço ao grande médico Dr. Marcos Dall'Oglio e a sua equipe pelo grande carinho e amizade por meu pai e por minha família. Agradeço a Deus por mãos tão abençoadas e por um coração tão sábio e generoso. A ciência sem humanidade não pode salvar e se torna inútil. Obrigada Dr. Marcos por seu coração completamente humanizado.*

*Agradeço de todo o meu coração a Deus pela  
proteção e grande amor por mim e por minha  
família.*

## Agradecimentos

Agradeço à minha orientadora Michelle Fração Muzitano e à minha co-orientadora Juliana Montani Raimundo por toda a assistência e ensinamentos acadêmicos transmitidos durante esta jornada.

Je remercie mon directeur de recherche Valerie Barbara Schini Kerth de croire en moi et dans mon travail avec enthousiasme et d'ouvrir les portes de son Laboratoire de Pharmacologie Cardiovasculaire pour mon approfondissement scientifique.

Agradeço a todos da UENF, em especial a ex-coordenadora da PSBB Kátia Valeriski pela compreensão durante minhas jornadas entre Campos e Macaé, para o cumprimento de todos os quesitos referentes ao curso do doutorado. Agradeço a atual coordenadora Olga Machado, assim como as secretárias Beatriz (Bia), Andrea e Marlene por toda a atenção recebida.

Agradeço ao carinho, amor, suporte e atenção singular dada por Beatriz (Bia do PAM/UENF). Não tenho palavras para lhe agradecer.

Agradeço a todos os meus amigos e colegas que de alguma forma fizeram parte desta história com seus diferentes jeitos, qualidades e carinhos: Isabela, Marlon, Máira, Thatiana, Leticia (UENF), Juliana (Juju) e a todos da UFRJ-Macaé.

I thank my colleagues from different parts of the world the joy and affection transmitted during my PhD research in France: Alan, Philippe, Yanna, Vanessa, Michel, Alexandra, Antonio, Malak, Phuong, Amissi, Brigitte, Cyril, Lee and Mary Kathy.

Agradeço a bolsa de estudos concedida pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ).

Agradeço a bolsa de estudos no exterior concedida pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

Agradeço a todos que de alguma forma fundamental contribuíram para meu desenvolvimento e aprendizado. Meus mais sinceros agradecimentos e orações.

“(…) Eu quem cuidava deles. (...), fui para eles como os que levantam uma criancinha contra o seu rosto; inclinei-me para ele para lhe dar de comer” (Oséias, 11, 1-4).

“Felizes os misericordiosos, porque alcançarão misericórdia” (Mateus, 5,7). Ano de 2016, o Ano Jubilar da Misericórdia pela Bula *Misericordie Vultus* (O Rosto da Misericórdia) instituído pelo Papa Francisco.

## SUMÁRIO

<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b> .....	XVI
<b>ÍNDICE DE TABELAS</b> .....	XXII
<b>LISTA DE EQUAÇÕES</b> .....	XXIV
<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b> .....	XXV
<b>RESUMO</b> .....	XXIX
<b>ABSTRACT</b> .....	XXX
<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	31
1.1 Doenças cardiovasculares .....	31
1.2 Os vasos sanguíneos.....	32
1.2.1 Funções do endotélio vascular .....	35
1.2.2 Fatores vasodilatadores derivados do endotélio.....	36
1.2.3 Óxido nítrico.....	37
1.2.4 EDHF .....	41
1.2.5 Prostaciclina (PGI <sub>2</sub> ) .....	42
1.3 Fisiopatologia das alterações vasculares associadas às DCVs.....	42
1.3.1 Disfunção endotelial .....	42
1.3.2 Estresse oxidativo.....	43
1.3.3 Senescência celular.....	45
1.4 As substâncias fenólicas: características e potencial farmacológico cardiovascular .....	46
1.5 Família Anacardiaceae e a espécie <i>Tapirira guianensis</i> .....	49
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	52
2.1 Objetivo Geral .....	52
2.2 Objetivos Específicos .....	52
2.2.1 Estudo fitoquímico de <i>T. guianensis</i> .....	52
2.2.2 Estudo farmacológico da ação de <i>T. guianensis</i> sobre artéria de grande calibre: aorta isolada de ratos Wistar.....	52
2.2.3 Estudo farmacológico da ação de <i>T. guianensis</i> sobre artéria de calibre médio: artéria coronária isolada de porco .....	52
2.2.4 Estudo farmacológico da ação de <i>T. guianensis</i> sobre cultura de células endoteliais de coronária de porco.....	52
2.2.5 Estudo farmacológico da atividade antioxidante de <i>T. guianensis</i> .....	53
<b>3 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	54
3.1 Material vegetal.....	54

3.2	Obtenção dos extratos, frações e substâncias isoladas.....	54
3.3	Métodos cromatográficos e espectroscópicos empregados para estudo do EMT e frações.....	56
3.3.1	Cromatografia em camada delgada.....	56
3.3.2	Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) .....	57
3.3.3	Determinação da concentração de substâncias fenólicas através da cromatografia líquida de alta eficiência usando padrão de quercetina .....	57
3.3.4	Elucidação estrutural das substâncias isoladas.....	58
3.4	Isolamento das substâncias presentes nas frações FD e FA farmacologicamente ativas .....	58
3.5	Ensaio farmacológico .....	60
3.5.1	Ensaio em aorta isolada de ratos Wistar .....	60
3.5.2	Ensaio em artéria coronária isolada de porco.....	62
3.5.3	Ensaio em cultura primária de células endoteliais de artéria coronária de porco.....	64
3.5.4	Avaliação in vitro da atividade antioxidante através do sequestro do radical livre DPPH.....	70
3.6	Análise estatística .....	71
<b>4</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	<b>72</b>
4.1	Estudo com o EMT .....	72
4.1.1	Obtenção e análise do perfil químico do EMT .....	72
4.1.2	Avaliação do efeito vasodilatador do EMT em aorta de ratos Wistar	73
4.1.3	Avaliação do efeito vasodilatador do EMT em artéria coronária de porco	79
4.1.4	Avaliação dos efeitos do EMT em cultura de células endoteliais .	84
4.2	Estudo com as frações.....	93
4.2.1	Obtenção das frações.....	93
4.2.2	Avaliação do efeito vasodilatador das frações em aorta de ratos Wistar	94
4.3	Estudo antioxidante com o EMT e as frações .....	96
4.3.1	Avaliação in vitro pelo sequestro do radical livre DPPH .....	96
4.4	Estudo com as frações biologicamente ativas .....	98
4.4.1	Perfil químico da FD .....	98
4.4.2	Perfil químico da FA .....	113
4.4.3	Avaliação do efeito vasodilatador do 1,4,6-tri-O-galoil- $\beta$ -D-glicose (FA10) e quercetina 3-O- (6''-O-galoil)- $\beta$ -D-galactopiranosídeo (FA12.10) em aorta de ratos Wistar.....	151

4.4.4	Sub-frações promissoras.....	152
<b>5</b>	<b>DISCUSSÃO</b> .....	<b>160</b>
5.1	Ação vascular do extrato das folhas da <i>T. guianensis</i> em aorta de ratos <i>Wistar</i> .....	161
5.2	Perfil vasodilatador e mecanismo de ação do EMT em artéria coronária de porco .....	163
5.3	Ação do EMT na senescência de células endoteliais isoladas de artéria coronária de porco .....	166
5.4	Ação antioxidante <i>in vitro</i> do EMT e frações .....	171
5.5	Ação das frações biologicamente ativas .....	172
<b>6</b>	<b>CONCLUSÕES</b> .....	<b>176</b>
<b>7</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>177</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Representação esquemática de um corte histológico de uma artéria muscular e uma artéria elástica. ....	33
Figura 2: Anatomia comparativa da circulação coronariana interespecies.. ..	35
Figura 3: Representação esquemática da contribuição dos fatores derivados do endotélio no relaxamento vascular em função do tamanho do vaso sanguíneo. ....	37
Figura 4: Representação esquemática da regulação da atividade da óxido nítrico sintase endotelial (eNOS) pelo Ca <sup>2+</sup> intracelular e fosforilação.. ...	39
Figura 5: Ativação da óxido nítrico sintase endotelial cálcio-dependente e cálcio-independente.....	40
Figura 6: Mecanismo de ação vasodilatador do fator hiperpolarizante derivado do endotélio (EDHF) no relaxamento das células musculares lisas vasculares.....	41
Figura 7: A disfunção endotelial na patogênese dos eventos da doença cardiovascular.....	43
Figura 8: Ações celulares das espécies reativas de oxigênio (EROs). ....	44
Figura 9: Estrutura básica dos flavonoides.....	48
Figura 10: Ações cardiovasculares das substâncias fenólicas.....	49
Figura 11: <i>Tapirira guianensis</i> - espécie pertencente à família Anacardiaceae; um arbusto conhecido popularmente como pau-pombo.	51
Figura 12: Fluxograma para obtenção do extrato bruto metanólico (EMT) e frações das folhas da <i>T. guianensis</i> .....	55
Figura 13: Registro dos anéis de aorta após contratura induzida com fenilefrina a 10µM, seguido da adição de acetilcolina a 10 µM para verificação do relaxamento. ....	61
Figura 14: Etapas para a obtenção das células endoteliais de coronárias de porcos jovens e senescentes.....	66
Figura 15: Análise do perfil químico por cromatografia líquida de alta eficiência do extrato metanólico das folhas da <i>T. guianensis</i> . ....	73
Figura 16: Registro da tensão isométrica de anéis de aorta após contratura induzida com fenilefrina a 10 µM, seguida da adição de concentrações	



cumulativas (1 – 30 µg/mL) do extrato metanólico das folhas da <i>T. guianensis</i> (EMT).....	74
Figura 17: Curvas concentração-resposta para o extrato metanólico das folhas de <i>T. guianensis</i> (EMT; 1 – 30 µg/mL) em anéis de aorta de ratos com e sem endotélio. ....	75
Figura 18: Avaliação do envolvimento da via do NO no efeito vasodilatador do extrato metanólico das folhas da <i>T. guianensis</i> (EMT) em anéis de aorta de ratos com endotélio. ....	77
Figura 19: Avaliação do envolvimento do prostaciclina no efeito vasodilatador do extrato metanólico das folhas da <i>T. guianensis</i> (EMT) em anéis de aorta de ratos com endotélio. ....	78
Figura 20: Curvas concentração-resposta para o extrato metanólico das folhas da <i>T. guianensis</i> (EMT) em anéis de coronária de porco com e sem endotélio. ....	79
Figura 21: Envolvimento das vias do óxido nítrico (NO) e do fator hiperpolarizante derivado do endotélio (EDHF) na vasodilatação induzida pelo extrato metanólico das folhas da <i>T. guianensis</i> (EMT) em anéis de coronária de porco.....	80
Figura 22: Envolvimento das vias da prostaciclina (PGI <sub>2</sub> ) e do fator hiperpolarizante derivado do endotélio (EDHF) na vasodilatação induzida pelo extrato metanólico das folhas da <i>T. guianensis</i> (EMT) em anéis de coronária de porco.....	81
Figura 23: Curvas concentração-resposta do mecanismo de ação redox-sensível no efeito vasodilatador pelo extrato metanólico das folhas da <i>T. guianensis</i> (EMT) em anéis de coronária de porco.....	83
Figura 24: Avaliação microscópica das células endoteliais de coronária suína após tratamento com o extrato metanólico das folhas de <i>T. guianensis</i> (EMT).....	85
Figura 25: Avaliação da citotoxicidade por citometria de fluxo através da marcação por anexina-V-FITC e iodeto de propídio das células endoteliais de coronária suína tratadas com altas doses do extrato metanólico das folhas de <i>T. guianensis</i> (EMT).....	86
Figura 26: Avaliação da apoptose induzida pelo extrato metanólico das folhas de <i>T. guianensis</i> (EMT) em cultura primária de células endoteliais de coronária de porco, comparadas a células controle (C).....	87
Figura 27: Atividade SA-βgal em células endoteliais de coronária de porco jovens (P1) e senescentes (P3) em modelo de senescência replicativa. ...	88

<b>Figura 28: Atividade SA-<math>\beta</math>gal em células endoteliais jovens P1 na ausência (C) e presença do extrato metanólico das folhas da <i>T. guianensis</i> (EMT).</b>	<b>89</b>
<b>Figura 29: Atividade SA-<math>\beta</math>gal em células endoteliais senescentes na ausência (C) e presença do extrato metanólico das folhas da <i>T. guianensis</i> (EMT).</b>	<b>90</b>
<b>Figura 30: Análise de proteínas reguladoras do ciclo celular em modelo de senescência replicativa de células endoteliais senescentes (P3) de coronária suína após 48 h de tratamento com extrato metanólico das folhas da <i>T. guianensis</i> (EMT), por <i>Western blotting</i>.</b>	<b>92</b>
<b>Figura 31: Curvas concentração-resposta para as frações obtidas a partir do extrato metanólico das folhas da <i>T. guianensis</i>. (1 – 30 <math>\mu</math>g/mL) em anéis de aorta de ratos com endotélio.</b>	<b>95</b>
<b>Figura 32: Ação antioxidante in vitro após sequestro do radical livre DPPH do extrato metanólico das folhas da <i>T. guianensis</i> (EMT), fração hexânica (FH), fração diclorometano (FD), fração acetato de etila (FA), fração butanólica (FB) e fração aquosa remanescente (FAq) das folhas da <i>T. guianensis</i>.</b>	<b>97</b>
<b>Figura 33: Análise do perfil químico por cromatografia líquida de alta eficiência da fração diclorometano (FD) das folhas da <i>T. guianensis</i>.</b>	<b>99</b>
<b>Figura 34: Fluxograma de isolamento da substância FD18 a partir da fração diclorometano (FD) das folhas da <i>T. guianensis</i>.</b>	<b>102</b>
<b>Figura 35: Obtenção de sub-fração parcialmente purificada da fração diclorometano (FD) das folhas da <i>T. guianensis</i>.</b>	<b>103</b>
<b>Figura 36: Análise do perfil químico por cromatografia líquida de alta eficiência da FD18 das folhas da <i>T. guianensis</i>.</b>	<b>106</b>
<b>Figura 37: Cromatograma e espectro de UV do padrão de quercetina. ..</b>	<b>107</b>
<b>Figura 38: (A) Espectro de RMN de <math>^1\text{H}</math> (400 MHz, DMSO-<math>\text{d}_6</math>) da substância FD18 da classe dos flavonoides, particularmente um flavonol identificado como quercetina, isolada da fração diclorometano (FD) da <i>T. guianensis</i> e (B) seus sinais característicos ampliados do espectro.</b>	<b>110</b>
<b>Figura 39: Estrutura química do flavonol quercetina (FD18) isolado da fração diclorometano (FD), com os respectivos deslocamentos químicos dos prótons identificados nos anéis aromáticos, após análise do RMN de <math>^1\text{H}</math>.</b>	<b>112</b>
<b>Figura 40: Análise do perfil químico por cromatografia líquida de alta eficiência da fração acetato de etila das folhas da <i>T. guianensis</i>.</b>	<b>114</b>

<b>Figura 41: Perfil químico por CLAE-UV-EM da fração acetato de etila (FA) das folhas da <i>T. guianensis</i>.....</b>	<b>115</b>
<b>Figura 42: Fluxograma de separação e isolamento de sub-frações e substâncias isoladas a partir da fração acetato de etila (FA) das folhas da <i>T. guianensis</i>.....</b>	<b>119</b>
<b>Figura 43: Análise do perfil químico por cromatografia líquida de alta eficiência do composto FA10 da fração acetato de etila das folhas da <i>T. guianensis</i>.....</b>	<b>121</b>
<b>Figura 44: (A) Espectro de RMN de <sup>1</sup>H (400 MHz, DMSO- d<sub>6</sub>) da substância FA10 da classe dos taninos hidrolisáveis, particularmente os galotaninos, identificada como 1,4,6-tri-O-galoil-β-D-glicopiranoose, isolada da fração acetato de etila (FA) da <i>T. guianensis</i> e (B) seus sinais característicos ampliados do espectro. ....</b>	<b>125</b>
<b>Figura 45: (A) Espectro de RMN APT (100 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) da substância FA10 da classe dos taninos hidrolisáveis, particularmente os galotaninos, identificada como 1,4,6-tri-O-galoil-β-D-glicopiranoose, isolada da fração acetato de etila (FA) da <i>T. guianensis</i> e (B) seus sinais característicos ampliados do espectro. ....</b>	<b>126</b>
<b>Figura 46: Espectro de RMN 2D – COSY da substância FA10 da classe dos taninos hidrolisáveis, particularmente os galotaninos, identificada como 1,4,6-tri-O-galoil-β-D-glicopiranoose, isolada da fração acetato de etila (FA) da <i>T. guianensis</i>.....</b>	<b>127</b>
<b>Figura 47: Espectro de RMN 2D – HSQC da substância FAc10 da classe dos taninos hidrolisáveis, particularmente os galotaninos, identificada como 1,4,6-tri-O-galoil-β-D-glicopiranoose, isolada da fração acetato de etila (FA) da <i>T. guianensis</i>.....</b>	<b>128</b>
<b>Figura 48: Espectro de RMN 2D – HMBC da substância FA10 da classe dos taninos hidrolisáveis, particularmente os galotaninos, identificada como 1,4,6-tri-O-galoil-β-D-glicopiranoose, isolada da fração acetato de etila (FA) da <i>T. guianensis</i>.....</b>	<b>129</b>
<b>Figura 49: Estrutura química do galotanino 1,4,6-tri-galoil-β-D-glicose (FA10), isolado da fração acetato de etila (FA), com as principais correlações observadas. ↔ COSY: J<sub>1,2</sub>= 8,39 Hz, presença de β-glicose, ↔ HMBC: correlações a longa distância, ..... HSQC: correlação de curta distância no carbono C-1 anomérico da β-glicose.....</b>	<b>133</b>
<b>Figura 50: Análise do perfil químico por cromatografia líquida de alta eficiência da FA12, obtida a partir da fração acetato de etila (FA) das folhas da <i>T. guianensis</i>.....</b>	<b>135</b>

Figura 51: Análise do perfil químico por cromatografia líquida de alta eficiência do flavonoide FA12.10 isolado da sub-fração FA12 a partir da fração acetato de etila das folhas da <i>T. guianensis</i> .....	137
Figura 52: (A) Espectro de RMN de $^1\text{H}$ (500 MHz, DMSO- $\text{d}_6$ ) da substância FA12.10 da classe dos flavonoides, isolada da sub-fração FA12 identificada como quercetina 3-O-(6''-O-galoil)- $\beta$ -D-galactopiranosídeo, a partir da fração acetato de etila (FA) da <i>T. guianensis</i> e (B) seus sinais característicos ampliados do espectro. ....	141
Figura 53: Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ (500 MHz, DMSO- $\text{d}_6$ ) da substância FA12.10 da classe dos flavonoides, isolada da sub-fração FA12 identificada como quercetina 3-O-(6''-O-galoil)- $\beta$ -D-galactopiranosídeo, a partir da fração acetato de etila (FA) da <i>T. guianensis</i> .....	142
Figura 54: Espectro de RMN 2D – COSY da substância FA12.10 da classe dos flavonoides, isolada da sub-fração FA12 identificada como quercetina 3-O-(6''-O-galoil)- $\beta$ -D-galactopiranosídeo, a partir da fração acetato de etila (FA) da <i>T. guianensis</i> . ....	143
Figura 55: Espectro de RMN 2D – HSQC da substância FA12.10 da classe dos flavonoides, isolada da sub-fração FA12 identificada como quercetina 3-O-(6''-O-galoil)- $\beta$ -D-galactopiranosídeo, a partir da fração acetato de etila (FA) da <i>T. guianensis</i> . ....	144
Figura 56: Espectro de RMN 2D – HMBC da substância FA12.10 da classe dos flavonoides, isolada da sub-fração FA12 identificada como quercetina 3-O-(6''-O-galoil)- $\beta$ -D-galactopiranosídeo, a partir da fração acetato de etila (FA) da <i>T. guianensis</i> . ....	145
Figura 57: Estrutura química da quercetina 3-O-(6''-O-galoil)- $\beta$ -D-galactopiranosídeo (FA12.10) isolada da fração acetato de etila (FA), com as principais correlações observadas. $\leftrightarrow$ COSY: $J_{1,2} = 7,7$ Hz, presença de $\beta$ -galactose, $\leftrightarrow$ HMBC: correlações a longa distância, ..... HSQC: correlação de curta distância no carbono C-1 anomérico da $\beta$ -glicose..	148
Figura 58: Análise do perfil químico por cromatografia líquida de alta eficiência da TAc 29 das folhas da <i>T. guianensis</i> . ....	150
Figura 59: Curvas concentração-resposta do tanino hidrolisável 1,4,6-tri-galoil- $\beta$ -D-glicose (FA10) (1 – 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) e do flavonoide quercetina 3-O-(6''-O-galoil)- $\beta$ -D-galactopiranosídeo (FA12.10) (1 – 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), ambas as substâncias isoladas da fração acetato de etila (FA) do extrato metanólico das folhas de <i>T. guianensis</i> em anéis de aorta com endotélio. ....	151
Figura 60: Análise do perfil químico por cromatografia líquida de alta eficiência da sub-fração FA11 obtida a partir da fração acetato de etila (FA) das folhas da <i>T. guianensis</i> .....	154

<b>Figura 61: Análise do perfil químico por cromatografia líquida de alta eficiência da sub-fração FA14 obtida a partir da fração acetato de etila (FA) das folhas da <i>T. guianensis</i>.....</b>	<b>155</b>
<b>Figura 62: Perfil químico por CLAE-UV-EM da sub-fração FA11 farmacologicamente ativa, obtida a partir da fração acetato de etila (FA) das folhas da <i>T. guianensis</i>.....</b>	<b>157</b>
<b>Figura 63: Curvas concentração-resposta para as sub-frações (A) FA11 e (B) FA14 (1 – 30 µg/mL) oriundas da FA do extrato bruto metanólico das folhas de <i>T. guianensis</i> em anéis de aorta com endotélio. ....</b>	<b>159</b>
<b>Figura 64: Principais mecanismos sugeridos na vasodilatação induzida pelo extrato metanólico da <i>Tapirira guianensis</i> em aorta isolada de ratos Wistar. ....</b>	<b>163</b>
<b>Figura 65: Mecanismo redox-sensível sugerido na vasodilatação induzida pelo extrato metanólico da <i>Tapirira guianensis</i> em artéria coronária isolada de porco. ....</b>	<b>165</b>
<b>Figura 66: Principais mecanismos sugeridos quanto ao retardo da senescência endotelial induzida pelo extrato metanólico da <i>Tapirira guianensis</i> em cultura primária de células endoteliais de coronária de porco. ....</b>	<b>169</b>

## ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1: Sistema gradiente. A = H <sub>2</sub> O [acidificada com ácido fosfórico (H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> ) a pH = 3,2] e B = acetonitrila, utilizando vazão de 1 mL/min. ....	57
Tabela 2: Descrição das informações referentes aos anticorpos primários e secundários utilizados no estudo.....	69
Tabela 3: Partição líquido-líquido para obtenção das frações a partir de 50 g do extrato bruto metanólico das folhas da <i>T. guianensis</i> (EMT). ....	93
Tabela 4: Procedimento cromatográfico a partir de 1028,4 mg da fração diclorometano (FD) das folhas da <i>T. guianensis</i> .....	101
Tabela 5: Deslocamentos químicos ( $\delta$ ) indicativos de um padrão 5,7-dihidroxiado para o anel A e um padrão 3',4'-dihidroxiado para o anel B da substância FD18, identificada como quercetina. ....	111
Tabela 6: Comparação entre os sinais de RMN de <sup>1</sup> H da substância FD18 identificada como quercetina e a literatura (HUANG et al., 2013). ....	111
Tabela 7: Análise por CLAE-UV-EM da fração acetato de etila (FA) com ênfase nos picos majoritários (254 nm) e substâncias isoladas. ....	116
Tabela 8: Procedimento cromatográfico a partir de 2000 mg da fração acetato de etila (FA) das folhas da <i>T. guianensis</i> .....	117
Tabela 9: Procedimento cromatográfico a partir de 100,7 mg da sub-fração FA12 obtida da fração acetato de etila (FA) das folhas da <i>T. guianensis</i> . ....	118
Tabela 10: Deslocamentos químicos ( $\delta$ ) indicativos de um padrão de poliol central tri esterificado com ácido gálico, da substância FA10, identificada como 1,4,6-tri-galoil- $\beta$ -D-glicopiranosose.....	130
Tabela 11: Comparação entre os sinais de RMN de <sup>1</sup> H da substância FA10 identificada como 1,4,6-tri-galoil- $\beta$ -D-glicopiranosose e a literatura (NAWWAR et al., 1994). ....	131
Tabela 12: Comparação entre os sinais de RMN de <sup>13</sup> C da substância FA10 identificada como 1,4,6-tri-galoil- $\beta$ -D-glicopiranosose e a literatura (NAWWAR et al., 1994). ....	132
Tabela 13: Deslocamentos químicos ( $\delta$ ) indicativos de um padrão 5,7-dihidroxiado para o anel A e um padrão 3',4'-dihidroxiado para o anel B, com uma $\beta$ -glicosilação, seguida por uma unidade galoila da substância FA12.10, um derivado da quercetina, identificada como quercetina 3-O- $\beta$ -D-(6''-galoil) galactopiranosídeo. ....	146

**Tabela 14: Comparação entre os sinais de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  da substância FA12.10, um derivado da quercetina, identificada como quercetina 3-O- $\beta$ -D-(6''-galoil) galactopiranosídeo e a literatura (BRACA *et al.*, 2003). ..... 147**

**Tabela 15: Análise por CLAE-UV-EM da sub-fração FA11 com ênfase nos picos majoritários (254 nm) e substâncias isoladas..... 158**

## LISTA DE EQUAÇÕES

**Equação 1: Equação de 1º grau formada pela análise do padrão de quercetina nas concentrações 500 – 16,625 µg/mL. .... 58**

**Equação 2: Fórmula para cálculo da atividade antioxidante após sequestro do DPPH..... 71**



## LISTA DE ABREVIATURAS

[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> – concentração intracelular de cálcio

AC – adenilato ciclase

ADP – difosfato de adenosina

Akt – proteína quinase B

AMPC – 3'5' -monofosfato de adenosina cíclico

Ang II – angiotensina II

AS – anisaldeído sulfúrico

ATP – trifosfato de adenosina

AVE – acidente vascular encefálico

BH<sub>2</sub> – diidrobiopterina

BH<sub>4</sub> – tetrahidrobiopterina

C<sub>18</sub> – sílica de fase inversa

CCD – cromatografia em camada delgada

CE<sub>50</sub> – concentração necessária para produzir 50% do efeito máximo

CI<sub>50</sub> – concentração inibitória média

CLAE – cromatografia líquida de alta eficiência

CLC – cromatografia líquida clássica

CMLVs – células musculares lisas vasculares

COX – ciclooxigenase

DCNTs – doenças crônicas não transmissíveis

DCVs – doenças cardiovasculares

DMSO – dimetilsulfóxido

DPPH – 1,1-difenil-2-picrilidrazila

EDHF – do inglês *endothelium-derived hyperpolarizing factor*

EGb 761® – Extrato padronizado de *Ginkgo biloba*

EM – espectrometria de massas

EMT – extrato metanólico de *Tapirira guianensis*

eNOS – NOS endotelial

ET<sub>B</sub> – receptores de endotelinas do tipo B

FA – fração acetato de etila

FACs – do inglês *fluorescence-activated cell sorting*

FAq – fração aquosa

FB – fração butanólica

FD – fração diclorometano

FH – fração hexânica

FMN – flavina mononucleotídeo

GCs – guanilato ciclase solúvel

GMPc– 3'5'-monofosfato de guanosina cíclico

GTP – guanosina trifosfato

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> – peróxido de hidrogênio

Hp90 – proteína de choque térmico de 90-kDa

IK<sub>Ca</sub> – canais de potássio dependentes de cálcio de condutância intermediária

IL-6 – interleucina-6

iNOS – NOS induzível

IP – iodeto de propídeo

L-NA – L-N<sup>G</sup>-nitroarginina

L-NAME – N<sup>o</sup>-nitro-L-arginina metil éster

MnTMPyP – Mn(III)tetrakis(1-metil-4-piridil) porfirina

NADPH – nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato

NF- $\kappa$ B – fator nuclear kappa B

nNOS – NOS neuronal

NO – óxido nítrico, do inglês *nitric oxide*

NOS – enzima óxido nítrico sintase

NP/PEG – do inglês *Natural products-polyethylene glycol reagent*

ODQ – 1H-[1,2,4] oxadiazolo [4,3-a] quinoxalin-1-ona

PARNA Jurubatiba – Parque Nacional da Restinga de Jurubatiba

PCR – proteína C-reativa

PEG catalase – análogo permeável da catalase associada ao polietilenoglicol;

p-eNOS – eNOS fosforilada

PGI<sub>2</sub> – prostaciclina

PI3-K – fosfatidilinositol 3-quinase

PKA – quinase dependente de AMPc

PKG – quinase dependente de GMPc

PP2 – (4-amino-3-(4-clorofenil)-1H-pirazolo [3,4-d] piridina, 4-amino-5-(4-clorofenil)-7-(t-butil) pirazolo [3,4-d] piridina

RC – reveladores cromatográficos

R<sub>max</sub> – relaxamento máximo

RMN – ressonância magnética nuclear

SA- $\beta$ gal – atividade beta-galactosidase associada à senescência

SCV – sistema cardiovascular

SFB – soro fetal bovino

SFs – substâncias fenólicas

SK<sub>Ca</sub> – canais de potássio dependentes de cálcio de pequena condutância

SOD – superóxido dismutase

TNF- $\alpha$  – fator de necrose tumoral- $\alpha$

$t_R$  – tempo de retenção

Tram-34 – 1-[(2-clorofenil)difenilmetil]-1H-pirazole

U46619 – análogo sintético do TXA<sub>2</sub>

VS – vanilina sulfúrica

## RESUMO

A *Tapirira guianensis* (Anacardiaceae) é uma planta conhecida popularmente como pau-pombo, apresenta importância do ponto de vista ecológico e como fonte de novos princípios bioativos. Quanto à ação no sistema cardiovascular, um único estudo demonstra seu efeito hipotensor em modelo animal, sem aprofundamento farmacológico nem identificação das substâncias responsáveis por esse efeito. Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi realizar um estudo fitoquímico, biomonitorado pela atividade vasodilatadora, a partir do extrato metanólico das folhas de *T. guianensis* (EMT), a ação frente a mecanismos de senescência endotelial e a ação antioxidante *in vitro*. O fracionamento biomonitorado do EMT permitiu o isolamento e caracterização da quercetina, quercetina 3-O-(6''-O-galoil)- $\beta$ -D-galactopiranosídeo, e do 1,4,6-tri-O-galoil- $\beta$ -D-glicose por RMN, além da identificação dos compostos galoil-hexahidroxidifenil (HHDP)-hexosídeo e miricetina deoxihexosídeo, por CLAE-UV-EM. Estas substâncias ainda não haviam sido relatadas na espécie *T. guianensis*. O EMT induziu vasodilatação mediada pela via NO/GMPc, com ativação da eNOS através da via PI3K/Akt, além de ativar também a via PGI<sub>2</sub>, ambas estudadas em aorta de ratos. A 1,4,6-tri-O-galoil- $\beta$ -D-glicose e a quercetina 3-O-(6''-O-galoil)- $\beta$ -D-galactopiranosídeo não apresentaram atividade vasodilatadora nos anéis de aorta. De acordo com dados da literatura a quercetina e a miricetina desoxihexosídeo são capazes de induzir vasodilatação em aorta de ratos e parecem ser as substâncias responsáveis por esta atividade no EMT. O EMT induziu vasodilatação em coronária de porco, por via redox-sensível na ativação da Src quinase e PI3-K/Akt. Em cultura primária de células endoteliais de coronária de porco, o EMT reduziu o marcador de senescência SA- $\beta$ gal em células senescentes P3, após 48 h. Quanto a proteínas envolvidas na senescência, o EMT não alterou a expressão de p53, enquanto as expressões de p21 e p16 foram reduzidas após 48 h, em células senescentes P3. Na ação antioxidante *in vitro*, o EMT e as frações, exceto a Hex foram mais potentes do que o padrão Egb 761<sup>®</sup>, entretanto, não foram maiores que o padrão de quercetina. Portanto, os resultados alcançados sugerem uma ação promissora das folhas da *T. guianensis* em distúrbios vasculares, mostrando efeitos farmacológicos em vias essenciais relacionadas às doenças cardiovasculares.

## ABSTRACT

*Tapirira guianensis* (Anacardiaceae), commonly known as *pau-pombo*, is a plant species with ecological relevance and a potential source of new bioactive principles. In respect to its action on the cardiovascular system, a single report showed the hypotensive action from its leaves in an animal model, without any further understanding of the mechanism of action or identification of active compounds. Thus, the objective of the present study was to conduct a biomonitored phytochemical study of the vasodilatory activity of methanol crude extract of leaves of *T. guianensis* (MET), endothelial senescence mechanisms and antioxidant action *in vitro*. The biomonitored fractionation of MET allowed the isolation and characterization of quercetin, quercetin 3-O-(6''-O-galloyl)- $\beta$ -D-galactopyranoside and 1,4,6-tri-O-galloyl- $\beta$ -D-glucose by NMR, besides the identification of the galloyl-hexahydroxydiphenoyl (HHDP)-hexoside and myricetin deoxyhexoside compounds by HPLC-UV-MS. These substances had not yet been reported in *T. guianensis* species. MET induced vasodilation mediated by the NO/cGMP pathway, with activation of eNOS through the PI3K/Akt pathway, and also enabled the PGI<sub>2</sub> pathway, both studied in rat aorta. The compounds 1,4,6-tri-O-galloyl- $\beta$ -D-glucose and quercetin 3-O-(6''-O-galloyl)- $\beta$ -D-galactopyranoside showed no vasodilatory activity in rings of aorta. According to data from the literature, quercetin and myricetin deoxyhexoside are able to induce vasodilation in rat aorta, and they appear to be the substances responsible for the MET activity. MET induced vasodilation in porcine coronary, through a redox-sensitive pathway in the activation of Src kinase and PI3K/Akt. In primary culture of endothelial cells of porcine coronary, MET reduced the senescence marker SA- $\beta$ gal in senescent cells, after 48 h. In respect to cell cycle regulatory proteins involved in senescence, the MET did not alter p53 expression, while the expression of p21 and p16 were reduced after 48 h in senescent P3 cells. For *in vitro* antioxidant activity, MET and the tested fractions, except fraction Hex, were more potent than the standard Egb 761<sup>®</sup>, however, quercetin standard has the higher activity. Therefore, the results here suggest a promising action of leaves from *T. guianensis* in vascular disorders, showing pharmacological effects in pathways involved in the progression of cardiovascular disease.

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Doenças cardiovasculares

As doenças crônicas não transmissíveis (DCNTs) apresentam um grande impacto na saúde mundial e brasileira, sendo doenças de caráter multifatorial e que apresentam fatores de risco de alta prevalência (BRASIL, 2011; WHO, 2015). No Brasil, as doenças cardiovasculares (DCVs), neoplasias, doenças respiratórias crônicas e diabetes são as DCNTs de maior prevalência (BRASIL, 2011; SCHMIDT *et al.*, 2011; SANTOS *et al.*, 2015).

As DCVs apresentam uma estatística alarmante tanto em relação aos casos de incapacidade quanto ao número de óbitos, representando a principal causa de morbimortalidade no mundo e, portanto, um grave problema de saúde pública (BRASIL, 2011; SANTOS *et al.*, 2015; WHO, 2015). Há uma estimativa de que 17,5 milhões de pessoas morreram em 2012, representando 31% de toda a população global. Deste total de óbitos, 7,4 milhões ocorreram devido a doenças cardíacas coronarianas e 6,7 milhões, por acidente vascular encefálico (AVE) (WHO, 2015).

As DCVs incluem doenças do coração e dos vasos sanguíneos periféricos e cerebrais. As DCVs podem ser divididas em doenças associadas à aterosclerose (isquemia do miocárdio, doença cerebrovascular e doenças da aorta e outras artérias, incluindo a doença vascular periférica) e outras DCVs (doenças congênitas do coração, danos ao coração e válvulas devido à febre reumática, cardiomiopatias e arritmias cardíacas) (WHO, 2015).

Uma das principais formas de prevenir as DCVs é a mudança do estilo de vida, como adoção de uma alimentação saudável, prática de atividades físicas e interrupção do tabagismo (WHO, 2015). Pessoas que apresentam um ou mais fatores de risco como hipertensão arterial sistêmica, obesidade, diabetes e hiperlipidemia estão em elevado risco cardiovascular. Após o estabelecimento da DCV, o tratamento pode ser realizado com diferentes classes de medicamentos, os quais possuem, como alvos farmacológicos, enzimas, receptores, canais iônicos e vias metabólicas. Contudo, ao contrário das terapias infecciosas, esses agentes farmacológicos não oferecem cura, somente previnem ou reduzem a progressão da doença quando usados de forma contínua (REGITZ-ZAGROSEK *et al.*, 2011; WEBER *et al.*, 2013).

## 1.2 Os vasos sanguíneos

O sistema vascular é constituído de artérias e veias que possuem a função de distribuir o sangue para as diversas partes do corpo, suprindo as necessidades celulares dos diferentes tecidos (KOEPPEN & STANTON, 2009; HALL, 2011).

As paredes das artérias e veias são formadas por três camadas ou túnicas, denominadas de túnica íntima (mais interna), túnica média (intermediária) e túnica adventícia (mais externa), as quais apresentam composições características, de acordo com o tipo de vaso (CORADA *et al.*, 2014) (**Figura 1**).

A túnica íntima é constituída por uma camada contínua que reveste internamente todos os vasos, sendo constituída pelo endotélio que repousa sobre uma lâmina basal. Externamente à túnica íntima, há uma pequena quantidade de tecido frouxo, denominada de camada subendotelial. Na maioria das artérias segue-se uma lâmina de material elástico, a lâmina elástica interna (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2004).

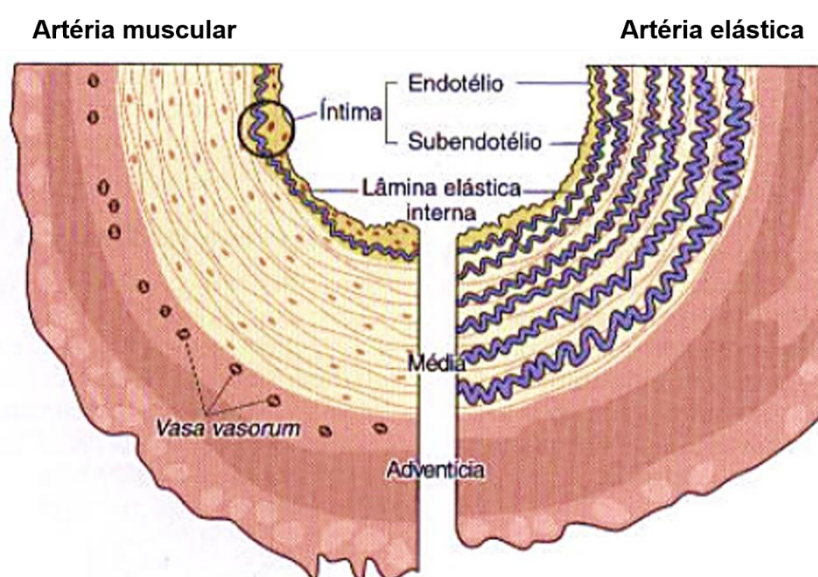
A túnica média é constituída por fibras musculares lisas e fibras colágenas, as quais podem variar conforme o tipo de vaso (artéria ou veia) e o seu calibre (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2004). As células musculares lisas vasculares (CMLVs) são altamente especializadas, funcionando por meio da contração e relaxamento para regular o diâmetro dos vasos sanguíneos, pressão arterial e distribuição do fluxo sanguíneo (CLARCK & PYNE-GEITHMAN, 2005). Os mediadores produzidos pelas células endoteliais se difundem para as CMLVs subjacentes, iniciando diversos sinais celulares que regulam o tônus vascular, sendo este um processo crítico para a manutenção da homeostase vascular (FURCHGOTT & ZAWADZKI, 1980; CHATTERJEE & CATRAVAS, 2008; TRIGGLE *et al.*, 2012).

A regulação do tônus vascular é possível devido à ação do aparelho contrátil de actina-miosina das CMLVs, o qual é precedido pelo aumento da concentração intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$  ( $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ). Tal aumento pode ocorrer por duas vias; (1) através da abertura dos canais de  $\text{Ca}^{2+}$  do tipo L regulados por voltagem após a despolarização da membrana e (2) pela liberação de  $\text{Ca}^{2+}$  do retículo sarcoplasmático. O complexo  $\text{Ca}^{2+}$ -calmodulina é formado e ativa a quinase da



cadeia leve de miosina, que fosforila a cadeia leve de miosina. Desta forma, a cadeia leve de miosina pode interagir com os filamentos de actina, formando as pontes cruzadas de actina-miosina, dando início à contração das CMLVs (KOEPPEN & STANTON, 2009; HALL, 2011).

A túnica adventícia é formada de tecido conjuntivo, contendo quantidades variáveis de fibras colágenas. Apresenta pequenos vasos sanguíneos destinados à nutrição dos tecidos denominados de *vasa vasorum*, que em latim significa “vaso dos vasos” (**Figura 1**) (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2004).



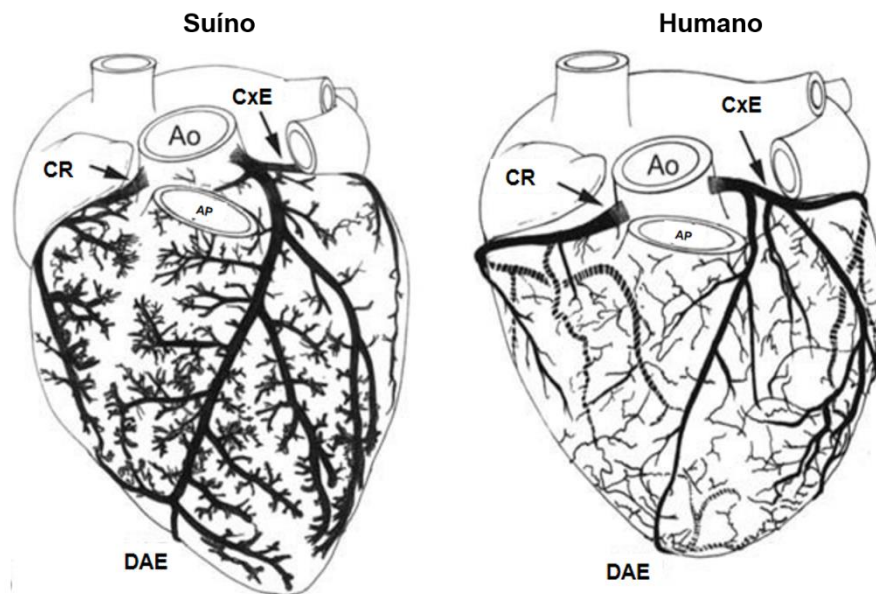
**Figura 1: Representação esquemática de um corte histológico de uma artéria muscular e uma artéria elástica.** A túnica média de uma artéria muscular contém predominantemente músculo liso, enquanto a túnica média das artérias elásticas é formada por camadas de músculo liso intercaladas por lâminas elásticas. A camada adventícia e a porção externa da média possuem vasos sanguíneos pequenos (*vasa vasorum*) e fibras elásticas e colágenas. Retirado de JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2004.

Diferentes vasos sanguíneos isolados de animais de experimentação são utilizados para avaliação dos processos envolvidos na regulação do tônus vascular e na fisiopatologia da hipertensão arterial sistêmica, do remodelamento vascular, da aterosclerose e de alterações relacionadas ao diabetes (ZARAGOZA *et al.*, 2011; ZHAO & GU, 2014). Portanto, a variabilidade interespecie na fisiologia cardiovascular constitui um fator importante a ser considerado na utilização de modelos experimentais para que estes possam ser

utilizados de forma adequada e viabilizem comparações com os processos clínicos observados no homem.

A aorta é um vaso de condutância responsável pela distribuição do sangue oxigenado do coração para todo o corpo, sofrendo diversas ramificações à medida que avança na irrigação do organismo (KOEPPEN & STANTON, 2009; HALL, 2011). Do ponto de vista fisiopatológico, apresenta importância devido ao desenvolvimento de aterosclerose da aorta, aneurisma dissecante da aorta e coarctação da aorta (FERRARI *et al.*, 1998; HERBEL, 2001; ALLEN *et al.*, 2013). A aorta apresenta uma primeira ramificação em sua porção ascendente, gerando as artérias coronárias direita e esquerda, as quais possibilitam a manutenção da viabilidade de todo o tecido cardíaco, já que a difusão de nutrientes e oxigênio das câmaras cardíacas para irrigar todo o tecido é um processo inviável. Exatamente devido esta função, a artéria coronária é amplamente estudada, principalmente, devido o infarto agudo do miocárdio gerado após obstrução coronariana (KOEPPEN & STANTON, 2009; HALL, 2011).

Devido à semelhança genética entre humanos e ratos, tecidos isolados destes animais, como a aorta, são amplamente usados em pesquisas científicas (SPENCER, 2012). Estudos com coronária suína possuem grandes vantagens, já que existem similaridades fisiológicas quando comparada à fisiologia cardíaca humana, como em aspectos da coagulação, anatomia e distribuição da circulação coronariana (GOODMAN, 1999; SUZUKI *et al.*, 2011; GALON *et al.*, 2013) (**Figura 2**).



**Figura 2: Anatomia comparativa da circulação coronariana interespécies.** A distribuição das artérias coronárias e fornecimento para o miocárdio por colaterais no coração suíno e coração humano são muito semelhantes, sendo o coração de porco um preditor nas possíveis respostas em corações humanos após estudos experimentais. Ao: aorta; AP: artéria pulmonar; CR: artéria coronária direita; CxE: artéria circunflexa esquerda; DAE: artéria descendente anterior esquerda. Adaptado de *University of Minnesota*, disponível em [www.vhlab.umn.edu](http://www.vhlab.umn.edu), acesso em 04/2016.

### 1.2.1 Funções do endotélio vascular

O endotélio vascular é um órgão extenso constituído por uma monocamada de células localizada entre a parede dos vasos sanguíneos e o sangue (JAFFE, 1987; AUGUSTIN *et al.*, 1994; RAJENDRAN *et al.*, 2013). Sendo assim, as células endoteliais cobrem uma extensa área dentro dos vasos sanguíneos, a qual, em um adulto de 70 Kg, corresponde a aproximadamente 1000 m<sup>2</sup>, com aproximadamente 10<sup>12</sup> células (JAFFE, 1987; AUGUSTIN *et al.*, 1994).

As células endoteliais possuem ação parácrina, autócrina e endócrina, de forma que recebem e efetuam respostas fisiológicas indispensáveis na regulação do tônus vascular, manutenção da fluidez sanguínea e homeostase do tecido vascular, além de possuir uma função de barreira seletiva, regulando o fluxo de solutos e a permeabilidade dos fluidos entre o sangue e os tecidos (JAFFE, 1987; AUGUSTIN *et al.*, 1994; CINES *et al.*, 1998).

O endotélio também regula a homeostase, através da produção de substâncias pró-trombóticas, anti-trombóticas, fibrinolíticas e antifibrinolíticas, de

processos inflamatório e imune, possuindo ainda um papel fundamental nos processos de proliferação e migração celular, que envolvem o remodelamento vascular e a angiogênese (FURCHGOTT & VANHOUTTE, 1989; FÉLÉTOU & VANHOUTTE, 2006; CHATTERJEE & CATRAVAS, 2008; TRIGGLE *et al.*, 2012). O endotélio vascular ainda é capaz de detectar estímulos mecânicos tais como pressão e tensão de cisalhamento, assim como estímulos de substâncias vasoativas (FURCHGOTT & ZAWADZKI, 1980).

### 1.2.2 Fatores vasodilatadores derivados do endotélio

O endotélio é capaz de produzir e responder a vários mediadores potentes que possuem ação local. Normalmente, estes fatores atuam de forma coordenada, para que as ações vasodilatadora e vasoconstritora ocorram de forma equilibrada para regular a resistência do leito vascular, mantendo a perfusão estável do tecido (URAKAMI-HARASAWA *et al.*, 1997; CINES *et al.*, 1998; SIMOKAWA, 2014). Entre os fatores circulantes naturais vasodilatadores tem-se a acetilcolina (via receptor muscarínico M<sub>3</sub>), a bradicinina (via receptor de cinina B<sub>2</sub>), a histamina (via receptor histaminérgico H<sub>2</sub>) e a endotelina [(via receptores de endotelinas do tipo B (ET<sub>B</sub>)], os quais atuarão pela produção do principal fator relaxante derivado do endotélio, o NO (do inglês *nitric oxide*) (VANHOUTTE *et al.*, 2009).

Além do NO, a prostaciclina (PGI<sub>2</sub>) e o EDHF (do inglês *endothelium-derived hyperpolarizing factor*) são importantes vasodilatadores derivados do endotélio vascular, os quais atuam por mecanismos intracelulares distintos, contudo, irão acarretar em uma resposta fisiológica comum que desencadeia na dilatação do músculo liso vascular (FURCHGOTT & VANHOUTTE, 1989; FÉLÉTOU & VANHOUTTE, 2006; TRIGGLE *et al.*, 2012).

A contribuição dos três principais fatores derivados do endotélio, NO, EDHF e PGI<sub>2</sub>, no relaxamento vascular ocorre de forma heterogênea quanto à sua ação nos leitos vasculares, variando de acordo com o tamanho dos diferentes vasos sanguíneos (SHIMOKAWA *et al.*, 1996; URAKAMI-HARASAWA *et al.*, 1997). O NO apresenta um papel mais pronunciado em vasos arteriais de condução, como aorta e artérias coronárias epicárdicas. O EDHF desempenha importante função predominantemente em artérias de resistência, como os microvasos coronarianos e artérias mesentéricas (SHIMOKAWA *et al.*,

1996; URAKAMI-HARASAWA *et al.*, 1997), enquanto que a contribuição da PGI<sub>2</sub>, parece não mudar de acordo com o tipo de vaso (SHIMOKAWA *et al.*, 1996) (**Figura 3**).



**Figura 3:** Representação esquemática da contribuição dos fatores derivados do endotélio no relaxamento vascular em função do tamanho do vaso sanguíneo. EDHF: fator hiperpolarizante derivado do endotélio; NO: óxido nítrico, PGI<sub>2</sub>: prostaciclina. Adaptado de SHIMOKAWA, 2014.

### 1.2.3 Óxido nítrico

Dentre os fatores liberados pelo endotélio, o NO é o principal fator vasodilatador, sendo fundamental na manutenção da homeostase vascular. (VALLANCE *et al.*, 1989; SEIDEL, *et al.*, 1997; VALLANCE & CHAN, 2001; ANACAK & CATRAVAS, 2006; YILDIZ, 2007). Em mamíferos, a enzima NO sintase (NOS) se encontra em três isoformas: NOS neuronal (nNOS) e NOS endotelial (eNOS), ambas constitutivas e dependentes de cálcio/calmodulina, e a NOS induzível (iNOS), independente de Ca<sup>2+</sup> (IADECOLA, 1997; CALABRESE *et al.*, 2007; FÖRSTERMAN & SESSA, 2012).

A nNOS é uma enzima expressa constitutivamente no encéfalo, sendo encontrada em diferentes sítios neuronais, dependendo das regiões anatômicas e funcionais, assim como nos rins, ilhotas pancreáticas, músculo esquelético e células musculares lisas. A isoforma eNOS é principalmente expressa nas células endoteliais, além de ser encontrada em cardiomiócitos, plaquetas,

cérebro, sinciciotrofoblasto de placenta humana e rins (FÖRSTERMAN & SESSA, 2012). Já a iNOS é expressa somente após um estímulo imunológico e durante uma resposta inflamatória celular (NATHAN, 1997; FÖRSTERMAN & SESSA, 2012).

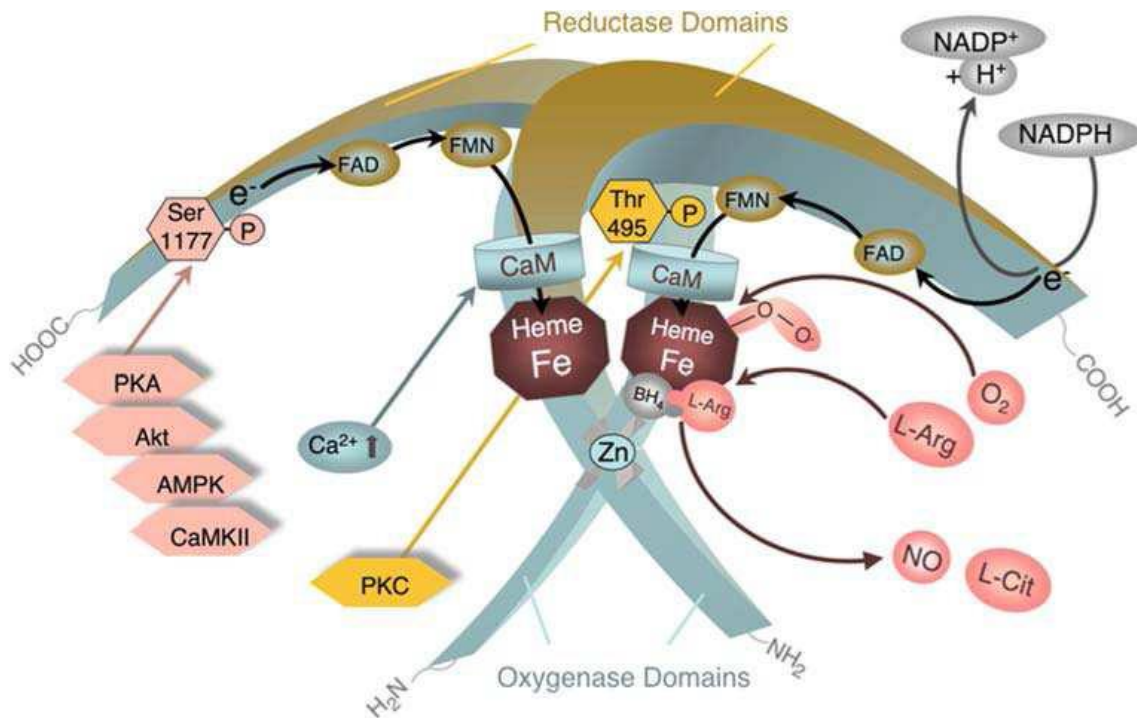
Estruturalmente a eNOS é constituída por um domínio redutase e um domínio oxidase, nos quais a síntese de NO a partir de L-arginina é catalisada na presença de oxigênio, nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH) e de cofatores como flavina mononucleotídeo (FMN), flavina adenina dinucleotídeo, heme e tetrahidrobiopterina (BH4) (KOSHLAND, 1992; LOWENSTEIN *et al.*, 1994; IADECOLA, 1997; VINCENT *et al.*, 1998; CALABRESE *et al.*, 2007; FÖRSTERMAN & SESSA, 2012).

Ainda, os domínios são constituídos de sítios proteicos específicos, nos quais resíduos serina (Ser1177 e Ser1179) e treonina (Thr495) são pontos importantes na regulação da atividade da eNOS (ZHAO *et al.*, 2015). Os resíduos Ser1177 e Ser1179 são sítios de ativação, enquanto que o resíduo Thr495 é um sítio de inativação (**Figuras 4 e 5**) (FÖRSTERMAN & SESSA, 2012). Nas células endoteliais vasculares, em condições basais, a caveolina-1 presente na membrana celular mantém a ligação com a eNOS, o que leva a uma inibição de sua atividade enzimática, sendo um mecanismo que limita a produção de NO (BALLIGAND *et al.*, 2009; FÖRSTERMAN & SESSA, 2012).

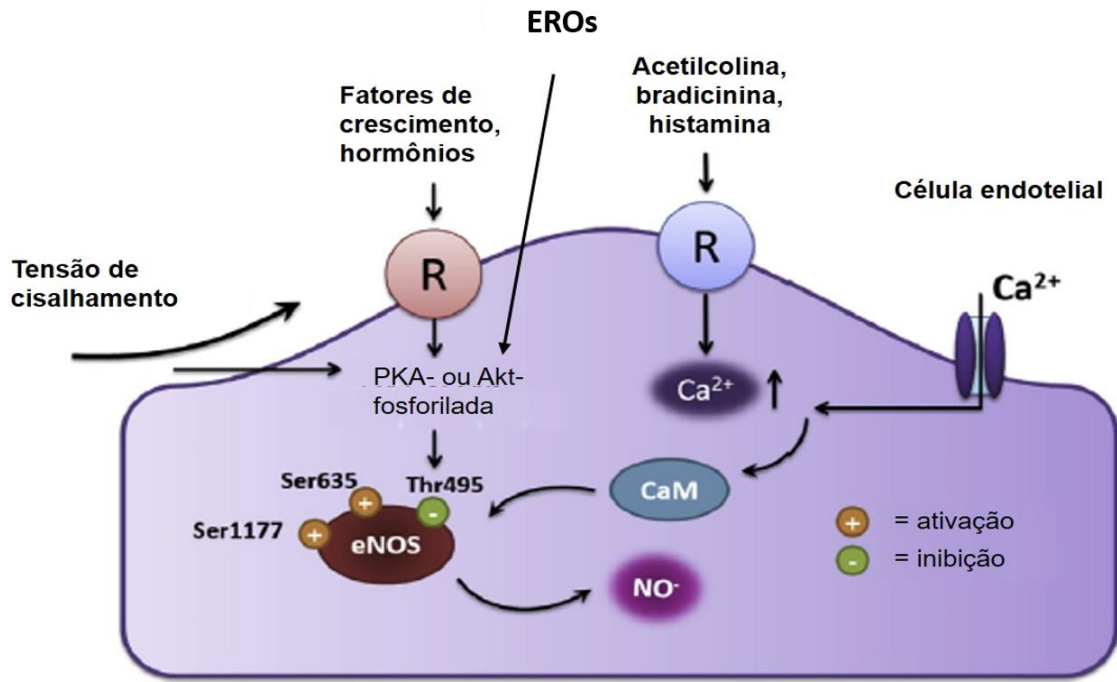
A ativação de receptores presentes na membrana das células endoteliais por agonistas como a acetilcolina, bradicinina e histamina, resulta em um aumento da  $[Ca^{2+}]_i$ , levando à quebra da interação entre caveolina/eNOS pela ligação do complexo  $Ca^{2+}$ /calmodulina à eNOS, facilitando o fluxo de elétrons a partir do domínio redutase para o domínio oxigenase (**Figura 4 e 5**) (ZHAO *et al.*, 2015).

A eNOS também pode ser ativada por mecanismos independentes do aumento do  $[Ca^{2+}]_i$ , como ocorre na ativação induzida por forças mecânicas como a tensão de cisalhamento ou estresse de cisalhamento, assim como a presença de espécies reativas de oxigênio (EROs) em concentrações fisiológicas como o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) (ZHAO *et al.*, 2015), o qual também atua por mecanismos dependentes do  $[Ca^{2+}]_i$  (THOMAS *et al.*, 2002). O  $H_2O_2$  leva a ativação da eNOS mediada pela PI3-K via fosforilação de Ser1177 e mecanismo dependente de Akt, enquanto que na desfosforilação da Thr495

não há envolvimento de cálcio e Akt (THOMAS *et al.*, 2002). Um possível papel para o aumento da atividade e expressão da eNOS  $H_2O_2$ -induzida, se deve a um possível mecanismo de compensação para a manutenção da atividade do NO em processos de aumento do estresse oxidativo, presentes em muitas doenças vasculares (**Figura 5**) (THOMAS *et al.*, 2002).



**Figura 4: Representação esquemática da regulação da atividade da óxido nítrico sintase endotelial (eNOS) pelo  $Ca^{2+}$  intracelular e fosforilação.** CaM: calmodulina; CaMKII: proteína quinase II dependente de  $Ca^{2+}$ /calmodulina; PKA: proteína quinase A; AMPK: proteína quinase AMP-ativada; PKC: proteína quinase C. Retirado de FÖRSTERMAN & SESSA, 2012.



**Figura 5: Ativação da óxido nítrico sintase endotelial cálcio-dependente e cálcio-independente.** EROs: espécies reativas de oxigênio. Adaptado de ZHAO *et al.*, 2015.

O NO é uma molécula lipossolúvel que, por difusão passiva, rapidamente se difunde para as CMLVs. A vasodilatação mediada pelo NO ocorre com a ativação da enzima guanilato ciclase solúvel (GCs) (FÖRSTERMANN *et al.*, 1986), que a partir da guanosina trifosfato (GTP) produz 3'5' -monofosfato de guanosina cíclico (cGMP), que desencadeia a ativação da quinase dependente de cGMP (PKG). A PKG é uma proteína quinase serina/treonina específica, que leva a transferência catalítica do fosfato do ATP para alvos proteicos em seus resíduos serina e treonina, sendo identificadas em mamíferos as PKG-tipo I (PKG-I) e tipo II (PKG-II) (LUCAS *et al.*, 2000). No músculo liso vascular, a PKG-I foi detectada em alta concentração, a qual medeia a fosforilação de diversas proteínas, resultando em redução da sensibilidade da cadeia de miosina ao Ca<sup>2+</sup> intracelular, redução da liberação dos estoques de Ca<sup>2+</sup> pelo bloqueio de receptores IP<sub>3</sub>, abertura de canais de potássio que levam a hiperpolarização celular, e culminam com a vasodilatação (LUCAS *et al.*, 2000; EVGENOV *et al.*, 2006; KOEPPEN & STANTON, 2009; HALL, 2011; MITROVIC *et al.*, 2011).



#### 1.2.4 EDHF

A existência de um EDHF foi proposta na década de 80 devido à observação da hiperpolarização do músculo liso vascular independente do NO e da PGI<sub>2</sub> (EDWARDS *et al.*, 2010; GARLAND *et al.*, 2011). O estímulo para a hiperpolarização vascular se deve à ação de um agonista ou através de tensão de cisalhamento. O processo vasodilatador resultante terá três características, as quais consistem (1) na participação do endotélio, (2) vasodilatação de forma distinta quando comparada ao NO e PGI<sub>2</sub> e (3) envolvimento da ativação de canais de K<sup>+</sup>, que podem estar localizados no endotélio, CMLVs ou em ambos (BRYAN *et al.*, 2005). Em células endoteliais os agonistas acetilcolina, bradicinina e substância P ativam receptores que conduzem ao aumento da [Ca<sup>2+</sup>], o que aumenta a condutância do K<sup>+</sup> pelos canais de potássio ativados por cálcio (K<sub>Ca</sub>). O aumento do potássio extracelular leva a hiperpolarização da membrana das CMLVs, através da ativação do canal de potássio retificador (K<sub>ir</sub>) (Figura 6) (BUSSE *et al.*, 2002; EDWARDS *et al.*, 2010).

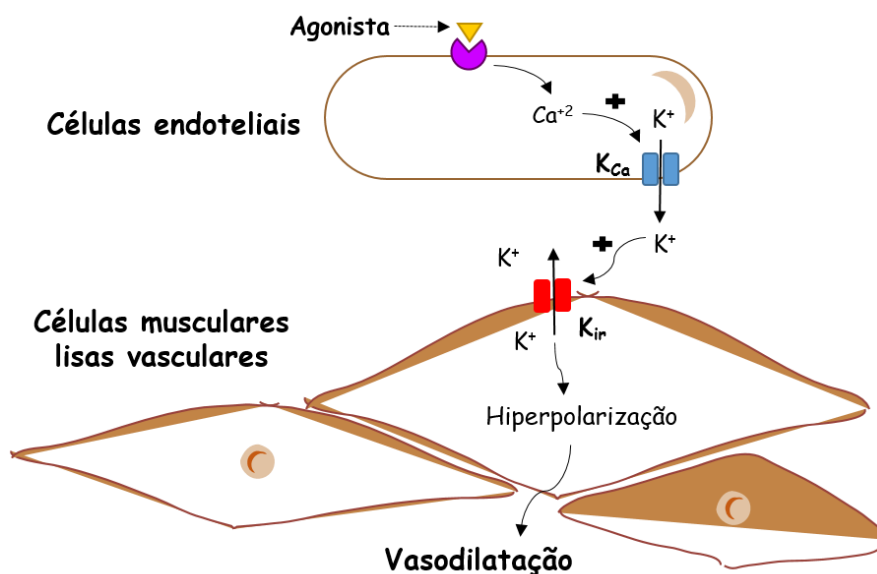


Figura 6: Mecanismo de ação vasodilatador do fator hiperpolarizante derivado do endotélio (EDHF) no relaxamento das células musculares lisas vasculares. K<sub>Ca</sub>: canais de potássio ativados por cálcio; K<sub>ir</sub>: canal de potássio retificador. Adaptado de Bryan *et al.*, 2005.

### 1.2.5 Prostaciclina (PGI<sub>2</sub>)

Ao contrário do NO, a PGI<sub>2</sub> causa a vasodilatação das CMLVs através da ligação ao receptor de PGI<sub>2</sub>, um membro de receptores acoplados a proteína G<sub>s</sub>, que segue com a ativação da adenilato ciclase (AC) e aumento da produção de 3'5' -monofosfato de adenosina cíclico (AMPc) (FUGITA *et al.*, 1998; HECKER, 2000; FÉLÉTOU *et al.*, 2010). O AMPc ativa a quinase dependente de AMPc (PKA), a qual provoca vasodilatação por mecanismos como a redução da sensibilidade da miosina ao Ca<sup>2+</sup> e redução dos níveis de [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> através da captação do Ca<sup>2+</sup> pelo retículo sarcoplasmático, e ainda a redução do influxo de Ca<sup>2+</sup> através dos canais de Ca<sup>2+</sup> do tipo L (EVANS & GUNDERSON, 1998; FUGITA *et al.*, 1998; FÉLÉTOU *et al.*, 2010).

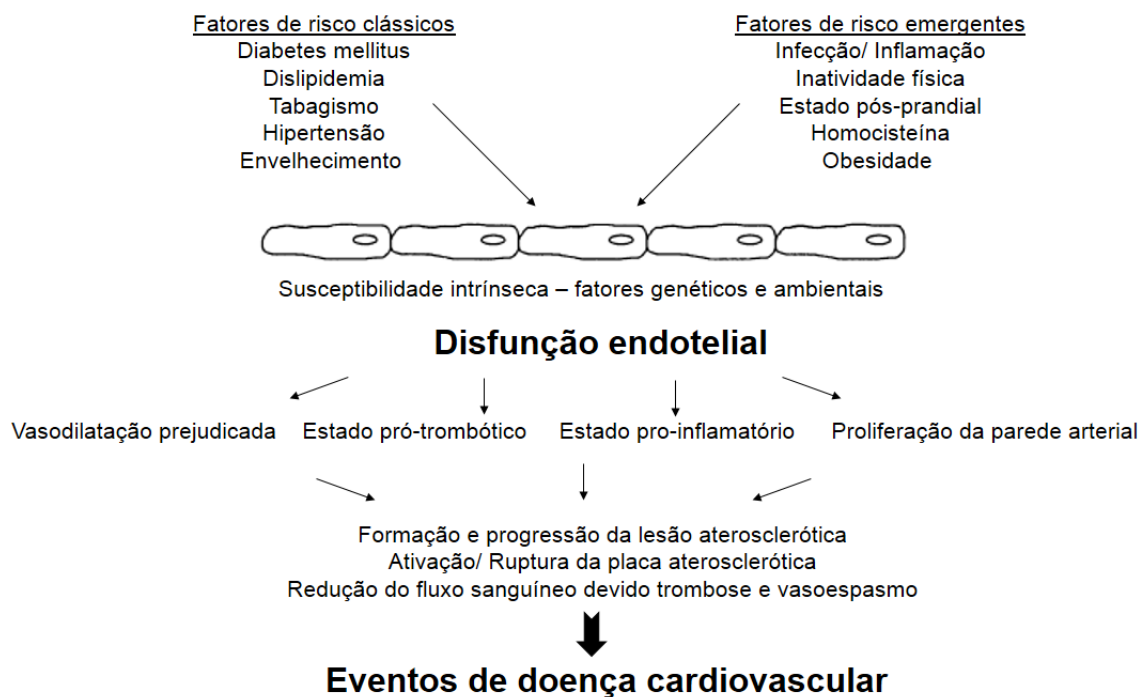
## 1.3 Fisiopatologia das alterações vasculares associadas às DCVs

### 1.3.1 Disfunção endotelial

A disfunção endotelial é decorrente de um conjunto de processos que levam a alterações nos mecanismos reguladores de síntese, liberação e/ou efeito dos fatores vasodilatadores e vasoconstritores, particularmente com redução da biodisponibilidade do NO e/ou aumento dos fatores constritores derivados do endotélio como angiotensina II, endotelina e prostanóides (CINES *et al.*, 1998; FÉLÉTOU *et al.*, 2010). O resultado deste desbalanço é uma redução da resposta vasodilatadora endotélio-dependente, a qual caracteriza a alteração funcional decorrente da disfunção endotelial (ANDERSON, 1999; VANHOUTTE, 2009; VANHOUTTE *et al.*, 2009; FÖRSTERMAN, 2010).

A disfunção endotelial é um processo subclínico que marca os eventos fisiopatológicos vasculares (CINES *et al.*, 1998; VANHOUTTE *et al.*, 2009; FÖRSTERMAN, 2010), a qual não está apenas associada às DCVs, mas pode preceder seu desenvolvimento, estando presente em fatores de risco como hipertensão arterial sistêmica, envelhecimento, diabetes, obesidade, sedentarismo e estresse (**Figura 7**) (WIDLANSKY *et al.*, 2003; TADDEI *et al.*, 1996). A disfunção endotelial está relacionada ao aumento do risco cardiovascular, estando envolvida na fisiopatologia da doença coronariana e da aterosclerose (LIBBY, 2001).

Além disso, na disfunção endotelial ocorre a regulação positiva das moléculas de adesão, aumento da secreção de citocinas e aderência de leucócitos, aumento da permeabilidade celular, oxidação de lipoproteínas de baixa densidade, ativação de plaquetas, proliferação e migração de CMLVs (LIBBY, 2001), desencadeando um estado pró-inflamatório, pró-trombótico e de hiperplasia e hipertrofia das CMLVs (WIDLANSKY *et al.*, 2003).



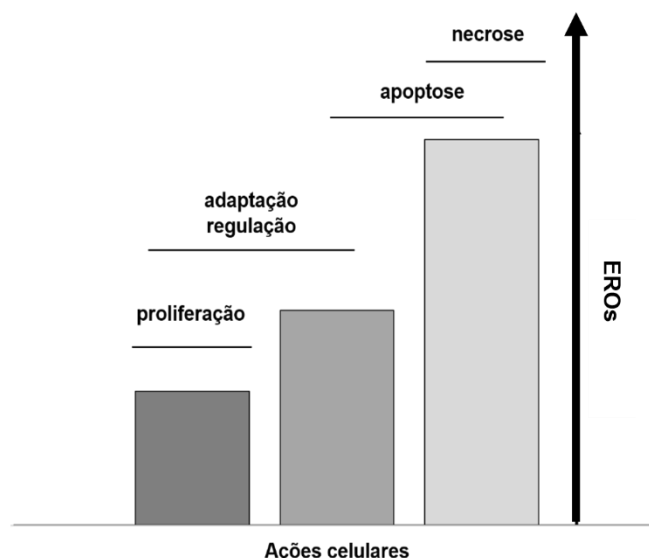
**Figura 7: A disfunção endotelial na patogênese dos eventos da doença cardiovascular.**  
Adaptado de WIDLANSKY *et al.*, 2003.

### 1.3.2 Estresse oxidativo

Em concentrações fisiológicas, as EROs como o  $O_2^{\cdot-}$  e o  $H_2O_2$  participam da regulação do desenvolvimento e da proliferação celular, regulando a homeostase do organismo (BUETLER *et al.*, 2004; LISMONT *et al.* 2015). As transduções de sinais reguladas pelas EROs são denominadas de sinalização redox e em células saudáveis, a atuação destas, como segundos mensageiros, é de fundamental importância (BUETLER *et al.*, 2004; LISMONT *et al.* 2015).

Entretanto, este papel fisiológico das EROs está intrinsecamente relacionado com as concentrações às quais o organismo é exposto, já que, em altas concentrações, podem induzir apoptose e necrose celular. Sendo assim,

um deslocamento no equilíbrio redox em favor de moléculas oxidadas, com perda dos mecanismos antioxidantes de defesa, dá origem ao fenômeno denominado estresse oxidativo, causando danos a biomoléculas e disparo de mecanismos de morte celular (**Figura 8**) (LISMONT *et al.* 2015).



**Figura 8: Ações celulares das espécies reativas de oxigênio (EROs).** Baseado em BUETLER *et al.*, 2004; LISMONT *et al.*, 2015.

O estresse oxidativo possui um papel importantíssimo no desenvolvimento das DCVs e está relacionado ao desenvolvimento de várias alterações vasculares (SCHNABEL & BLANKENBERG, 2007; VIRDIS *et al.* 2011). Desta forma, o desequilíbrio acarretado pelo aumento na produção de EROs condiciona o desenvolvimento da disfunção endotelial (FÖRSTERMAN, 2010).

A produção aumentada de EROs, como o  $O_2^{\cdot-}$ , leva a danos celulares e redução da biodisponibilidade do NO uma vez que o  $O_2^{\cdot-}$  reage com o NO formando o peróxido nitrito ( $ONOO^-$ ), (NASEEM, 2005; EVGENOV *et al.*, 2006; SCHNABEL & BLANKENBERG, 2007; TOTZECK *et al.*, 2011; FÖRSTERMAN & SESSA, 2012). O processo oxidativo leva ao desacoplamento da eNOS, que marca a disfunção endotelial. Isto ocorre devido à oxidação de BH4, um cofator essencial para a atividade da eNOS (**Figura 4**), o qual sofre oxidação pelo  $ONOO^-$ , produzindo  $BH_3^{\cdot}$  radicalar ou BH2 (diidrobiopterina). Tal evento reduz

a afinidade da eNOS pelo substrato L-arginina necessário para formação do NO e leva a geração de  $O_2^-$  (HUET *et al.*, 2011; FÖRSTERMAN & SESSA, 2012).

### 1.3.3 Senescência celular

O processo de envelhecimento é bem conhecido nos sistemas biológicos, sendo este um fenômeno natural iniciado na concepção e continuado durante o amadurecimento do organismo até sua morte. Em organismos jovens, tal processo está relacionado com a proteção do organismo, já que impede a proliferação de células danificadas, protegendo contra o desenvolvimento de células malignas e ajudando na manutenção da homeostasia (LÓPEZ-OTÍN *et al.*, 2013). Entretanto, em organismos senescentes, ocorre um acúmulo de células em estado de senescência acarretando em um aumento dos eventos deletérios para os tecidos, o que contribui para o envelhecimento (KAEBERLEIN, 2013; LÓPEZ-OTÍN *et al.*, 2013).

O processo de senescência celular é atualmente definido como o resultado da interrupção do ciclo celular, assim como da sua proliferação, ocorrendo após resposta a uma variedade de agentes que causam estresse (BEN-PORATH & WEINBERG, 2005). No entanto, as células senescentes apresentam alterações morfológicas, o que sugere que as mesmas possuem a capacidade de hipertrofia, ocorrendo desta forma, um desacoplamento entre o crescimento e a proliferação celular (ZHAO & DARZYNKIEWICZ *et al.*, 2013). No sistema cardiovascular (SCV), o processo de senescência celular acarreta várias alterações estruturais e funcionais na vasculatura. O conhecimento destas alterações é de grande importância para melhor compreensão e detecção das alterações presentes no processo, assim como na intervenção terapêutica (CHILDS *et al.*, 2015; LÓPEZ-OTÍN *et al.*, 2013; DONATO *et al.*, 2015).

A senescência provoca alterações específicas que podem ser divididas em alterações fenotípicas e marcadores celulares (ZHAO & DARZYNKIEWICZ *et al.*, 2013). As alterações fenotípicas são principalmente caracterizadas por disfunção dos telômeros e aumento celular, seguido de redução na divisão (LÓPEZ-OTÍN *et al.*, 2013). Já os marcadores incluem principalmente o aumento da expressão da atividade da  $\beta$ -galactosidase associada à senescência (SA- $\beta$ gal), assim como a ativação da chamada via clássica da senescência formada

pelas proteínas p53, p21 e p16 (ACOSTA *et al.*, 2008; COPPÉ *et al.*, 2008; KUILMAN *et al.*, 2010).

Os telômeros são complexos especializados de DNA-proteína presente nas extremidades do cromossomo de células eucarióticas, os quais preservam e mantêm a integridade genômica. Entretanto, a cada divisão celular há um processo denominado de encurtamento telomérico que pode ser disparado, e assim antecipar o processo de senescência celular (KUILMAN *et al.*, 2010). A taxa de encurtamento dos telômeros ocorre de forma dependente da idade, já que se encontram mais curtos em indivíduos biologicamente mais velhos, sendo também influenciada por fatores genéticos, ambientais e patológicos (LÓPEZ-OTÍN *et al.*, 2013).

Além do encurtamento telomérico presente no processo da senescência, um estudo desenvolvido por Dimri *et al.* (1995) observou um aumento na atividade da SA- $\beta$ gal. Foi demonstrando um aumento da atividade em cultura de fibroblastos oriundos da pele de pacientes idosos, e posteriormente ao estudo, a SA- $\beta$ gal tem sido um biomarcador de senescência amplamente usado. A enzima  $\beta$ -galactosidase, uma hidrolase lisossomal, que normalmente é ativa em pH 4,0, em células senescentes torna-se ativa em pH 6,0, sendo desta forma detectada através de ensaio bioquímico. Em ambos ensaios *in vitro* e *in vivo*, a porcentagem de células positivas para SA- $\beta$ gal encontra-se elevada em fibroblastos dérmicos e queratinócitos epidérmicos após as células serem cultivadas através de passagens sucessivas com transferência para novas garrafas de cultura celular (DIMRI *et al.*, 1995). A atividade SA- $\beta$ gal está relacionada ao aumento da atividade de enzimas lisossomais devido ao aumento da biogênese lisossômica em células senescentes (KURZ *et al.*, 2000).

#### **1.4 As substâncias fenólicas: características e potencial farmacológico cardiovascular**

Os produtos naturais obtidos de plantas apresentam um papel fundamental no desenvolvimento de novos fármacos, tendo em vista a obtenção de novas substâncias para o tratamento de diversas doenças (GRAGG & NEWMAN, 2013; NEWMAN & CRAGG, 2012; BRANDÃO *et al.*, 2006).

As substâncias fenólicas (SFs) são metabólitos secundários de plantas amplamente distribuídos na natureza, sendo conhecidos por seus efeitos em

alvos terapêuticos que minimizam o desenvolvimento das DCVs (TAPAS, 2008). Quimicamente, os fenólicos são definidos como substâncias que apresentam um anel aromático com uma ou mais hidroxilas, incluindo seus grupos funcionais, possuindo desta forma, uma ampla variação estrutural (TAPAS, 2008). As principais classes são constituídas por ácidos hidroxibenzoicos, ácidos hidroxicinâmicos, estilbenos, flavonoides, isoflavonoides, lignanas e taninos (SIMÕES *et al.*, 2008).

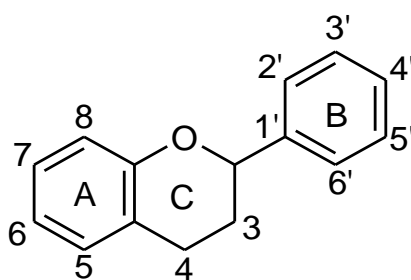
Entre os estilbenos, destaca-se o resveratrol, encontrado principalmente em cascas e sementes de uvas (CARRIZZO *et al.*, 2013a; CARRIZZO *et al.*, 2013b; IDO *et al.*, 2015). O resveratrol apresenta ações anti-inflamatórias, antioxidantes e cardioprotetora, assim como possui ação vasodilatadora em aorta de ratos *Wistar*, artéria de porcos, artéria mamária e veia safena humana (CARRIZZO *et al.*, 2013a; CARRIZZO *et al.*, 2013b). Os estudos com o resveratrol se encontram bem avançados, e ensaios clínicos em humanos já foram desenvolvidos apresentando resultados benéficos, melhorando a função cardiovascular e reduzindo os efeitos maléficos decorrentes do envelhecimento do sistema cardiovascular (CARRIZZO *et al.*, 2015; HUANG *et al.*, 2015; LI *et al.*, 2014).

Os flavonoides (nome originado do latim *flavus*, que significa amarelo) (LOPES *et al.*, 2016), são metabólitos secundários de plantas com mais de 8.000 estruturas identificadas (GRASSI *et al.*, 2010), possuindo ações fisiológicas e protetoras importantes nos vegetais (STAFFORD, 1991), como polinização (HUBER, 2008; WINKEL-SHIRLEY, 2001), controle de ações simbióticas que permitem a fixação de nitrogênio e controle da ação de hormônios para o crescimento e desenvolvimento (STAFFORD, 1991). Quanto às ações protetoras, destacam-se a de barreira contra raios ultravioleta (UV), ações contra insetos, fungos, vírus e bactérias (STAFFORD, 1991; WINKEL-SHIRLEY, 2001) e de desintoxicação contra EROs, agindo desta forma como antioxidantes (POLLASTRI *et al.*, 2011). Como a origem de seu nome pressupõe, os flavonoides são também responsáveis pela bela coloração de muitas plantas (WINKEL-SHIRLEY, 2001), além de conferir o sabor de alguns alimentos e bebidas (TAPAS *et al.*, 2008).

De acordo com suas características químicas, os flavonoides são SFs, compreendendo a maior representação química deste grupo (HUBER, 2008).

Tais diferenças estruturais podem ser detectadas e diferenciadas através de diferentes técnicas cromatográficas, como por exemplo, a análise cromatográfica acoplada a espectrometria de massas, que possibilita a identificação de moléculas através da formação de íons, os quais são avaliados quanto à sua relação massa/carga e/ou cromatografia acoplada a espectroscopia no UV, no qual a presença de duplas ligações que se alternam na estrutura fundamental possibilita a leitura de intensidades de bandas avaliadas no espectro do UV (LOPES *et al.*, 2000; HUBER, 2008). Além disso, a presença de diferentes grupos funcionais pode alterar a solubilidade (CHEN *et al.*, 2012), assim como gerar deslocamentos químicos nas análises de ressonância magnética nuclear (RMN) (WANG *et al.*, 2015).

Os flavonoides podem estar na forma de aglicona ou na forma conjugada, sendo esta possível, devido à variação química em pontos específicos da estrutura fundamental (LOPES, 2000). Os flavonoides possuem uma estrutura química comum com um esqueleto de carbono formado por duas fenilas (anéis A e B), unidas por uma sequência de três carbonos (anel C), totalizando 15 carbonos em sua estrutura básica (LOPES, 2000) (**Figura 9**). Desta forma, o núcleo fundamental da estrutura química dos flavonoides é designado como C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>, e, de acordo com a complexidade estrutural destas moléculas, podem ser divididas em antocianinas, chalconas, flavanas, flavanonas, flavonas, flavonóis e isoflavonoides (TAPAS, 2008).



**Figura 9: Estrutura básica dos flavonoides.**

Os flavonoides são substâncias bem conhecidas quanto às suas ações no SCV, e desta forma, tornam-se alvo de um crescente número de estudos científicos que buscam entender o mecanismo de ação de tais substâncias (**Figura 10**) (TAPAS *et al.*, 2008; ANNAPURNA *et al.*, 2009; GRASSI *et al.*, 2010; SALVAMANI *et al.*, 2014). Para os flavonoides foram descritos excelentes



resultados sobre o SCV, reduzindo a incidência de DCVs em avaliações epidemiológicas, assim como resultados benéficos em estudos pré-clínicos e clínicos (TAPAS *et al.*, 2008; ANNAPURNA *et al.*, 2009; GRASSI *et al.*, 2010; SALVAMANI *et al.*, 2014; WU *et al.*, 2014).



**Figura 10: Ações cardiovasculares das substâncias fenólicas.** SRAA: sistema renina-angiotensina-aldosterona.

### 1.5 Família Anacardiaceae e a espécie *Tapirira guianensis*

A família Anacardiaceae é constituída de 81 gêneros e aproximadamente 800 espécies. Dentre estas, destacam-se as espécies frutíferas *Mangifera indica* (manga) e *Anacardium occidentale* (caju), amplamente distribuídas e utilizadas no Brasil. A riqueza em metabólitos secundários e suas decorrentes ações biológicas tem tornado esta família um alvo de estudos na busca de novas moléculas bioativas (DAVID *et al.*, 1998; CORREIA *et al.*, 2001; JIMÉNEZ *et al.*, 2001; CORREIA *et al.*, 2006). As classes de metabólitos secundários típicos da família são os lipídeos fenólicos e os flavonoides, principalmente os biflavonoides, podendo também ser encontrado terpenos e esteróides (CORREIA *et al.*, 2006).

Para o gênero *Tapirira* predominam os estudos das características botânicas e ecológicas, ainda sendo escassos os estudos de suas propriedades farmacológicas (DAVID *et al.*, 1998; CORREIA *et al.*, 2001; CORREIA *et al.*, 2006). De acordo com os bancos de dados tropicos.org e zipcodezoo.com, são descritas em torno de 35 espécies para o gênero, as quais, até o momento, não apresentam descrição de efeitos farmacológicos no sistema cardiovascular, com exceção da espécie *Tapirira guianensis*.

A espécie *Tapirira guianensis*, conhecida popularmente como pau-pombo (**Figura 11**), apresenta importância do ponto de vista ecológico e como fonte de novos princípios bioativos (DAVID *et al.*, 1998; CORREIA *et al.*, 2001; CORREIA *et al.*, 2006). Em um estudo pioneiro de David *et al.* (1998) foi descoberta a presença do  $\beta$ -sitosterol, além de mais duas novas moléculas ativas contra o câncer de próstata humano, identificadas como 2-[10(*Z*)-heptadecenil]-1,4-hidroquinona e (4*R*,6*R*)-diidroxí-4-[10(*Z*)-heptadecenil]-2-ciclohexenone. Correia *et al.* (2008) identificou alguns flavonoides presentes nas folhas, sendo estes o kaempferol 3- $\alpha$ -raminosídeo, kaempferol 3- $\alpha$ -arabinofuranosídeo e quercetina 3- $\alpha$ -raminosídeo. Em pesquisas anteriores, a *T. guianensis* já havia sido avaliada quanto às suas ações como estimulante uterino (BARROS *et al.*, 1970; CORREIA *et al.*, 2003) e no tratamento da lepra, a sífilis e diarreia (MELLO *et al.*, 1971 *apud* DAVID *et al.*, 1998), além do uso medicinal no tratamento de aftas bucais e dor de garganta (COELHO-FERREIRA, 2009).

Quanto à ação no SCV, até o presente momento apenas Jiménez *et al.* (2001) avaliaram a ação do extrato bruto etanólico das folhas da *T. guianensis* sobre a pressão arterial sistêmica após aferição intra-arterial em ratos *Sprague-Dawley*, mostrando uma redução de 38,5% da pressão. Entretanto, ainda não há estudos que mostrem o mecanismo de ação pelo qual a *T. guianensis* age no sistema cardiovascular e quais substâncias são responsáveis pela ação farmacológica.



**Figura 11: *Tapirira guianensis* - espécie pertencente à família Anacardiaceae; um arbusto conhecido popularmente como pau-pombo. Fonte: [www.commonswikimedia.org/wiki/File:Tapirira-guianensis.jpg](http://www.commonswikimedia.org/wiki/File:Tapirira-guianensis.jpg).**

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo Geral

Investigar o perfil químico e farmacológico da espécie *T. guianensis* visando a identificação de produtos naturais com potencial para o tratamento da disfunção vascular associada a DCVs.

### 2.2 Objetivos Específicos

#### 2.2.1 Estudo fitoquímico de *T. guianensis*

- Avaliar o perfil químico do extrato metanólico, frações e substâncias obtidas das folhas da *T. guianensis*;
- Isolar e identificar os constituintes químicos com melhor perfil farmacológico por meios de técnicas cromatográficas;

#### 2.2.2 Estudo farmacológico da ação de *T. guianensis* sobre artéria de grande calibre: aorta isolada de ratos Wistar

- Avaliar o efeito vasodilatador do extrato, frações e substâncias isoladas;
- Investigar o mecanismo de ação da atividade vasodilatadora do extrato;

#### 2.2.3 Estudo farmacológico da ação de *T. guianensis* sobre artéria de calibre médio: artéria coronária isolada de porco

- Avaliar o efeito vasodilatador do extrato em artéria coronária de porco;
- Investigar o mecanismo de ação da atividade vasodilatadora do extrato;

#### 2.2.4 Estudo farmacológico da ação de *T. guianensis* sobre cultura de células endoteliais de coronária de porco

- Avaliar a citotoxicidade do extrato sobre cultura de células endoteliais jovens;
- Avaliar os efeitos do extrato sobre a atividade  $\beta$ -galactosidase associada à senescência em células endoteliais jovens e senescentes;
- Avaliar o efeito do extrato sobre a expressão de proteínas reguladoras do ciclo celular em células endoteliais senescentes;

### 2.2.5 Estudo farmacológico da atividade antioxidante de *T. guianensis*

- Avaliar a atividade antioxidante *in vitro* do extrato e frações, através do sequestro do radical livre DPPH;

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 Material vegetal

As folhas da espécie *T. guianensis* (Anacardiaceae) foram coletadas no mês de janeiro de 2011 (Autorização SISBIO 39673-2) no Parque Nacional da Restinga de Jurubatiba na cidade de Quissamã, RJ (22.19828° S; 41.46338° W). Uma exsicata foi depositada no herbário da Universidade Federal do Rio de Janeiro (RFA 38757), após realização da identificação botânica pela Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Tatiana Ungaretti Paleo Konno.

Após a seleção do material, este foi pesado e submetido à secagem em estufa a 40 °C, com circulação de ar, para retirada da água e, com isso, impedir reações de hidrólise e/ou crescimento microbiano. A secagem das folhas ocorreu até a obtenção de peso constante e em seguida foi realizada redução mecânica para a fragmentação em pequenas dimensões utilizando-se um liquidificador doméstico.

#### 3.2 Obtenção dos extratos, frações e substâncias isoladas

O extrato, frações e substâncias isoladas foram obtidas na Laboratório de Produtos Naturais da Universidade Federal do Rio de Janeiro (LAPRON) – *campus* Macaé. Três quilos de folhas trituradas foram macerados em metanol e, após a extração, o material foi filtrado em papel de filtro qualitativo (50 x 50 – 80 g) e rotaevaporado (Büchi *rotavapor* R-114<sup>®</sup>/ Büchi *waterbach* B-480<sup>®</sup>), sendo armazenado em dessecador contendo sílica gel.

Foi realizado o fracionamento do EMT (50 g) iniciado através da solubilização em solução hidroalcoólica (9:1), seguido da partição líquido-líquido do extrato, obtendo-se diferentes frações em solventes orgânicos, em ordem crescente de polaridade: fração hexânica (FH), fração diclorometano (FD), fração acetato de etila (FA) e fração butanólica (FB), conforme mostrado na **Figura 12**. O processo de semipurificação a partir do EMT (50 g) forneceu uma massa de 6,5287 g de FH (8 partições); 1,7312 g de FD (4 partições); 26,1552 g de FA (11 partições) e 7,2052 g de FB (4 partições). Após partição com butanol, foram obtidos 6,0103 g da fração aquosa remanescente (FAq). Após retiradas dos solventes orgânicos, todas as frações foram submetidas à liofilização, pesadas e armazenadas em dessecador contendo sílica gel.

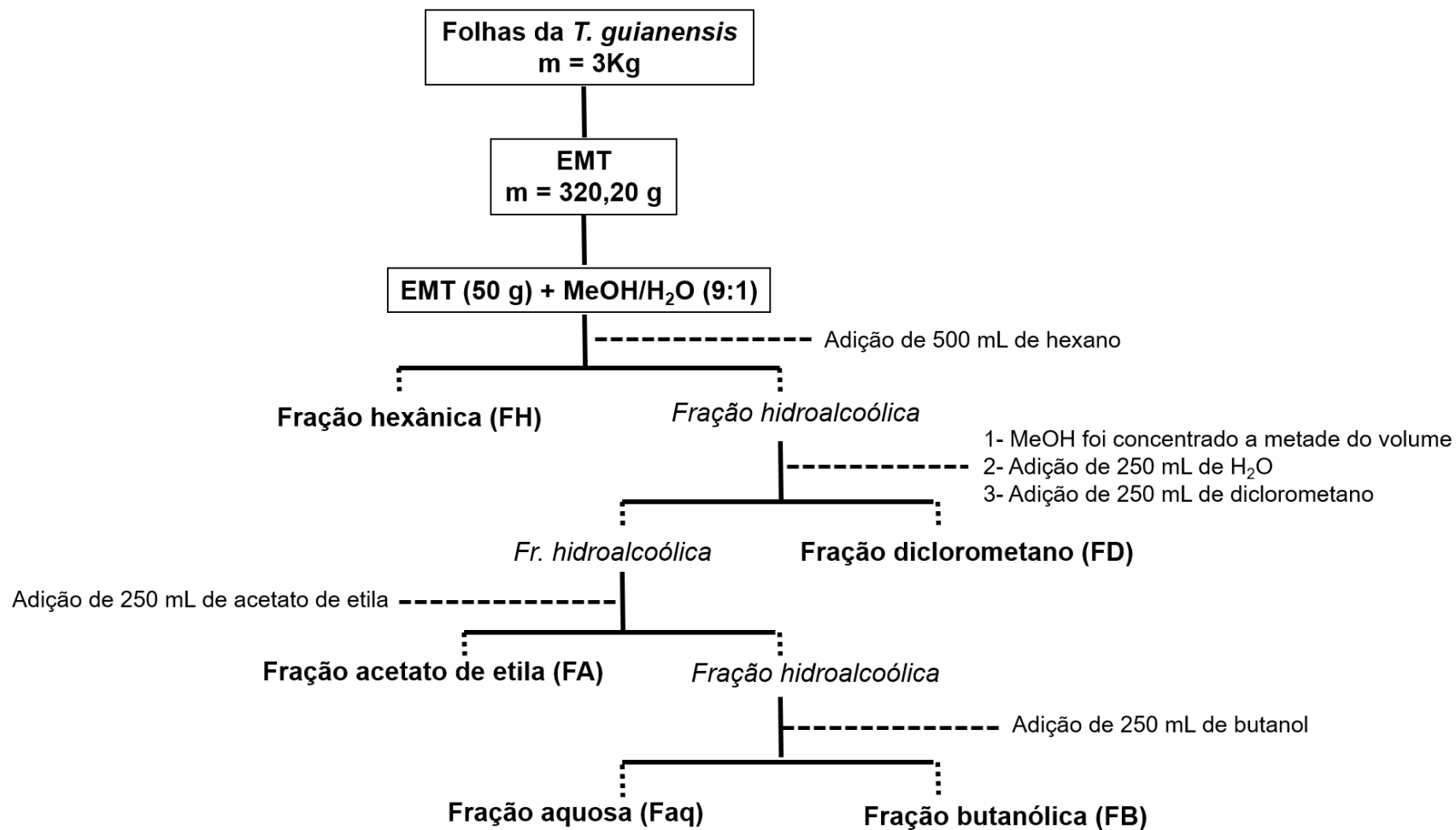


Figura 12: Fluxograma para obtenção do extrato bruto metanólico (EMT) e frações das folhas da *T. guianensis*.

### 3.3 Métodos cromatográficos e espectroscópicos empregados para estudo do EMT e frações

#### 3.3.1 Cromatografia em camada delgada

Para as análises durante os processos de separação dos metabólitos secundários foi utilizada uma fase estacionária constituída por uma camada delgada de sílica gel distribuída em uma folha de alumínio, sendo este conjunto denominado de placa cromatográfica utilizada na cromatografia em camada delgada (CCD).

Na superfície da placa ocorre o processo de eluição dos constituintes, com o auxílio da fase móvel previamente testada, seguido da aplicação de reveladores cromatográficos (RC). Desta forma, os RC foram utilizados para auxiliar nas análises específicas para as possíveis classe de metabólitos secundários presentes, de acordo com a metodologia de preparo sugerida por Wagner & Bladt (1995) e descrita abaixo:

- *Anisaldeído sulfúrico (AS)*

0,5 mL de anisaldeído foi misturado com 10 mL de ácido acético glacial, seguida de 85 mL de metanol e 5 mL de ácido sulfúrico concentrado, nesta ordem.

Na CCD foi borrifada a solução de AS, sendo a CCD seguida de aquecimento a 110 °C por 5-10 min, antes de ser avaliada no visível ou no UV-365 nm. Este processo possibilita a detecção de terpenos, propilpropanóides e saponinas.

- *Natural products-polyethylene glycol reagent (NP/PEG)*

Solução NP: solução metanólica a 1% de difenilboriloxietilamina (NP).

Solução PEG: solução metanólica a 5% de polietilenoglicol-4000 (PEG).

Na CCD, foi borrifada a solução NP; após secagem, a mesma foi observada em luz UV (Boitton 365 UV-A®) nos comprimentos de onda de 254 e 365 nm. Em seguida, foi borrifada a solução PEG, seguida de observação. Este processo possibilita a detecção de flavonoides e outros fenólicos na amostra em estudo, e diferencia por coloração algumas sub-classes.



### 3.3.2 Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

Para as análises em CLAE, utilizou-se o cromatógrafo líquido LC-100 (Shimadzu®), coluna RP-18 (5 µm, 4,0 x 250 mm, Nucleosil 100-5®) com diferentes sistemas de eluição, detector de arranjo de diodos (SPD – M20A, *prominence diode array detector*, Shimadzu®), bomba (LC 20 AT, *prominence liquid chromatograph*, Shimadzu®), injetor automático e *software LC solution*. A eluição por gradiente dos sistemas de análises foi realizada de acordo com a **Tabela 1**. O volume de injeção utilizado foi de 20 µL, sendo as amostras solubilizadas em acetonitrila.

**Tabela 1: Sistema gradiente. A = H<sub>2</sub>O [acidificada com ácido fosfórico (H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>) a pH = 3,2] e B = acetonitrila, utilizando vazão de 1 mL/min.**

TEMPO (min)	A (%)	B (%)
0,01	90	10
11	75	25
13	70	30
14	65	35
15	60	40
16	53	43
17	54	46
22	0	100
30	0	100
35	100	0
40	100	0

### 3.3.3 Determinação da concentração de substâncias fenólicas através da cromatografia líquida de alta eficiência usando padrão de quercetina

Conforme a metodologia do tópico 3.3.2, foi realizada a análise do padrão de quercetina nas concentrações de 500; 250; 125; 62,5; 31,25 e 16,625 µg/mL; com injeções em triplicata. Os picos cromatográficos e as respectivas áreas foram calculadas e, com a equação da reta ( $R^2 = 0,9998$ ) (**Equação 1**), foi avaliada a concentração dos flavonoides majoritários no MET e frações DCM e FA.

**Equação 1: Equação de 1º grau formada pela análise do padrão de quercetina nas concentrações 500 – 16,625 µg/mL.**

$$y = 48222 x$$

### 3.3.4 Elucidação estrutural das substâncias isoladas

As substâncias puras obtidas das sub-frações foram caracterizadas através de ressonância magnética nuclear (RMN) e de espectrometria de massas (EM). Os espectros de ressonância magnética nuclear de hidrogênios (RMN de  $^1\text{H}$ ) e de carbono-13 (RMN de  $^{13}\text{C}$ ) foram registrados em espectrômetro Bruker DRX-300, operando a 400 e 500 MHz (RMN de  $^1\text{H}$ ) e 100 MHz (RMN de  $^{13}\text{C}$ ), tendo sido utilizado o solvente deuterado DMSO- $d_6$  (Sigma®) para solubilização das amostras.

A cromatografia líquida foi acoplada a um espectro de massas ESI-IT (Bruker Daltonics), equipado com uma fonte de ionização por eletropulverização operando no modo positivo e um analisador de íons. As condições cromatográficas foram as seguintes: coluna Luna C18 (250 x 4,6 mm, 5 mm, Phenomenex®), volume de injeção da amostra de 10 µL a 1 mg/mL, taxa de fluxo de 1,0 mL/ min a 25 °C e água contendo 0,1% (v/v) de ácido fórmico (solvente A) e acetonitrila (solvente B) como fase móvel. O gradiente de eluição foi 5 % B in 0-3 min; 5-10 % B in 3-10 min; 10 % B in 10-12 min; 10-20 % B in 12-15 min; 20 % B in 15-17 min; 5-10 % B in 3-10 min; 10 % B in 10-12 min; 10-20 % B in 12-15 min; 20 % B in 15-17 min 35-45 % B in 32-40 min; 45 % B in 40-42 min; 45-60 % B in 42-50 min; 60 % B in 50-52 min; 60-80 % B in 52-60 min; 80 % B in 60-62 min; 80-100 % B in 62-70 min; 100 % B in 70-72 min; 100-5 % B in 72-75 min; 5 % B in 75-76 min. Os parâmetros do espectrômetro de massa utilizados foram: voltage capilar, 3,5 kV; temperatura de dessolvatação, 330 °C; fluxo de gás, 10L/ min; pressão, 70 psi e energia de colisão de 0,7eV. Utilizou-se nitrogênio como gás de secagem e nebulização.

### **3.4 Isolamento das substâncias presentes nas frações FD e FA farmacologicamente ativas**

A FD (1028,4 mg) foi solubilizada em hexano para formação de uma pastilha de sílica de fase normal (70-230 Mesh), adicionada em coluna filtrante

(11,0 x 2,2 cm) de sílica de fase normal, com partículas de 0.063-0200 mm, sendo cromatografada com os eluentes hexano:acetato de etila e acetato de etila:metanol, ambos em diferentes gradientes, considerando suas diferentes polaridades.

A FA (2000 mg) foi solubilizada em metanol para formação de uma pastilha de sílica silanizada RP-18 (SiliaFlash® G60), adicionada em coluna filtrante (18,0 x 2,2 cm) de sílica silanizada RP-18, com partículas entre 60-200 µm (Merck®), sendo cromatografada como os eluentes H<sub>2</sub>O:metanol em diferentes gradientes, considerando suas diferentes polaridades.

A **Sub17** (100,7 mg) foi solubilizada em água destilada e submetida a um novo procedimento cromatográfico em coluna sílica silanizada RP-18, com partículas entre 60-63 µm (Merck®), eluída com H<sub>2</sub>O:metanol em diferentes gradientes, considerando suas diferentes polaridades.

### 3.5 Ensaios farmacológicos

Para os ensaios da atividade vasodilatadora em anéis de aorta foram utilizados ratos machos *Wistar* (200 – 260 g), provenientes do Biotério de Experimentação anexo ao Laboratório Integrado de Pesquisa (LIP), da Universidade Federal do Rio de Janeiro - Campus Macaé. Os animais permaneceram durante todo o período experimental em condições controladas de luz (ciclo de 12 h de claro/escuro) e temperatura de 21 °C, recebendo água e ração *ad libitum*. Todos os protocolos experimentais foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEAU/CCS-UFRJ) da Universidade Federal do Rio de Janeiro, sob número de protocolo MACAÉ 01.

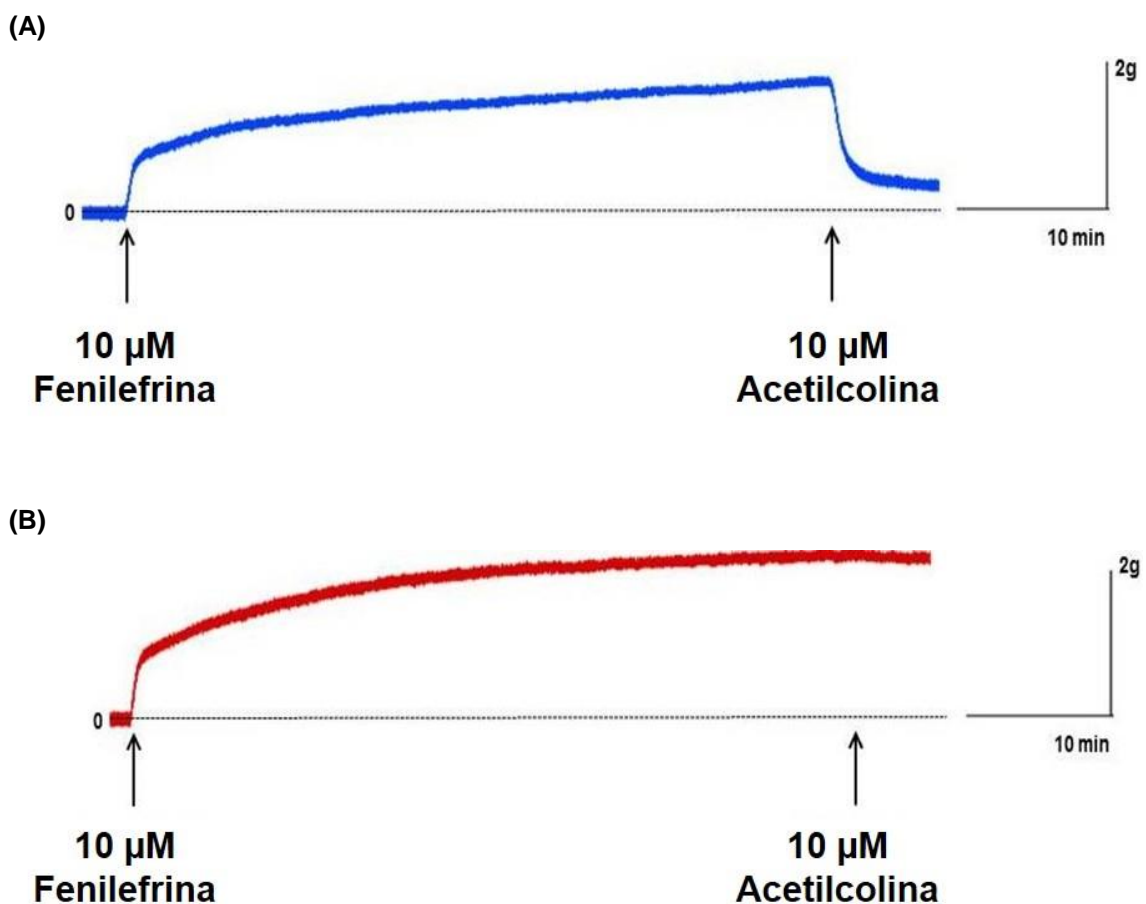
Os ensaios da atividade vasodilatadora e cultura de células endoteliais de artéria coronária de porcos foram realizados no *Laboratoire de Pharmacologie Cardiovasculaire da Université de Strasbourg (France)*. Para tais ensaios foram utilizados corações de porcos jovens doados para pesquisa, criados com fins à alimentação humana, provenientes de um abatedouro de Illkirch-Graffenstaden, na região da Alsace em Strasbourg/France.

#### 3.5.1 Ensaios em aorta isolada de ratos *Wistar*

##### a) Preparo dos anéis de aorta de ratos para registro de tensão isométrica

Ratos *Wistar* machos (200-280 g) foram eutanasiados através de anestesia geral por inalação de isoflurano, seguido de deslocamento cervical para que a porção torácica da artéria aorta fosse dissecada e limpa através da retirada do tecido conjuntivo externo, sendo dividida em cilindros de aproximadamente 4 a 5 mm de comprimento. Os anéis de aorta foram posicionados em hastes experimentais em cubas verticais, preenchidas com solução Krebs-Henseilet (em mM: NaCl 118, KCl 4,7, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,2, MgSO<sub>4</sub> 1,2, CaCl<sub>2</sub> 2,5, NaHCO<sub>3</sub> 25, glicose 11) de pH 7,4, continuamente oxigenada com mistura carbogênica (95% O<sub>2</sub> / 5% CO<sub>2</sub>), a 37 °C. Uma das extremidades do tecido foi acoplada a um transdutor de tensão isométrica (MLT0201; ADInstruments) e a outra extremidade em haste fixa, sendo os sinais gerados digitalizados (Power Lab 4/30; ADInstruments) e armazenados em computador para posterior análise através do programa LabChart Pro (ADInstruments).

Após o período de equilíbrio da preparação (90 min), a contratatura do músculo liso vascular foi induzida com 10  $\mu$ M de fenilefrina previamente solubilizada em solução de Krebs. Estabelecido o platô da contratatura, foram adicionados 10  $\mu$ M de acetilcolina previamente solubilizada em solução de Krebs para que fosse avaliada a integridade do endotélio. Este foi considerado íntegro quando o relaxamento observado após a adição de acetilcolina foi maior ou igual a 80%. Um relaxamento inferior a 10% na presença de acetilcolina confirmou a eficiência da remoção mecânica do endotélio realizada com o auxílio de uma cânula (**Figura 13 A e B**) (RAIMUNDO *et al.*, 2006).



**Figura 13:** Registro dos anéis de aorta após contratatura induzida com fenilefrina a 10 $\mu$ M, seguido da adição de acetilcolina a 10  $\mu$ M para verificação do relaxamento. (A) Aortas com endotélio íntegro, demonstrado por relaxamento induzido pela acetilcolina. (B) Aorta sem endotélio.

*b) Avaliação do efeito vasodilatador*

Foram utilizados anéis de aorta, com e sem endotélio, com o objetivo de verificar a importância do endotélio vascular para o efeito vasodilatador (RAIMUNDO *et al.*, 2006). Para avaliação do efeito vasodilatador, a contratatura do músculo liso vascular foi induzida novamente com 10  $\mu$ M de fenilefrina, seguida da adição de concentrações crescentes das amostras em estudo a partir de soluções estoques a 50 e 10 mg/mL solubilizadas em dimetilsulfóxido (DMSO): EMT, frações ou substâncias isoladas (1 a 30  $\mu$ g/mL).

*c) Investigação do mecanismo de ação do efeito vasodilatador*

Para investigação do mecanismo de ação do efeito vasodilatador do EMT, aortas com endotélio foram pré-tratadas por 15 min, antes da indução da contratatura com fenilefrina, com N<sup>ω</sup>-nitro-L-arginina metil éster (L-NAME, 100  $\mu$ M), inibidor da eNOS e indometacina (100  $\mu$ M), inibidor da ciclooxigenase (COX); com soluções estoques solubilizados em água destilada e wortmanina (300 nM), inibidor da fosfatidilinositol 3-quinase (PI3-K) e 1H-[1,2,4] oxadiazolo [4,3-a] quinoxalin-1-ona (ODQ, 100  $\mu$ M), inibidor da guanilato ciclase solúvel (sGC); com soluções estoques solubilizados em DMSO.

*3.5.2 Ensaios em artéria coronária isolada de porco*

*a) Preparo dos anéis de coronária de porco para registro de tensão isométrica*

Corações de porcos jovens foram dissecados para a retirada da artéria coronária descendente esquerda. Após dissecação, as artérias foram colocadas em solução Krebs (em mM: NaCl 119, KCl 4,7, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,18, MgSO<sub>4</sub>, 7 H<sub>2</sub>O 1,17, CaCl<sub>2</sub> 1,25, NaHCO<sub>3</sub> 25, glicose 11) com pH 7,4 para retirada do tecido conjuntivo e gordura. As artérias foram cortadas em anéis de cerca de 5 mm, os quais foram suspensos em hastes metálicas e mergulhados em solução de Krebs mantida a 37 °C e constantemente gaseificada com mistura carbogênica (95% O<sub>2</sub>/ 5% CO<sub>2</sub>). Uma das hastes metálicas estava acoplada a um transdutor de tensão isométrica (TIM – 1030) acoplado a um amplificador (emka TECHNOLOGIES®), e os sinais gerados foram digitalizados e armazenados em computador para posterior análise através do programa  $\mu$ Vessels®.

Foi realizada a estabilização dos anéis com 5 g de tensão com troca da solução de Krebs a cada 15 min com tempo de estabilização total de 60 min. Após a estabilização, foi realizada a avaliação da viabilidade do tecido muscular através da adição de solução de KCl a 80 mM. Após a contração induzida por KCl, foi realizada lavagem com solução Krebs, seguida por contração dos anéis com 60 nM de U46619, um análogo sintético do tromboxano A<sub>2</sub>. Estabelecido o platô da contratatura, foi adicionado 0,3 µM de bradicinina para que fosse avaliada a integridade do endotélio. Este foi considerado íntegro quando o relaxamento observado após a adição de bradicinina foi maior ou igual a 80%. Um relaxamento inferior a 10% na presença de bradicinina confirmava a eficiência da remoção mecânica do endotélio.

*b) Avaliação do efeito vasodilatador*

Foram utilizados anéis de coronária, com e sem endotélio, com o objetivo de verificar a importância do endotélio vascular para o efeito vasodilatador. Para avaliação do efeito vasodilatador, a contratatura do músculo liso vascular foi induzida com 10 µM de U46619, seguida da adição de concentrações crescentes do EMT (0,1 a 30 µg/mL) com soluções estoque solubilizadas em etanol, seguida de filtração com auxílio de membrana filtrante (Millex® GP 0,22 µM).

*c) Investigação do mecanismo de ação do efeito vasodilatador*

Para investigação do mecanismo de ação do efeito vasodilatador do EMT, as coronárias foram pré-tratadas por 15 min, antes da indução da contratatura com U46619, com L-N<sup>G</sup>-nitroarginina (L-NA, 100 µM), inibidor inespecífico da NOS; indometacina (10 µM), inibidor da ciclooxigenase; apamina (100 nM), inibidor seletivo dos canais de potássio dependentes de cálcio de pequena condutância (SK<sub>Ca</sub>); enzima superóxido dismutase (SOD, 500 U/mL); Mn(III)tetrakis(1-metil-4-piridil) porfirina (MnTMPyP, 100 µM), análogo permeável da SOD; enzima catalase (500 U/mL) e PEG catalase (500 U/mL), análogo permeável da catalase associada ao polietilenoglicol; com soluções estoques solubilizados em água destilada; e 1-[(2-clorofenil)difenilmetil]-1H-pirazole (Tram-34, 100nM), inibidor seletivo dos canais de potássio dependentes de cálcio de condutância intermediária (IK<sub>Ca</sub>); com solução estoque solubilizada em DMSO.

Alguns anéis foram pré-tratados por 60 minutos com (4-amino-3-(4-clorofenil)-1H-pirazolo [3,4-d] piridina, 4-amino-5-(4-clorofenil)-7-(t-butil) pirazolo [3,4-d] piridina (PP2, 10  $\mu$ M), inibidor da Src quinase (proteína tirosina quinase citoplasmática) ou wortmanina (30 nM), inibidor da PI3-K; com soluções estoques solubilizados em DMSO.

### 3.5.3 *Ensaio em cultura primária de células endoteliais de artéria coronária de porco*

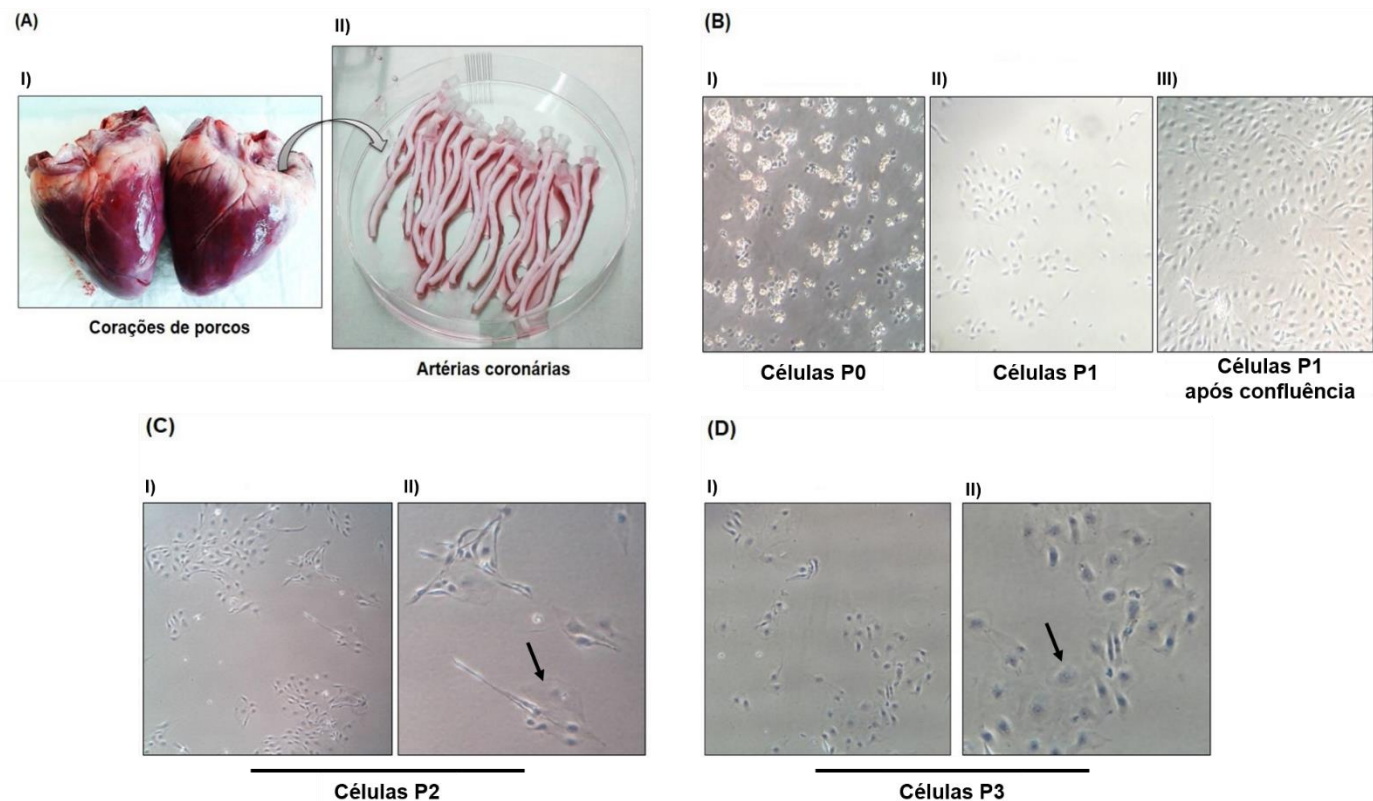
#### *a) Cultura celular de células endoteliais jovens e senescentes*

Corações de porcos jovens de ambos os sexos foram dissecados para a retirada da artéria coronária. Após a dissecação, as artérias foram colocadas em solução de Krebs (descrita em 3.5.2) e com auxílio de pequenas tesouras cirúrgicas foi retirado o tecido conjuntivo e gordura. Em condições estéreis, as artérias foram limpas com tampão fosfato-salino (PBS, do inglês *phosphate buffered saline*) (em mmol/L: NaCl 137, KCl 2,7, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 10, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,8) para retirar todo o sangue. No lúmen das artérias limpas foi adicionado 1 mg/mL de colagenase tipo 1 (260 U/mg) em meio MCDB131 (Gibco®) acrescido de soro fetal bovino a 15% (Gibco®), L-glutamina (2 mM), penicilina (100 U/mL), anfotericina B (250  $\mu$ g/mL), estreptomicina (100 U/mL), seguida de incubação a 37 °C por 15 min (**Figura 14 A**). Em seguida, as artérias foram submetidas ao processo mecânico manual através de esfregaço em meio MCDB131 completo, para retirada e coleta das células endoteliais em tubo cônico de 50 mL. Os tubos contendo as células foram centrifugados a 5000 rpm por 5 min, o sobrenadante foi descartado e o sedimento foi homogeneizado com meio MCDB131 completo e distribuído em frascos T25 para cultura de células aderentes.

As células endoteliais P0 foram cultivadas por 6 dias, com troca de meio a cada dois dias. As garrafas com confluência de 80% foram submetidas a passagens consecutivas para garrafas T75 para a obtenção de células P1. Após 6 dias as células P1 foram submetidas a passagens consecutivas para garrafas T75 para a obtenção de células P2 e estas, após 60% de confluência, foram plaqueadas para obtenção de células senescentes P3. Para os protocolos experimentais foram utilizadas as células P1 jovens e as células P3 senescentes (**Figura 14 B – D**).



As passagens foram realizadas com lavagem das células com PBS 1X por duas vezes consecutivas, seguida de aspiração sob vácuo e adição de tripsina 1X (Lonza®) a 37 °C por 3 min, para retirada das células endoteliais aderentes. Após este tempo de ação, a tripsina foi bloqueada com a adição do meio MCDB131 completo. As células em meio foram centrifugadas a 5000 rpm por 5 min, o sobrenadante foi descartado e o sedimento foi homogeneizado com meio MCDB131 completo. Foram retirados 20 µL da suspensão para a contagem das células em câmara de Neubauer e, em seguida, as células obtidas foram distribuídas conforme o protocolo experimental a ser realizado. Todos os procedimentos foram acompanhados observando-se as células com auxílio de microscópio invertido Nikon Eclipse TS100®.



**Figura 14: Etapas para a obtenção das células endoteliais de coronárias de porcos jovens e senescentes.** (A) Corações de porcos preparados para dissecção da artéria coronária (AI), artérias em condições estéreis para incubação com colagenase tipo I por 15 min a 37 °C (AII). (B) Células P0 após 6 horas de incubação a 37 °C, sendo cultivadas para obtenção das células P1 (BI). Células P1 de primeira passagem após dois de cultura (BII) e 6 dias de cultura com confluência (BIII), respectivamente. (C) Células P2 de segunda passagem com as características iniciais de senescência endotelial (CI), observada principalmente, na foto, pelo início do aumento citoplasmático e nuclear e início das alterações morfológicas (CII). (D) Células P3 de terceira passagem com as características de senescência endotelial (DI), observada principalmente, na foto, pelo grande aumento citoplasmático e nuclear e pronunciada alteração morfológica (DII).

## *b) Avaliação da citotoxicidade induzida do EMT*

A anexina-V-FITC é comumente usada para determinar quantitativamente a porcentagem de células, dentro de uma população celular, que podem estar sofrendo o processo de apoptose. Tal marcação está baseada na propriedade das células em perderem sua assimetria de membrana nas fases iniciais da apoptose. Em células apoptóticas, o fosfolípido de membrana fosfatidilserina é translocado do folheto interno da membrana plasmática para o folheto externo, tornando possível a ligação da anexina-V-FITC à fosfatidilserina, o que leva a identificação de células em apoptose. O iodeto de propídeo (IP) é uma sonda padrão de viabilidade utilizada, na citometria de fluxo, para distinguir células viáveis das células não-viáveis. As células viáveis, com membranas intactas, excluem o IP, enquanto que as membranas de células danificadas ou mortas são permeáveis. As células positivas para anexina-V-FITC e negativas para IP corresponderiam àquelas passando por processo apoptótico. As células que coram positivo para ambos, anexina-V-FITC e IP, corresponderiam àquelas nos estágios finais da apoptose ou já são células mortas. As células negativas para ambos, anexina-V-FITC e IP, corresponderiam a células vivas e que não sofreram apoptose mensurável (BD-Pharmingen™, 2016).

Para avaliar o potencial citotóxico do EMT, foram utilizadas células jovens P1, obtidas conforme o tópico 4.3.3. (a), em placa de 6 poços com  $18 \times 10^4$  células/poço. Após 1 h de incubação, as células foram tratadas com concentrações crescentes do EMT (0,1 a 300  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) com soluções estoque solubilizadas em etanol, seguida de filtração com auxílio de membrana filtrante (Millex® GP 0,22  $\mu\text{m}$ ) ou somente meio MCDB131 (controle negativo), por um período de 48 h. Antes da coleta das células, foi realizada a fotografia com o auxílio do microscópio invertido acoplado a uma câmera fotográfica. Posteriormente, o meio contendo as células aderentes foi transferido para tubo cônico de 15 mL e as células foram lavadas por duas vezes com PBS 1X, seguida da adição de 500  $\mu\text{L}$  de tripsina 1X, com incubação a 37 °C por 3 min. As células foram observadas em microscópio invertido para verificar se foram liberadas pelo processo de tripsinização e, posteriormente, 100  $\mu\text{L}$  de SFB foram adicionados e as células foram transferidas para os respectivos tubos cônicos de 15 mL, que foram centrifugados por 10 min a 1.800 rpm. O sobrenadante foi

descartado com cuidado até um volume de cerca de 200  $\mu\text{L}$  de meio, ao qual foram adicionados mais 300  $\mu\text{L}$  de meio completo. Em condições de pouca luminosidade foram adicionados, em cada tubo, 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de IP (Miltenyi Biotec®) e posteriormente seguiu-se a adição de 5  $\mu\text{L}$  de anexina-V-FITC, conforme especificação do fabricante (BD Biosciences®), com agitação. Como última etapa, foram transferidos 250  $\mu\text{L}$  de cada amostra para uma placa de 96 poços, a qual foi envolvida por papel alumínio e incubada por 5 min. A análise das placas de 96 poços após incubação foi realizada por citometria de fluxo através do equipamento Guava®.

*c) Avaliação dos efeitos do EMT em células endoteliais senescentes através da determinação da atividade SA- $\beta$ gal*

A avaliação da ação do EMT frente ao processo de senescência em células endoteliais foi realizada utilizando a sonda 5-dodecanoilaminofluoresceína di- $\beta$ -D-galactopiranosídeo ( $\text{C}_{12}$ -FDG; Molecular Probes®). Esta substância é um substrato fluorescente da  $\beta$ -galactosidase, permeável à membrana, o qual, após hidrólise dos resíduos galactosil, emitem fluorescência, sendo mantido no interior da célula.

Foram utilizadas células jovens P1 e células senescentes P3, obtidas conforme o tópico 3.4.3 (a), sendo a passagem realizada em placa de 6 poços com  $9 \times 10^4$  células/poço. As mesmas foram incubadas com concentrações crescentes do EMT (0,1 a 30  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) por um período de 48 h, com soluções estoque solubilizadas em etanol, seguida de filtração com auxílio de membrana filtrante (Millex® GP 0,22  $\mu\text{M}$ ). Para obtenção do controle negativo, as células foram incubadas somente com meio MCDB131.

Após a incubação, os poços foram lavados duas vezes com PBS 1X, seguido da adição de 300  $\mu\text{M}$  de cloroquina (Sigma®) no escuro, com incubação por 1 h. A cloroquina é uma base fraca que, após acúmulo nos lisossomos, eleva o pH para aproximadamente 6,0. A solução da cloroquina foi então aspirada e adicionado 1 mL da solução contendo meio MCDB131, cloroquina e  $\text{C}_{12}$ -FDG (33  $\mu\text{M}$ ), seguida de nova incubação por mais 1 h.

Posteriormente, os poços foram lavados duas vezes com PBS 1X, seguido da adição de tripsina 1X, com incubação a 37 °C por 3 min. O bloqueio da tripsina foi realizado com 100  $\mu\text{L}$  de SFB e adição de mais 400  $\mu\text{L}$  de PBS

1X. As células foram coletadas em tubos de microcentrífuga de 1,5 mL e centrifugadas a 4 °C, a 5000 rpm por 10 min, seguindo-se ao seu armazenamento a -80 °C, para posterior análise usando um citômetro de fluxo (FACSan, BD Biosciences, San Jose, CA). Foram utilizados os parâmetros de dispersão de luz para eliminação de células mortas e detritos. O sinal do C<sub>12</sub>-FDG foi analisado usando um detector FL1 e a atividade da SA-βgal foi estimada usando a mediana da intensidade de fluorescência da população.

*d) Avaliação dos efeitos do EMT na expressão de proteínas envolvidas na regulação do ciclo celular*

O EMT foi avaliado quanto à sua capacidade de modulação da expressão de proteínas envolvidas no processo de senescência celular, em células senescentes P3, obtidas conforme o tópico 3.4.3 (a). As proteínas avaliadas e os anticorpos foram descritos na **tabela 2**.

**Tabela 2: Descrição das informações referentes aos anticorpos primários e secundários utilizados no estudo.**

Proteínas em estudo	Anticorpo primário/ diluição	Anticorpo secundário policlonal/ diluição	Empresa
<b>p53</b>	Anti-p53/ 1:1000	Anti-rabbit IgG ligado a peroxidase/ 1:1000	Santa Cruz®
<b>p21</b>	Anti-p21/ 1:1000	Anti-rabbit IgG ligado a peroxidase/ 1:1000	Santa Cruz®
<b>p16</b>	Anti-p16/ 1:1000	Anti-rabbit IgG ligado a peroxidase/ 1:1000	Santa Cruz®
<b>Tubulina</b>	Anti-tubulina/ 1:1000	Anti-rabbit IgG ligado a peroxidase/ 1:1000	Cell signaling®

Após o tratamento com o EMT, as células foram lavadas por duas vezes com 10 mL de PBS 1X, posteriormente aspirado por completo, seguido da adição do tampão de lise gelado (Tris/HCl 20 mM, NaCl 150 mM, Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> 1 mM, fosfato de sódio 10 mM, NaF 20 mM, ácido ocadáico 0,01 mM, inibidor de protease e

1% de Triton X-100) e manutenção das garrafas ou placas contendo as células no gelo, por 10 min. Com o auxílio de pequenos rodos, foi realizada a coleta das células, cuidadosamente, seguida de transferência para tubos de microcentrifuga de 1,5 mL armazenados em gelo; a solução foi submetida a sonicação por 5 s a 60 mGHz em banho de gelo, com o auxílio do equipamento Bioblock®. As amostras foram armazenadas a -80 °C para posteriores análises.

Foi realizada a curva de BSA, do inglês *bovine serum* albumin, através do kit de Bradford para a quantificação de proteínas, obtido da Bio-Rad Laboratories (California – USA) com dosagem de cada amostra em duplicata para a quantificação. O total de proteínas utilizado foi de 35 µg. As proteínas das amostras estudadas, assim como os marcadores do peso molecular (Ladder®), foram separadas em gel de poliacrilamida a 70 V por 1 h e 30 min. Em seguida, foram eletrotransferidas, a 100 V durante 2 h (Sistema da Biorad®), para membranas de nitrocelulose (GE Healthcare®), as quais foram bloqueadas com solução contendo 5 % de albumina sérica bovina (Euromedex®) em solução de TBS-T do inglês *Tris-Buffered Saline-Tween* (10 % de TBS, 0,001 % de tween em água ultra pura), por 1 h. Para a detecção das proteínas, as membranas foram incubadas com os respectivos anticorpos primários diluídos em TBS-T, a 4 °C, por 16 h. As membranas foram, então, lavadas com solução TBS-T por 4 vezes, a cada 5 min, e incubadas com os respectivos anticorpos secundários ligados à peroxidase diluídos em TBS-T, por 1 h, em temperatura ambiente. A solução de peróxido e luminol (1:1) (ambos da Bio-Rad Laboratories®) foi então aplicada na membrana e a quimioluminescência foi detectada utilizando o imunodetector ImageQuant LAS 4000® (GE HealthCare®).

#### 3.5.4 Avaliação *in vitro* da atividade antioxidante através do sequestro do radical livre DPPH

A avaliação da atividade antioxidante foi realizada pelo método fotocolorimétrico do radical livre estável 1,1-difenil-2-picrilidrazila (DPPH), em placa de 96 poços. Este método se baseia no sequestro do DPPH por antioxidantes, o que acarreta em redução na absorbância em 517 nm, acompanhada de perda de cor.

A determinação da atividade antioxidante pelo método do DPPH foi realizada conforme Nascimento *et al.* (2011), com algumas modificações. O

extrato padronizado de *Ginkgo biloba* (EGb 761®) (solubilizada em H<sub>2</sub>O:MeOH (50:50)), bem como um padrão de quercetina, EMT e frações (solubilizadas em metanol), foram testados nas concentrações 1, 5, 10, 25, 50, 100 e 200 µg/mL, acrescidos de 50 µL da solução de DPPH 300 µM. O controle negativo foi realizado com 50 µL de DPPH e metanol. Após a adição do DPPH, as soluções foram mantidas por 30 min em temperatura ambiente, e então avaliada por leitura da absorbância a 517 nm no espectrômetro UV-vis.

A capacidade de sequestrar radical livre foi expressa como percentual de inibição de oxidação do radical e calculado conforme a fórmula:

**Equação 2: Fórmula para cálculo da atividade antioxidante após sequestro do DPPH.**

$$AA\% = 100 - \{[(ABS_{amostra} - ABS_{branco}) \times 100] / ADPPH\}$$

onde AA% é a porcentagem da atividade antioxidante, ABS<sub>branco</sub> é a absorbância da solução de MeOH, ABS<sub>amostra</sub> é a absorbância da amostra em MeOH e ABS<sub>DPPH</sub> é a absorbância da solução de DPPH em MeOH. Posteriormente, foi feito o cálculo da concentração necessária para produzir 50% da resposta máxima (CE<sub>50</sub>) através de regressão não-linear.

### 3.6 Análise estatística

Todos os resultados foram apresentados como média ± E.P.M.. Nos experimentos de tensão isométrica com aorta e coronária, os resultados foram expressos como média ± E.P.M. do percentual de relaxamento da contratatura induzida por fenilefrina e U46619, respectivamente. Todas as análises estatísticas e cálculos da CE<sub>50</sub> e CI<sub>50</sub> foram realizados utilizando-se o programa Prism 5.0 (GraphPad Software, USA). Para os experimentos de tensão isométrica e morte celular, foi utilizado o teste de análise de variância (One-way – ANOVA), seguido pelo pós-teste de Bonferroni. Para os experimentos da atividade SA-βgal e expressão de proteínas envolvidas na regulação do ciclo celular, foi utilizado o teste *t* pareado. As diferenças entre os grupos foram consideradas estatisticamente significativas quando  $P < 0,05$ .

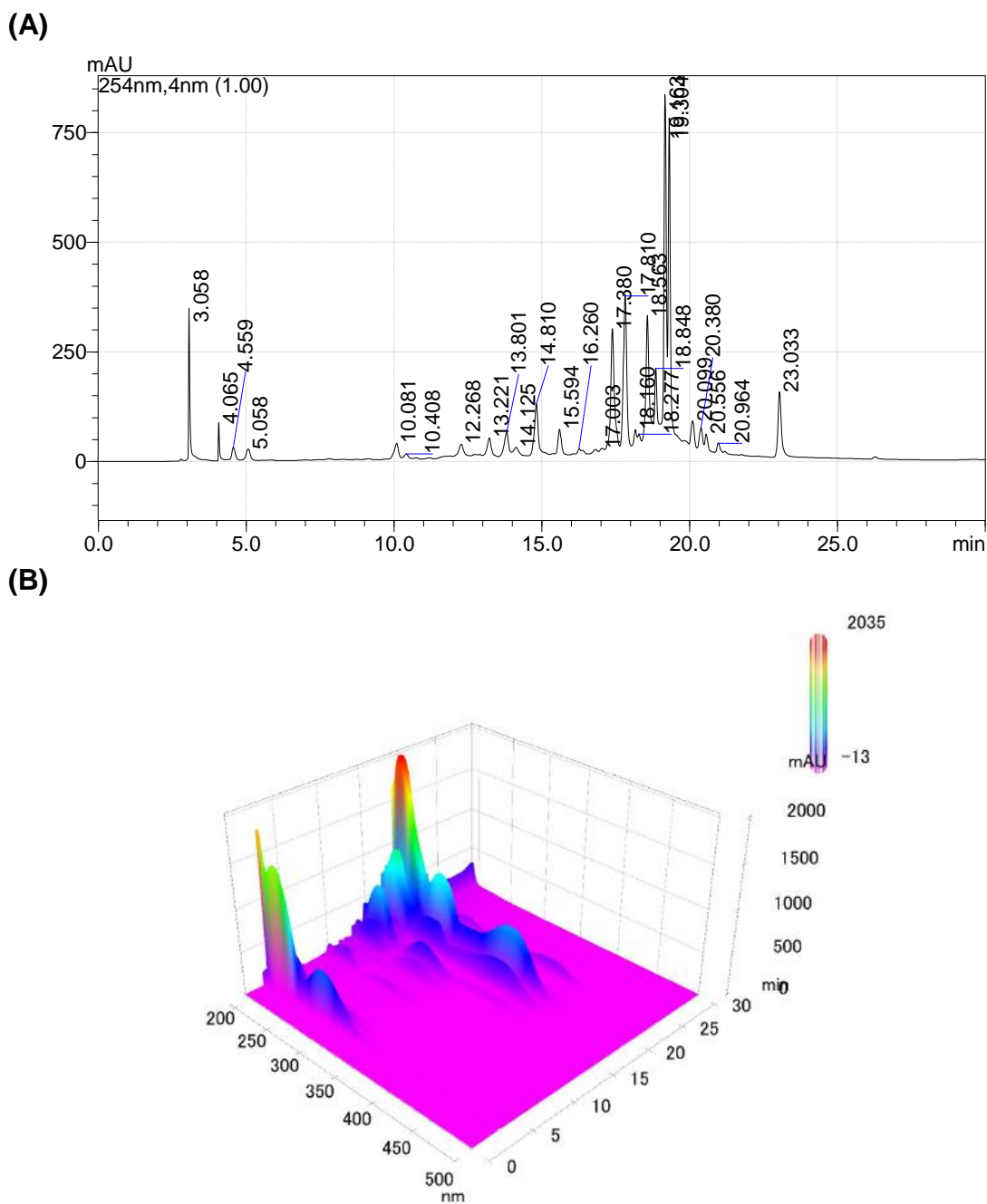
## 4 RESULTADOS

### 4.1 Estudo com o EMT

#### 4.1.1 *Obtenção e análise do perfil químico do EMT*

O EMT seco, com massa de 320,2 g, apresentou um rendimento de 10,67% p/p. A análise química do EMT realizada por CLAE-UV-DAD permitiu avaliar o perfil químico do extrato na concentração de 2 mg/mL, no qual, o cromatograma apresentou 27 picos em um intervalo de tempo de retenção ( $t_R$ ) entre 3,058 a 23,033 min, os quais tiveram seus respectivos dados espectroscópicos de UV analisados na faixa espectral de 190 a 400 nm. Observa-se a partir das análises espectrais, que o EMT é um extrato rico em SFs, sendo promissor para o estudo cardiovascular (**Figura 15 A e B**).



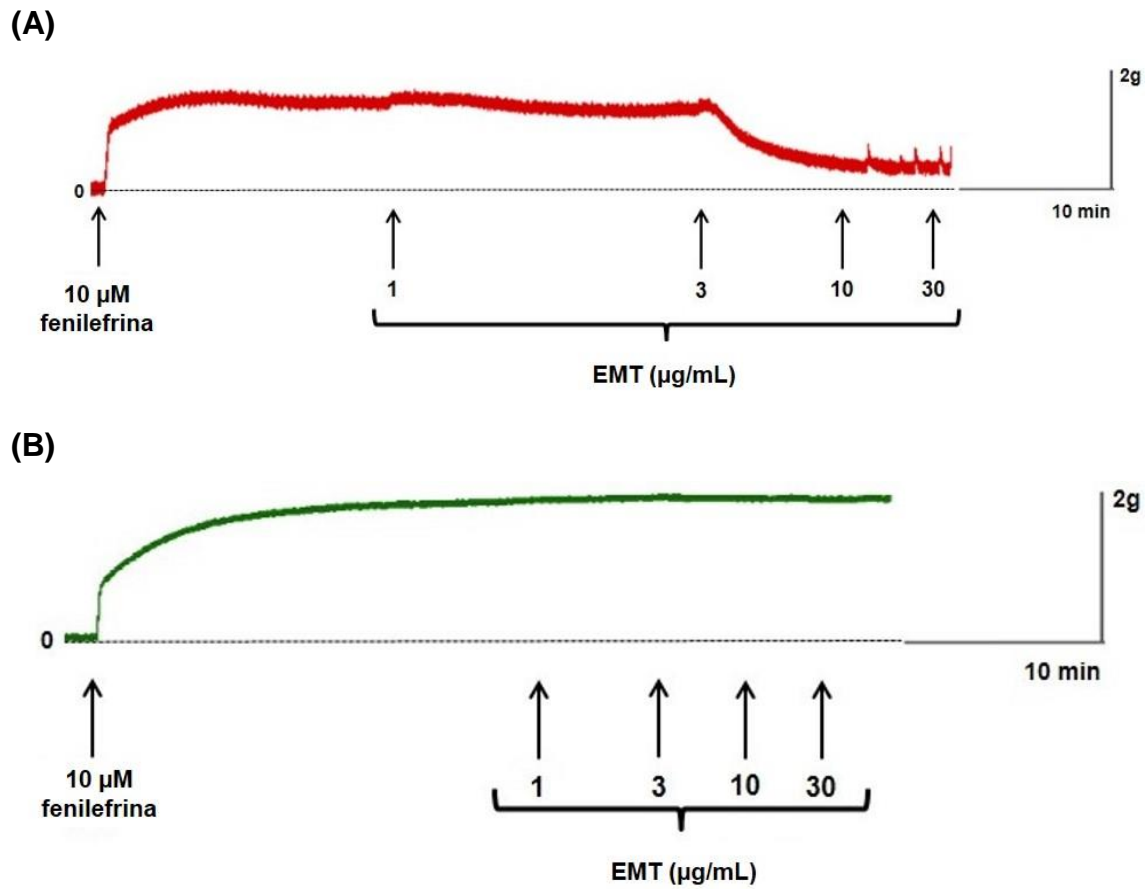


**Figura 15: Análise do perfil químico por cromatografia líquida de alta eficiência do extrato metanólico das folhas da *T. guianensis*. (A) Cromatograma obtido em 254 nm após corrida gradiente (ACN/H<sub>2</sub>O) por 45 min (representado até 30 min), com fluxo de corrida igual a 1mL/min. (B) Gráfico 3D no qual podem ser observados os espectros de UV referentes a cada pico.**

#### 4.1.2 Avaliação do efeito vasodilatador do EMT em aorta de ratos Wistar

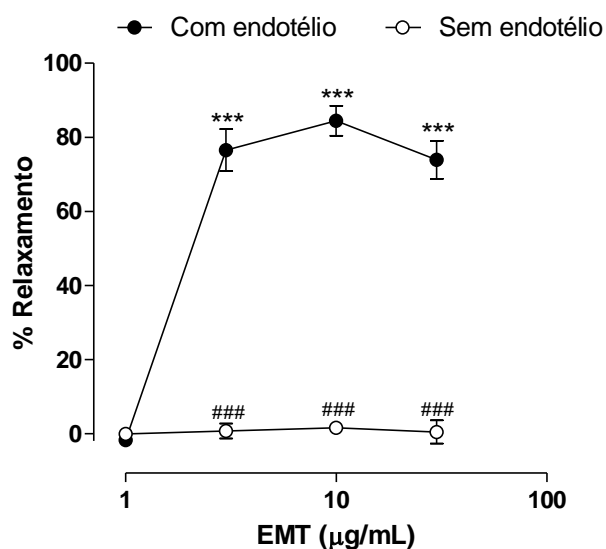
O efeito vasodilatador do EMT foi avaliado em aortas com e sem endotélio com o objetivo de determinar a importância do mesmo para o efeito

farmacológico. Sendo observado uma ação endotélio dependente do EMT em anéis de aorta de ratos *Wistar*, conforme mostra a **Figura 16 A e B**.



**Figura 16:** Registro da tensão isométrica de anéis de aorta após contratura induzida com fenilefrina a 10 μM, seguida da adição de concentrações cumulativas (1 – 30 μg/mL) do extrato metanólico das folhas da *T. guianensis* (EMT). (A) aorta com endotélio. (B) aorta sem endotélio.

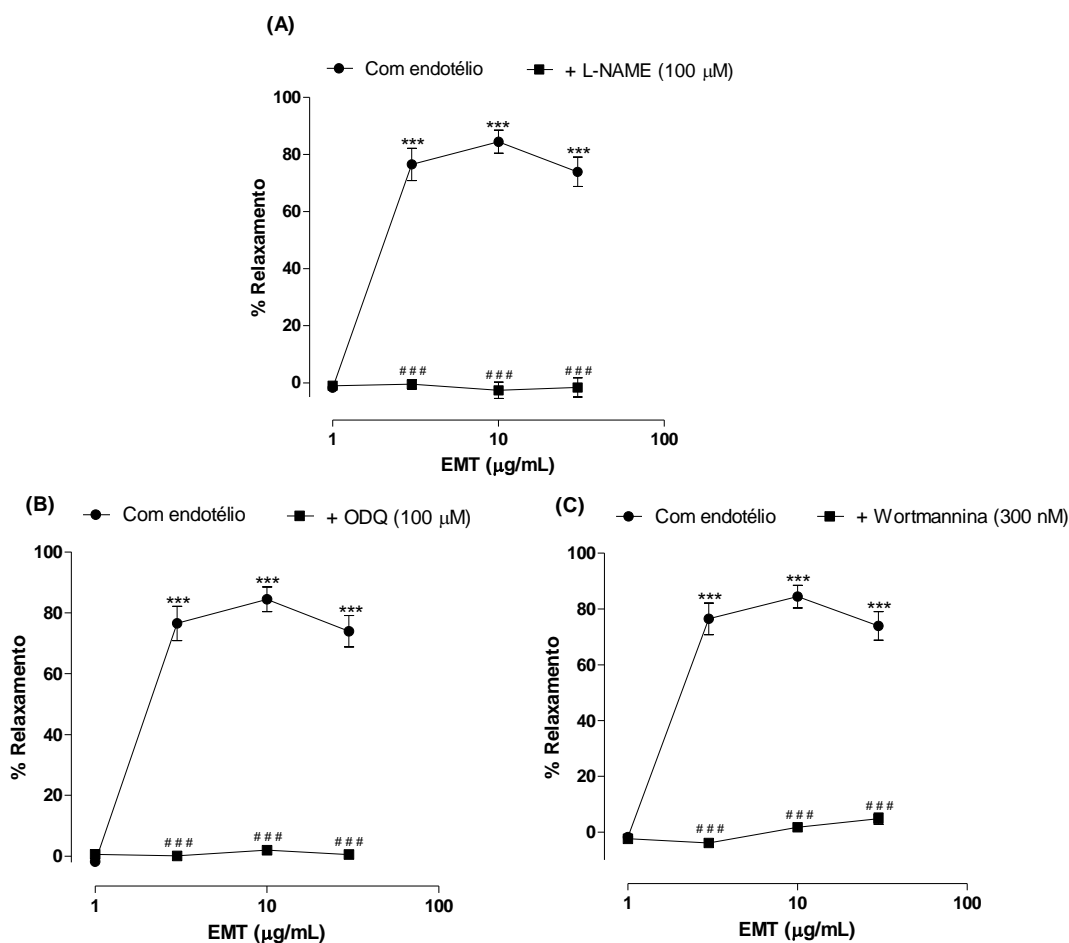
Em aortas com endotélio, o EMT provocou intenso relaxamento vascular. O efeito máximo observado foi de  $84,46 \pm 4,04$  % ( $P < 0,0001$ ) na concentração de  $10 \mu\text{g/mL}$ , com concentração inibitória média ( $CI_{50}$ ) igual a  $4,46 \pm 0,97 \mu\text{g/mL}$ . Em aortas sem endotélio, o EMT não provocou nenhuma alteração significativa do tônus vascular (**Figura 17**).



**Figura 17:** Curvas concentração-resposta para o extrato metanólico das folhas de *T. guianensis* (EMT; 1 – 30  $\mu\text{g/mL}$ ) em anéis de aorta de ratos com e sem endotélio. Os dados representam a média  $\pm$  E.P.M. de 7-8 experimentos. \*\*\* $P < 0,0001$ , comparado ao controle; ### $P < 0,0001$ ; comparado com endotélio.

#### 4.1.2.1 Participação da via do NO na vasodilatação induzida pelo EMT

A investigação do mecanismo de ação do efeito vasodilatador do EMT foi iniciada com a via do NO, principal vasodilatador liberado pelo endotélio, através do pré-tratamento de aortas com endotélio com L-NAME (100  $\mu$ M), um inibidor da NOS. Como mostrado na **Figura 18 A**, o efeito do EMT foi totalmente inibido na presença do bloqueador L-NAME ( $P < 0,0001$ ). Resultado semelhante foi obtido na presença de ODQ (10  $\mu$ M), um inibidor da sGC (**Figura 18 B**), indicando que o efeito do EMT envolve a via NO/GMPc. Como a fosforilação da eNOS é um importante mecanismo de ativação desta enzima, alguns anéis de aorta foram pré-tratados com wortmanina (300 nM), um inibidor da PI3K (**Figura 18 C**). Na presença de wortmanina, o efeito vasodilatador do EMT foi completamente inibido, indicando que a via PI3K/Akt é crucial para ativação da eNOS.

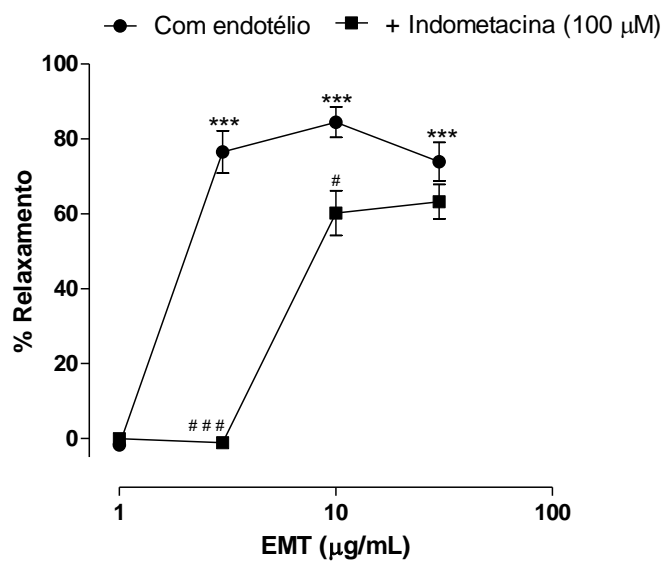


**Figura 18: Avaliação do envolvimento da via do NO no efeito vasodilatador do extrato metanólico das folhas da *T. guianensis* (EMT) em anéis de aorta de ratos com endotélio.** (A) Curvas concentração-resposta na ausência e presença de L-NAME (100 µM). (B) Curvas concentração-resposta na ausência e presença de wortmanina (300 nM). (C) Curvas concentração-resposta na ausência e presença de ODQ (100 µM). Os dados representam a média ± E.P.M. de 5-8 experimentos. \*\*\* $P < 0,0001$ , comparado ao controle; ### $P < 0,0001$ , comparado a com endotélio.

#### 4.1.2.2 Participação da $PGI_2$ no efeito vasodilatador do EMT

O envolvimento da via da  $PGI_2$  na vasodilatação induzida pelo EMT foi investigado através do pré-tratamento com indometacina (100 µM), um inibidor da COX. A indometacina provocou um deslocamento para direita da curva concentração-resposta do EMT, com aumento da  $CI_{50}$  para  $14,56 \pm 2,13$  µg/mL, indicando que a  $PGI_2$  também está envolvida no relaxamento vascular provocado pelo extrato. Na concentração de 10 µg/mL de EMT, o relaxamento vascular foi

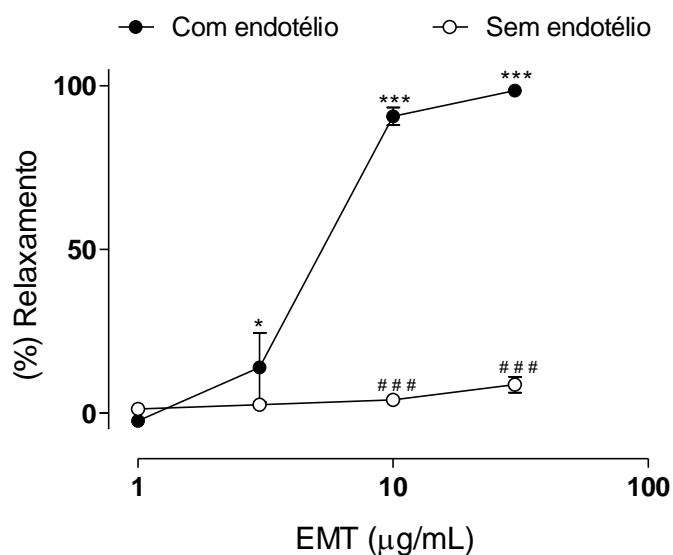
reduzido de  $84,46 \pm 4,04$  para  $60,22 \pm 5,98\%$  na presença de indometacina. (Figura 19).



**Figura 19: Avaliação do envolvimento do prostaciclina no efeito vasodilatador do extrato metanólico das folhas da *T. guianensis* (EMT) em anéis de aorta de ratos com endotélio.** Curvas concentração-resposta na ausência e presença de indometacina (100 µM). Os dados representam a média  $\pm$  E.P.M. de 6-8 experimentos. \*\*\* $P < 0,0001$ , comparado ao controle; # $P < 0,05$  e ### $P < 0,0001$ ; comparado com endotélio.

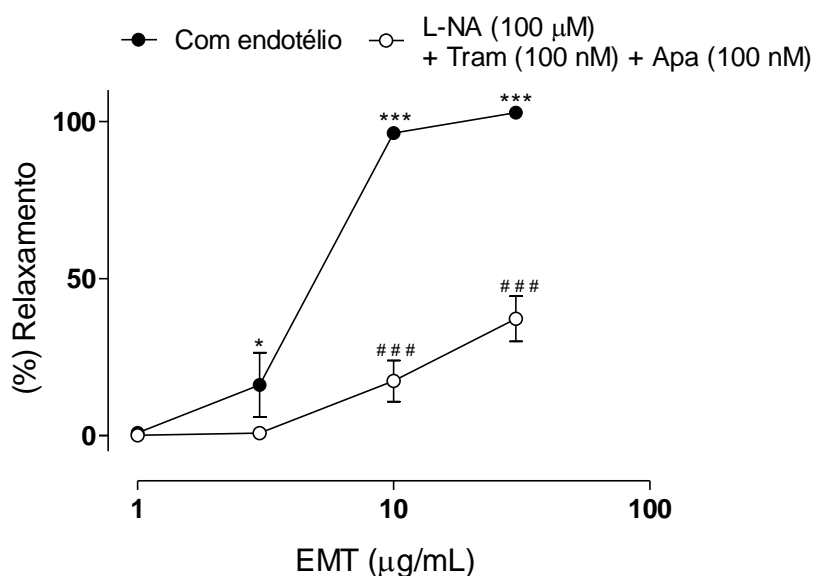
#### 4.1.3 Avaliação do efeito vasodilatador do EMT em artéria coronária de porco

O EMT promoveu intenso relaxamento dos anéis de coronária de porco na presença do endotélio, com efeito de  $92,07 \pm 2,70\%$  observado na concentração de  $10 \mu\text{g/mL}$ , sendo mantido o platô até a máxima concentração de  $30 \mu\text{g/mL}$ . Em vasos sem endotélio, o EMT não provocou nenhuma alteração significativa do tônus vascular (**Figura 20**). Estes resultados indicam que o efeito vasodilatador do EMT em artérias coronárias de porcos envolve vias de sinalizações dependentes do endotélio, corroborando os efeitos vasorelaxantes em anéis de aorta de ratos *Wistar* (**Figuras 17 – 19**).



**Figura 20:** Curvas concentração-resposta para o extrato metanólico das folhas da *T. guianensis* (EMT) em anéis de coronária de porco com e sem endotélio. Os dados representam a média  $\pm$  E.P.M. de 5-6 experimentos.\*\*\* $P < 0,0001$ , comparado ao controle; ### $P < 0,0001$ ; comparado com endotélio.

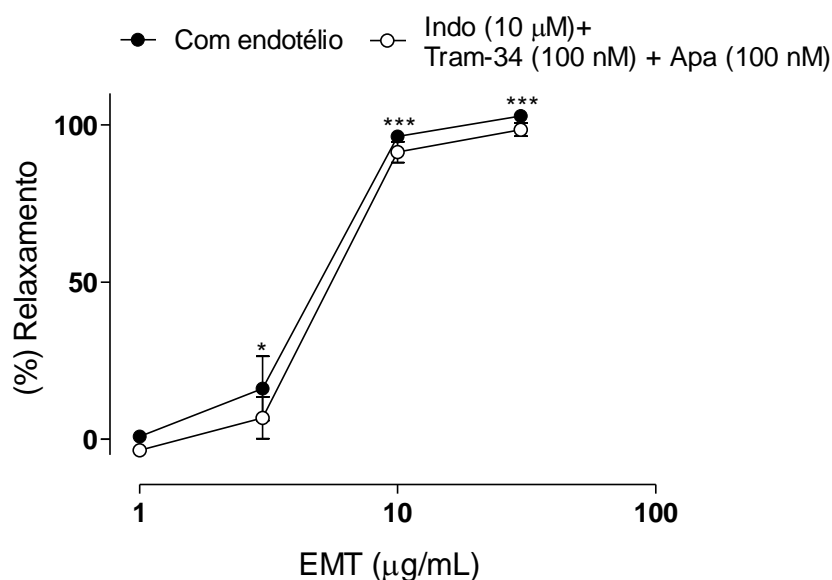
Para avaliar o envolvimento do NO e do EDHF no efeito do EMT, foi realizado o pré-tratamento das coronárias com os inibidores L-NA (100  $\mu$ M), inibidor da NOS, e a combinação de apamina (100 nM) mais Tram (100 nM), inibidores seletivos dos canais SK<sub>Ca</sub> e IK<sub>Ca</sub>, respectivamente. Na presença dos inibidores, foi observada uma redução significativa do efeito vasodilatador do EMT, com redução do efeito máximo para  $17,37 \pm 6,56\%$  na concentração de 30  $\mu$ g/mL (**Figura 21**). Tal resultado pressupõe que há participação significativa do NO, assim como do EDHF, no efeito vasodilatador induzido pelo EMT nas coronárias de porcos.



**Figura 21: Envolvimento das vias do óxido nítrico (NO) e do fator hiperpolarizante derivado do endotélio (EDHF) na vasodilatação induzida pelo extrato metanólico das folhas da *T. guianensis* (EMT) em anéis de coronária de porco.** Curvas concentração-resposta para EMT na ausência e presença de L-NA e da combinação de apamina (Apa) mais Tram-34. Os dados representam a média  $\pm$  E.P.M. de 6-8 experimentos.\*\*\* $P < 0,0001$ , comparado ao controle; ### $P < 0,0001$ ; comparado com endotélio.



Para avaliar o envolvimento da via da PGI<sub>2</sub> e EDHF foi realizado o pré-tratamento das coronárias com a combinação dos inibidores indometacina (10 μM) e apamina (100 nM) mais Tram (100nM), combinação esta que não alterou significativamente a vasodilatação induzida pelo EMT (**Figura 22**). Tal resultado pressupõe que não há participação significativa de ambos os fatores PGI<sub>2</sub> e EDHF e sugere que a inibição observada na **Figura 21** seja decorrente primordialmente da inibição da NOS, indicando que o NO deve ser o principal fator endotelial envolvido no efeito vasodilatador do EMT em anéis de coronária de porco.



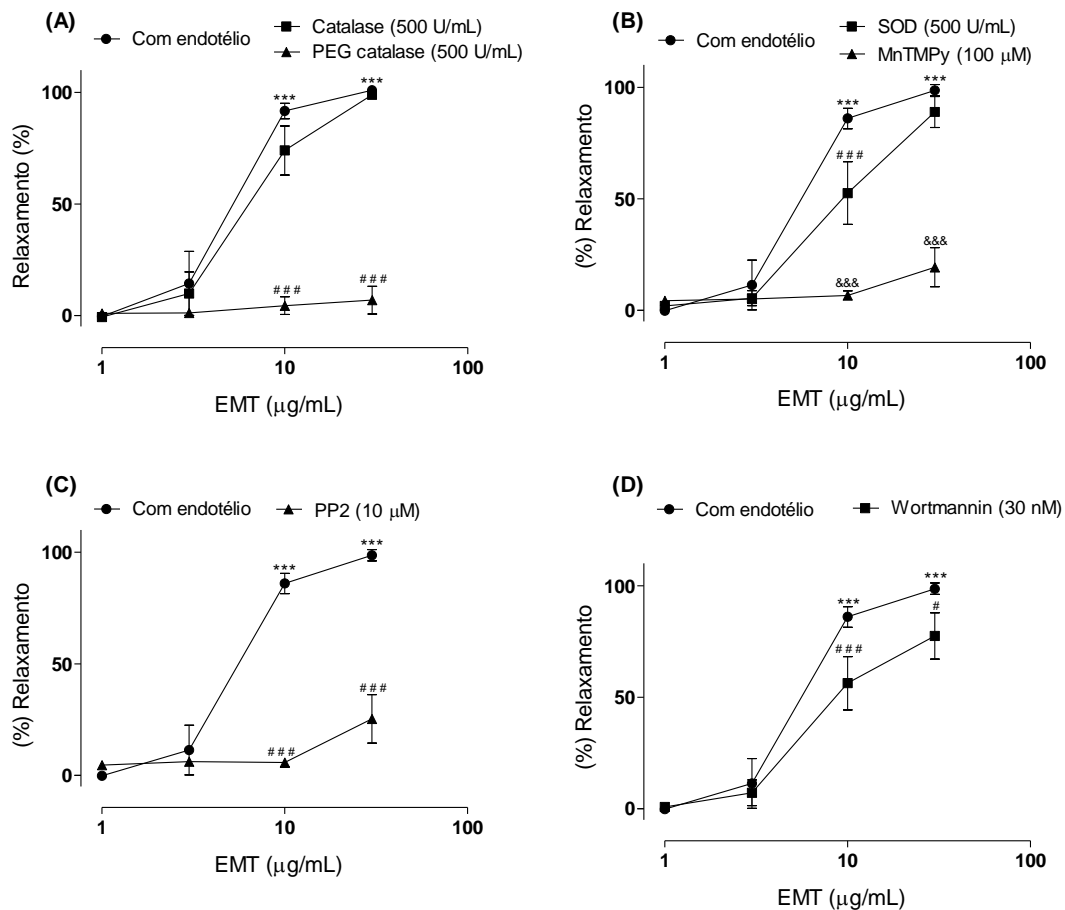
**Figura 22: Envolvimento das vias da prostaciclina (PGI<sub>2</sub>) e do fator hiperpolarizante derivado do endotélio (EDHF) na vasodilatação induzida pelo extrato metanólico das folhas da *T. guianensis* (EMT) em anéis de coronária de porco.** Curvas concentração-resposta para EMT na ausência e presença de indometacina e da combinação de apamina (Apa) mais Tram-34. Os dados representam a média ± E.P.M. de 6-8 experimentos. \*\*\* $P < 0,0001$ , comparado ao controle.

#### 4.1.3.1 Participação das espécies reativas de oxigênio e da via Src quinase e PI3K/Akt na vasodilatação induzida pelo EMT

Estudos têm mostrado que SFs podem provocar aumento da produção de EROs em células endoteliais e desta forma ativar mecanismos vasodilatadores (STAICULESCU *et al.*, 2014; ANSELM *et al.*, 2009). Para avaliar o envolvimento do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> extracelular e intracelular no efeito do EMT, foi realizado o pré-tratamento com catalase e PEG-catalase, respectivamente. Na presença de catalase, o relaxamento induzido pelo EMT não foi significativamente alterado. No entanto, a incubação com PEG-catalase provocou deslocamento da curva concentração-resposta do EMT para a direita, sendo observada redução do relaxamento de  $91,67 \pm 3,48$  % para  $4,41 \pm 3,9$ %, na concentração de 10 µg/mL (**Figura 23 A**).

Para avaliar o envolvimento do ânion superóxido extracelular e intracelular, foram realizados pré-tratamentos com a SOD e MnTMPy (um mimético da SOD permeável a membrana), respectivamente. Na presença de SOD, foi observada redução do relaxamento somente na concentração de 10 µg/mL (**Figura 23 B**). Na presença de MnTMPy, a vasodilatação induzida pelo EMT foi significativamente reduzida de  $86,00 \pm 4,6$  % para  $6,63 \pm 2,0$  %, na concentração de 10 µg/mL (**Figura 23 B**).

A ativação da Src através de eventos redox pode levar a ativação da via PI3K/Akt nas células endoteliais e conseqüentemente da eNOS (ANSELM *et al.*, 2009). Sendo assim, foram realizados pré-tratamentos com PP2, inibidor da Src, e com wortmanina, inibidor da PI3K. Na presença de PP2 e de wortmanina, foi observada uma redução do relaxamento induzido, por 10 µg/mL de EMT, de  $86,00 \pm 4,6$ % para  $5,7 \pm 1,99$  % e  $56,28 \pm 11,98$ %, respectivamente (**Figura 23 C e D**). Desta forma, a ativação da eNOS pelo EMT parece estar relacionada ao aumento da produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e ânion superóxido, seguida da ativação da Src e da via PI3K/Akt.

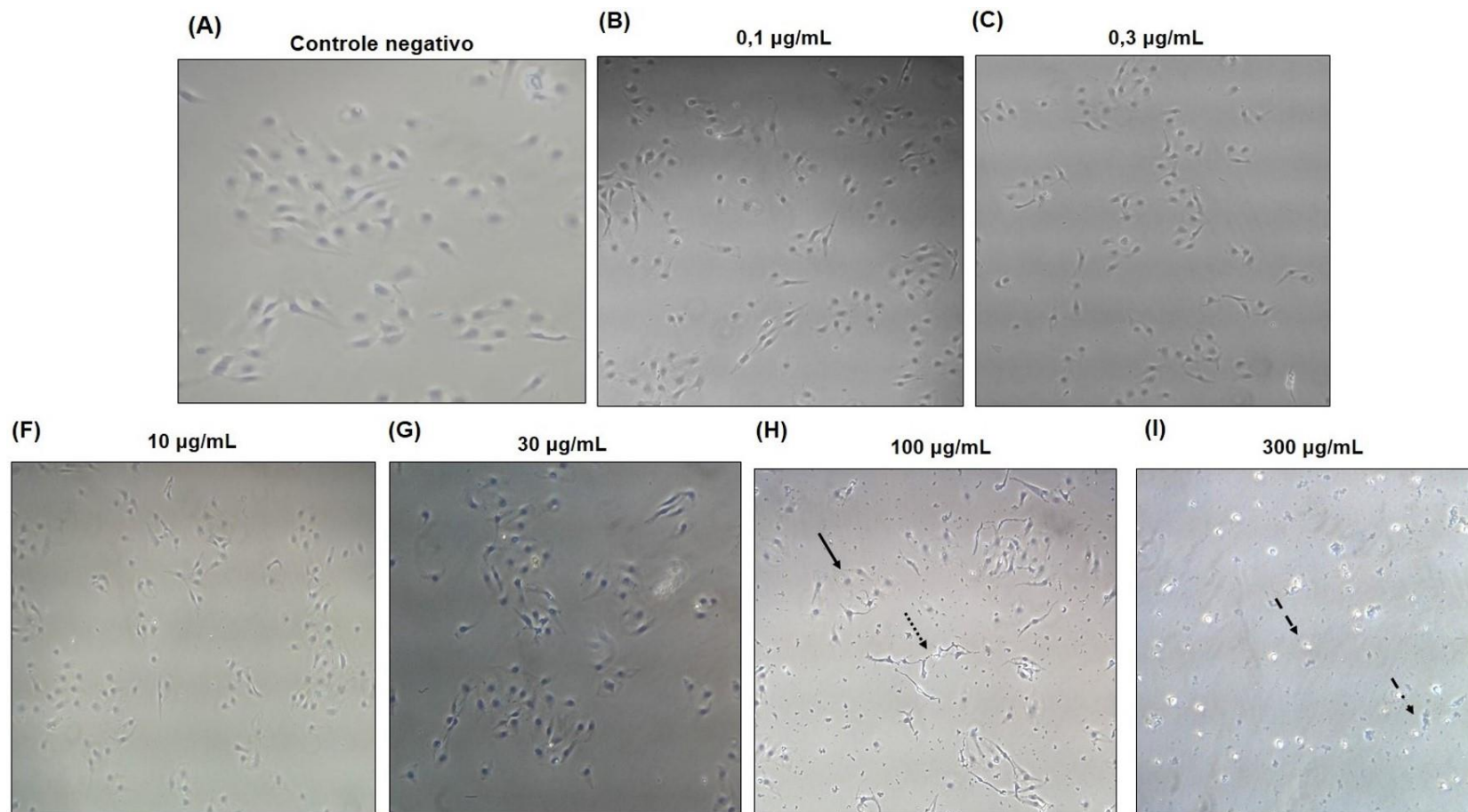


**Figura 23: Curvas concentração-resposta do mecanismo de ação redox-sensível no efeito vasodilatador pelo extrato metanólico das folhas da *T. guianensis* (EMT) em anéis de coronária de porco. (A) Com endotélio; presença de catalase e presença do análogo da catalase permeável à membrana, a PEG-catalase. (B) Com endotélio; presença de SOD e presença do mimético permeante da SOD, o MnTMPy. (C) Com endotélio e PP2. (D) Com endotélio e presença de wortmanina. Os dados representam a média  $\pm$  E.P.M. de 7-9 experimentos. \*\*\* $P < 0,001$ , comparado ao controle; ### $P < 0,0001$  e & $P < 0,05$  e &&& $P < 0,0001$  comparados com o endotélio.**

#### 4.1.4 Avaliação dos efeitos do EMT em cultura de células endoteliais

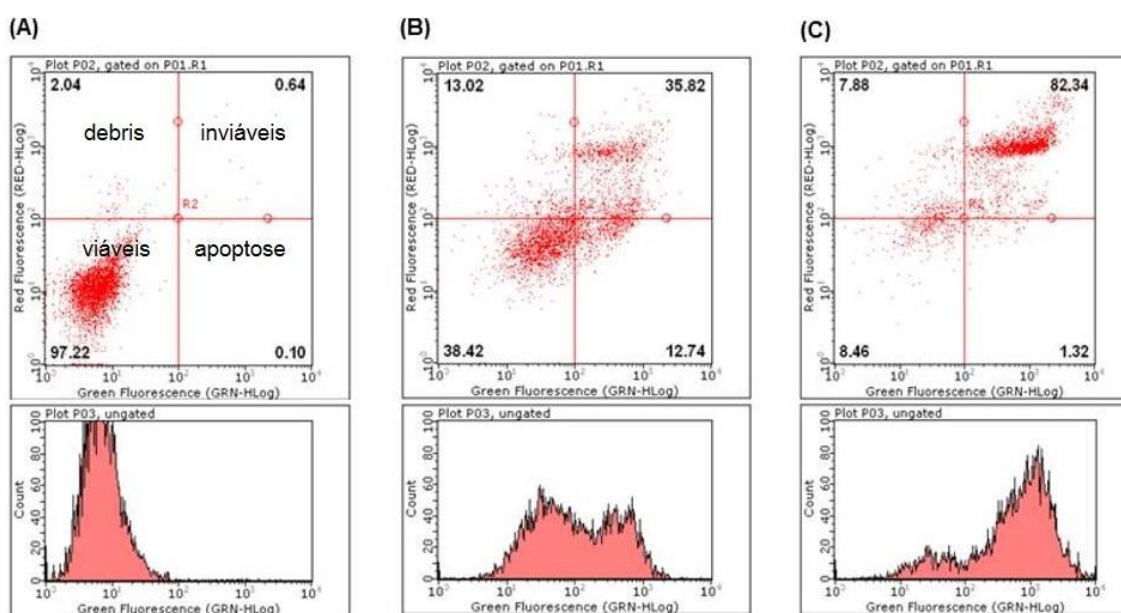
##### 4.1.4.1 Avaliação da citotoxicidade induzida pelo EMT

Inicialmente, para avaliar a citotoxicidade induzida pelo EMT, foi realizada a incubação das células endoteliais P1 por um período de 48 h com diferentes concentrações (0,1 – 300 µg/mL) do extrato. Nas análises microscópicas, o tratamento nas concentrações entre 0,1 – 30 µg/mL não provocou alterações morfológicas quando comparado ao controle negativo (ausência de tratamento) (**Figura 24 A – G**). Entretanto, na concentração de 100 µg/mL do EMT foram observadas alterações e danos, visualizando-se células lesadas e início de morte celular, completa alteração morfológica e presença de debris, os quais progrediram com a intensificação da morte celular na presença de 300 µg/mL do EMT (**Figura 24 H e I**).



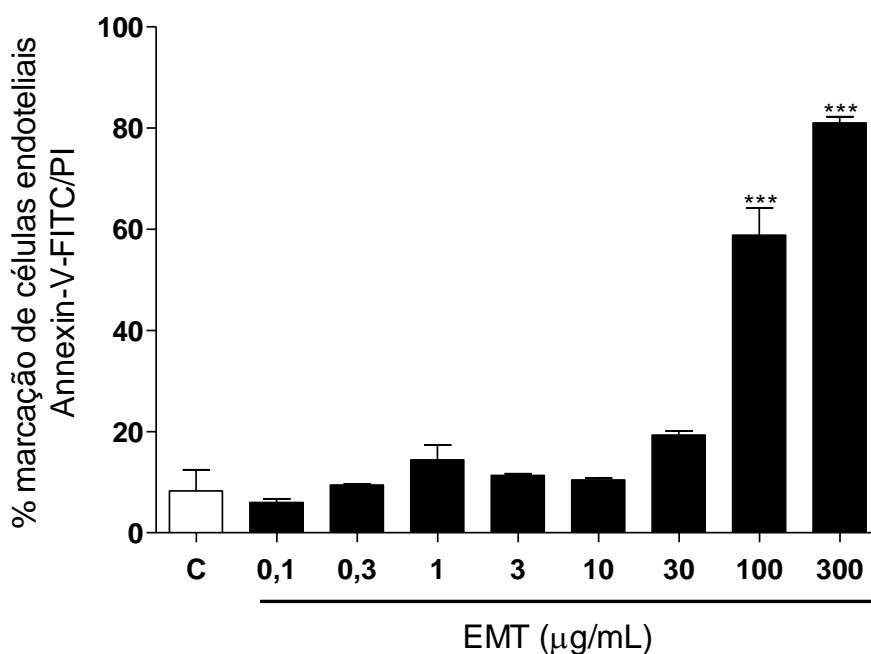
**Figura 24: Avaliação microscópica das células endoteliais de coronária suína após tratamento com o extrato metanólico das folhas de *T. guianensis* (EMT).** As células endoteliais foram tratadas por 48 h. (A) o controle negativo (ausência de tratamento) apresentou-se inalterado, assim como (B – G) nas concentrações de 0,1 – 30 µg/mL do EMT; (H) Concentração de 100 µg/mL do EMT (→ presença de célula endotelial, .....→ dano e perda da morfologia celular); (I) Concentração de 300 µg/mL do EMT (– → pontos amarelos sem aderência observados ao microscópio invertido, – ▶ restos celulares).

A morte celular foi detectada pela marcação com anexina-V-FITC conjugada ao iodeto de propídeo. A anexina V-FITC apresenta alta afinidade pelos fosfolípídeos de membrana carregados negativamente, em especial pela fosfatidilserina, a qual passa a ser expressa em maior concentração do lado externo da membrana celular quando ocorre desorganização membranar decorrente de danos celulares. A anexina V conjugada ao corante isotiocianato de fluoresceína (FITC) torna as células passíveis de identificação e quantificação pela citometria de fluxo. O iodeto de propídeo, devido seu alto peso molecular, só pode ter acesso intracelular após alterações significativas na membrana plasmática, permitindo assim a entrada do corante e intercalação com o DNA. Portanto, a utilização de anexina V-FITC conjugada ao iodeto de propídeo permitiu a identificação das populações celulares viáveis, apoptóticas, inviáveis e os *debris*, determinadas a partir do deslocamento nos quatro quadrantes do gráfico de dispersão (**Figura 25**).



**Figura 25: Avaliação da citotoxicidade por citometria de fluxo através da marcação por anexina-V-FITC e iodeto de propídeo das células endoteliais de coronária suína tratadas com altas doses do extrato metanólico das folhas de *T. guianensis* (EMT). (A) Controle negativo, no qual se observa a população de células endoteliais viáveis. (B) Na concentração de 100 µg/mL de EMT, se pode observar um desvio para a direita, no qual ocorreu o início dos processos apoptóticos que progridem para células inviáveis. (C) Na concentração de 300 µg/mL de EMT pode se observar um desvio para a direita com baixo número de células viáveis e alto grupo populacional de células inviáveis.**

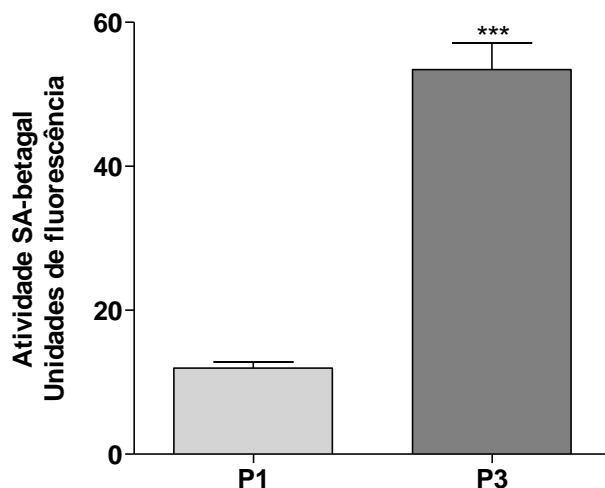
Na avaliação das células endoteliais marcadas com anexinaV/IP após 48 h de tratamento com EMT nas concentrações entre 0,1 e 30  $\mu\text{g/mL}$ , não foram observados efeitos tóxicos para as células. Entretanto, na concentração de 100  $\mu\text{g/mL}$ , se pode observar a ativação dos processos apoptóticos, em que  $58,84 \pm 5,40 \%$  ( $P < 0,0001$ ) das células endoteliais apresentaram marcação para anexinaV-FITC/IP. Na concentração de 300  $\mu\text{g/mL}$ , praticamente todas as células se encontraram em processo apoptótico, onde  $81,01 \pm 1,23\%$  ( $P < 0,0001$ ) das células endoteliais apresentaram marcação para anexinaV-FITC/IP. Portanto, as concentrações de 100 e 300  $\mu\text{g/mL}$  não foram usadas nos experimentos farmacológicos posteriores (**Figura 26**).



**Figura 26: Avaliação da apoptose induzida pelo extrato metanólico das folhas de *T. guianensis* (EMT) em cultura primária de células endoteliais de coronária de porco, comparadas a células controle (C). A marcação por anexina V-FITC/IP permitiu identificar a porcentagem de células que sofreram danos devidos à toxicidade do extrato. Os dados representam a média  $\pm$  E.P.M. de 4 experimentos. \*\*\* $P < 0,0001$ , comparado ao controle P1.**

#### 4.1.4.2 Avaliação do efeito do EMT na senescência endotelial através da determinação da atividade SA- $\beta$ gal

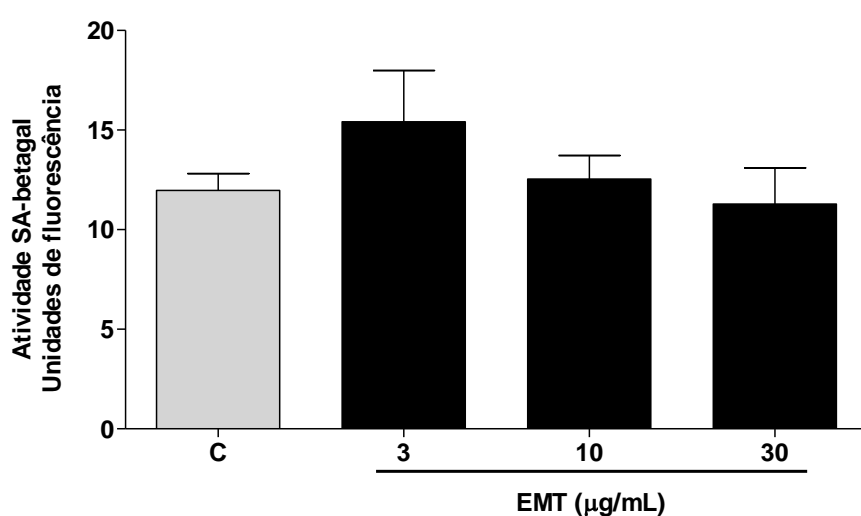
Para avaliação da senescência endotelial foi utilizada a medida da atividade SA- $\beta$ gal no modelo de senescência replicativa. As células endoteliais jovens (P1) apresentaram baixa atividade SA- $\beta$ gal, sendo detectada  $11,97 \pm 1,68$  de intensidade de fluorescência após a hidrólise do marcador C<sub>12</sub>-FDG em pH 6,0. Já as células senescentes P3 apresentaram fluorescência de  $51,20 \pm 12,23$  de intensidade de fluorescência ( $P < 0,0001$ ), o que demonstra a indução da senescência endotelial após a terceira passagem em cultura (**Figura 27**).



**Figura 27:** Atividade SA- $\beta$ gal em células endoteliais de coronária de porco jovens (P1) e senescentes (P3) em modelo de senescência replicativa. Os dados representam a média  $\pm$  E.P.M. de 4-6 experimentos. \*\*\* $P < 0,0001$  comparado com P1.

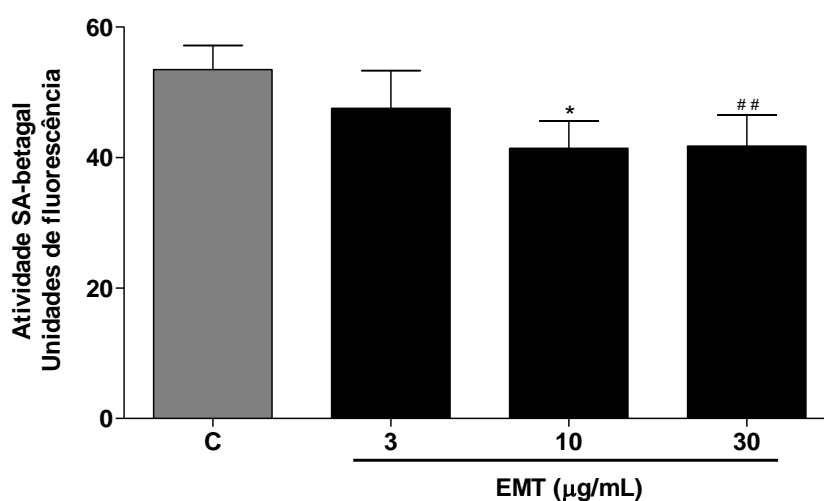


Para o estudo dos efeitos do EMT, foi avaliada a ação em células P1 e P3, nas quais avaliou-se a possível indução de senescência ou a redução da atividade SA- $\beta$ gal, respectivamente. A atividade SA- $\beta$ gal não foi induzida em células P1 tratadas nas concentrações de 3  $\mu$ g/mL ( $15,42 \pm 5,1$  de intensidade de fluorescência), 10  $\mu$ g/mL ( $12,55 \pm 2,36$  de intensidade de fluorescência) e 30  $\mu$ g/mL ( $11,29 \pm 3,63$  de intensidade de fluorescência) de EMT (**Figura 28**), indicando que o EMT não induz senescência em células endoteliais jovens suínas.



**Figura 28: Atividade SA- $\beta$ gal em células endoteliais jovens P1 na ausência (C) e presença do extrato metanólico das folhas da *T. guianensis* (EMT).** O tratamento de células P1 com 3 – 30  $\mu$ g/mL de EMT não induziu senescência em células endoteliais de coronária suína após 48 h de incubação. Os dados representam a média  $\pm$  E.P.M. de 4 experimentos.

Em células senescentes P3, o EMT reduziu significativamente a atividade SA- $\beta$ gal de  $51,20 \pm 12,23$  de intensidade de fluorescência para  $41,38 \pm 10,26$  de intensidade de fluorescência ( $P < 0,05$ ) e  $41,73 \pm 11,68$  de intensidade de fluorescência ( $P < 0,001$ ) nas concentrações de 10  $\mu\text{g/mL}$  e 30  $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente (**Figura 29**).



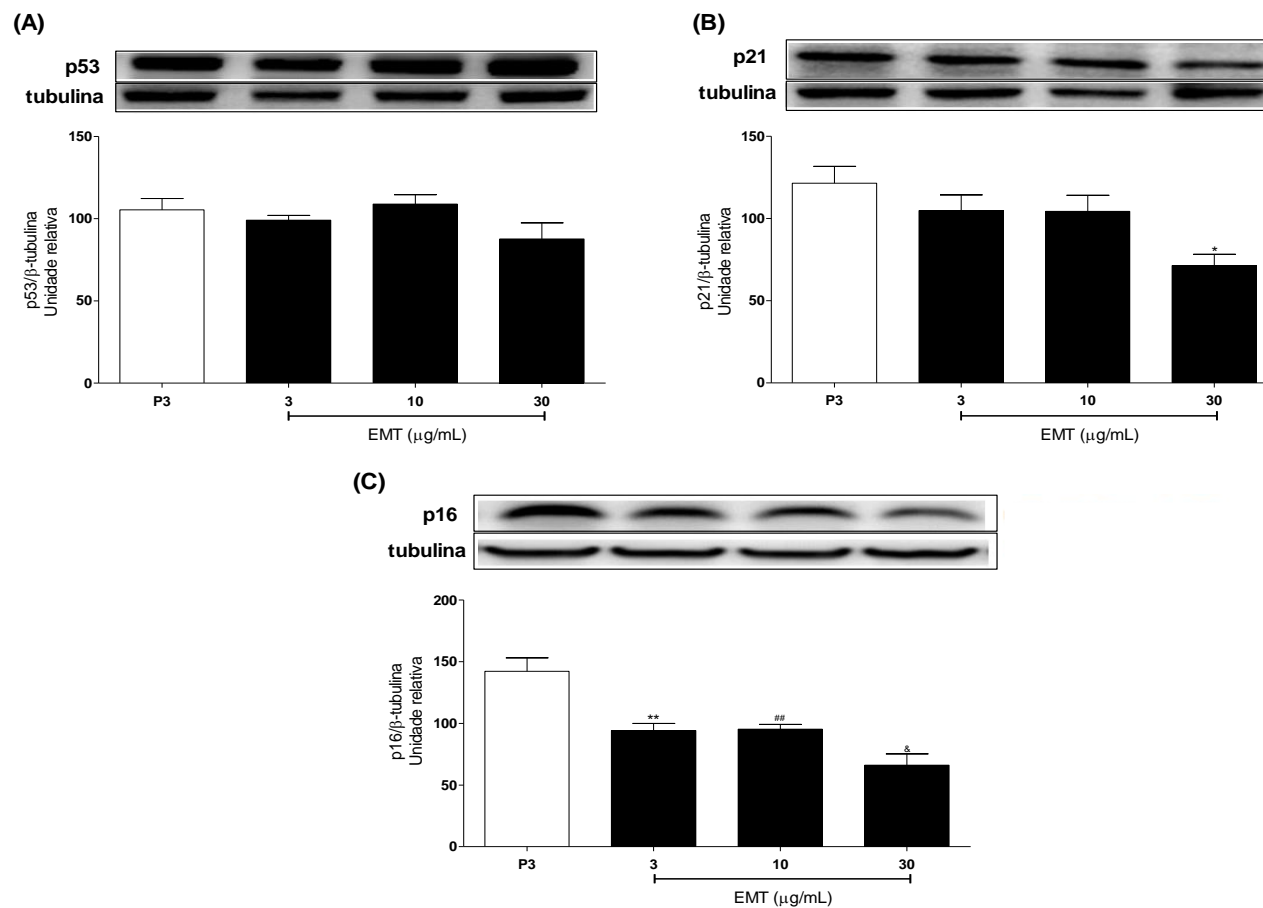
**Figura 29: Atividade SA- $\beta$ gal em células endoteliais senescentes na ausência (C) e presença do extrato metanólico das folhas da *T. guianensis* (EMT).** O tratamento de células P3 com 10 e 30  $\mu\text{g/mL}$  de EMT reduziu a atividade SA- $\beta$ gal em células endoteliais de coronária suína após 48 h de incubação. Os dados representam a média  $\pm$  E.P.M. de 6 experimentos. \* $P < 0,05$  comparado com P3; ## $P < 0,001$  comparado com P3.

#### 4.1.4.3 Avaliação do EMT na expressão de proteínas reguladoras do ciclo celular em células endoteliais senescentes

Previamente foi demonstrado por Khemais *et al.* (2015) que células endoteliais jovens (P1) possuem menor expressão para as proteínas regulatórias do ciclo celular p53, p21 e p16, comparados a P3. Sendo assim, a avaliação da ação farmacológica do EMT frente a senescência endotelial foi avaliada em células P3, frente a possível modulação das proteínas p53, p21 e p16, as quais podem ser ativadas por sinais indutores de senescência.

O tratamento das células endoteliais com EMT (3 – 30  $\mu\text{g/mL}$ ) não alterou a expressão de p53 (**Figura 30 A**). Na concentração de 30  $\mu\text{g/mL}$  de EMT, a

expressão de p21 em células endoteliais P3 foi reduzida de 121,44% para 71,39%. Não houve efeito significativo nas concentrações de 3 e 10 µg/mL de EMT (**Figura 30 B**). O EMT reduziu a expressão de p16 em células endoteliais senescentes em todas as concentrações testadas, sendo que com 30 µg/mL foi observada redução da expressão de 142,24% para 66,18% (**Figura 30 C**).



**Figura 30: Análise de proteínas reguladoras do ciclo celular em modelo de senescência replicativa de células endoteliais senescentes (P3) de coronária suína após 48 h de tratamento com extrato metanólico das folhas da *T. guianensis* (EMT), por *Western blotting*. Os resultados estão apresentados pelos *immunoblots* (painéis superiores) e os valores correspondentes (painéis inferiores) para a expressão de (A) p53, (B) p21 e (C) p16. Os dados representam a média ± E.P.M. de 4-5 experimentos. \* $P < 0,05$ ; \*\* $P < 0,001$ ; ## $P < 0,001$ ; & $P < 0,05$  comparado; todos comparados com P3.**

## 4.2 Estudo com as frações

### 4.2.1 Obtenção das frações

A partição líquido-líquido de 50 g do EMT possibilitou a obtenção das frações FH, FD, FA, FB e FAq, com diferentes polaridades e massas iguais a 6,5287; 1,7312; 26,1552; 7,20052 e 6,0103 g, respectivamente. Dentre as frações obtidas a FA apresentou o rendimento mais alto, sendo este de 52% (**Tabela 3**). No ensaio biomonitorado, as frações foram avaliadas quanto a atividade vasodilatadora em anéis de aorta de ratos Wistar, conforme item 3.5.1 e o estudo prosseguiu com as frações FD e FA, as quais apresentaram ação vasodilatadora, conforme item 4.2.2.

**Tabela 3: Partição líquido-líquido para obtenção das frações a partir de 50 g do extrato bruto metanólico das folhas da *T. guianensis* (EMT).**

FRAÇÕES	MASSA (g)	Rendimento (%)
FH	6,5287	13
FD	1,7312	4
FA	26,1552	52
FB	7,2052	14
FAq	6,0103	12
Perda	2,36	5

FH: fração hexânica; FD: fração diclorometano; FA: fração acetato de etila; FB: fração butanólica; FAq: fração aquosa.

#### 4.2.2 Avaliação do efeito vasodilatador das frações em aorta de ratos Wistar

Todas as frações do EMT obtidas por particionamento líquido-líquido foram testadas em aortas com endotélio. A fração FH não provocou qualquer alteração do tônus vascular (**Figura 31 A**). A fração FD promoveu relaxamento dos anéis de aorta com efeito máximo de  $53,56 \pm 4,87\%$  observado na concentração de  $30 \mu\text{g/mL}$ , com  $\text{CI}_{50}$  de  $44,81 \pm 6,77 \mu\text{g/mL}$  ( $P < 0,0001$ ) (**Figura 31 B**). A fração FA apresentou um perfil de efeito semelhante ao observado para o EMT. Foi observado efeito máximo de  $91,46 \pm 2,86\%$  na concentração de  $10 \mu\text{g/mL}$  ( $P < 0,0001$ ), com  $\text{CI}_{50}$  igual a  $3,09 \pm 0,37 \mu\text{g/mL}$  (**Figura 31 C**). As frações FB e FAq apresentaram efeitos semelhantes, com relaxamento máximo de  $27,17 \pm 0,31\%$  e  $20,77 \pm 0,19\%$ , respectivamente, na concentração de  $10 \mu\text{g/mL}$  ( $P < 0,0001$ ) (**Figura 31 D e E**). Estes resultados indicam que as frações FD e FA devem concentrar os metabólitos responsáveis pelo efeito vasodilatador do EMT.

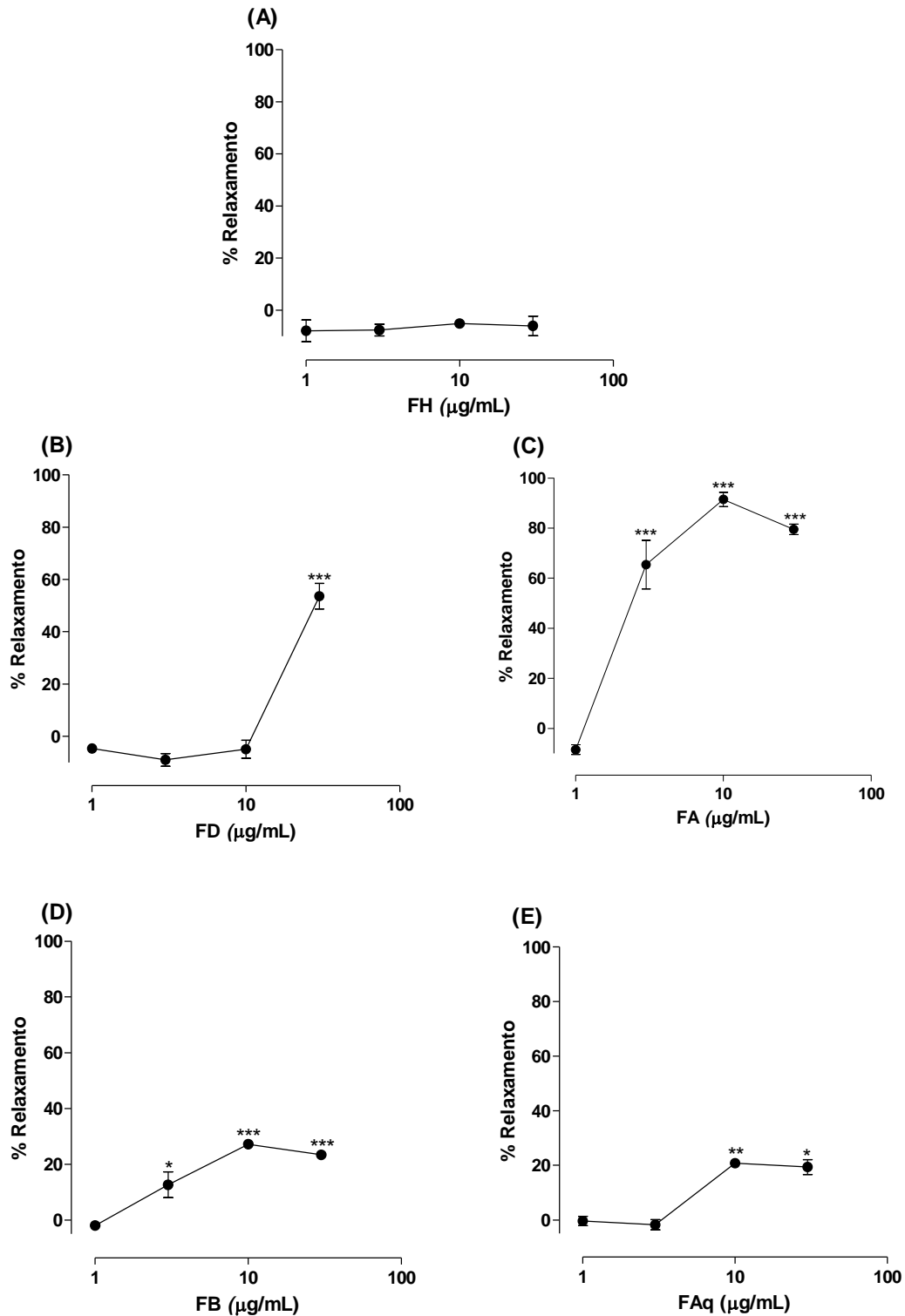


Figura 31: Curvas concentração-resposta para as frações obtidas a partir do extrato metanólico das folhas da *T. guianensis*. (1 – 30  $\mu\text{g/mL}$ ) em anéis de aorta de ratos com endotélio. (A) Fração hexânica (FH). (B) Fração diclorometano (FD). (C) Fração acetato de etila (FA). (D) Fração butanólica (FB). (E) Fração aquosa remanescente (FAq). Os dados representam a média  $\pm$  E.P.M. de 3-6 experimentos. \* $P < 0,05$ ; \*\* $P < 0,001$  e \*\*\* $P < 0,0001$ , comparado ao controle.

### 4.3 Estudo antioxidante com o EMT e as frações

#### 4.3.1 Avaliação *in vitro* pelo sequestro do radical livre DPPH

Para avaliar a ação antioxidante do EMT e suas frações, foram utilizados, como controles positivos, o extrato padronizado de *Ginkgo biloba* (EGb 761®) e a quercetina. O EGb 761® apresentou ação antioxidante, sendo  $22,91 \pm 0,65$  µg/mL a concentração do extrato necessária para produzir 50% da resposta máxima (CE<sub>50</sub>), enquanto que a quercetina apresentou uma maior potência, com CE<sub>50</sub> igual a  $1,89 \pm 0,16$  µg/mL (**Figura 32**).

O EMT apresentou um melhor perfil de atividade antioxidante *in vitro* comparado ao EGb 791®, com CE<sub>50</sub> de  $3,12 \pm 0,19$  µg/mL, sendo desta forma mais potente do que o controle positivo *Ginkgo biloba*. Entretanto, não possui potência tão elevada quanto o padrão quercetina. A fração Hex apresentou uma atividade antioxidante *in vitro* com CE<sub>50</sub> de  $40,30 \pm 0,39$  µg/mL, sendo desta forma menos potente, quando comparada aos padrões EGb 791® e quercetina. A fração DCM apresentou um perfil de atividade antioxidante *in vitro* similar ao EGb 791®, com CE<sub>50</sub> de  $19,83 \pm 0,89$  µg/mL. Entretanto, possui menor atividade quando comparada ao padrão quercetina. A fração FA apresentou um melhor perfil de atividade antioxidante *in vitro* comparado ao EGb 791®, com CE<sub>50</sub> de  $5,32 \pm 0,15$  µg/mL, sendo desta forma mais potente do que o controle positivo *Ginkgo biloba*. Entretanto, possui menor atividade quando comparada ao padrão quercetina. A fração BuOH e a fração Aq<sub>rem</sub> apresentaram melhor perfil de atividade antioxidante *in vitro* comparadas ao EGb 791®, com CE<sub>50</sub> de  $3,12 \pm 0,19$  µg/mL e  $14,33 \pm 0,14$  µg/mL, respectivamente, sendo desta forma ambas mais potentes do que o controle positivo *Ginkgo biloba*. Entretanto, possuem menor atividade quando comparadas ao padrão quercetina (**Figura 32**).



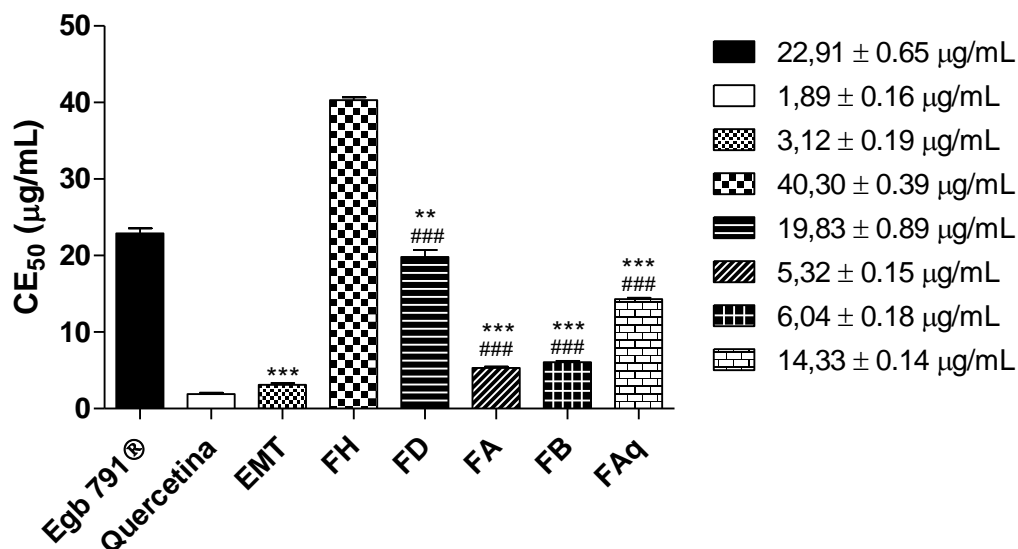
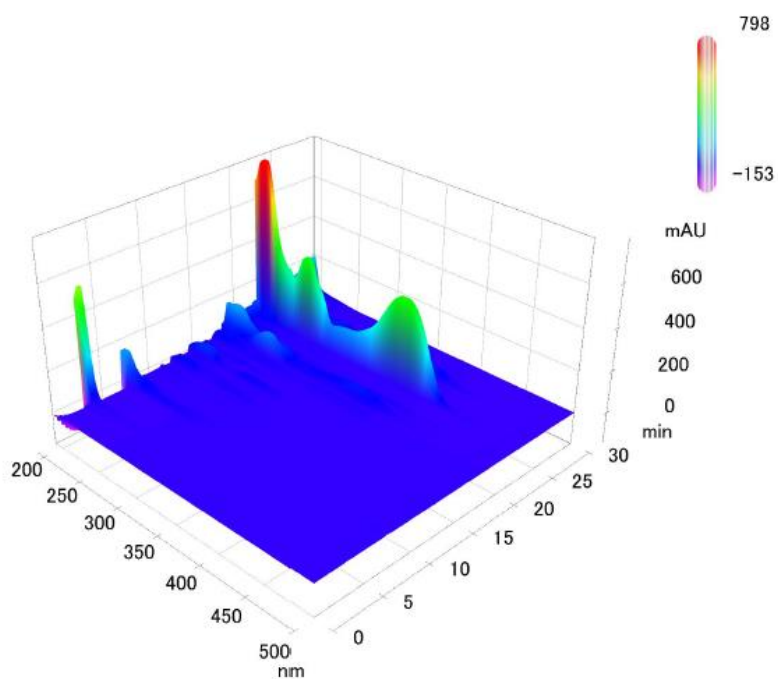
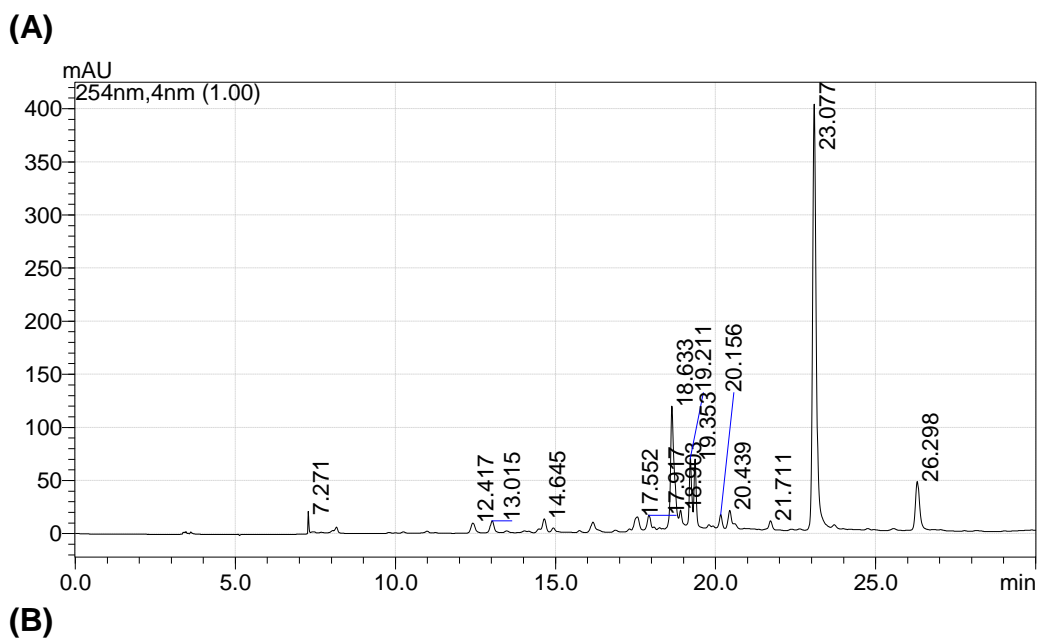


Figura 32: Ação antioxidante in vitro após sequestro do radical livre DPPH do extrato metanólico das folhas da *T. guianensis* (EMT), fração hexânica (FH), fração diclorometano (FD), fração acetato de etila (FA), fração butanólica (FB) e fração aquosa remanescente (FAq) das folhas da *T. guianensis*. Comparação da concentração eficaz para produzir 50% do efeito antioxidante máximo (CE<sub>50</sub>) dos controles positivo EGb 761® e quercetina, comparados a EMT e suas frações orgânicas. Os dados representam a média ± E.P.M. de 8 experimentos.

## 4.4 Estudo com as frações biologicamente ativas

### 4.4.1 Perfil químico da FD

A FD apresentou um cromatograma com 15 picos em um intervalo de tempo de retenção entre 7,271 a 26,298 min, os quais tiveram seus respectivos dados espectroscópicos de UV analisados na faixa espectral de 190 a 600 nm na concentração de 1 mg/mL. As análises dos espectros de UV possibilitaram a avaliação analítica, propondo-se a presença de SFs (**Figura 33 A e B**). Devido à polaridade da fração, é ainda possível supor a presença de metabólitos secundários, como terpenos, que não puderam ser detectados nas condições de análise por CLAE.

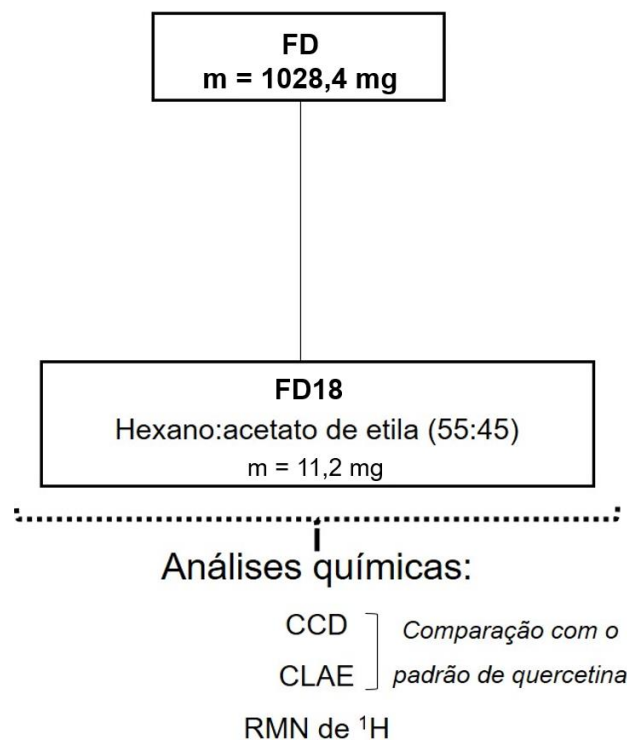


**Figura 33: Análise do perfil químico por cromatografia líquida de alta eficiência da fração diclorometano (FD) das folhas da *T. guianensis*. (A) Cromatograma obtido em 254 nm após corrida gradiente (ACN/H<sub>2</sub>O) por 45 min (representado até 30 min), com fluxo de corrida igual a 1mL/min. (B) Gráfico 3D no qual podem ser observados os espectros de UV referentes a cada pico.**

A cromatografia da FD possibilitou a obtenção de 28 sub-frações (**Tabela 4**), dentre elas a sub-fração **FD18**, com formação de pequenos cristais bem agrupados de coloração amarelo-ouro, que após homogeneização tornou-se um pó amarelo. Após análise por CCD e CLAE foi constatado a presença de uma substância flavonídica isolada, sendo realizada a comparação com o padrão de quercetina, que possibilitou a caracterização da substância (**Figura 34**).

**Tabela 4: Procedimento cromatográfico a partir de 1028,4 mg da fração diclorometano (FD) das folhas da *T. guianensis*.**

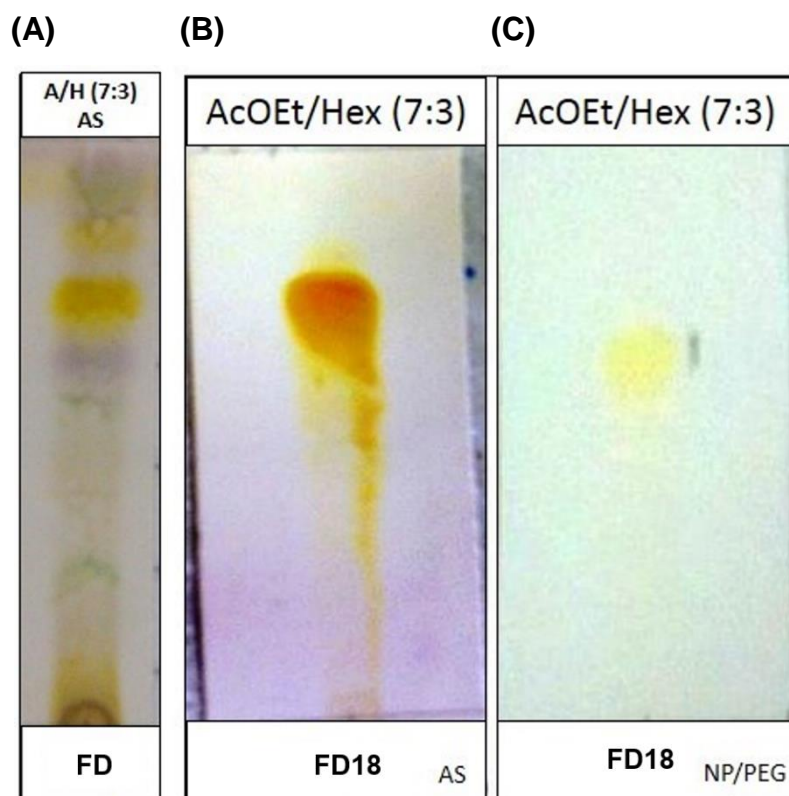
<b>SUB-FRAÇÃO OBTIDA</b>	<b>SOLVENTE</b>	<b>MASSA (mg)</b>
FD1	Hexano	6,5
FD2	Hexano:acetato de etila (85:15)	2,4
FD3	Hexano:acetato de etila (85:15)	1,4
FD4	Hexano:acetato de etila (85:15)	1,8
FD5	Hexano:acetato de etila (85:15)	2,4
FD6	Hexano:acetato de etila (85:15)	1,5
FD7	Hexano:acetato de etila (70:30)	2,8
FD8	Hexano:acetato de etila (70:30)	14,8
FD9	Hexano:acetato de etila (70:30)	6,9
FD10	Hexano:acetato de etila (70:30)	11,2
FD11	Hexano:acetato de etila (70:30)	2,1
FD12	Hexano:acetato de etila (70:30)	3,3
FD13	Hexano:acetato de etila (70:30)	5
FD14	Hexano:acetato de etila (70:30)	7,3
FD15	Hexano:acetato de etila (55:45)	25,3
FD16	Hexano:acetato de etila (55:45)	10,1
FD17	Hexano:acetato de etila (55:45)	12,4
FD18	Hexano:acetato de etila (55:45)	11,2
FD19	Hexano:acetato de etila (55:45)	13
FD20	Hexano:acetato de etila (55:45)	2,9
FD21	Hexano:acetato de etila (50:50)	26,9
FD22	Hexano:acetato de etila (50:50)	14,2
FD23	Hexano:acetato de etila (50:50)	7,2
FD24	Acetato de etila:hexano (75:25)	13,7
FD25	Acetato de etila	64,7
FD26	Acetato de etila:metanol (70:30)	481,8
FD27	Acetato de etila:metanol (55:45)	66,7
FD28	Metanol	92,7
<b>Massa total = 912,2 mg</b>		



**Figura 34: Fluxograma de isolamento da substância FD18 a partir da fração diclorometano (FD) das folhas da *T. guianensis*.**

#### 4.4.1.1 Quercetina (FD18) isolada da FD

O método de purificação possibilitou a obtenção de uma sub-fração **FD18** parcialmente pura em Hex:AcOEt (65:45). Avaliando-se no UV a 254 nm e 350 nm e com os reveladores anisaldeído sulfúrico e NP/PEG, a substância demonstra ser um flavonoide (**Figura 35 A – C**). A avaliação física mostrou que a substância forma cristais de coloração amarela.

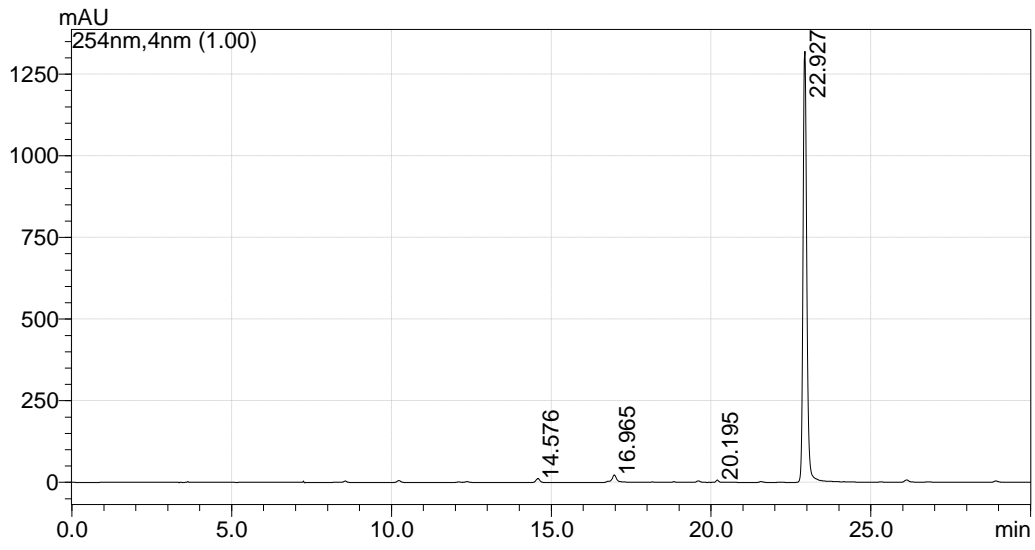


**Figura 35: Obtenção de sub-fração parcialmente purificada da fração diclorometano (FD) das folhas da *T. guianensis*.** (A) Cromatoplaça de sílica gel da fração FD, utilizando como eluente AcOEt/Hex (7:3) e após revelação com anisaldeído sulfúrico (AS). (B) Cromatoplaça de sílica gel da sub-fração FD18 20, utilizando como eluente AcOEt/Hex (7:3) e após revelação com AS. (C) Cromatoplaça de sílica gel da sub-fração FD18, utilizando como eluente AcOEt/Hex (7:3) e após revelação com (*Natural Products-Polyethylene glycol reagent*) NP/PEG.

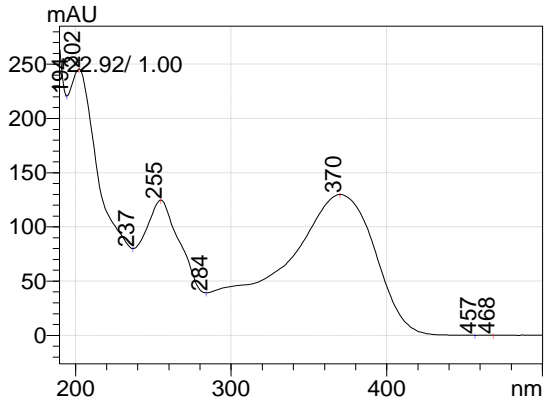
A análise da **FD18** por CLAE-UV-DAD mostrou um pico majoritário no  $t_R$  de 22,927 min; a % de área do pico foi de 97,26%, com índice de pureza máximo igual a 1.000.000. Assim sugere-se o isolamento do composto, com massa igual a 11,2 mg, correspondendo a 3,35  $\mu\text{g}/\text{mg}$  da fração FD, quando quantificado por CLAE, utilizando curva-padrão de quercetina comercial. A análise do espectro de UV em 254 e 350 nm confirmou a avaliação analítica da CCD, sendo a substância um flavonoide (**Figura 36 A – C**). Sugere-se que o mesmo seja o flavonol quercetina, após comparação com o padrão de quercetina (ambos com  $t_R$  22,94 min), os quais possuem um espectro com bandas de absorção máxima em 255 e 370 nm. Posteriormente a fração FD18 foi confirmada com análises por RMN (**Figura 37 A e B**).



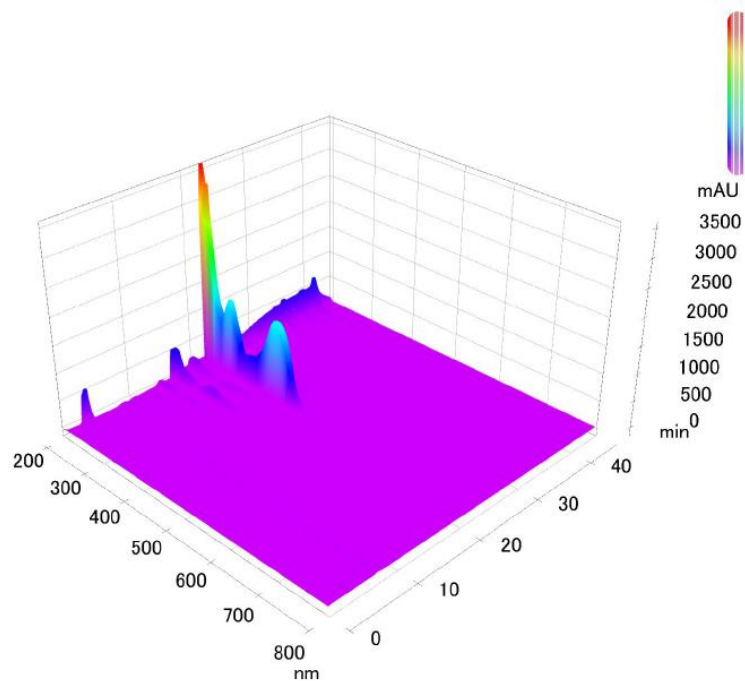
**(A)**



**(B)**

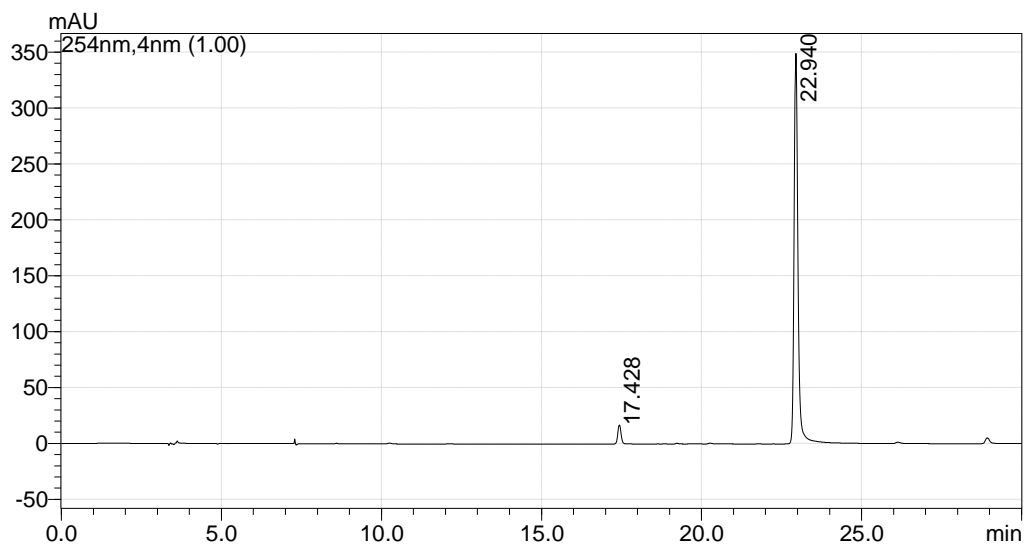


(C)

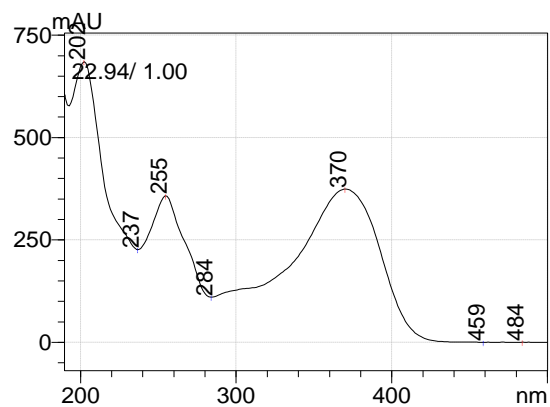


**Figura 36: Análise do perfil químico por cromatografia líquida de alta eficiência da FD18 das folhas da *T. guianensis*. (A) Cromatograma obtido em 254 nm após corrida gradiente (ACN/H<sub>2</sub>O) por 45 min (representado até 40 min), com fluxo de corrida igual a 1mL/min, no qual observa-se um pico majoritário em 22,927 min. (B) Espectro característico de substância flavonóidica. (C) Gráfico 3D no qual podem ser observados os espectros de UV referentes a cada pico.**

(A)



(B)

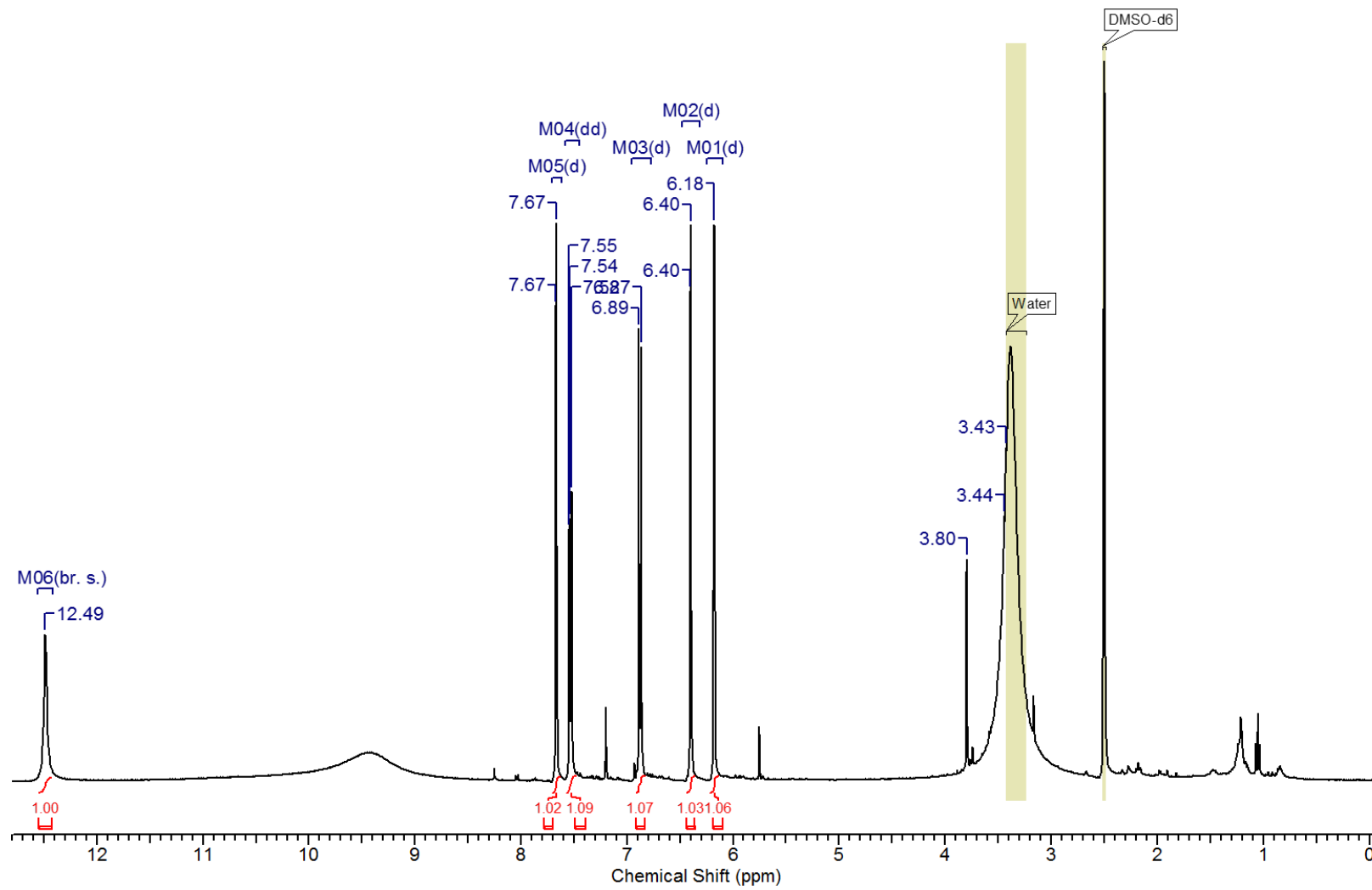


**Figura 37: Cromatograma e espectro de UV do padrão de quercetina. (A)** Cromatograma obtido em 254 nm após corrida gradiente (ACN/H<sub>2</sub>O) por 45 min, com fluxo de corrida igual a 1mL/min, no qual observa-se um pico majoritário em 22,94 min. **(B)** Espectro de UV da quercetina.

As análises em 400 MHz do RMN de  $^1\text{H}$  sugeriram um esqueleto fundamental flavonoídico, os quais apresentaram deslocamentos químicos ( $\delta$ ) característicos, observados entre 12,46 a 6,15 ppm, com suas respectivas constantes de acoplamento ( $J$ ). Os sinais permitiram identificar os hidrogênios aromáticos, propondo um padrão 5,7-dihidroxiado para o anel A e um padrão 3',4'-dihidroxiado para o anel B.

Os sinais de RMN de  $^1\text{H}$  para o anel A foram caracterizados por um duplete em  $\delta$  6,15 ppm ( $J= 1,96$  Hz), seguido por um duplete em  $\delta$  6,37 ppm ( $J= 1,96$  Hz), com a constante de acoplamento indicando uma interação de hidrogênios que mantém entre si relação meta, correspondendo aos hidrogênios H-6 e H-8, respectivamente. Ainda para o anel A foi identificado um singlete em  $\delta$  12,46, característico da hidroxila em C5. O padrão espectral do anel B foi definido pela presença de dois dupletos em  $\delta$  7,64 ppm ( $J= 1,96$  Hz) e  $\delta$  6,85 ppm ( $J= 8,51$  Hz) e de um duplo duplete em  $\delta$  7,50 ppm ( $J= 8,51; 2,35$  Hz), correspondente aos hidrogênios H-2', H-5' e H-6'; respectivamente (**Figura 38 A e B**) (**Tabela 5**). A comparação dos dados de RMN de  $^1\text{H}$  com o relatado na literatura (HUANG *et al.*, 2013) (**Tabela 6**), assim como os dados de CLAE-UV, possibilitaram propor a estrutura da quercetina para a amostra isolada **FD18** (**Figura 39**), a qual não foi posteriormente avaliada quanto à ação vasodilatadora em anéis de aorta de ratos *Wistar*, devido ao grande número de estudos científicos que já comprovaram sua ação vasodilatadora, conforme apresentado na sessão de discussão.

(A)



(B)

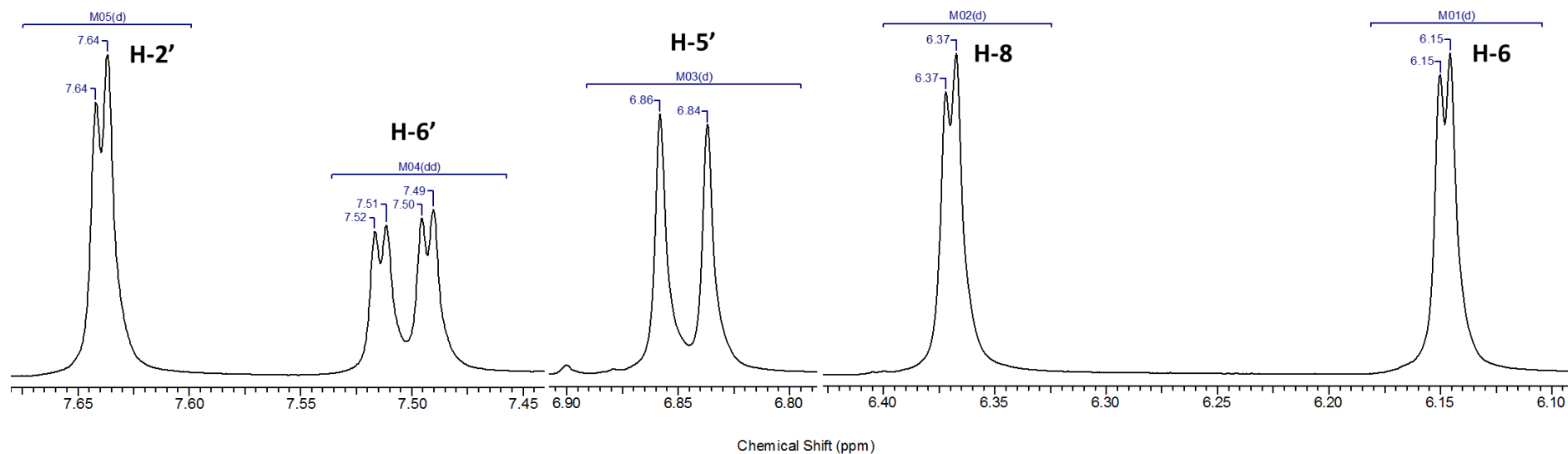


Figura 38: (A) Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ) da substância FD18 da classe dos flavonoides, particularmente um flavonol identificado como quercetina, isolada da fração diclorometano (FD) da *T. guianensis* e (B) seus sinais característicos ampliados do espectro.

Tabela 5: Deslocamentos químicos ( $\delta$ ) indicativos de um padrão 5,7-dihidroxilado para o anel A e um padrão 3',4'-dihidroxilado para o anel B da substância FD18, identificada como quercetina.

	$\delta_H$ ppm; (m J Hz) (DMSO- $d_6$ )
<b>Anel A</b>	
H-6	6,15 (d, $J= 1,96$ Hz)
H-8	6,37 (d, $J= 1,96$ Hz)
<b>Anel B</b>	
H-2'	7,64 (d, $J= 1,96$ Hz)
H-5'	6,85 (d, $J= 8,51$ Hz)
H-6'	7,50 (dd, $J= 8,51, 2,05$ Hz)
OH-5	12,46 (s)

Tabela 6: Comparação entre os sinais de RMN de  $^1H$  da substância FD18 identificada como quercetina e a literatura (HUANG *et al.*, 2013).

	$\delta_H$ ppm; (m J Hz) TDCM20 (DMSO- $d_6$ )	$\delta_H$ ppm; (m J Hz) HUANG <i>et al.</i> , 2013 (DMSO- $d_6$ )
<b>Anel A</b>		
H-6	6,15 (d, $J= 1,96$ Hz)	6,19 (d, $J= 2,0$ Hz)
H-8	6,37 (d, $J= 1,96$ Hz)	6,40 (d, $J= 2,0$ Hz)
<b>Anel B</b>		
H-2'	7,64 (d, $J= 1,96$ Hz)	7,68 (d, $J= 2,2$ Hz)
H-5'	6,85 (d, $J= 8,51$ Hz)	6,88 (d, $J= 8,4$ Hz)
H-6'	7,50 (dd, $J= 8,51, 2,05$ Hz)	7,54 (dd, $J= 8,4, 2,2$ Hz)
OH-5	12,46 (s)	12,50 (s)

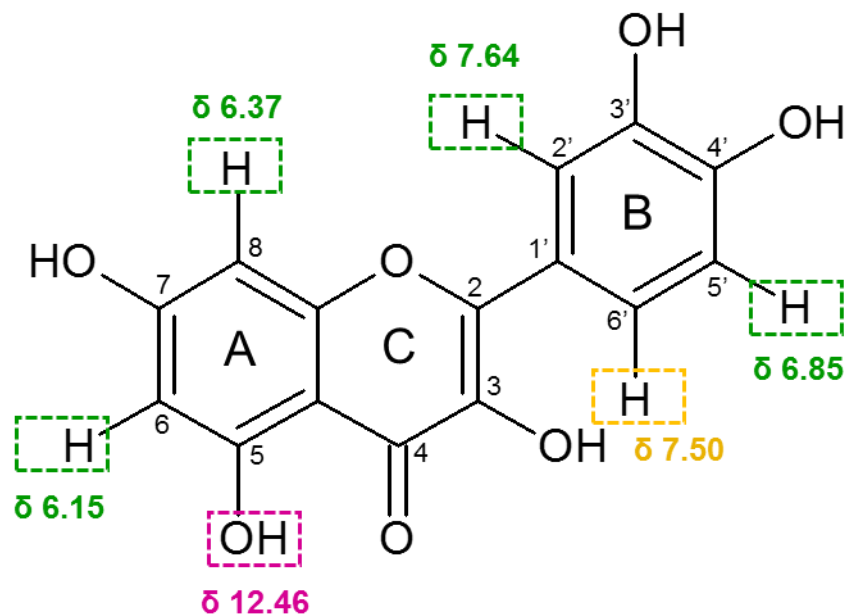
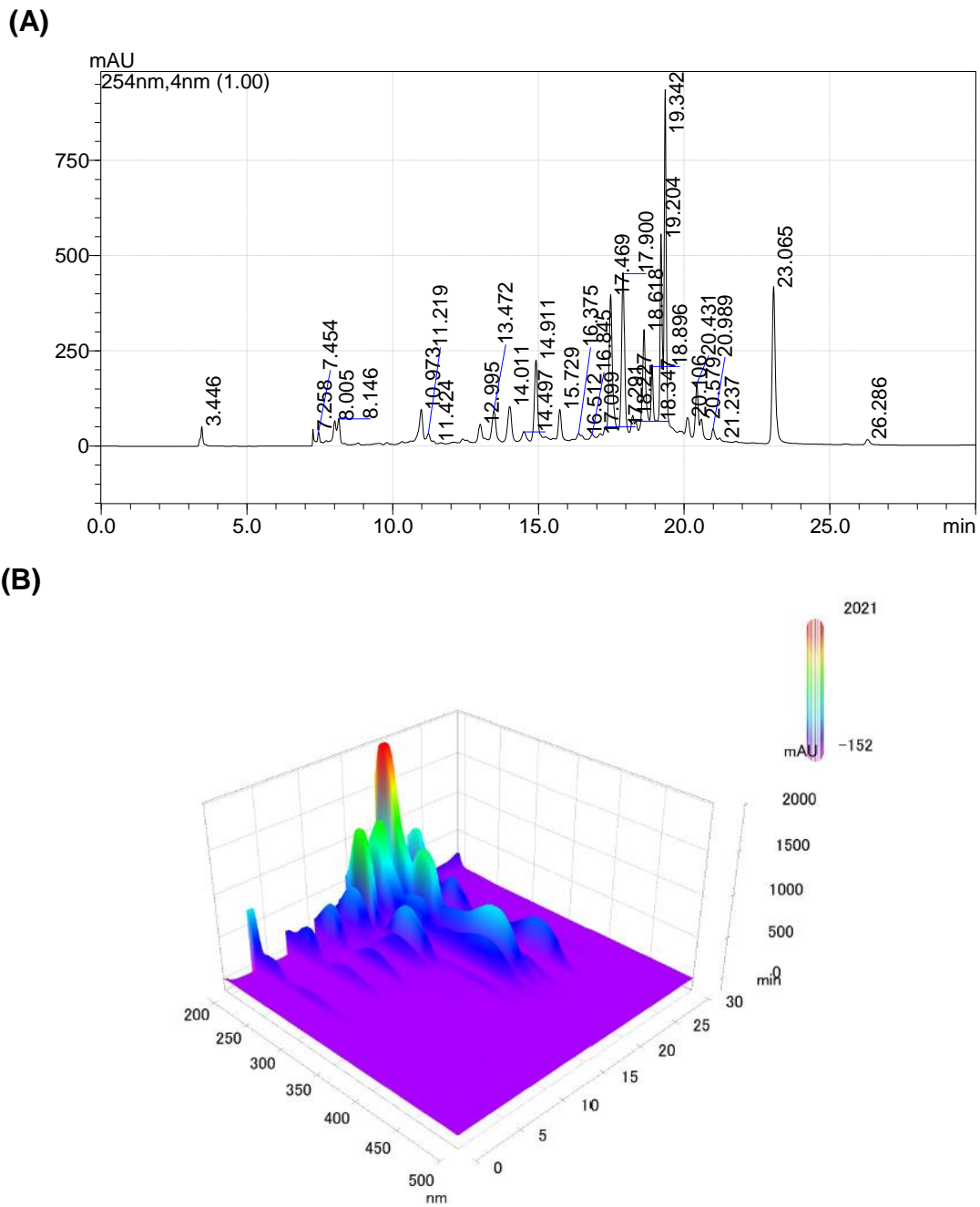


Figura 39: Estrutura química do flavonol quercetina (FD18) isolado da fração diclorometano (FD), com os respectivos deslocamentos químicos dos prótons identificados nos anéis aromáticos, após análise do RMN de<sup>1</sup>H.



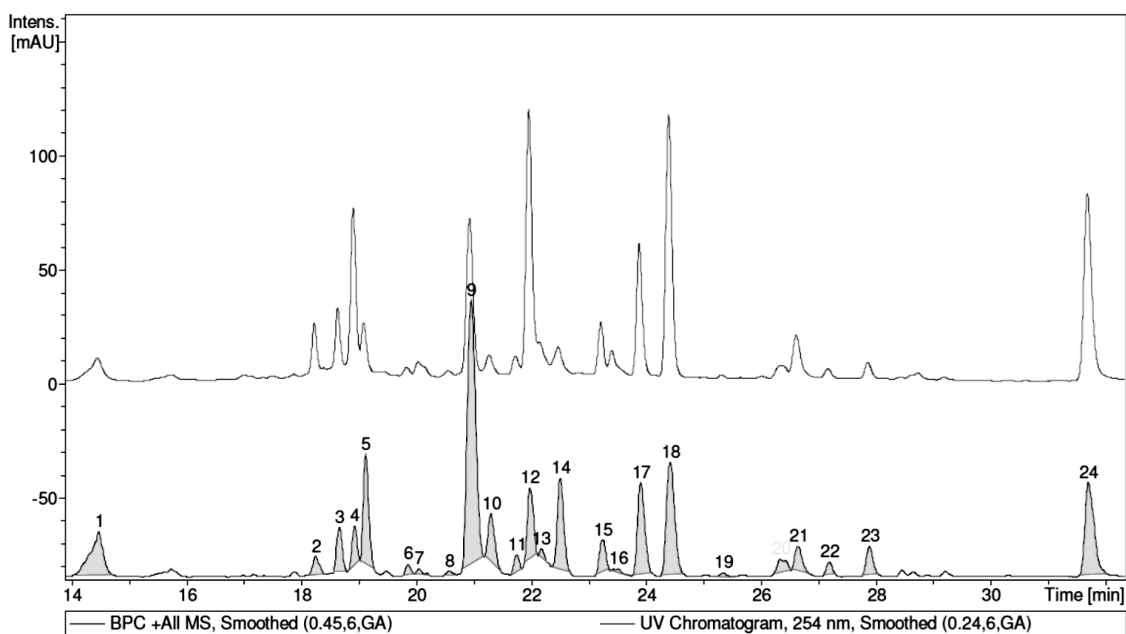
#### 4.4.2 Perfil químico da FA

As análises químicas da FA por CLAE-UV-DAD permitiram avaliar o seu perfil químico na concentração de 2 mg/mL com volume de injeção igual a 20  $\mu$ L. O cromatograma apresentou 34 picos em um intervalo de tempo de retenção entre 3,446 e 26,286 min, os quais tiveram seus respectivos dados espectroscópicos de UV analisados na faixa espectral de 190 a 400 nm. Além disso, obtiveram-se os dados da área e do % de área de cada pico. As análises dos espectros de UV nos  $\lambda$  de onda de 254 nm e 365 nm possibilitaram a avaliação analítica, propondo-se a presença majoritária de flavonoides (**Figura 40 A e B**).



**Figura 40: Análise do perfil químico por cromatografia líquida de alta eficiência da fração acetato de etila das folhas da *T. guianensis*. (A) Cromatograma obtido em 254 nm após corrida gradiente (ACN/H<sub>2</sub>O) por 45 min (representado até 30 min), com fluxo de corrida igual a 1 mL/min. (B) Gráfico 3D no qual podem ser observados os espectros de UV referentes a cada pico.**

A FA, sendo a mais ativa na ação vasodilatadora, foi analisada por CLAE-UV-EM e apresentou um perfil de SFs muito similar ao EMT. Os principais picos do cromatograma no UV observados são os 4, 9, 12, 17, 18 e 24, os quais apresentaram características majoritárias da presença de substâncias da classe dos flavonóis no espectro do UV, com  $\lambda_{\text{max}}$  de 250 – 280 nm e 350 – 380 nm (**Figura 41**), com exceção do pico 4. Este último apresentara UV característico para tanino hidrolisável. Os espectros de massa em modo negativo para cada pico principal possibilitaram a identificação de taninos hidrolisáveis e flavonóis, dentre estes especificamente glicosídeos de quercetina e miricetina, conforme **Tabela 7**.



**Figura 41:** Perfil químico por CLAE-UV-EM da fração acetato de etila (FA) das folhas da *T. guianensis*.

Tabela 7: Análise por CLAE-UV-EM da fração acetato de etila (FA) com ênfase nos picos majoritários (254 nm) e substâncias isoladas.

Picos principais	Identificação	Tempo de retenção ( $t_R$ , min)	Íon pseudomolecular (m/z)	Fragmentação m/z (Perda)
4	1,4,6-tri-O-galoil- $\beta$ -D-glicose <sup>a</sup>	18,9	654,17 [M+18] <sup>+</sup>	467,12 (170+18)
9	quercetina 3-O-(6''-O-galoil)- $\beta$ -D-galactopiranosídeo <sup>a</sup>	21,0	617,17 [M+H] <sup>+</sup>	-
12	miricetina desoxihexosídeo	22,0	465,13 [M+H] <sup>+</sup>	319,06 (146)
17	quercetina pentosídeo	23,9	435,12 [M+H] <sup>+</sup>	303,05 (132)
18	quercetina di-deoxihexosídeo	24,5	595,20 [M+H] <sup>+</sup>	449,13 (146) 303,06 (146)
24	quercetina <sup>a</sup>	31,7	303,05 [M+H] <sup>+</sup>	-

<sup>a</sup>Substância isolada

A cromatografia da FA possibilitou a obtenção de 19 sub-frações (**Tabela 8**), dentre elas as sub-frações **FA10**, **FA11**, **FA12**, **FA14** e **FA16**, com perfil fitoquímico promissor para ação cardiovascular após análise por CLAE. A fração pura **FA10** (m = 10,1 mg), eluída com H<sub>2</sub>O:metanol (80:20), foi identificada como um tanino hidrolisável, 1,4,6-tri-O-galoil- $\beta$ -D-glicose, após análises uni-dimensionais de RMN de <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C e bi-dimensionais COSY, HSQC e HMBC. Este tanino foi testado nos anéis de aortas dos ratos *Wistar*. A segunda fração pura **FA16** (m = 17,5 mg), eluída com H<sub>2</sub>O:metanol (60:40), foi identificada como quercetina, após análise uni-dimensionais de RMN de <sup>1</sup>H (**Figura 42**). As **FA11** e **FA14** foram testadas nos anéis de aortas dos ratos *Wistar*.

A cromatografia da sub-fração FA12 possibilitou a obtenção de 13 sub-frações (**Tabela 9**), dentre elas isolou um flavonoide, da classe os flavonóis, nomeado como **FA12.10** (m = 9,6 mg), eluído com H<sub>2</sub>O:metanol (60:40), identificado como quercetina 3-O-(6-O-galoil)- $\beta$ -D-glicopiranosídeo, após análises uni-dimensionais de RMN de <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C e bi-dimensionais COSY, HSQC e HMBC. Este flavonol foi testado nos anéis de aortas dos ratos *Wistar* (**Figura 42**).

**Tabela 8: Procedimento cromatográfico a partir de 2000 mg da fração acetato de etila (FA) das folhas da *T. guianensis*.**

<b>SUB-FRAÇÃO OBTIDA</b>	<b>SOLVENTE</b>	<b>MASSA (mg)</b>
<b>FA1</b>	Metanol	42,1
<b>FA2</b>	Metanol	283,9
<b>FA3</b>	H <sub>2</sub> O:Metanol (10:90)	26,7
<b>FA4</b>	H <sub>2</sub> O:Metanol (10:90)	9,0
<b>FA5</b>	H <sub>2</sub> O:Metanol (10:90)	140,3
<b>FA6</b>	H <sub>2</sub> O:Metanol (20:80)	139,1
<b>FA7</b>	H <sub>2</sub> O:Metanol (20:80)	45,0
<b>FA8</b>	H <sub>2</sub> O:Metanol (20:80)	2,3
<b>FA9</b>	H <sub>2</sub> O:Metanol (20:80)	102,8
<b>FA10</b>	H <sub>2</sub> O:Metanol (20:80)	10,1
<b>FA11</b>	H <sub>2</sub> O:Metanol (20:80)	236,5
<b>FA12</b>	H <sub>2</sub> O:Metanol (30:70)	100,7
<b>FA13</b>	H <sub>2</sub> O:Metanol (30:70)	178,8
<b>FA14</b>	H <sub>2</sub> O:Metanol (40:60)	267,5
<b>FA15</b>	H <sub>2</sub> O:Metanol (40:60)	29,5
<b>FA16</b>	H <sub>2</sub> O:Metanol (40:60)	17,5
<b>FA17</b>	H <sub>2</sub> O:Metanol (40:60)	8,6
<b>FA18</b>	H <sub>2</sub> O:Metanol (50:50)	36,7
<b>FA19</b>	H <sub>2</sub> O:Metanol (90:10)	30,6
<b>Total = 1.707,7 mg</b>		

**Tabela 9: Procedimento cromatográfico a partir de 100,7 mg da sub-fração FA12 obtida da fração acetato de etila (FA) das folhas da *T. guianensis*.**

<b>SUB-FRAÇÃO OBTIDA</b>	<b>SOLVENTE</b>	<b>MASSA (mg)</b>
FA12.1	H <sub>2</sub> O	2,6
FA12.2	H <sub>2</sub> O	0,5
FA12.3	H <sub>2</sub> O:MeOH (80:20)	0,7
FA12.4	H <sub>2</sub> O:MeOH (80:20)	2,0
FA12.5	H <sub>2</sub> O:MeOH (80:20)	7,4
FA12.6	H <sub>2</sub> O:MeOH (60:40)	17,3
FA12.7	H <sub>2</sub> O:MeOH (60:40)	5,2
FA12.8	H <sub>2</sub> O:MeOH (60:40)	15,0
FA12.9	H <sub>2</sub> O:MeOH (60:40)	11,3
FA12.10	H <sub>2</sub> O:MeOH (60:40)	9,6
FA12.11	H <sub>2</sub> O:MeOH (60:40)	8,8
FA12.12	H <sub>2</sub> O:MeOH (60:40)	2,5
FA12.13	MeOH	2,1
<b>Massa total = 85 mg</b>		

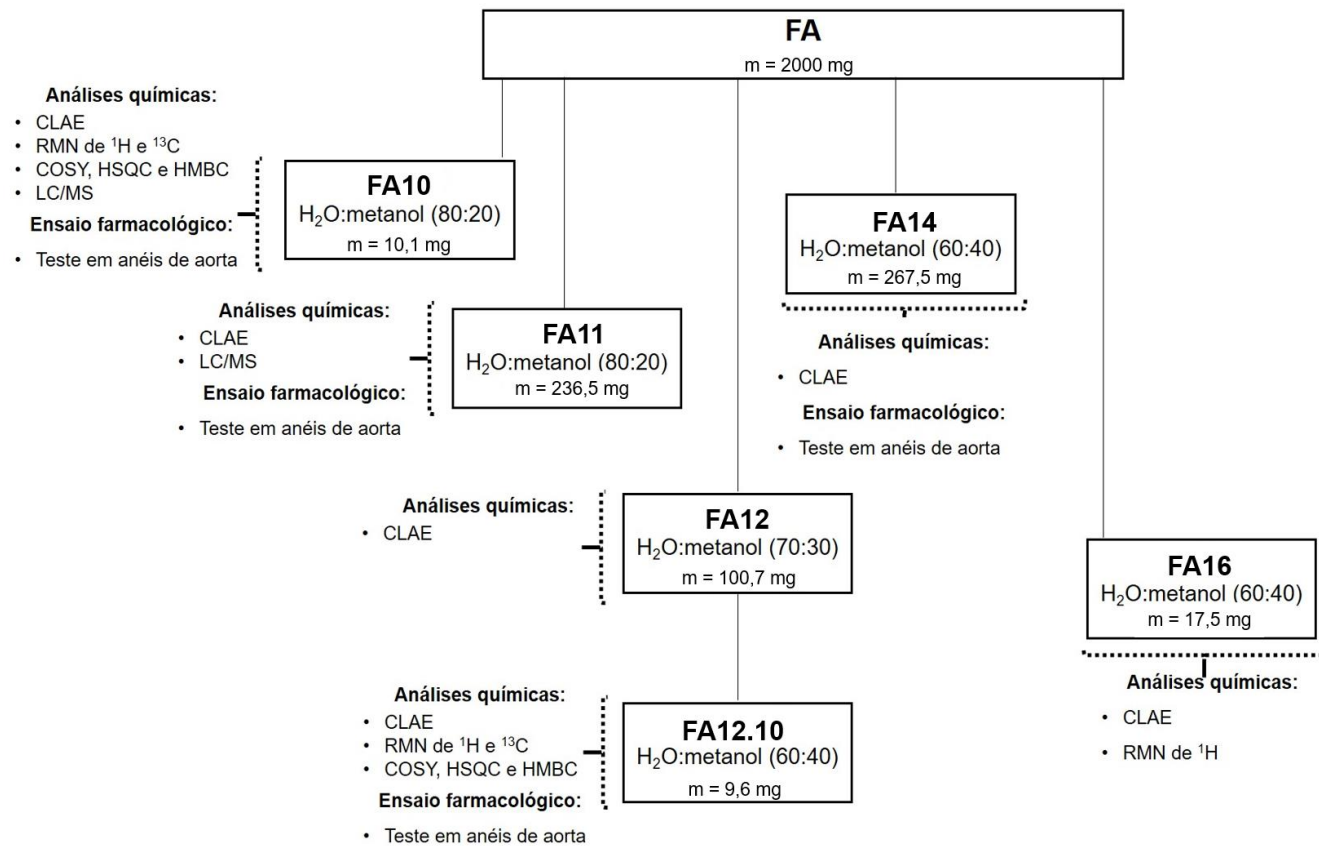


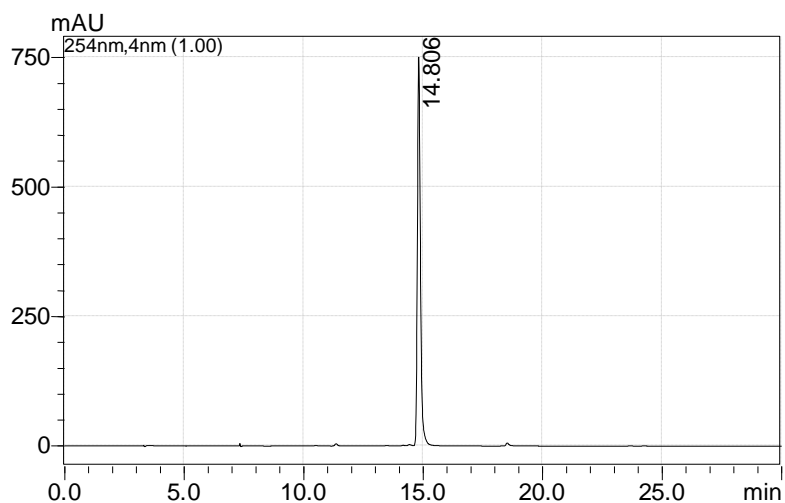
Figura 42: Fluxograma de separação e isolamento de sub-frações e substâncias isoladas a partir da fração acetato de etila (FA) das folhas da *T. guianensis*.

#### 4.4.2.1 1,4,6-tri-O-galoil- $\beta$ -D-glicose (FA10) isolada da FA

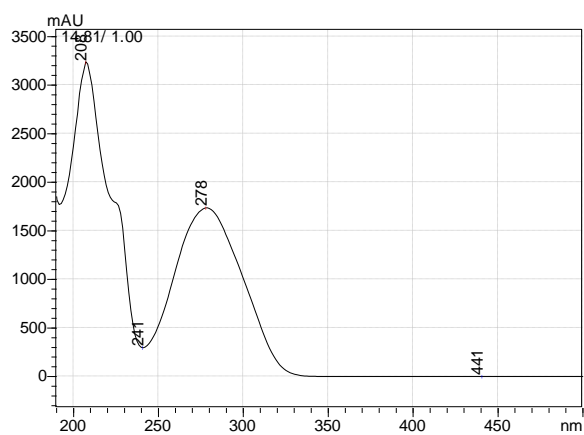
O método cromatográfico em coluna aberta com sílica de fase inversa C<sub>18</sub> possibilitou a obtenção de uma substância isolada nomeada como **FA10**, sendo um pó branco que precipita entre 2 e 8 °C e solúvel em MeOH. Apresentou  $t_R$  de 14,806 min com  $\lambda_{\text{máx}}$  de 202 e 278 nm (**Figura 43 A e B**).



(A)



(B)



**Figura 43: Análise do perfil químico por cromatografia líquida de alta eficiência do composto FA10 da fração acetato de etila das folhas da *T. guianensis*. (A) Cromatograma obtido em 254 nm após corrida gradiente (ACN/H<sub>2</sub>O) por 45 min, com fluxo de corrida igual a 1mL/min. (B) Espectro da substância fenólica com seus respectivos tempos de retenção, observados no cromatograma.**

As análises dos espectros do RMN de  $^1\text{H}$  em 400 MHz e APT sugeriram que a substância pertence à classe dos taninos hidrolisáveis, também chamados de galotaninos ou taninos gálicos.

O espectro do RMN de  $^1\text{H}$  evidenciou sinais que posteriormente foram divididos em dois grupos, propondo a caracterização de sinais presentes em hidrogênios referentes à unidade de carboidrato e três hidrogênios aromáticos, singletos, os quais foram correlacionados com o APT, sendo referentes às três unidades de ácido gálico, devido integração dos átomos de hidrogênio (**Figura 44 A e B**) (**Figura 45**).

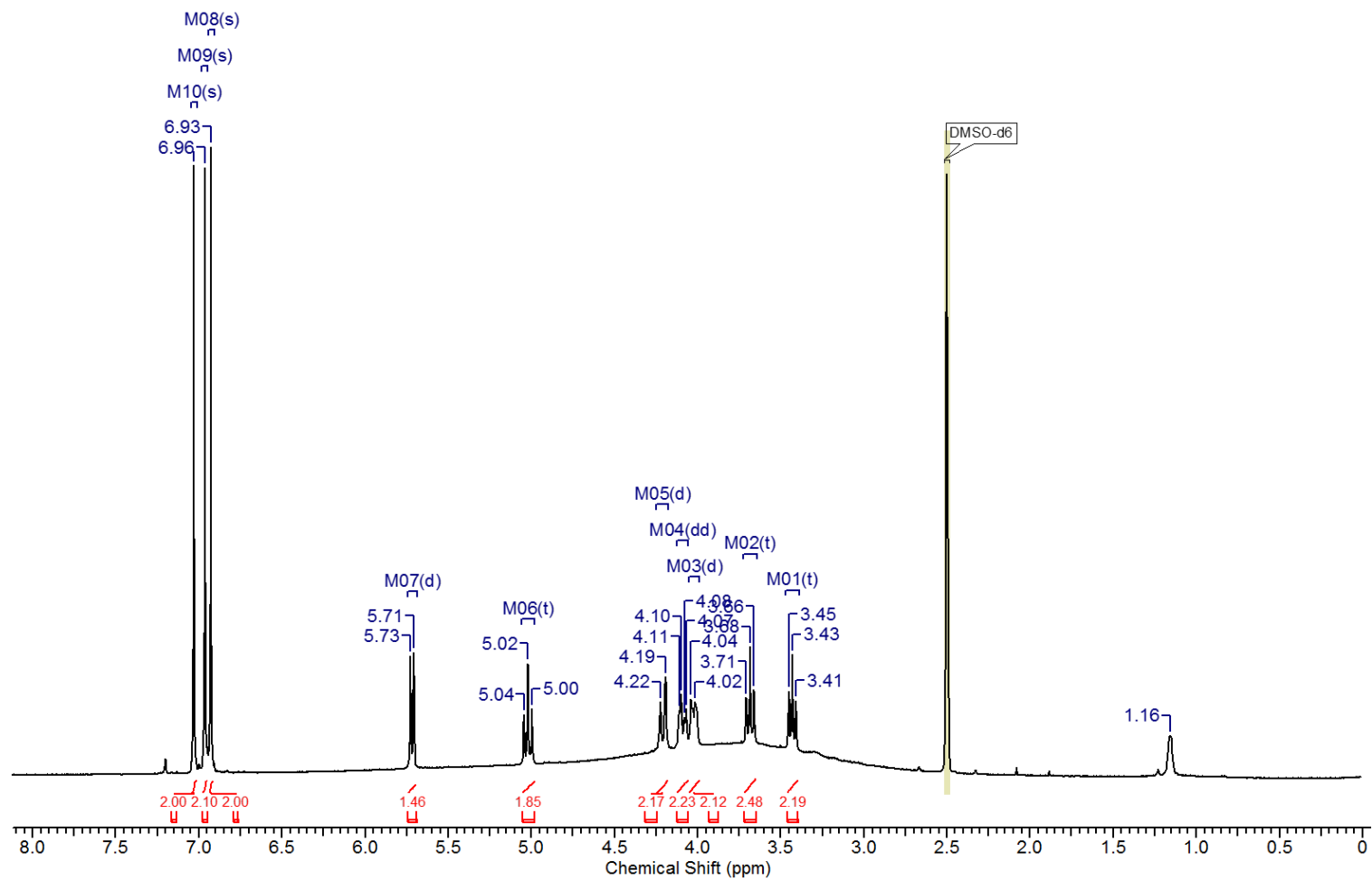
Primeiramente, o espectro de APT apresentou seis sinais com  $\delta_c$  entre 94,2 – 62,1 ppm, também característicos de carbonos de carboidratos, possibilitando a proposição de uma hexose (**Figura 45**). Adicionalmente, o sinal do RMN de APT em  $\delta_c$  94,2 ppm, analisado juntamente com o sinal do RMN de  $^1\text{H}$  em  $\delta_H$  5,72 ppm, com constante de acoplamento de  $J = 8,39$  Hz, foi atribuído ao hidrogênio anomérico (**Figura 44 A e B**) (**Tabela 10**). O valor da constante de acoplamento entre H-1 e H-2 ( $J_{1,2} = 8,39$  Hz) permitiu a conclusão da presença da  $\beta$ -glicose, tendo em vista que a constante de acoplamento de prótons  $\alpha$ -anoméricos ocorre na faixa de 1 – 4 Hz (AGRAWAL *et al.*, 1992). Estes dados comparados a valores descritos na literatura (NAWWAR *et al.*, 1994) permitiram a confirmação da presença de uma unidade de  $\beta$ -D-glicopiranosose.

Através da análise bidimensional por COSY e HSQC foi possível atribuir os hidrogênios acoplados por  $J_{H,H}$ , assim como a atribuição dos sinais de carbono e hidrogênio diretamente ligados ( $J_{C,H}$ ) da  $\beta$ -glicose, respectivamente (**Figura 46 e 47**).

O espectro de RMN APT ainda apresentou sinais com deslocamentos químicos característicos de átomo de carbono aromático e carbonila, os quais apareceram com um padrão de três em três sinais de intensidade ao longo faixa de  $\delta_c$  entre 165 – 108 ppm. Os sinais relativos aos carbonos entre  $\delta_c$  164,9, 165,5 e 164,5, analisados pelas intensas correlações observadas no mapa de contornos HMBC (**Figura 48**), em conjunto com o mapa de contorno COSY para os hidrogênios H-1, H-4 e H-6, ajudaram a proposição de três carbonos carbonila relativos a três grupos galoila, formando ligações ésteres com as hidroxilas dos respectivos carbonos C-1, C-4 e C-6 da  $\beta$ -glicose.

Desta forma, a comparação dos dados de RMN de  $^1\text{H}$  e APT com os relatados na literatura (NAWWAR *et al.*, 1994), e as correlações observadas nas experiências bidimensionais, (**Tabela 11 e 12**) possibilitaram propor um padrão de poliol central com três hidroxilas esterificadas com ácido gálico, sendo a substância **FA10** identificada como 1,4,6-tri-O-galoil- $\beta$ -D-glicopiranoose (**Figura 49**), a qual foi posteriormente avaliada quanto à sua ação vasodilatadora em anéis de aorta de ratos *Wistar*.

(A)



(B)

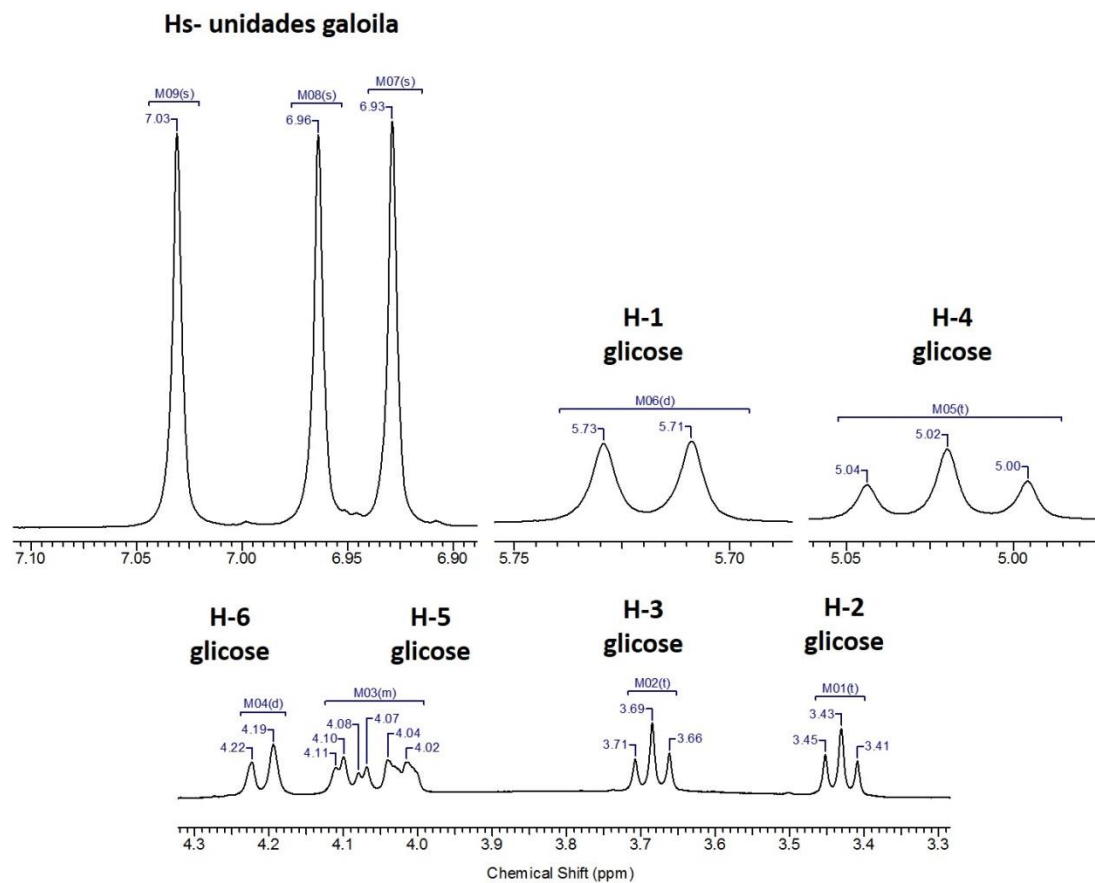


Figura 44: (A) Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ) da substância FA10 da classe dos taninos hidrolisáveis, particularmente os galotaninos, identificada como 1,4,6-tri-*O*-galoil- $\beta$ -D-glicopiranoose, isolada da fração acetato de etila (FA) da *T. guianensis* e (B) seus sinais característicos ampliados do espectro.

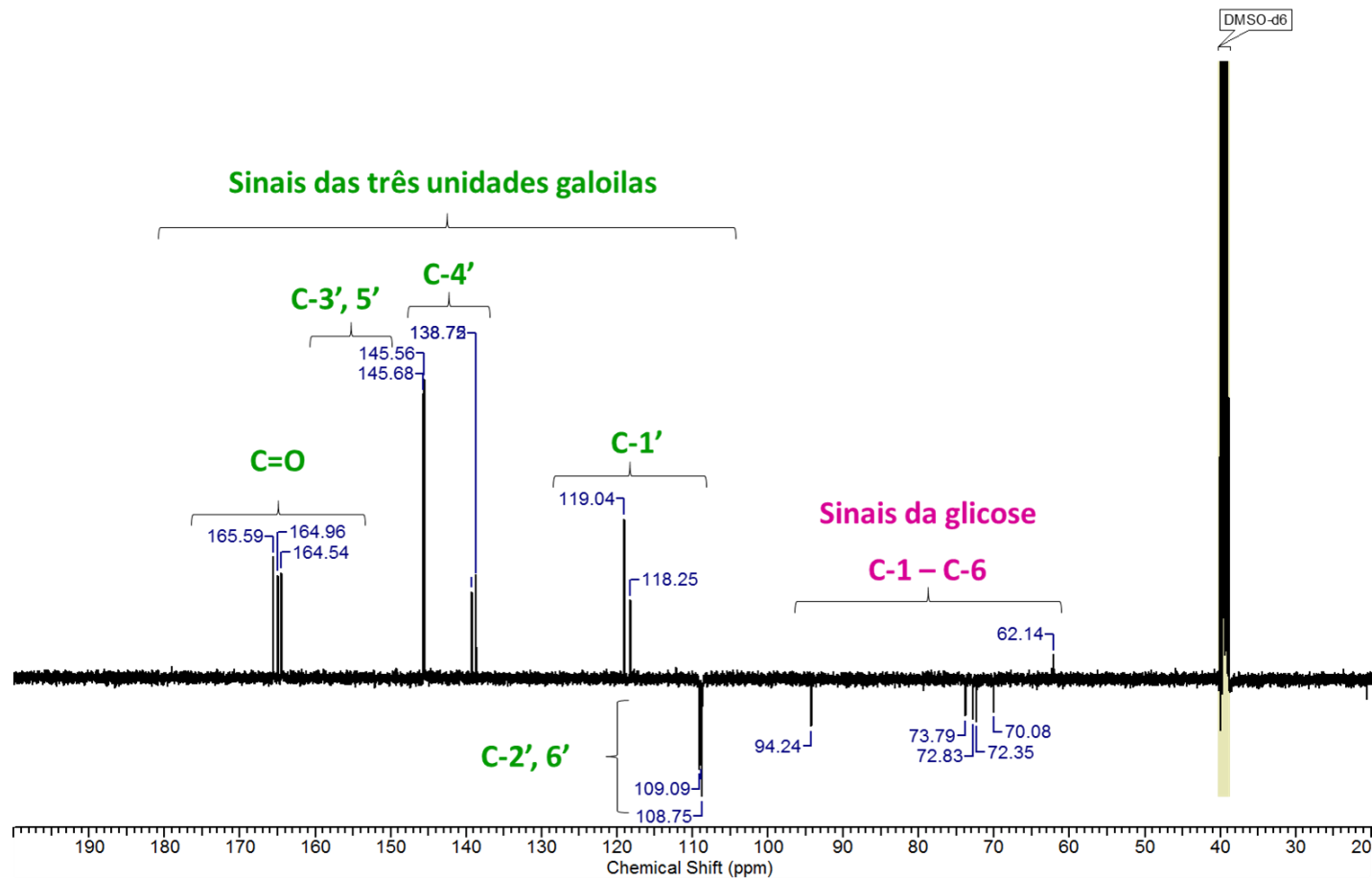


Figura 45: (A) Espectro de RMN APT (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) da substância FA10 da classe dos taninos hidrolisáveis, particularmente os galotaninos, identificada como 1,4,6-tri-*O*-galoil-β-D-glicopiranoose, isolada da fração acetato de etila (FA) da *T. guianensis* e (B) seus sinais característicos ampliados do espectro.

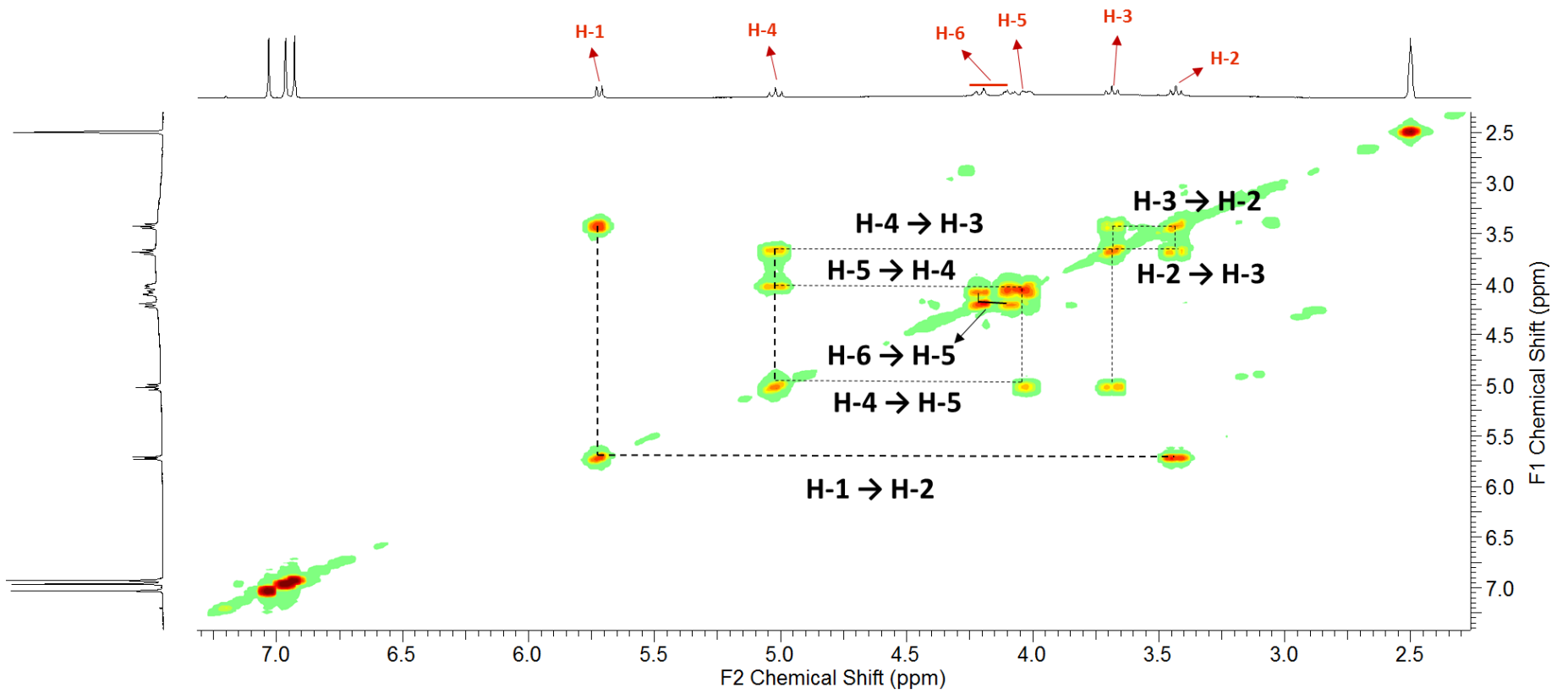


Figura 46: Espectro de RMN 2D – COSY da substância FA10 da classe dos taninos hidrolisáveis, particularmente os galotaninos, identificada como 1,4,6-tri-*O*-galoil- $\beta$ -D-glicopiranoose, isolada da fração acetato de etila (FA) da *T. guianensis*.

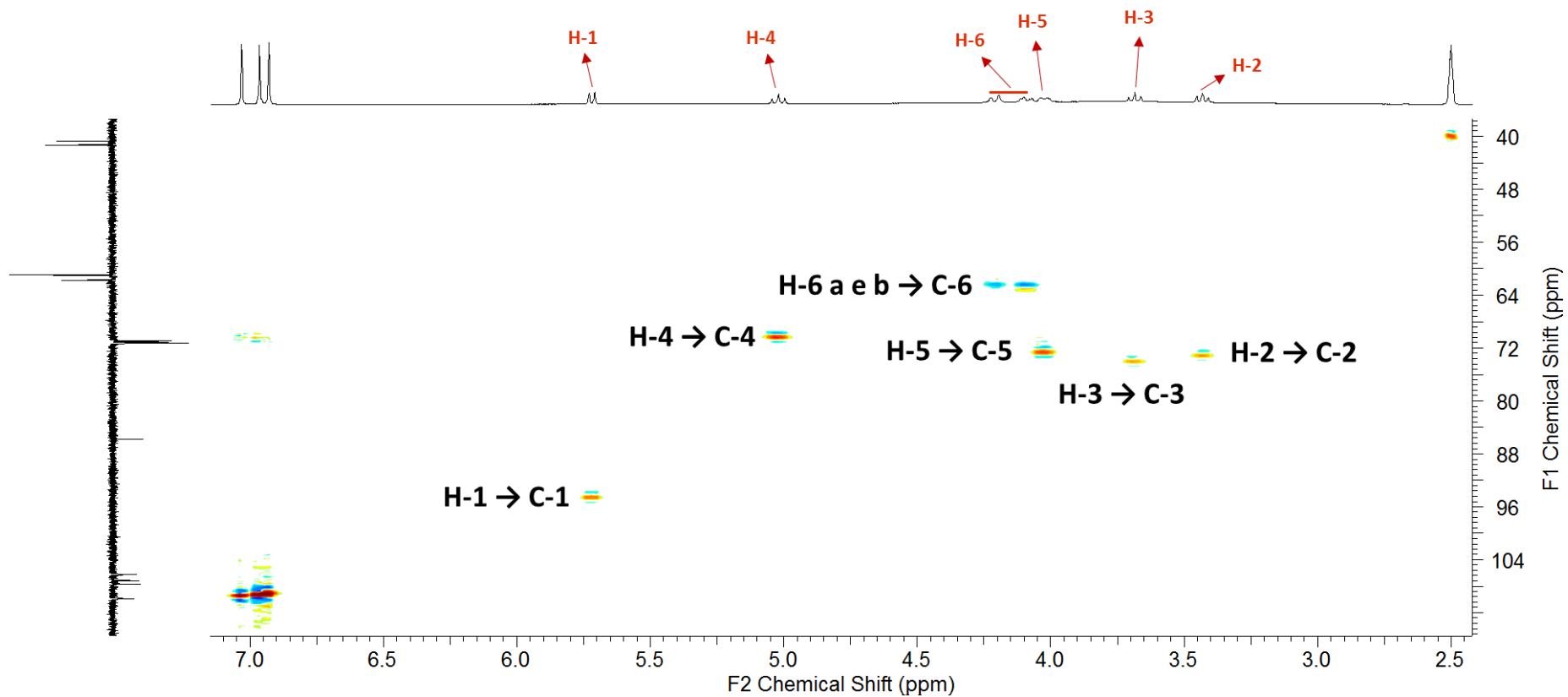


Figura 47: Espectro de RMN 2D – HSQC da substância FAc10 da classe dos taninos hidrolisáveis, particularmente os galotaninos, identificada como 1,4,6-tri-*O*-galloil-β-D-glicopiranoose, isolada da fração acetato de etila (FA) da *T. guianensis*.



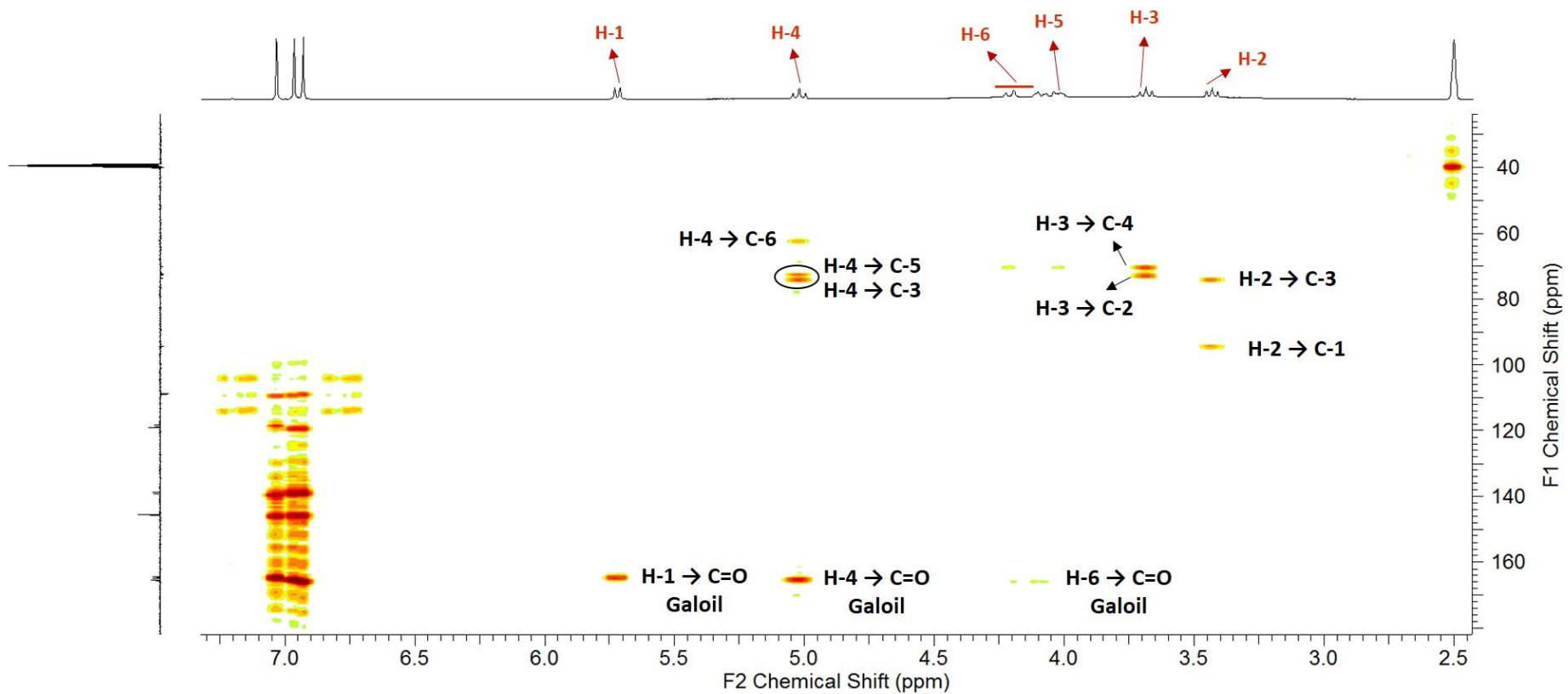


Figura 48: Espectro de RMN 2D – HMBC da substância FA10 da classe dos taninos hidrolisáveis, particularmente os galotaninos, identificada como 1,4,6-tri-O-galoil-β-D-glicopirranose, isolada da fração acetato de etila (FA) da *T. guianensis*.

Tabela 10: Deslocamentos químicos ( $\delta$ ) indicativos de um padrão de poliol central tri esterificado com ácido gálico, da substância FA10, identificada como 1,4,6-tri-galoil- $\beta$ -D-glicopirranose.

	$\delta_H$ ppm; (m J Hz) (DMSO- $d_6$ )	$\delta_C$ (ppm) (DMSO- $d_6$ )
<b>D-glicose</b>		
1	5,72 (d, $J= 8,39$ Hz)	94,5
2	3,43 (t, $J= 8,39$ Hz)	73,1
3	3,69 (t, $J= 8,39$ Hz)	74,1
4	5,02 (t, $J= 8,39$ Hz)	72,5
5	4,03 (d, $J= 8,39$ Hz)	70,4
6 a e b	4,21 (d, $J= 12,28$ Hz) 4,09 (dd, $J= 12,28; 4,38$ Hz)	62,4
<b>Unidades galoil</b>		
<b>galoil A</b>		
1'		119,4
2', 6'	6,96 (s)	109,3
3', 5'		145,8
4'		139,0
C=O		165,3
<b>galoil B</b>		
1'		119,4
2', 6'	6,93 (s)	109,1
3', 5'		145,9
4'		139,1
C=O		165,9
<b>galoil C</b>		
1'		118,6
2', 6'	7,03 (s)	109,4
3', 5'		146,0
4'		139,6
C=O		164,9

Tabela 11: Comparação entre os sinais de RMN de  $^1\text{H}$  da substância FA10 identificada como 1,4,6-tri-galoil- $\beta$ -D-glicopirranose e a literatura (NAWWAR *et al.*, 1994).

	$\delta_{\text{H}}$ ppm; (m J Hz) FA11.1 (DMSO- $d_6$ )	$\delta_{\text{H}}$ ppm; (m J Hz) NAWWAR <i>et al.</i> , 1994 (DMSO- $d_6$ )
<b>D-glicose</b>		
1	5,72 (d, $J= 8,39$ Hz)	5,72 (d, $J= 8,50$ Hz)
2	3,43 (t, $J= 8,39$ Hz)	3,50 (t, $J= 8,50$ Hz)
3	3,69 (t, $J= 8,39$ Hz)	3,88 (t, $J= 8,5$ Hz)
4	5,02 (t, $J= 8,39$ Hz)	5,02 (t, $J= 8,5$ Hz)
5	4,03 (d, $J= 8,39$ Hz)	4,05 (m)
6 a e b	4,21 (d, $J= 12,28$ Hz)	4,20 (d, $J= 13,00$ Hz)
	4,09 (dd, $J= 12,28; 4,38$ Hz)	4,08 (dd, $J= 13,00; 5,00$ Hz)
<b>Unidades galoil</b>		
<b>galoil A</b>		
1'		
2', 6'	6,96 (s)	6,95 (s)
3', 5'		
4'		
C=O		
<b>galoil B</b>		
1'		
2', 6'	6,93 (s)	6,92 (s)
3', 5'		
4'		
C=O		
<b>galoil C</b>		
1'		
2', 6'	7,03 (s)	7,02 (s)
3', 5'		
4'		
C=O		

Tabela 12: Comparação entre os sinais de RMN de  $^{13}\text{C}$  da substância FA10 identificada como 1,4,6-tri-galoil- $\beta$ -D-glicopirranose e a literatura (NAWWAR *et al.*, 1994).

	$\delta_c$ FA11.1 (DMSO- $d_6$ )	$\delta_c$ NAWWAR <i>et al.</i> , 1994 (DMSO- $d_6$ )
<b>D-glicose</b>		
1	94,5	94,7
2	73,1	72,9
3	74,1	73,8
4	72,5	72,5
5	70,4	70,2
6 a e b	62,4	62,3
<b>Unidades galoil</b>		
<b>galoil</b>		
1'	119,4	118,0
	119,4	118,9
	118,6	119,9
2', 6'	109,3	108,7
	109,1	108,9
	109,4	109,0
3', 5'	145,8	145,4
	145,9	145,5
	146,0	145,6
4'	139,0	138,6
	139,1	138,6
	139,6	
C=O	165,3	164,5
	165,9	165,0
	164,0	165,8

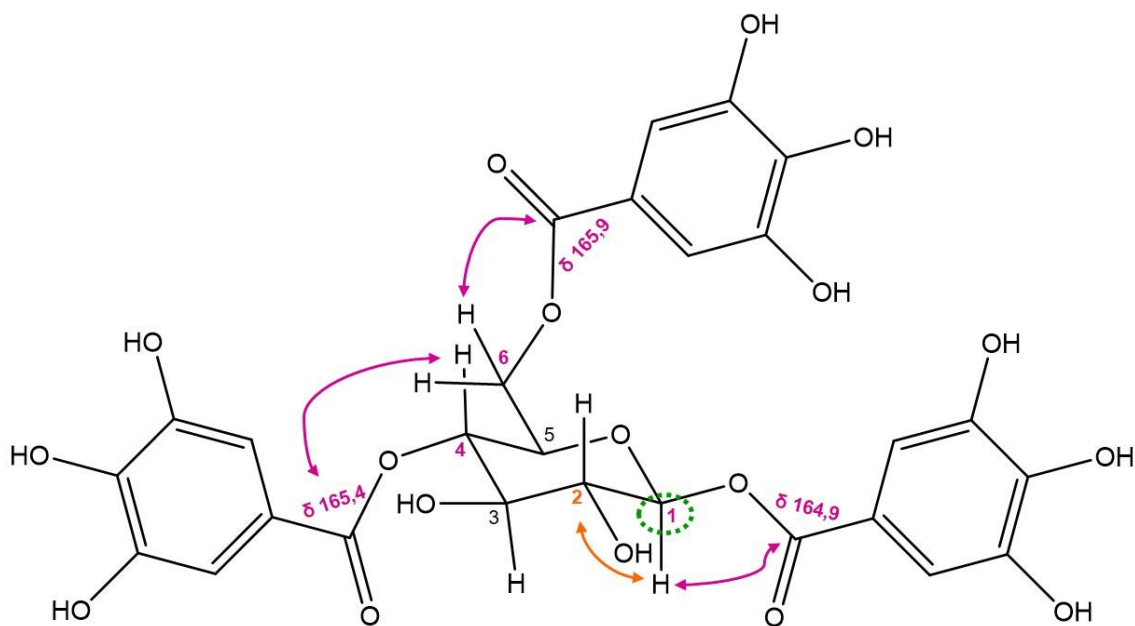
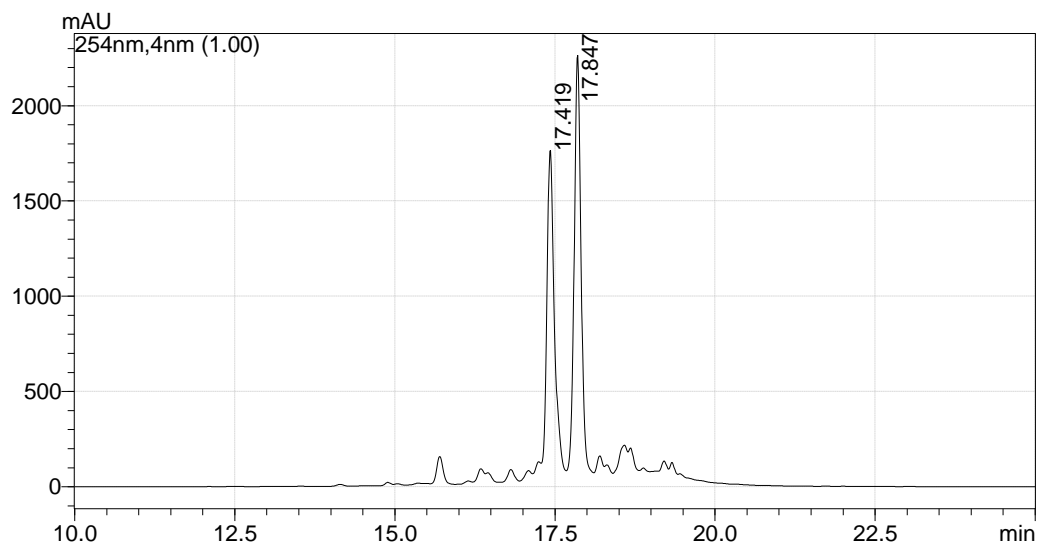


Figura 49: Estrutura química do galotanino 1,4,6-tri-galoil- $\beta$ -D-glicose (FA10), isolado da fração acetato de etila (FA), com as principais correlações observadas.  $\leftrightarrow$  COSY:  $J_{1,2} = 8,39$  Hz, presença de  $\beta$ -glicose,  $\leftrightarrow$  HMBC: correlações a longa distância, ..... HSQC: correlação de curta distância no carbono C-1 anomérico da  $\beta$ -glicose.

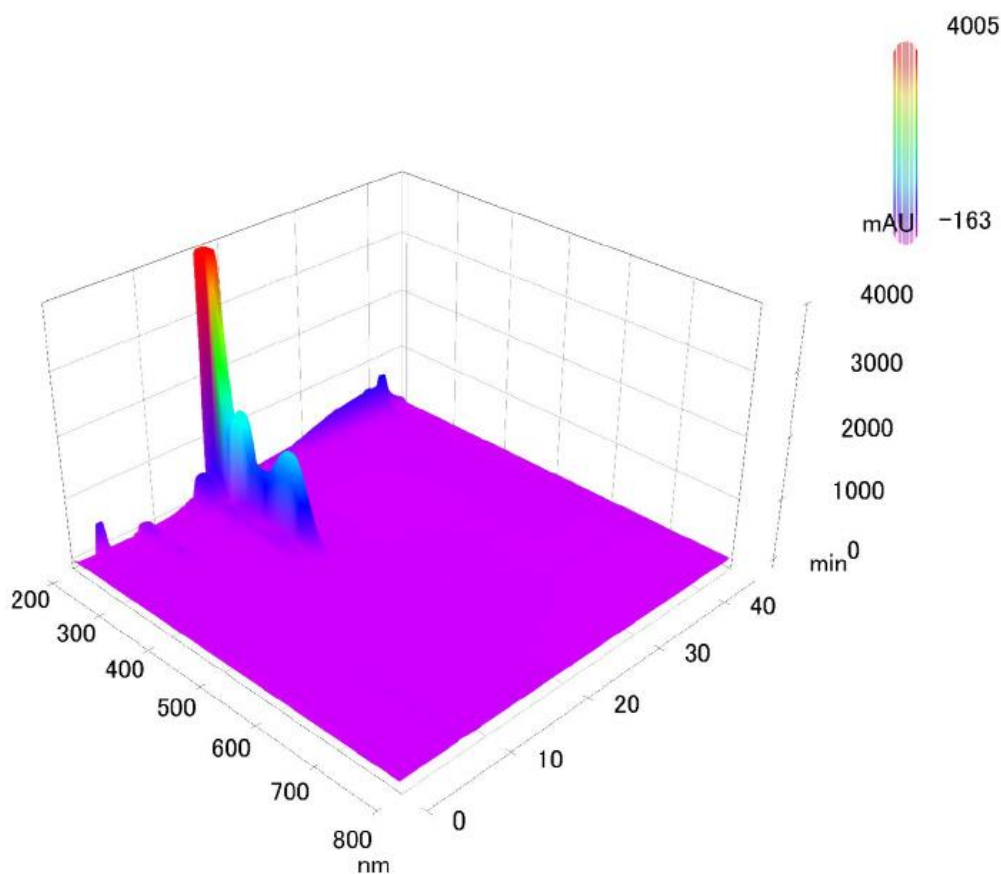
#### 4.4.2.2 *Quercetina 3-O-(6''-O-galoil)-β-D-galactopiranosídeo (FA12.10) isolada a partir da sub-fração FA12*

O método cromatográfico em coluna aberta com sílica de fase inversa C<sub>18</sub> possibilitou a obtenção da FA12, com massa igual 100,7 mg correspondendo a 5,04% da FA, a qual apresentou dois picos majoritários nos *t<sub>R</sub>* de 17,419 e 17,847 min, ambos espectros característicos de flavonoides. Obteve-se um índice de pureza para ambas as amostras de 0,987124 e 0,78559, respectivamente (**Figuras 50 A e B**).

(A)



(B)

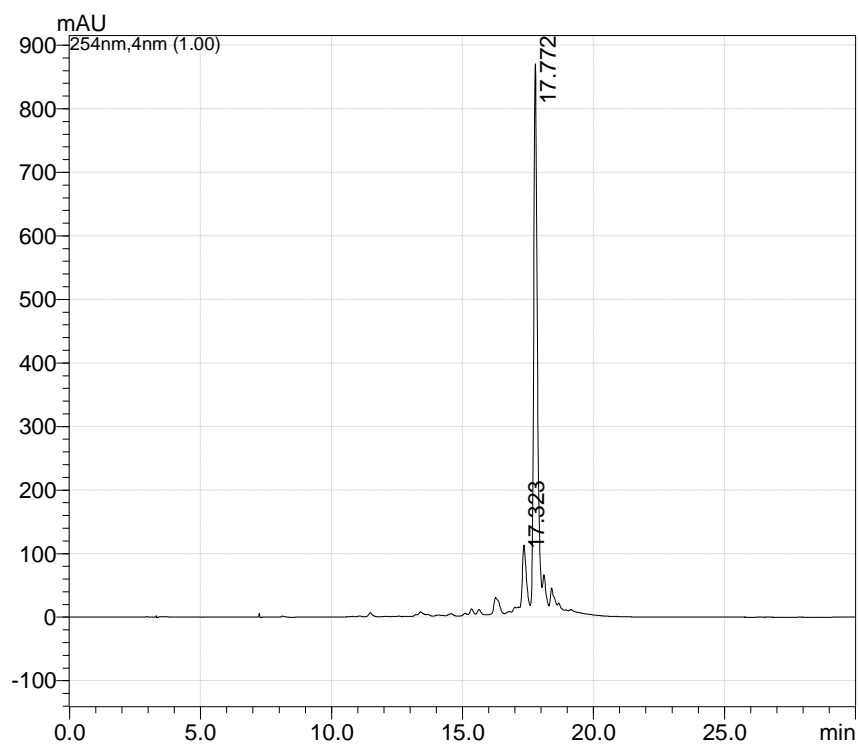


**Figura 50: Análise do perfil químico por cromatografia líquida de alta eficiência da FA12, obtida a partir da fração acetato de etila (FA) das folhas da *T. guianensis*. (A) Cromatograma obtido em 254 nm após corrida gradiente (ACN/H<sub>2</sub>O) por 45 min (representado até 40 min), com fluxo de corrida igual a 1mL/min, no qual observam-se picos majoritários em 17,419 e 17,847 min. (B) Gráfico 3D no qual podem ser observados os espectros de UV referentes a cada pico.**

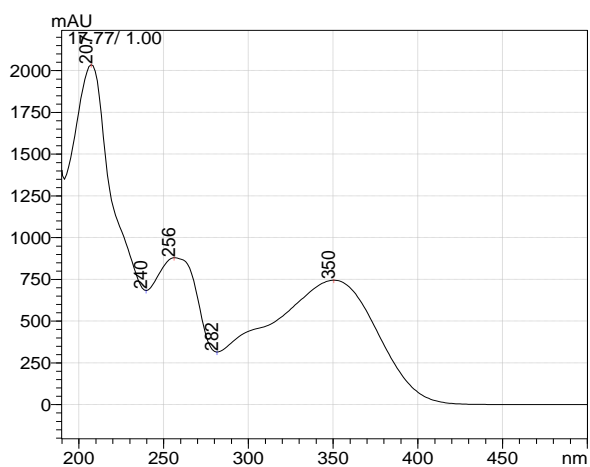
O método cromatográfico possibilitou a separação da substância nomeada como **FA12.10**, que após a análise por CLAE-UV-DAD, apresentou um pico majoritário no TR de 17,772 min, com massa igual a 9,6 mg correspondendo a 1,88% da sub-fração 17, com  $\lambda_{\text{máx}}$  de 254 e 352 nm, característico de um flavonol (**Figura 51 A e B**). A **FA12.10** foi posteriormente avaliada quanto à sua ação vasodilatadora em anéis de aorta de ratos *Wistar*.



(A)



(B)



**Figura 51: Análise do perfil químico por cromatografia líquida de alta eficiência do flavonoide FA12.10 isolado da sub-fração FA12 a partir da fração acetato de etila das folhas da *T. guianensis*. (A) Cromatograma obtido em 254 nm após corrida gradiente (ACN/H<sub>2</sub>O) por 45 min, com fluxo de corrida igual a 1mL/min, no qual observa-se um pico majoritário em 17,77 min. (B) Espectro característico de substância flavonóidica.**

As análises dos espectros do RMN de  $^1\text{H}$  em 500 MHz e  $^{13}\text{C}$  sugeriram que a substância pertence à classe dos flavonoides, sendo um derivado da quercetina galoil glicosídeo.

O espectro do RMN de  $^1\text{H}$  evidenciou sinais que posteriormente puderam ser caracterizados como sinais pertencentes à classe dos flavonoides (**Figura 52 A e B**), sinais propondo a presença de carboidrato e um sinal de hidrogênios aromáticos evidenciado por um singlete, os quais foram analisados em conjunto com o RMN de  $^{13}\text{C}$  (**Figura 53**).

Primeiramente, o espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  apresentou seis sinais com  $\delta_c$  entre 102,0 – 62,1 ppm, também característicos de carbonos de carboidratos, possibilitando a proposição de uma hexose. Adicionalmente, a partir do sinal do RMN de  $^{13}\text{C}$  em  $\delta_c$  102,0 ppm, analisado com o sinal do RMN de  $^1\text{H}$  em  $\delta_H$  5,35 ppm, o qual sendo um duplete com constante de acoplamento de  $J = 7,70$  Hz, foi possível corroborar a existência de um hidrogênio anomérico (**Figura 52 e 53**) (**Tabela 13**). O valor da constante de acoplamento entre H-1 e H-2 ( $J_{1,2} = 7,70$  Hz) permitiu a conclusão da presença de uma  $\beta$ -hexose, tendo em vista que a constante de acoplamento de prótons  $\alpha$ -anoméricos ocorre na faixa de 1 – 4 Hz (AGRAWAL *et al.*, 1992).

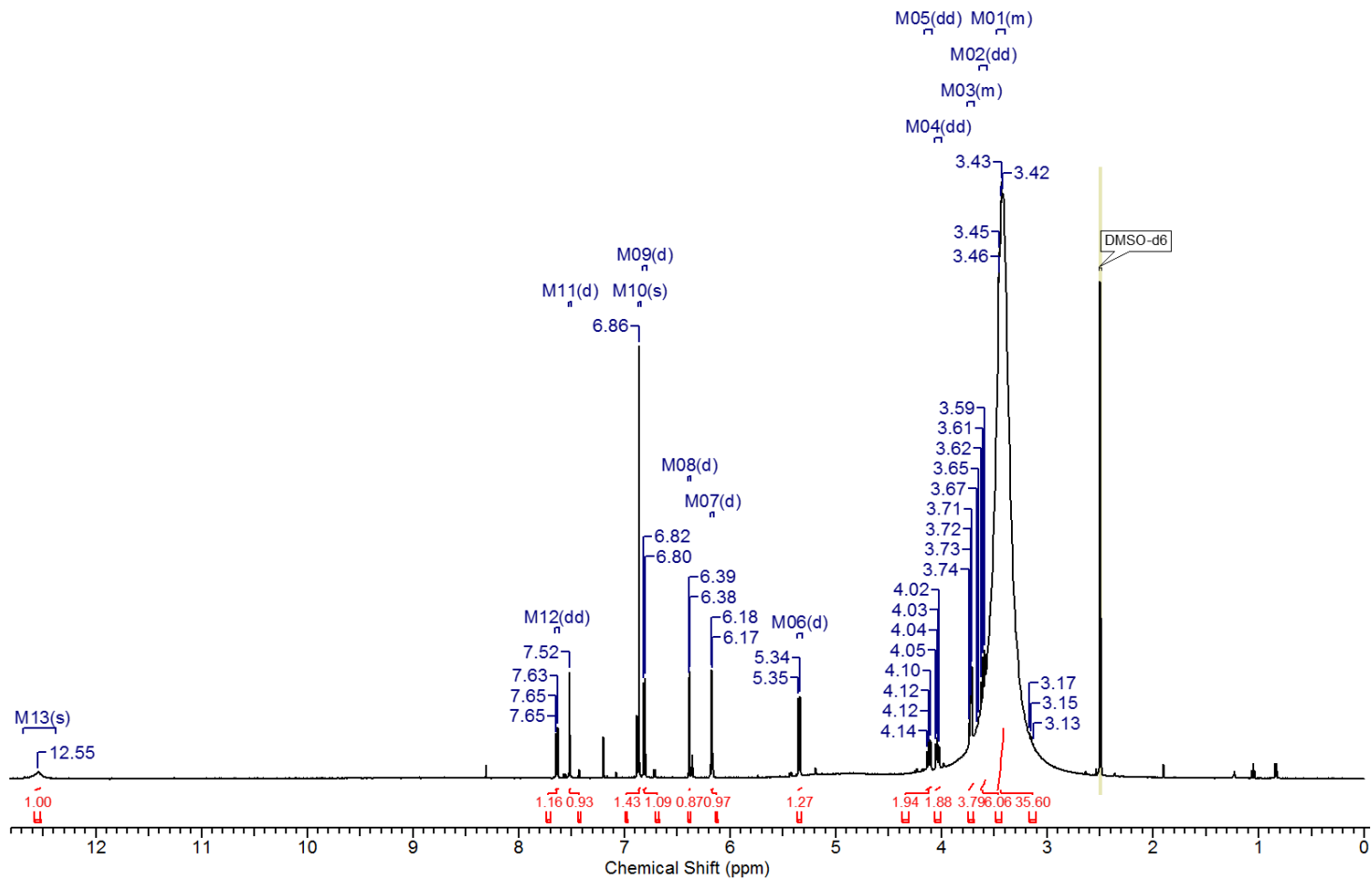
Os sinais de  $^1\text{H}$  na região de 4 ppm e os sinais de  $^{13}\text{C}$  são compatíveis com a galactose. Analisando a multiplicidade do H-3'' foi verificado que ele acopla com o H-2'' com  $J_{axial-axial}$  de 9,5 Hz e com o H-4'' com  $J_{axial-equatorial}$  de 3,20 Hz. Os sinais dos hidrogênios H-4'' e H-5'' encontram-se sobrepostos em um multiplete na região de 3,7 ppm. Porém, a multiplicidade observada para o H-3'' confirma a identidade do açúcar como uma unidade de galactose. A única diferença entre a galactose e a glicose é a posição relativa do H-4'' que na glicose é axial e na galactose, equatorial. Estes dados comparados a valores descritos na literatura (AGRAWAL *et al.*, 1992) permitiram confirmar a presença de uma unidade de  $\beta$ -galactose.

Através da análise bidimensional por mapas de contornos do COSY e HSQC, foi possível atribuir os hidrogênios acoplados por  $J_{H,H}$ , assim como a atribuição dos sinais de carbono e hidrogênio diretamente ligados ( $J_{C,H}$ ) da  $\beta$ -galactose, respectivamente (**Figura 54 e 55**).

Os sinais analisados no mapa de contornos HMBC possibilitaram a interpretação da correlação entre o sinal em 4,06 ppm e a carbonila da unidade

de ácido gálico em 165,9 ppm (**Figura 56**). Desta forma, a comparação dos dados de RMN do  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  com os relatados na literatura (BRACA *et al.*, 2003) (**Tabela 14**) possibilitou propor um padrão 5,7-dihidroxiado para o anel A e um padrão 3',4'-dihidroxiado para o anel B, com uma  $\beta$ -glicosilação, seguida por uma unidade galoila, sendo a substância **FA12.10** identificada como a quercetina 3-O-(6''-O-galoil)- $\beta$ -D-galactopiranosídeo (**Figura 57**), a qual foi posteriormente avaliada quanto à ação vasodilatadora em anéis de aorta de ratos *Wistar*.

(A)



(B)

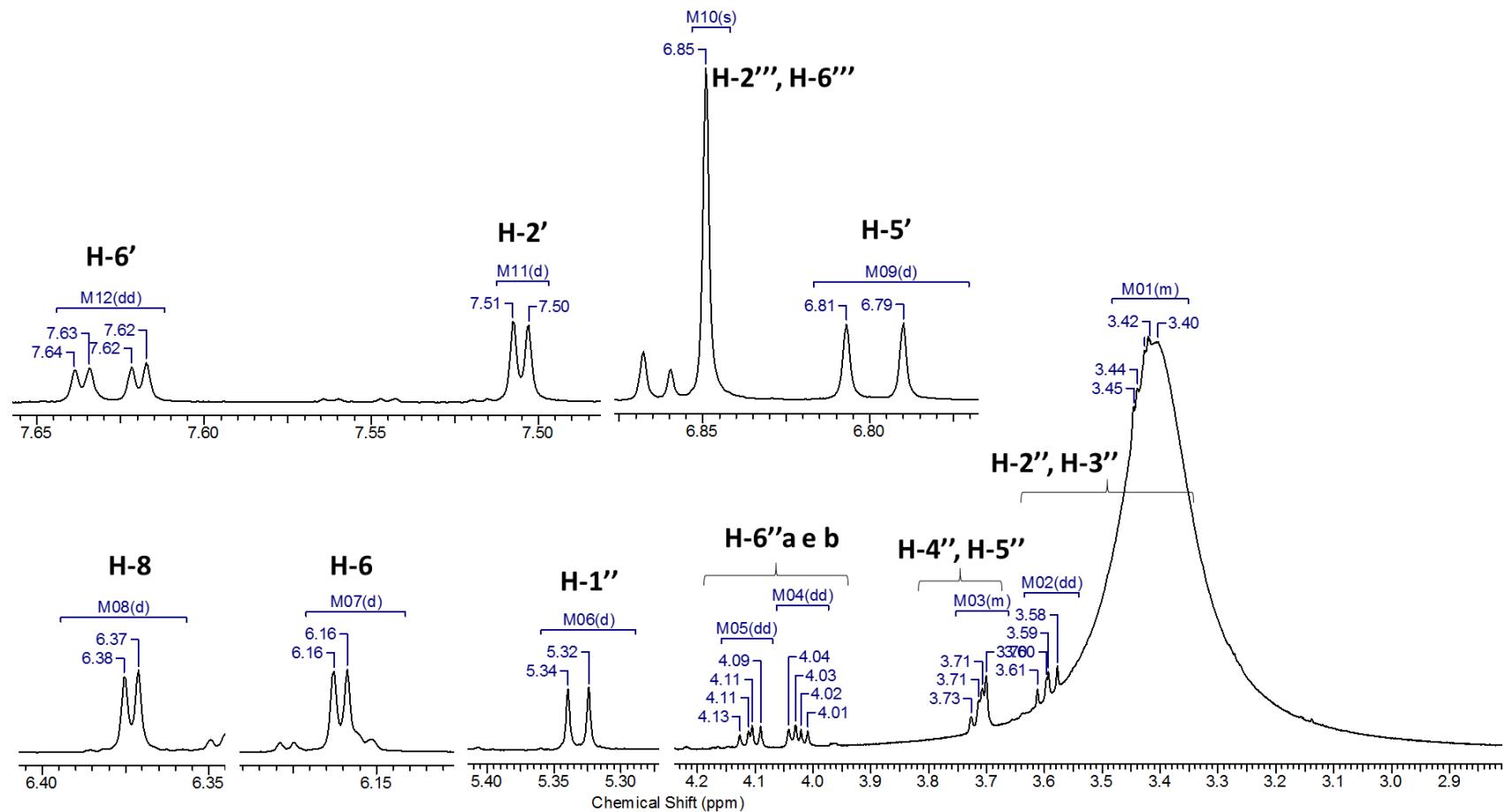


Figura 52: (A) Espectro de RMN de <sup>1</sup>H (500 MHz, DMSO- *d*<sub>6</sub>) da substância FA12.10 da classe dos flavonoides, isolada da sub-fração FA12 identificada como quercetina 3-O-(6''-O-galoil)-β-D-galactopiranosídeo, a partir da fração acetato de etila (FA) da *T. guianensis* e (B) seus sinais característicos ampliados do espectro.

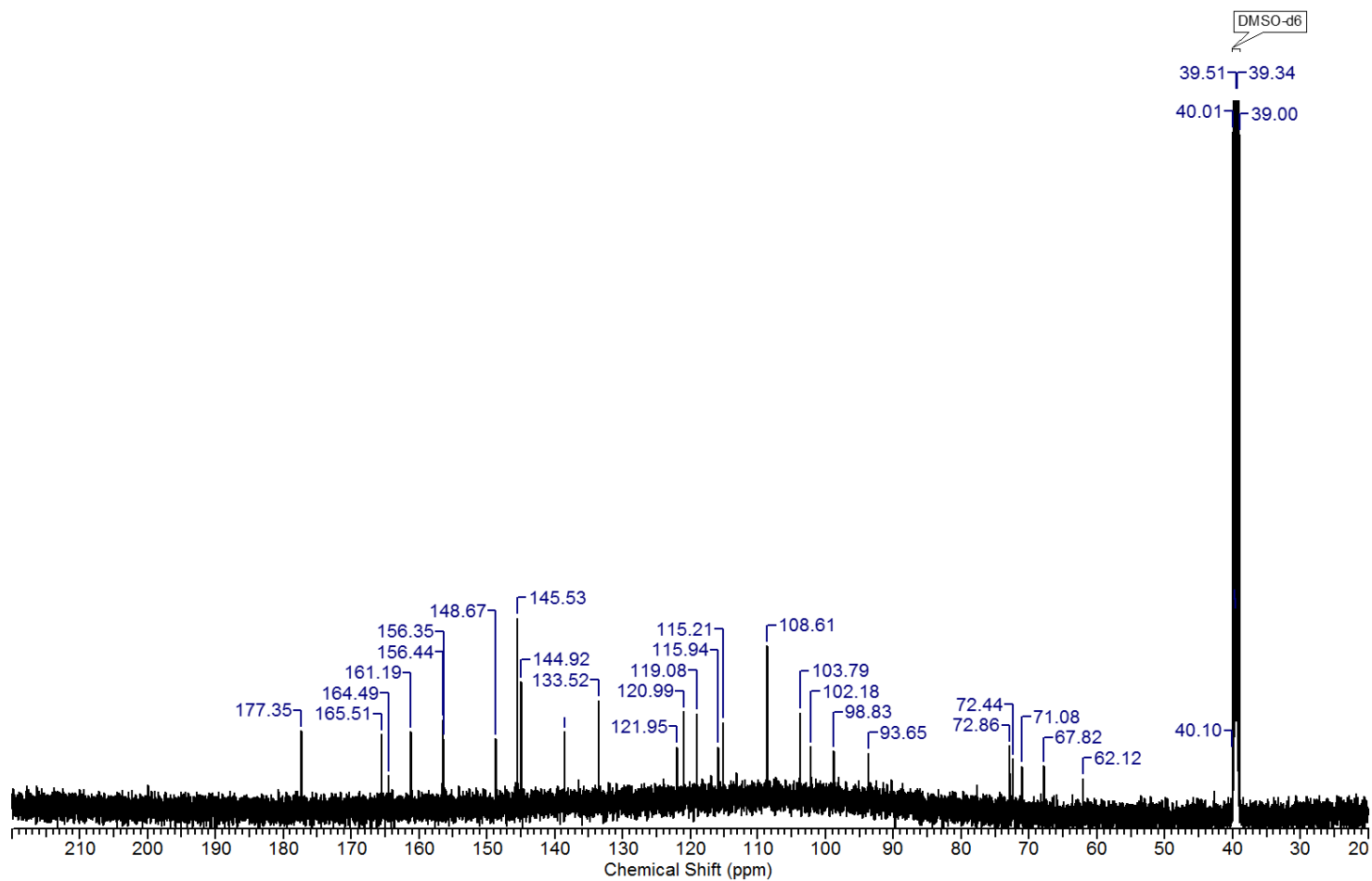


Figura 53: Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (500 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ) da substância FA12.10 da classe dos flavonoides, isolada da sub-fração FA12 identificada como quercetina 3-O-(6'-O-galoiil)- $\beta$ -D-galactopiranosídeo, a partir da fração acetato de etila (FA) da *T. guianensis*.

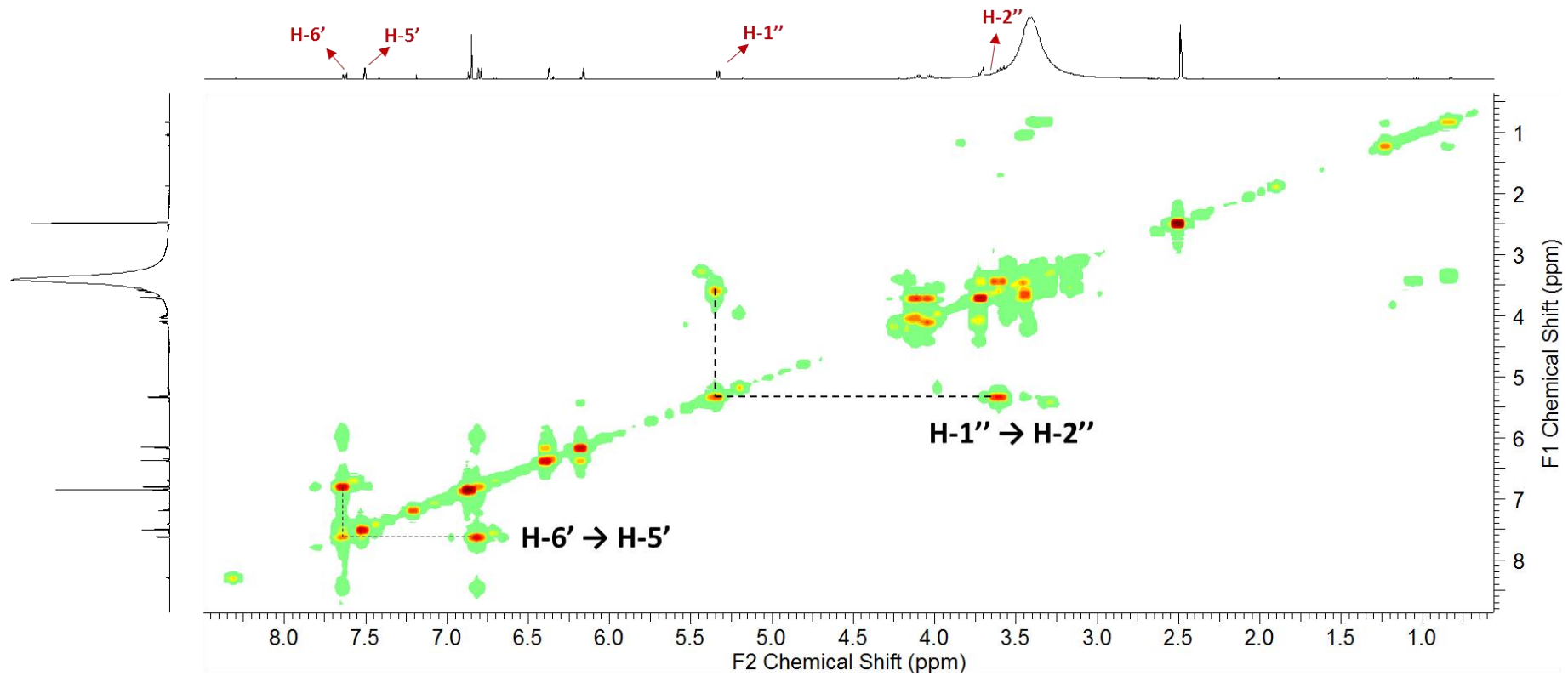


Figura 54: Espectro de RMN 2D – COSY da substância FA12.10 da classe dos flavonoides, isolada da sub-fração FA12 identificada como quercetina 3-O-(6''-O-galoiil)-β-D-galactopiranosídeo, a partir da fração acetato de etila (FA) da *T. guianensis*.

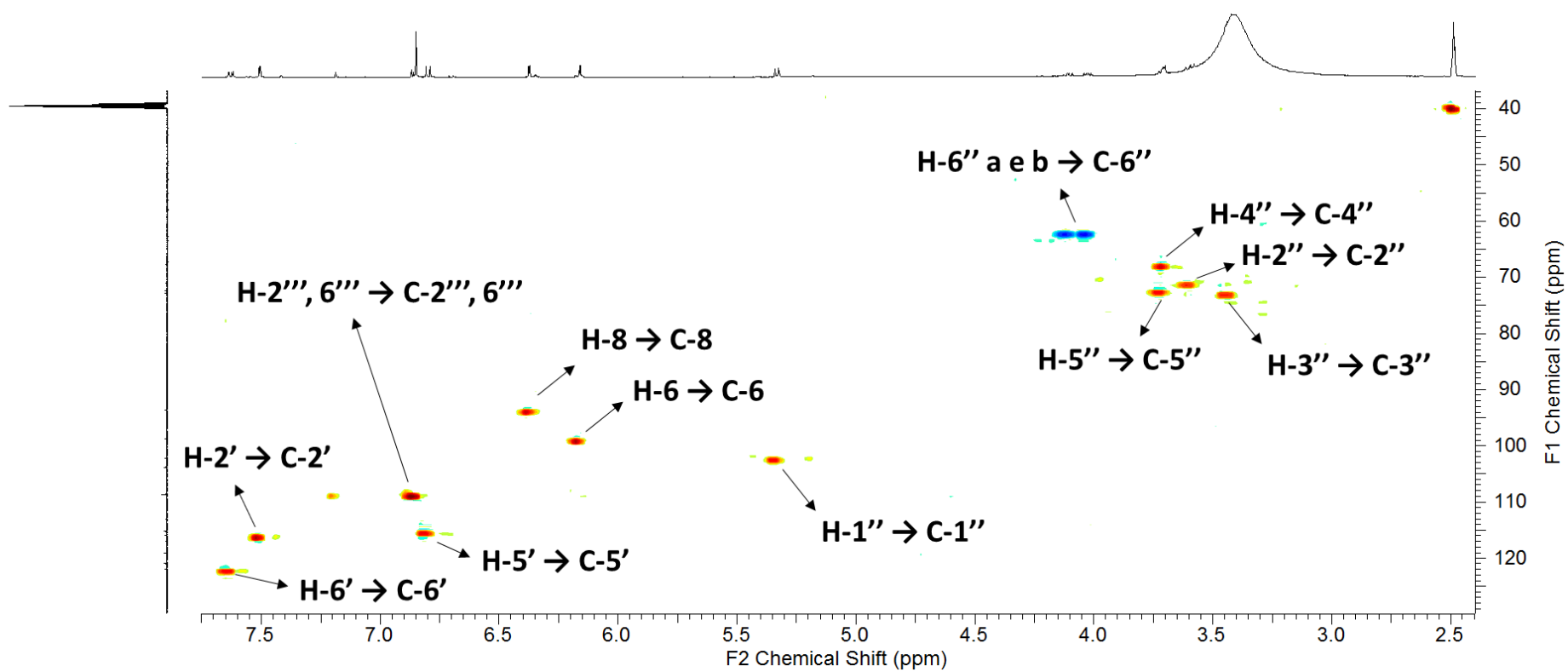


Figura 55: Espectro de RMN 2D – HSQC da substância FA12.10 da classe dos flavonoides, isolada da sub-fração FA12 identificada como quercetina 3-O-(6'-O-galoiil)-β-D-galactopiranosídeo, a partir da fração acetato de etila (FA) da *T. guianensis*.



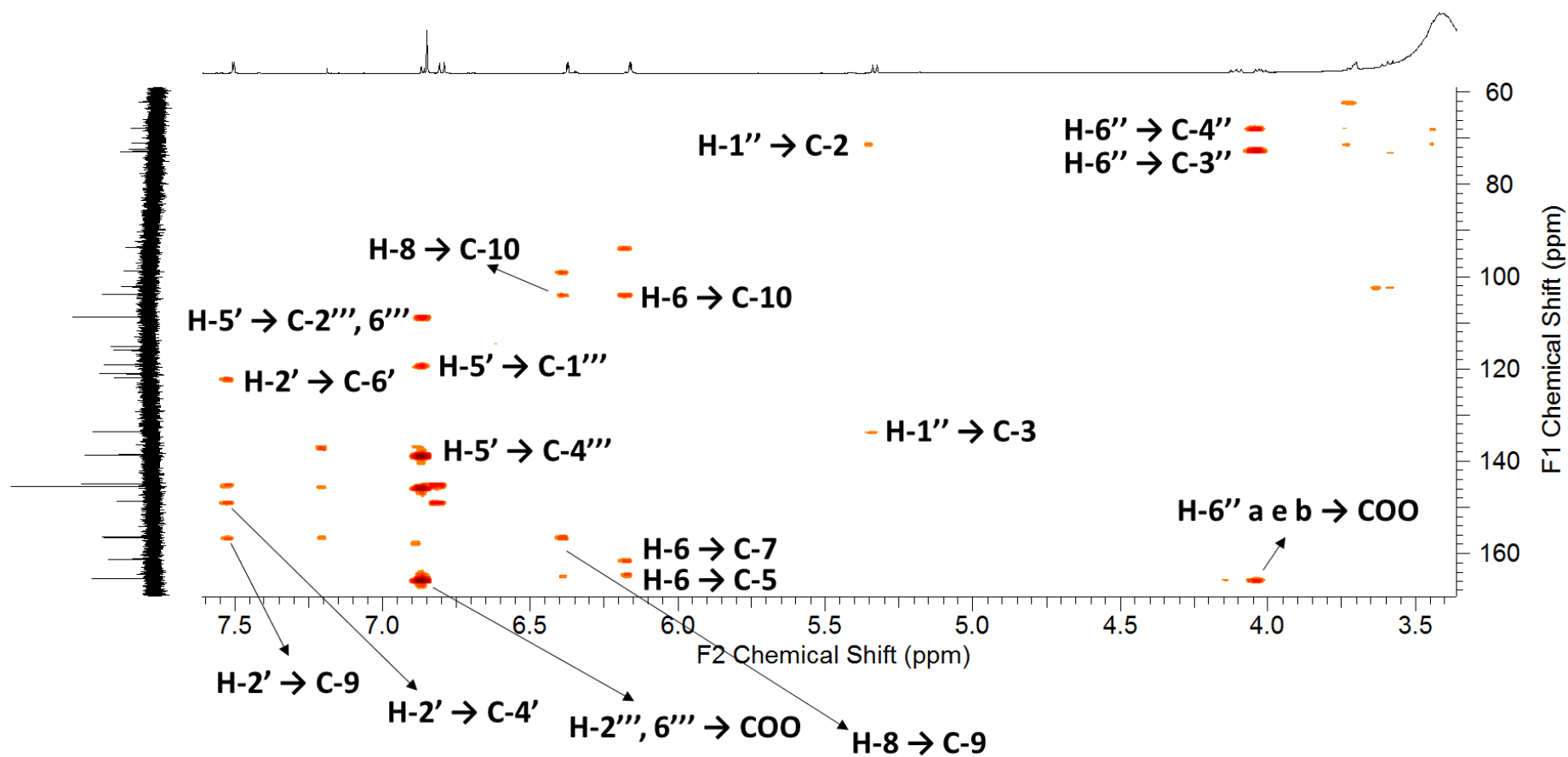


Figura 56: Espectro de RMN 2D – HMBC da substância FA12.10 da classe dos flavonoides, isolada da sub-fração FA12 identificada como quercetina 3-O-(6'-O-galoil)-β-D-galactopiranosídeo, a partir da fração acetato de etila (FA) da *T. guianensis*.

Tabela 13: Deslocamentos químicos ( $\delta$ ) indicativos de um padrão 5,7-dihidroxiado para o anel A e um padrão 3',4'-dihidroxiado para o anel B, com uma  $\beta$ -glicosilação, seguida por uma unidade galoila da substância FA12.10, um derivado da quercetina, identificada como quercetina 3-O- $\beta$ -D-(6''-galoil) galactopiranosídeo.

	$\delta_H$ ppm; (m J Hz) (DMSO- $d_6$ )	$\delta_C$ (ppm) (DMSO- $d_6$ )
<b>Anel A e C</b>		
2		156,3
3		138,5
4		177,3
5		161,1
6	6,17 (d, $J= 1,96$ Hz)	98,7
7		165,4
8	6,38 (d, $J= 2,20$ Hz)	93,6
9		156,2
10		103,7
<b>Anel B</b>		
1'		120,9
2'	7,51 (d, $J= 2,20$ Hz)	115,9
3'		145,4
4'		148,6
5'	6,81 (d, $J= 8,31$ Hz)	115,1
6'	7,64 (dd, $J= 8,56, 2,20$ Hz)	121,9
<b><math>\beta</math>-galactose</b>		
H-1''	5,33 (d, $J= 7,83$ Hz)	102,1
H-2''	3,60 (dd, $J= 9,5; 7,7$ Hz)	71,0
H-3''	3,45 (dd, $J= 9,5; 3,2$ Hz)	72,4
H-4''	3,72 (m)	67,8
H-5''	3,73 (m)	72,8
H-6''a	4,12 (dd, $J= 10,64, 7,46$ Hz)	62,0
H-6''b	4,04 (dd, $J= 10,52, 5,87$ Hz)	
<b>galoil</b>		
1'''		119,0
2''', 6'''	6.86 (s)	108,5
3''', 5'''		144,8
4'''		138,5
C=O		164,8

Tabela 14: Comparação entre os sinais de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  da substância FA12.10, um derivado da quercetina, identificada como quercetina 3-O- $\beta$ -D-(6''-galoil) galactopiranosídeo e a literatura (BRACA *et al.*, 2003).

	$\delta_{\text{H}}$ ppm; (m J Hz) (DMSO- $d_6$ )	$\delta_{\text{H}}$ ppm; (m J Hz) BRACA <i>et al.</i> , 2003 (DMSO- $d_6$ )	$\delta_{\text{C}}$ (ppm) (DMSO- $d_6$ )	$\delta_{\text{C}}$ (ppm) BRACA <i>et al.</i> , 2003 (DMSO- $d_6$ )
<b>Anel A e C</b>				
2			156,3	156,3
3			138,5	133,6
4			177,3	177,4
5			161,1	161,2
6	6,17 (d, $J= 1,96$ Hz)	6,18 (d, $J= 1,8$ Hz)	98,7	98,7
7			165,4	164,2
8	6,38 (d, $J= 2,20$ Hz)	6,39 (d, $J= 1,8$ Hz)	93,6	93,5
9			156,2	156,4
10			103,7	103,9
<b>Anel B</b>				
1'			120,9	121,1
2'	7,51 (d, $J= 2,20$ Hz)	7,51 (d, $J= 2,0$ Hz)	115,9	115,2
3'			145,4	144,8
4'			148,6	148,5
5'	6,81 (d, $J= 8,31$ Hz)	6,81 (d, $J= 8,0$ Hz)	115,1	116,0
6'	7,64 (dd, $J= 8,56,$ 2,20 Hz)	7,65 (dd, $J= 8,0, 2,0$ Hz)	121,9	121,9
<b><math>\beta</math>-galactose</b>				
1''	5,33 (d, $J= 7,83$ Hz)	5,36 (d, $J= 7,6$ Hz)	102,1	102,2
2''	3,60 (dd, $J= 9,5; 7,7$ Hz)		71,0	71,1
3''	3,45 (dd, $J= 9,5; 3,2$ Hz)		72,4	72,9
4''	3,72 (m)		67,8	62,7
5''	3,73 (m)		72,8	72,8
6''a	4,12 (dd, $J= 10,64,$ 7,46 Hz)	4,08 (dd, $J= 12,0,$ 3,0 Hz)	62,0	62,0
6''b	4,04 (dd, $J= 10,52,$ 5,87 Hz)	4,04 (dd, $J= 12,0,$ 5,0 Hz)		
<b>galoil</b>				

1''''			119,0	119,1
2''', 6''''	6.86 (s)	6,88 (s)	108,5	108,6
3''', 5''''			144,8	145,5
4''''			138,5	138,5
C=O			164,8	165,5

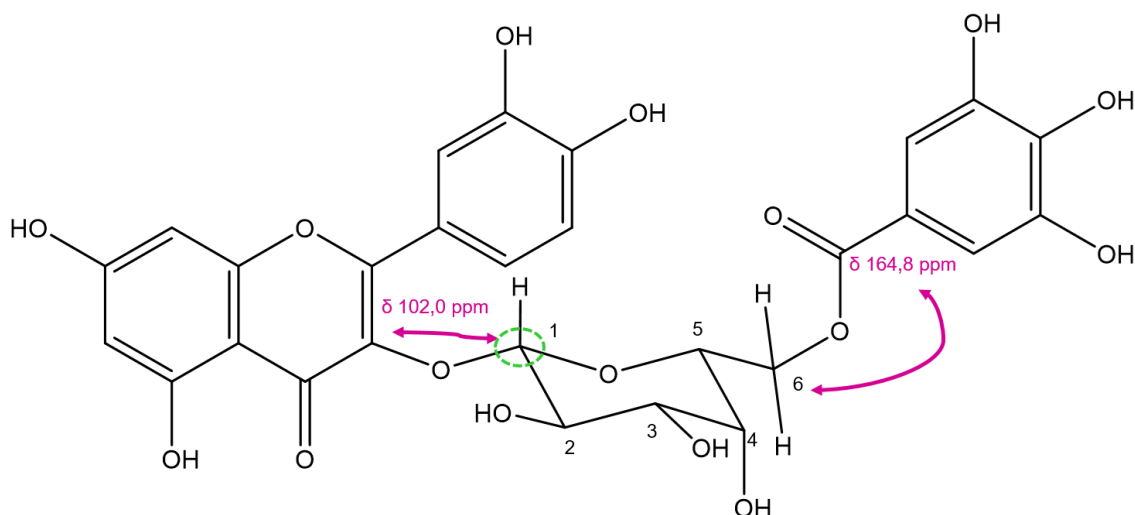
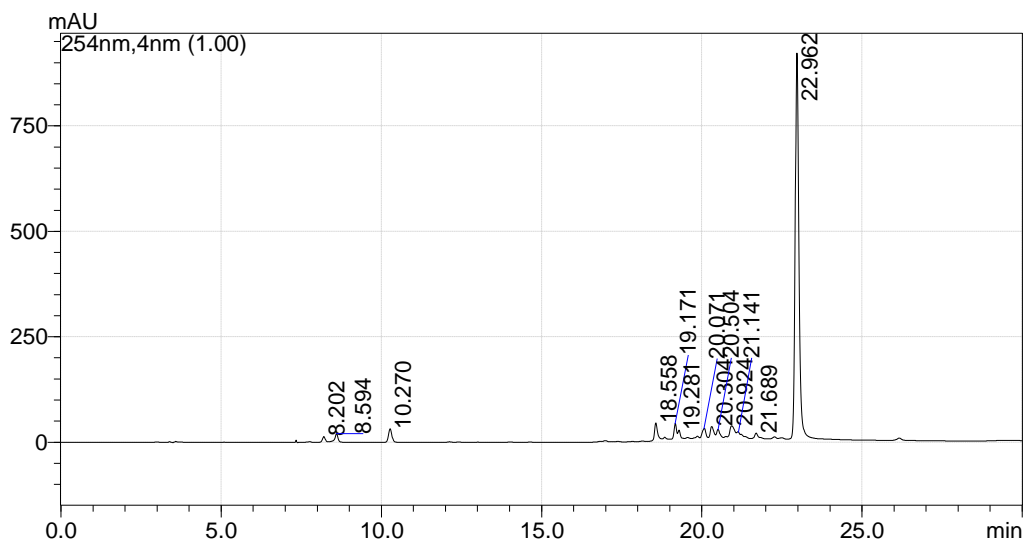


Figura 57: Estrutura química da quercetina 3-O-(6''-O-galoiil)-β-D-galactopiranosídeo (FA12.10) isolada da fração acetato de etila (FA), com as principais correlações observadas. ↔ **COSY**:  $J_{1,2} = 7,7$  Hz, presença de β-galactose, ↔ **HMBC**: correlações a longa distância, ..... **HSQC**: correlação de curta distância no carbono C-1 anomérico da β-glicose.

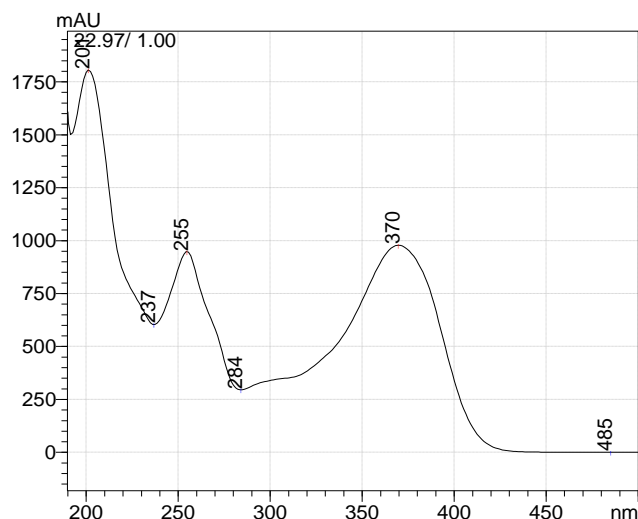
#### 4.4.2.3 Quercetina (FA16) isolada da FA

O método cromatográfico possibilitou a obtenção da sub-fração **FA16** com um pico majoritário no  $t_R$  de 22,962 min, possuindo um espectro com bandas em 255 e 370 nm característicos da quercetina, correspondendo a 3,40  $\mu\text{g}/\text{mg}$  na FA quando quantificada por CLAE, utilizando curva-padrão de quercetina comercial (**Figuras 58 A e B**).

(A)



(B)

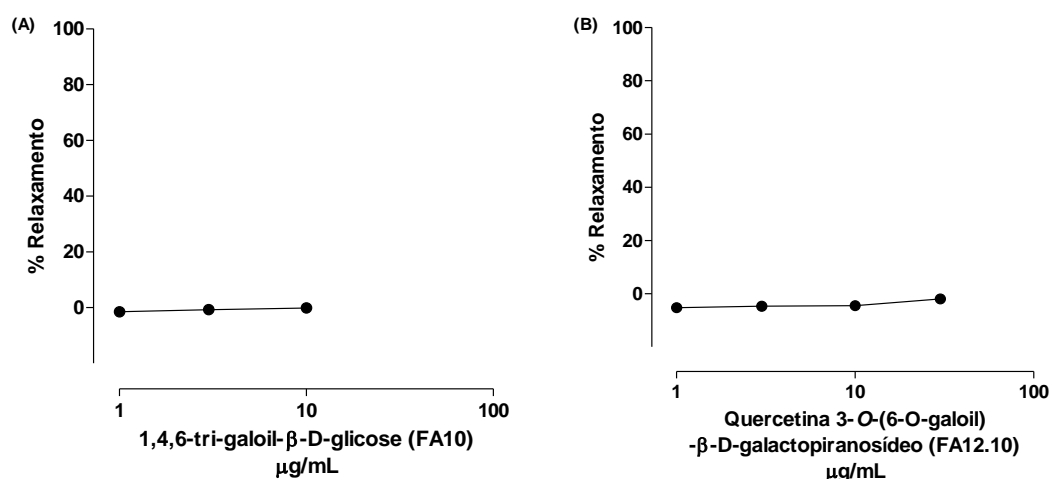


**Figura 58: Análise do perfil químico por cromatografia líquida de alta eficiência da TAc 29 das folhas da *T. guianensis*. (A) Cromatograma obtido em 254 nm após corrida gradiente (ACN/H<sub>2</sub>O) por 45 min com fluxo de corrida igual a 1 mL/min, no qual observa-se um pico majoritário em 22,97 min. (B) Espectro característico de substância flavonóidica.**

A comparação dos dados de RMN de <sup>1</sup>H com o relatado na literatura (HUANG *et al.*, 2013), assim como os dados do espectro de UV, possibilitaram propor a estrutura da quercetina para a amostra isolada **FA16**, a qual não foi posteriormente avaliada quanto à sua ação vasodilatadora em anéis de aorta de ratos *Wistar*, devido ao grande número de estudos científicos que já comprovaram sua ação vasodilatadora.

#### 4.4.3 Avaliação do efeito vasodilatador do 1,4,6-tri-O-galoil- $\beta$ -D-glicose (FA10) e quercetina 3-O- (6''-O-galoil)- $\beta$ -D-galactopiranosídeo (FA12.10) em aorta de ratos Wistar

O método fitoquímico (descrito no item 3.4) permitiu o isolamento de duas SFs possivelmente promissoras (descrito nos itens 4.4.2.1 e 4.4.2.2), as quais foram avaliadas quanto ao perfil vasodilatador. A **FA10** foi identificada como uma substância isolada da classe dos taninos hidrolisáveis, o 1,4,6-tri-galoil- $\beta$ -D-glicose, o qual não apresentou efeito vasodilatador (**Figura 59 A**). Da **FA12** foi isolado o flavonoide identificado como quercetina 3-O-(6-O-galoil)- $\beta$ -D-galactopiranosídeo, que também não apresentou efeito vasodilatador (**Figura 59 B**).



**Figura 59:** Curvas concentração-resposta do tanino hidrolisável 1,4,6-tri-galoil- $\beta$ -D-glicose (FA10) (1 – 10  $\mu\text{g/mL}$ ) e do flavonoide quercetina 3-O-(6''-O-galoil)- $\beta$ -D-galactopiranosídeo (FA12.10) (1 – 50  $\mu\text{g/mL}$ ), ambas as substâncias isoladas da fração acetato de etila (FA) do extrato metanólico das folhas de *T. guianensis* em anéis de aorta com endotélio. Os dados representam a média  $\pm$  E.P.M. de 5 experimentos.

O EMT, a FA e a FA12 apresentaram efeito máximo e potência similares em aortas com endotélio. Além disso, ambos foram mais eficazes e potentes que a fração DCM, que possui a quercetina como substância majoritária. Entretanto, ressalta-se que o efeito vasodilatador da FA12 está relacionado com outras SFs

presentes na fração, tendo em consideração que uma das substâncias isoladas, a quercetina 3-O-(6-O-galoil)- $\beta$ -D-galactopiranosídeo não apresentou efeito.

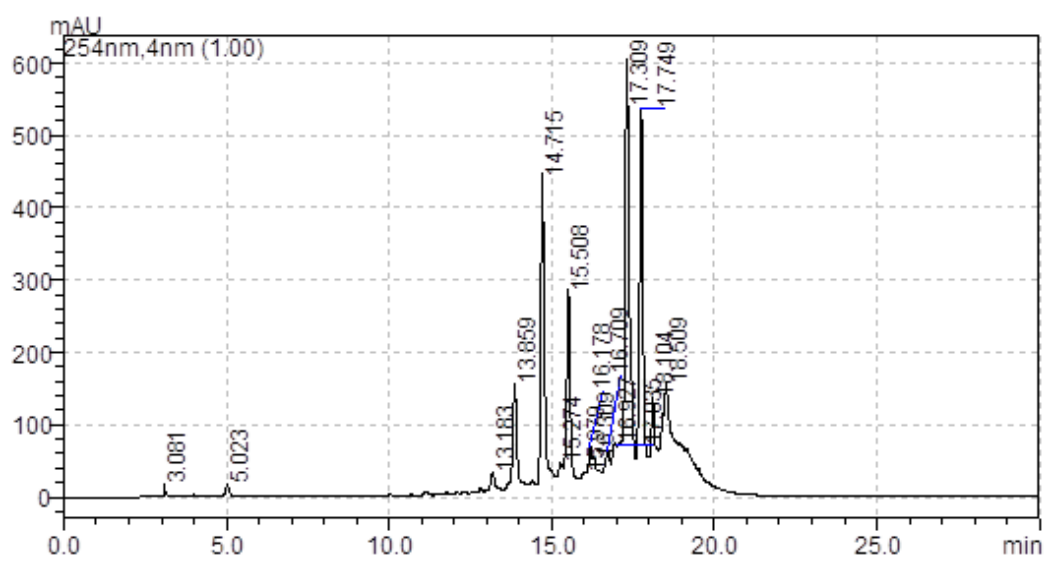
#### 4.4.4 *Sub-frações promissoras*

##### 4.4.4.1 *Análise química das sub-frações promissoras*

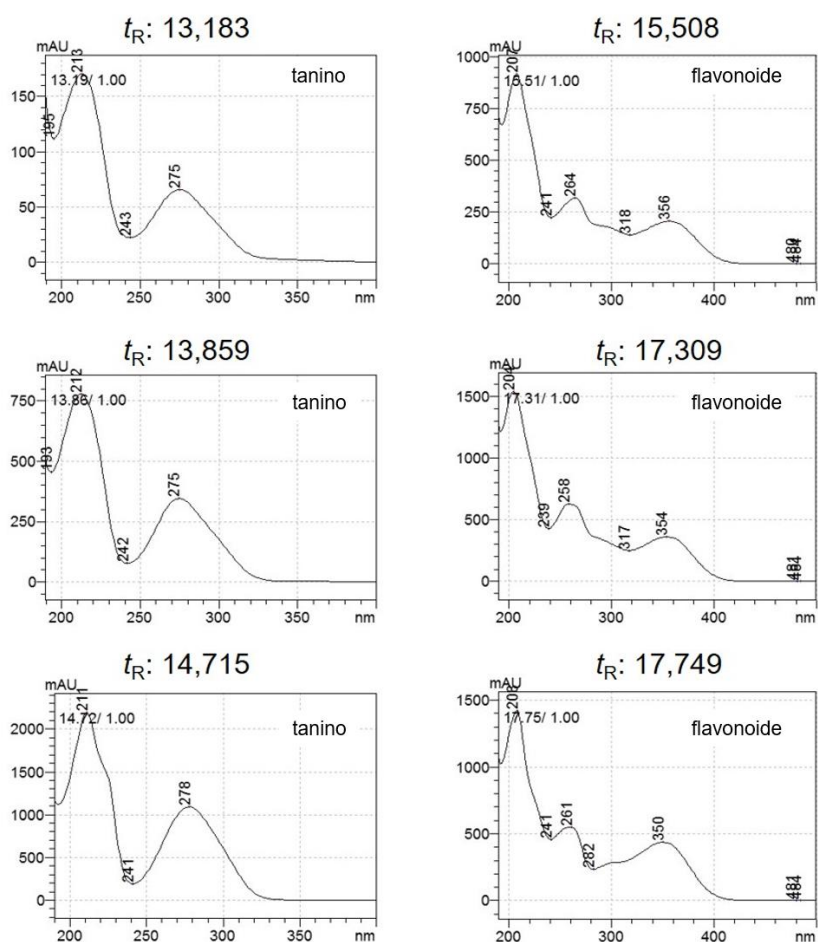
O método cromatográfico em coluna aberta com sílica de fase inversa C<sub>18</sub> possibilitou a obtenção das sub-frações **FA11** (m = 236,5 mg), contendo 6 picos majoritários (**Figura 60**) e **FA14** (m = 267,5 mg), contendo dois picos majoritários (**Figura 61**), os quais apresentaram um perfil cromatográfico com espectros característicos de SFs. Desta forma, devido ao perfil químico promissor, estas sub-frações foram posteriormente avaliadas quanto à ação vasodilatadora em anéis de aorta de ratos *Wistar*.



(A)

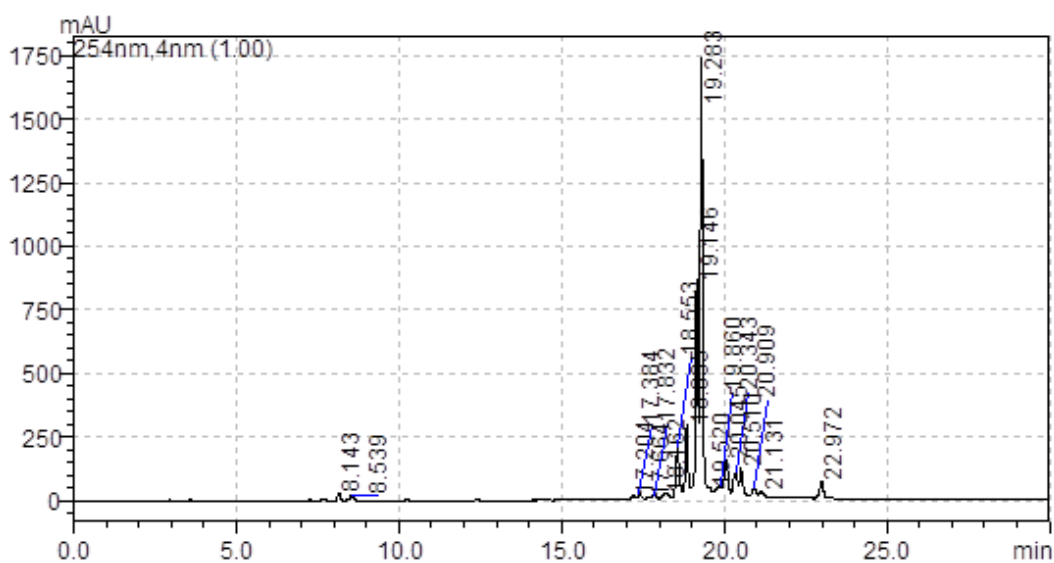


(B)

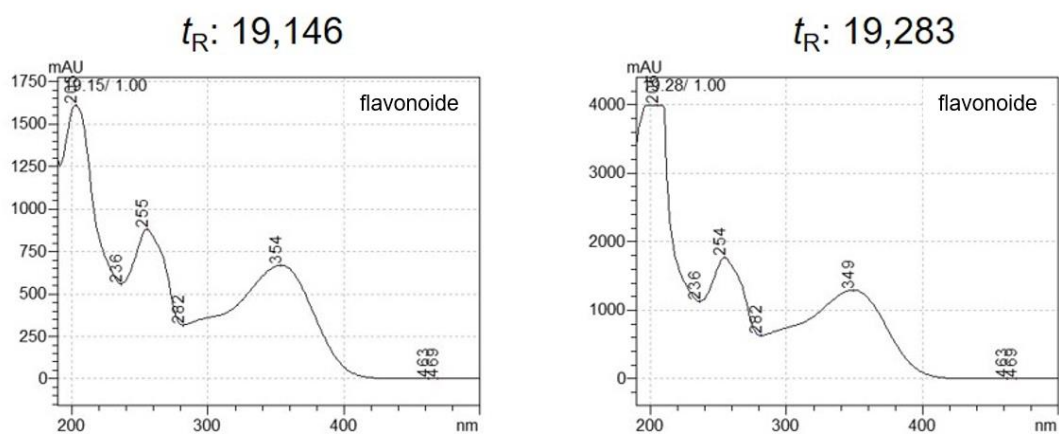


**Figura 60:** Análise do perfil químico por cromatografia líquida de alta eficiência da sub-fração FA11 obtida a partir da fração acetato de etila (FA) das folhas da *T. guianensis*. (A) Cromatograma obtido em 254 nm após corrida gradiente (ACN/H<sub>2</sub>O) por 45 min, com fluxo de corrida igual a 1mL/min. (B) Espectros de UV dos compostos fenólicos com seus respectivos tempos de retenção (RT), em minutos, observados no cromatograma.

(A)



(B)



**Figura 61: Análise do perfil químico por cromatografia líquida de alta eficiência da sub-fração FA14 obtida a partir da fração acetato de etila (FA) das folhas da *T. guianensis*. (A) Cromatograma obtido em 254 nm após corrida gradiente (ACN/H<sub>2</sub>O) por 45 min, com fluxo de corrida igual a 1mL/min. (B) Espectros de UV dos compostos fenólicos com seus respectivos tempos de retenção ( $t_R$ ), em minutos, observados no cromatograma.**

O perfil químico por CLAE-UV-EM da **FA11** foi estudado, devido à sua ação vasodilatadora nos anéis de aorta de ratos *Wistar*, descrita no item 4.4.4.2. Os principais picos do cromatograma no UV observados são os 6, 7, 10, 13 e 14 (**Figura 62**). Além da presença de ambas as substâncias isoladas identificadas na análise por LC-MS da **FA11**, o 1,4,6-tri-*O*-galoil- $\beta$ -D-glicopiranosose (**6**) e a quercetina 3-*O*-(6''-*O*-galoil)- $\beta$ -D-galactopiranosídeo (**10**), um tanino hidrolisável, o galoil-HHDP-hexosídeo (**7**) e um flavonoide, a miricetina desoxihexosídeo (**13**), também foram identificados (**Tabela 15**).

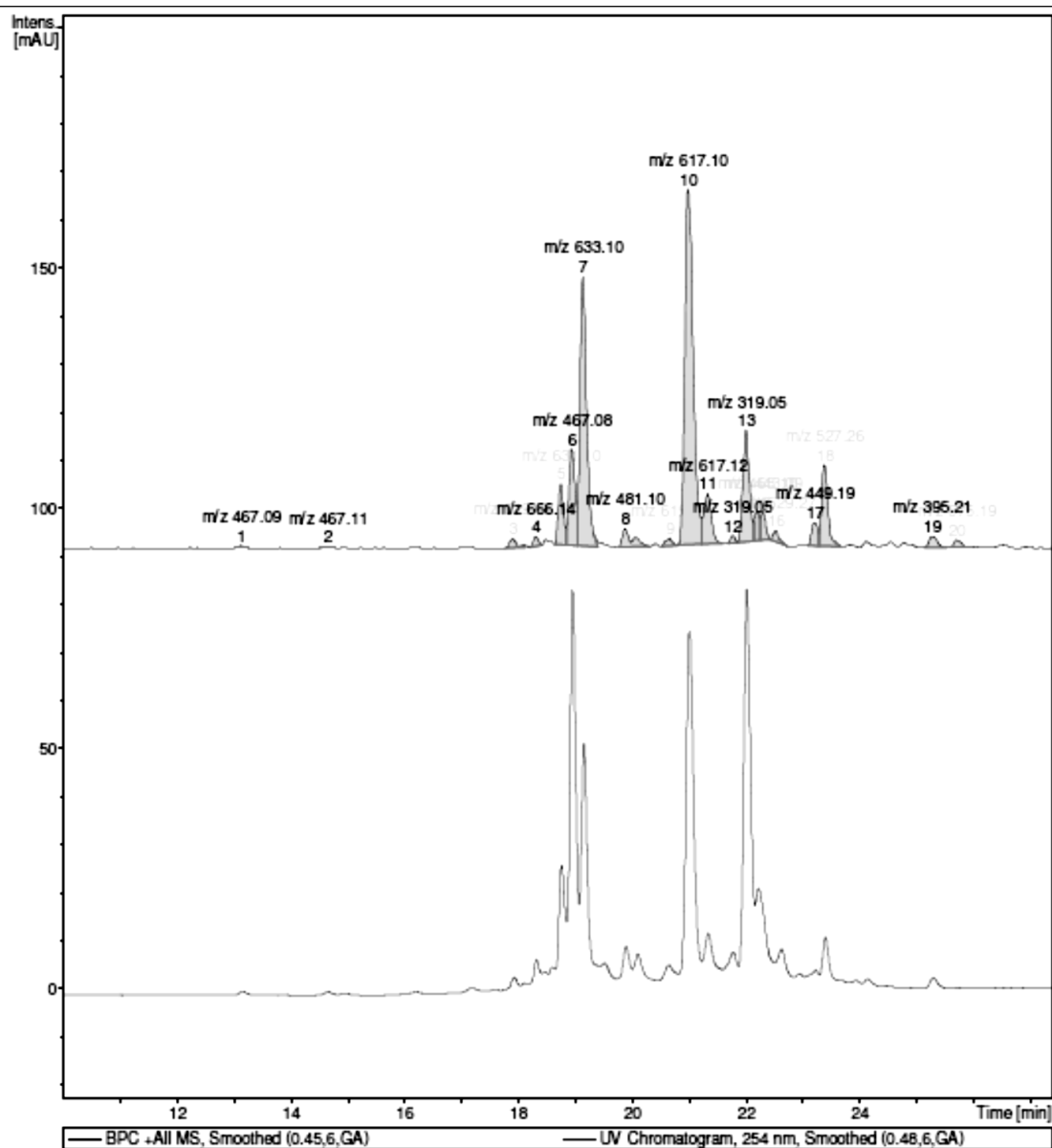


Figura 62: Perfil químico por CLAE-UV-EM da sub-fração FA11 farmacologicamente ativa, obtida a partir da fração acetato de etila (FA) das folhas da *T. guianensis*.

Tabela 15: Análise por CLAE-UV-EM da sub-fração FA11 com ênfase nos picos majoritários (254 nm) e substâncias isoladas.

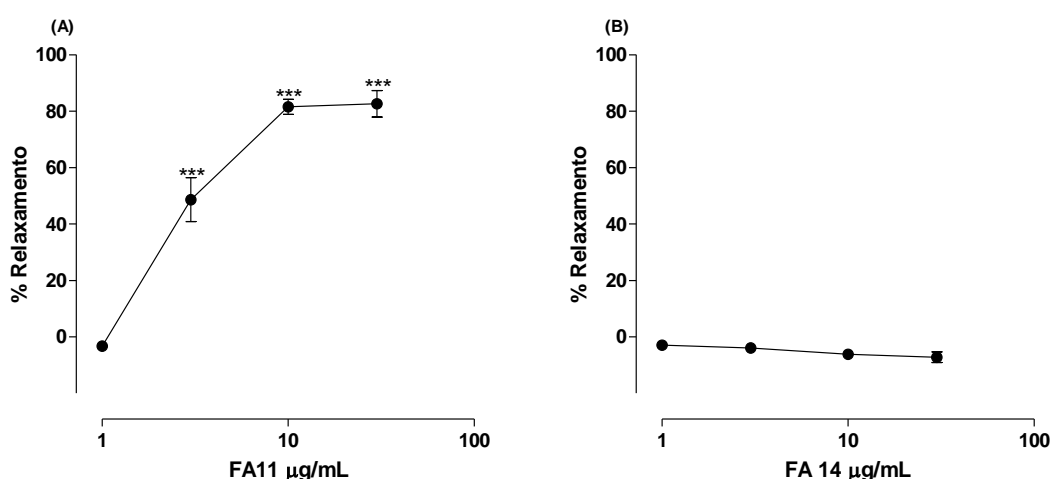
Picos principais	Identificação	Tempos de retenção ( $t_R$ , min)	Íon pseudomolecular (m/z)	Fragmentação m/z (Perda)
6	1,4,6-tri-O-galoil- $\beta$ -D-glicose <sup>a</sup>	18,9	654,17 [M+18] <sup>+</sup>	467,12 (170+18)
7	galoil-HHDP-hexosídeo	19,2	633,10 [M+H] <sup>+</sup>	-
10	quercetina 3-O-(6''-O-galoil)- $\beta$ -D-galactopiranosídeo <sup>a</sup>	21,0	617,17 [M+H] <sup>+</sup>	-
13	miricetina desoxihexosídeo	22,0	465,13 [M+H] <sup>+</sup>	319,06 (146)

<sup>a</sup>Substância isolada

#### 4.4.4.2 Avaliação do efeito vasodilatador das sub-frações promissoras em aorta de ratos Wistar

As sub-frações **FA11** e **FA14** obtidas a partir da fração FA foram avaliadas quanto ao perfil vasodilatador induzido em aortas com endotélio, devido à ação vasodilatadora da fração FA.

A sub-fração **FA11** provocou relaxamento vascular de  $81,53 \pm 2,70\%$  e  $82,59 \pm 4,70\%$  nas concentrações de 10 e 30  $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente ( $P < 0,0001$ ), com  $\text{CI}_{50}$  igual a  $3,99 \pm 0,70 \mu\text{g/mL}$ . Devido ao perfil vasodilatador similar entre MET e FA, as SFs presentes na **FA11** parecem ser responsáveis por grande parte da ação vascular do EMT (**Figura 63 A**). A **FA14**, apesar de possuir dois flavonoides como substâncias majoritárias, não apresentou efeito vasodilatador como mostrado na **Figura 63 B**.



**Figura 63:** Curvas concentração-resposta para as sub-frações (A) FA11 e (B) FA14 (1 – 30  $\mu\text{g/mL}$ ) oriundas da FA do extrato bruto metanólico das folhas de *T. guianensis* em anéis de aorta com endotélio. Os dados representam a média  $\pm$  E.P.M. de 5 experimentos. \*\*\* $P < 0,0001$ , comparado ao controle.

## 5 DISCUSSÃO

Neste trabalho foi realizado o estudo fitoquímico biomonitorado pela atividade vasodilatadora do extrato metanólico das folhas da *T. guianensis* (Anacardiaceae), sendo um estudo pioneiro quanto à avaliação farmacológica dos seus efeitos vasculares, assim como, na ação frente os mecanismos envolvidos na senescência endotelial e sua ação antioxidante *in vitro*.

Apesar de haver relatos quanto ao uso medicinal da *T. guianensis* (SOUZA & FELFILI, 2006; COELHO-FERREIRA, 2009), não foram encontrados dados sobre seu uso popular para o tratamento de DCVs após o levantamento bibliográfico realizado acerca de estudos etnofarmacológicos. Entretanto, um estudo científico mostrou resultados promissores para o avanço desta pesquisa biomonitorada com as folhas da *T. guianensis* (JIMÉNEZ *et al.*, 2001). Após a avaliação da ação de plantas presentes na flora venezuelana no SCV, foi demonstrado que o extrato bruto etanólico das folhas da *T. guianensis* foi capaz de reduzir a pressão arterial de ratos *Sprague-Dawley*. A amostra continha triterpenos e flavonoides, os quais não foram identificados, nem realizada a separação química para a atribuição do efeito farmacológico (JIMÉNEZ *et al.*, 2001).

No presente estudo, o EMT apresentou um perfil fitoquímico promissor para possível ação vascular após avaliação por CLAE-UV, devido à presença de SFs da classe dos taninos e flavonoides, sendo isolados e caracterizados os flavonoides quercetina e a quercetina 3-O-(6''-O-galoil)- $\beta$ -D-galactopiranosídeo, assim como o tanino hidrolizável 1,4,6-tri-O-galoil- $\beta$ -D-glicose, além da identificação de outro tanino hidrolizável, galoil-HHDP-hexosídeo, e um flavonoide, a miricetina desoxihexosídeo, os quais serão discutidos ao longo de suas ações vasculares. Um estudo anterior isolou quatro flavonóis após partição em acetato de etila do extrato metanólico das folhas da *T. guianensis* (CORREIA *et al.*, 2008), dos quais a quercetina 3-O-ramnosídeo e kaempferol demonstraram ação vascular *in vitro* (CALDERONE *et al.*, 2004; XU *et al.*, 2006; XU *et al.*, 2015). A quercetina 3-O-ramnosídeo, também conhecida como quercitrina, apresentou baixa eficácia na ação vasodilatadora com  $E_{m\acute{a}x}$  igual a  $48 \pm 8\%$  em aorta de ratos *Wistar* (CALDERONE *et al.*, 2004). Entretanto, o kaempferol possui ações vasodilatadoras em anéis de artéria coronária de porco,



com ação dependente e independente do endotélio (XU *et al.*, 2006; XU *et al.*, 2015), assim como ação dependente do endotélio em aorta de camundongos C57BL/6J (XIAO *et al.*, 2009). Estes resultados reforçam a existência de SFs presentes na espécie *T. guianensis* com ações benéficas vasculares.

### **5.1 Ação vascular do extrato das folhas da *T. guianensis* em aorta de ratos *Wistar***

O EMT provocou intensa vasodilatação em aortas isoladas de ratos *Wistar*. Assim, o efeito hipotensor descrito por Jiménez *et al.* (2001) pode estar relacionado a atividade vasodilatadora da planta.

Pelo fato do endotélio vascular ter papel crucial na regulação do tônus vascular através da liberação de fatores vasoconstritores e vasodilatadores (URAKAMI-HARASAWA *et al.*, 1997; CINES *et al.*, 1998; SIMOKAWA, 2014), inicialmente foi determinada a participação do endotélio no efeito vasodilatador do EMT em anéis de aorta de ratos. O efeito do EMT foi totalmente abolido na ausência do endotélio, sendo, portanto, dependente do endotélio.

A contribuição dos mediadores derivados do endotélio como o NO e PGI<sub>2</sub> no relaxamento vascular ocorre de forma heterogênea, variando de acordo com o tamanho dos vasos sanguíneos (URAKAMI-HARASAWA *et al.*, 1997; SIMOKAWA, 2014). O NO possui uma participação mais pronunciada em vasos como aorta, enquanto a contribuição da PGI<sub>2</sub> não sofre variação de acordo com o tipo de vaso (URAKAMI-HARASAWA *et al.*, 1997; SIMOKAWA, 2014). Muitas classes de SFs presentes em plantas com ação cardiovascular são capazes de modular tais mecanismos (LUNA-VÁSQUEZ *et al.*, 2013), sendo assim, a ação vascular do EMT foi estudada em aorta de ratos *Wistar*, frente as vias do NO e PGI<sub>2</sub>.

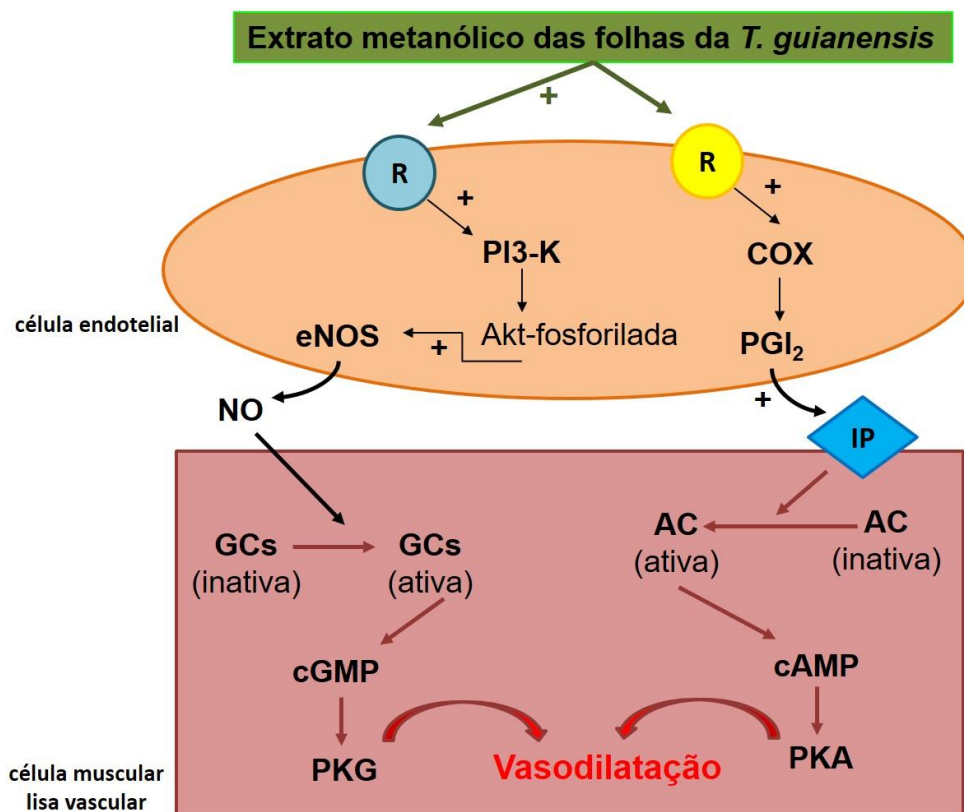
Os experimentos demonstraram que o EMT induz um relaxamento mediado pela via NO/GMPc, uma vez que o efeito foi bloqueado por L-NAME (inibidor da NOS) e ODQ (inibidor da GCs) (**Figura 64**). Estes dados sugerem que na composição do extrato existe(m) substância(s) que pode(m) estar agindo através de receptores presentes nas células endoteliais que ativam a produção endotelial de NO. Após a produção do NO, este difunde-se para as CMLVs, onde ativa a GCs e a produção de cGMP, o qual por sua vez, ativa a PGK levando a

fosforilação de diferentes proteínas que acarretam na redução da  $[Ca^{2+}]_i$  e relaxamento vascular (FÖRSTERMANN *et al.*, 1986; LUCAS *et al.*, 2000).

A ativação da eNOS, com subsequente produção de NO, envolve diferentes vias de sinalização, as quais podem ser moduladas pelas SFs, dependendo de qual receptor endotelial ativado (NAKAMURA *et al.*, 2002; GHAYUR *et al.*, 2007). Os receptores muscarínicos, histaminérgicos e de bradicinina levam à ativação da eNOS pelo aumento da  $[Ca^{2+}]_i$  nas células endoteliais (FELETOU & VANHOUTE, 2006). Além da ativação dependente de  $Ca^{2+}$  da eNOS, alguns receptores provocam a ativação mediada por fosforilação de resíduos de aminoácidos específicos, como os receptores de estrogênio e insulina endoteliais que levam à ativação da enzima através da via PI3K/Akt (MENDELSON, 2002; ARCE-ESQUIVEL *et al.*, 2013). Como o efeito do extrato foi significativamente inibido na presença de wortmanina, inibidor da PI3K, acredita-se que a(s) substância(s) presente(s) no EMT ativa(m) receptores que levam à ativação da eNOS através da via PI3K/Akt (**Figura 64**).

Além do NO, a  $PGI_2$  também está envolvida no efeito vasodilatador do EMT, entretanto, com uma participação menos pronunciada (**Figura 64**). A  $PGI_2$ , um eicosanóide derivado da ação da ciclooxigenase no ácido araquidônico (HECKER, 2000; FÉLÉTOU *et al.*, 2010), ativa os receptores IP acoplados à proteína Gs, levando ao aumento dos níveis intracelulares de AMPc seguido da ativação da PKA e redução da  $[Ca^{2+}]_i$  (FÉLÉTOU *et al.*, 2010).

Tendo em vista a disfunção endotelial como uma condição patológica nas DCVs, na qual ocorre uma redução na biodisponibilidade do NO em células endoteliais (CINES *et al.*, 1998; FÉLÉTOU *et al.*, 2010), os efeitos farmacológicos observados mostram uma ação promissora do EMT no microambiente vascular.



**Figura 64: Principais mecanismos sugeridos na vasodilatação induzida pelo extrato metanólico da *Tapirira guianensis* em aorta isolada de ratos *Wistar*.** AC: adenilato ciclase; COX: ciclooxigenase; cAMP: monofosfato cíclico de adenosina; cGMP: monofosfato cíclico de guanosina; eNOS: óxido nítrico sintase endotelial; NO: óxido nítrico; IP: receptor de prostaciclina; PI3-K: fosfatidilinositol 3-quinase; PKA: quinase dependente de AMPc; PKG: quinase dependente de GMPC. R: receptor.

## 5.2 Perfil vasodilatador e mecanismo de ação do EMT em artéria coronária de porco

A atividade vasodilatadora do EMT em aorta de ratos *Wistar* foi a base para o avanço de posteriores estudos com artéria coronária de porco. O EMT também induziu um relaxamento significativo em coronárias de porcos na presença do endotélio, o qual não foi observado na ausência do endotélio.

Os experimentos realizados para investigação do mecanismo de ação indicaram que a via do NO parece ser o mecanismo predominante para a vasodilatação em coronárias de porco, como foi observado nas aortas de ratos. Ainda, a produção de NO parece estar relacionada à ativação de um mecanismo redox-sensível pelo EMT, com produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e superóxido intracelulares.

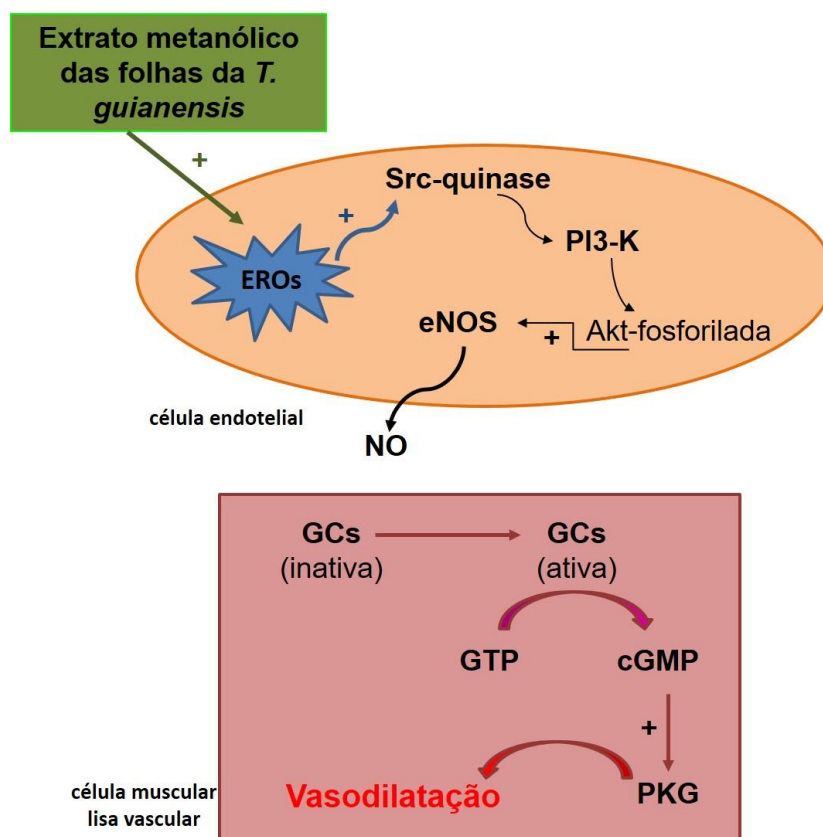
Estas EROs podem ativar a Src quinase e conseqüentemente a via PI3K/Akt e assim produzir vasodilatação, como confirmado pela inibição da atividade do EMT na presença de PP2 e wortmanina (inibidores da Src-quinase e PI3-K/Akt, respectivamente) (**Figura 65**).

O mecanismo redox-sensível induzido é uma possível via de ativação na produção de NO (STOCLET *et al.*, 2004), de forma que a produção controlada e localizada de EROs pode participar da ação vasorelaxante (NDIAYE *et al.*, 2003; NDIAYE *et al.*, 2004). Em aorta de coelhos foi observada uma vasodilatação mediada pela ativação da eNOS a curto prazo após tratamento com 250  $\mu$ M de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, ocorrendo uma redução significativa no grupo tratado com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e 500  $\mu$ M de L-NAME (THOMAS *et al.*, 2002). Desta forma, foi observado que o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> possui importantes implicações fisiológicas nos mecanismos vasculares vasodilatadores (CAI *et al.*, 2002; THOMAS *et al.*, 2002).

Esta ação pró-oxidante do EMT pode ser atribuída a presença das SFs, as quais mostram ação vascular por ativação redox-sensível em diferentes estudos. Um extrato de vinho tinto brasileiro, que apresenta como principais constituintes a quercetina, miricetina e kaempferol, apresentou ação hipotensora em ratos *Wistar*, com intenso relaxamento vascular através da via do NO com ativação redox-sensível da via PI3K/Akt em anéis de artéria mesentérica superior (RIBEIRO *et al.*, 2016). Um extrato seco concentrado de vinho tinto francês, rico em catequina, epicatequina, antocianinas e ácidos fenólicos, induziu significativo relaxamento dependente do endotélio em anéis de coronárias de porcos (NDIAYE *et al.*, 2004). Em cultura de células endoteliais suínas, as SFs presentes no vinho tinto francês promoveram a formação de NO através de mecanismo redox-sensível, ocorrendo redução da ação vasodilatadora após tratamento de anéis com catalase e SOD (NDIAYE *et al.*, 2004).

Um extrato padronizado de ácidos fenólicos das folhas da *Dicksonia sellowiana* (Dicksoniaceae) contendo ácido gálico, ácido protocatecuico, ácido clorogênico, ácido cumárico, ácido ferúlico, ácido sináptico e ácido cinâmico apresentou potente efeito vasoçdilador dependente do endotélio em anéis de artéria coronária de porcos envolvendo as vias do NO e EDHF, no qual, as EROs apresentaram-se como um ponto chave na ativação da via Src-quinase e PI3K/Akt (RATTMANN *et al.*, 2012).

Os resultados obtidos no presente estudo em aorta de rato e coronária de porco corroboram a ação vasodilatadora do EMT, assim como a participação da via de sinalização da PI3K/Akt como a principal responsável pela ativação da eNOS. Assim, a princípio pode-se sugerir que não há uma variabilidade interespecie e entre diferentes tecidos vasculares. A variação das respostas farmacológicas interespecie é um fator importante que pode ser observado em diferentes estudos pré-clínicos, levando a uma divergência entre os mecanismos de ação de uma determinada substância, descritos na literatura científica (CALDERONE *et al.*, 2004; JIANG *et al.*, 2005; ROBERTS *et al.*, 2013).



**Figura 65: Mecanismo redox-sensível sugerido na vasodilatação induzida pelo extrato metanólico da *Tapirira guianensis* em artéria coronária isolada de porco.** cGMP: monofosfato cíclico de guanosina; eNOS: óxido nítrico sintase endotelial; EROs: espécies reativas de oxigênio; NO: óxido nítrico; PI3-K: fosfatidilinositol 3-quinase; PKA: quinase dependente de AMPc; PKG: quinase dependente de GMPc.

### **5.3 Ação do EMT na senescência de células endoteliais isoladas de artéria coronária de porco**

Para o SCV, o processo de envelhecimento se torna crítico já que está relacionado com a redução da funcionalidade dos vasos, influenciada principalmente pela biodisponibilidade reduzida de fatores vasodilatadores derivados do endotélio como o NO e EDHF (SIKORA *et al.*, 2010; KOVACIC *et al.*, 2011). Além da redução dos fatores vasodilatadores, foi também observado um aumento da liberação de fatores indutores de senescência como micropartículas endoteliais, EROs e citocinas pró-inflamatórias, levando ao agravamento dos danos no microambiente vascular devido a indução de mecanismos que levam a morte celular por apoptose das células endoteliais (UNTERLUGGAUER *et al.*, 2003; UNGVARI *et al.*, 2010).

No processo de senescência, as células endoteliais estão metabolicamente ativas, entretanto, não se encontram mais aptas a responder a estímulos mitogênicos (IMANISHI *et al.*, 2008; KOVACIC *et al.*, 2011a), levando a um declínio da função endotelial durante o envelhecimento vascular (IMANISHI *et al.*, 2008; KOVACIC *et al.*, 2011). Por exemplo, em pacientes idosos é observado um aumento de células endoteliais com padrão de senescência, assim como uma reduzida resposta vascular à acetilcolina (KOVACIC *et al.*, 2011; SEALS *et al.*, 2011). Pode ser observado também um estado denominado de envelhecimento precoce vascular em indivíduos jovens que decorre de estados crônicos, após a instalação de um fator de risco, como no caso da hipertensão (KOTSIS *et al.*, 2011; HARVEY *et al.*, 2015).

Em modelo de passagem seriada de células em cultura, é observado um aumento de células SA- $\beta$ gal positivas, assim como observado em amostras clínicas, incluindo alterações na morfologia, redução da taxa de proliferação e superexpressão de proteínas p53/p21 e p16, sendo tais alterações características da senescência celular (HAYFLICK & MOORHEAD, 1961; JOHNSON *et al.*, 1994; ALCORTA *et al.*, 1996; HARA *et al.*, 1996; WAGNER *et al.*, 2001; (MINAMINO & KOMURO, 2006). A atividade SA- $\beta$ gal está correlacionada com o envelhecimento celular, sendo observado que células SA- $\beta$ gal positivas apresentaram maior expressão de p53 e p16 em ateroma na superfície luminal de artéria coronária humana (MINAMINO & KOMURO, 2006).

A p53 leva a um aumento na transcrição gênica da p21, também denominada de inibidor de quinase dependente de ciclina-1 (CDK), mediando a parada do ciclo celular através de uma ação conjunta pela via p53/p21, levando ao envelhecimento celular (CHEN *et al.*, 2006). A p16 promove a senescência pela inibição de quinases dependentes de ciclina 4 (CDK4) e 6 (CDK6) (OHTANI *et al.*, 2004). Estas vias convergem com a redução da fosforilação da proteína retinoblastoma (Rb), levando a inibição de fatores de transcrição e expressão de genes necessários para a transição G1/S no ciclo celular (CAMPISI *et al.*, 2007).

Fármacos utilizados na clínica como a losartana (bloqueador do receptor de angiotensina) e o nifedipino (bloqueador de canais de cálcio) demonstraram ação promissora anti-senescência *in vitro* e *in vivo* (MAESO *et al.*, 1998; HAYASHI *et al.*, 2014). Em ratos senescentes espontaneamente hipertensos, a losartana melhorou o relaxamento de anéis de aorta dependente e independente do endotélio vascular, sugerindo que a angiotensina II desempenha papel principal através dos receptores tipo 1 na redução da resposta vascular na senescência vascular (MAESO *et al.*, 1998). Na senescência induzida por alta concentração de glicose (22 mM), o nifedipino reduziu a produção de EROs e aumentou a atividade da eNOS em células endoteliais senescentes de veia umbilical humana (HAYASHI *et al.*, 2014). Quanto aos estudos com SFs e extratos de plantas enriquecidos com tais substâncias, estas apresentam-se como uma nova terapia promissora em ações anti-envelhecimento (SUN *et al.*, 2015; ZHU *et al.*, 2015; ROOS *et al.*, 2016), levando a um retardo na senescência endotelial (SUN *et al.*, 2015; HUANG *et al.*, 2015), assim como levam à melhora da função endotelial de indivíduos idosos (HEISS *et al.*, 2015).

O modelo de senescência replicativa é uma ferramenta para a avaliação de intervenções terapêuticas no processo da senescência endotelial (TCHKONIA *et al.*, 2013), uma vez que propicia a avaliação do fenótipo celular presente na senescência, através de biomarcadores e alterações na morfologia (BURGER *et al.*, 2012). Sendo assim, o presente estudo analisou a ação do EMT em modelo de senescência replicativa em cultura primária de células endoteliais de artéria coronária de porcos. Os efeitos do EMT foram avaliados em dois diferentes biomarcadores de senescência: a atividade SA- $\beta$ gal e a expressão de proteínas reguladoras do ciclo celular.

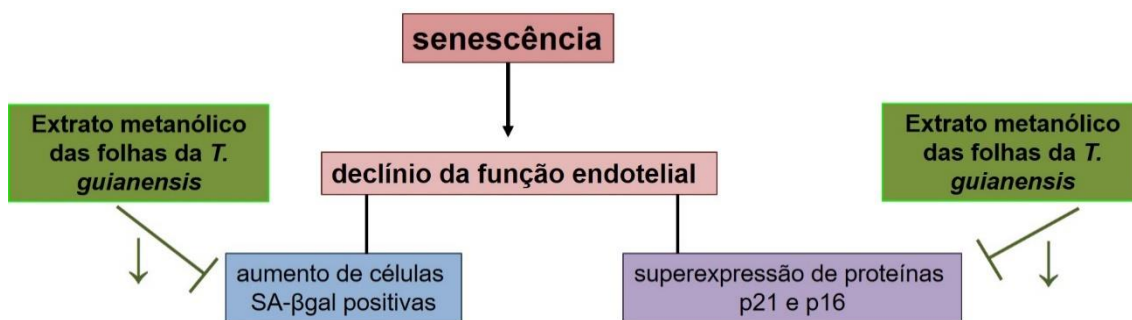
Tendo em vista que os mecanismos fisiopatológicos da senescência estão relacionados ao desencadeamento de processos apoptóticos, inicialmente foi avaliado se o EMT apresenta efeito citotóxico em células jovens P1. Assim, foi possível estabelecer que nas concentrações até 30 µg/mL não ocorre a indução de apoptose e de necrose em células endoteliais pelo EMT.

O pré-tratamento de células endoteliais senescentes P3 com EMT foi capaz de reduzir a atividade SA-βgal nestas células, indicando um potencial anti-envelhecimento do extrato (**Figura 66**). Khemais-Benkhiat *et al.* (2015) também observaram que extratos padronizados ricos em SFs de folhas com flores das espécies *Crataegus oxyacanthal* e *C. monogyna*, respectivamente, foram capazes de reduzir a atividade SA-βgal em células endoteliais senescentes P3, a qual encontra-se relacionada com um aumento da expressão da eNOS induzida pelo extrato.

Hayashi *et al.* (2006) mostraram que o NO pode prevenir a senescência endotelial, avaliada através da atividade SA-βgal, e que as substâncias que aumentam a produção de NO e antioxidantes podem retardar a senescência endotelial induzida por alta concentração de glicose. Como o efeito vasodilatador do EMT envolve a ativação da produção endotelial de NO, pode ser que esta ação também esteja envolvida na redução da atividade SA-βgal provocada pelo EMT.

O modelo de senescência replicativa também está associado ao aumento da expressão de reguladores negativos do ciclo celular, as proteínas repressoras p53, p21 e p16, como mostrado por Khemais-Benkhiat *et al.* (2015). O tratamento das células endoteliais P3 com EMT não alterou a expressão de p53, enquanto reduziu as expressões de p21 e p16 (**Figura 66**), indicando que o extrato atua em mecanismos independentes da p53. Tais resultados observados sugerem que o EMT pode estar atuando no retardo do processo de senescência endotelial, já que a redução da expressão de p21 e p16 está relacionada com a redução do envelhecimento vascular presente nas DCVs (BAI *et al.*, 2016).





**Figura 66:** Principais mecanismos sugeridos quanto ao retardo da senescência endotelial induzida pelo extrato metanólico da *Tapirira guianensis* em cultura primária de células endoteliais de coronária de porco.

SFs como o paenol (JAMAL *et al.*, 2014), juglanina (YANG *et al.*, 2014a), quercetina (ROOS *et al.*, 2016), quercetina-3-O-β-D-glicuronídeo (YANG *et al.*, 2014b) e quercetagetina 3,4'-dimetil éter (YANG *et al.*, 2015) e extratos ricos em SFs (KHEMAIS-BENKHIAT *et al.*, 2015; SUN *et al.*, 2015) têm demonstrado ações na redução de biomarcadores como a atividade SA-βgal e proteínas reguladoras do ciclo celular, reduzindo desta forma os processos envolvidos na senescência do microambiente vascular.

O paeonol, presente em plantas chinesas da família Paeoniaceae, é utilizado na medicina tradicional para redução do estresse oxidativo. Em modelo de senescência induzida por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, células endoteliais de veia umbilical humana pré-tratadas com paenol apresentaram redução da expressão de p53 e da marcação para atividade SA-βgal (JAMAL *et al.*, 2014a). Em fibroblastos humanos, o flavonol juglanina isolado do extrato bruto metanólico das partes aéreas (folhas e caules) da *Polygonum aviculare* (Polygonaceae) foi capaz de reduzir a expressão das proteínas p53 e p21, reguladas positivamente em modelo de senescência induzida por adriamicina, além de reduzir a marcação SA-βgal e EROs intracelular (YANG *et al.*, 2014a).

Em células endoteliais de coronária de porcos, o extrato padronizado rico em SFs de folhas e flores das espécies *C. oxyacanthal* e *C. monogyna*, respectivamente, preveniu a senescência induzida por replicação devido a redução da expressão das proteínas p53, p21 e p16, e também reduziu o estresse oxidativo induzido pela NADPH oxidase, COX e sistema angiotensina local (KHEMAIS-BENKHIAT *et al.*, 2015). A senescência endotelial e aterosclerose em aorta torácica de camundongos pré-diabéticos foi reduzida

com o extrato de batata doce roxa, além de regulação negativa para EROs e inflamassoma NLRP3, um complexo protéico expresso na vasculatura que induz a disfunção endotelial, sugerindo mais alvos potenciais dos flavonoides na prevenção da senescência endotelial que acelera o desenvolvimento das DCVs (SUN *et al.*, 2015).

A quercetina foi efetiva em células endoteliais senescentes humanas e células mesenquimais derivadas de medula óssea senescentes, em camundongos; entretanto, tal ação estaria relacionada à eliminação destas células, para qual é sugerida uma nova abordagem terapêutica para melhorar a função cardiovascular (ZHU *et al.*, 2015). A combinação da quercetina com o fármaco antineoplásico dasatinibe também resultou em uma redução significativa em células senescentes, através da avaliação do marcador de senescência TAF<sup>+</sup>, do inglês *telomere-associated foci*, que avalia focos de dano ao DNA (ROOS *et al.*, 2016). Na camada média de aorta de camundongos envelhecidos e hipercolesterolêmicos foi observada melhora da função vascular devido aumento da biodisponibilidade de NO e aumento da sensibilidade ao nitroprussiato de sódio, um doador de NO, sendo um estudo pioneiro que demonstra a correlação entre a eliminação de células senescentes e a melhora do fenótipo vascular associada ao envelhecimento e a hipercolesterolemia crônica (ROOS *et al.*, 2016).

Das partes aéreas da *P. aviculare* foi isolada a quercetina-3-O- $\beta$ -D-glicuronídeo, a qual mostrou efeitos inibitórios na senescência em fibroblastos humanos e células endoteliais de veia umbilical humana, através da redução da atividade SA- $\beta$ gal e EROs e redução na senescência replicativa (YANG *et al.*, 2014b). A quercetina 3,4'-dimetil éter, um flavonol isolado da *Inula japonica* (Asteraceae), reduziu a atividade SA- $\beta$ gal na senescência replicativa e induzida por adriamicina em células endoteliais de veia umbilical humana, além de reduzir a expressão de p53 e p21 e EROs (YANG *et al.*, 2015).

Tendo em consideração os estudos prévios com a quercetina e dois de seus derivados, a quercetina-3-O- $\beta$ -D-glicuronídeo e a quercetina 3,4'-dimetil éter na redução da senescência (YANG *et al.*, 2014b; YANG *et al.*, 2015; ROOS *et al.*, 2016), sugere-se que a quercetina e a quercetina 3-O-(6''-O-galoil)- $\beta$ -D-galactopiranosídeo presentes no EMT podem ser constituintes responsáveis pela redução de marcadores envolvidos na senescência endotelial.

#### 5.4 Ação antioxidante *in vitro* do EMT e frações

Parte deste trabalho avaliou a possível ação antioxidante *in vitro* das folhas da *T. guianensis* através do método da redução do sequestro do radical sintético DPPH, amplamente utilizado na avaliação preliminar da atividade antioxidante de plantas (CAI *et al.*, 2006; NASCIMENTO *et al.*; 2011).

O EMT e suas frações, exceto a fração FH, foram mais potentes do que o padrão Egb 761®. Entretanto, nenhuma amostra apresentou potência antioxidante similar à da quercetina. A propriedade antioxidante observada para o EMT e frações sugere potencial para ação em mecanismos oxidativos, os quais estão associados a indução e/ou progressão de doenças que envolvam o endotélio vascular.

O estresse oxidativo é um grave fator de disfunção do endotélio vascular, desempenhando um papel importante na fisiopatologia de várias doenças vasculares (LUM *et al.*, 2001). Apesar do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> participar de mecanismos fisiológicos que levam a produção de NO, as células endoteliais expostas a longo prazo a altas concentrações de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> apresentam redução dos mecanismos de fosforilação da eNOS, o que explica a perda da função da eNOS nas DCVs, após lesão oxidativa crônica (HU *et al.*, 2008). O estresse oxidativo crônico pode levar a outra condição crítica para endotélio vascular, o início da senescência prematura, devido a perda da integridade dos telômeros (KURZ *et al.*, 2004). De acordo com a teoria dos radicais livres, as EROs podem promover senescência através do encurtamento dos telômeros induzido pela inativação da família Src quinase (HAYASHI *et al.*, 2006).

A capacidade antioxidante do EMT e das frações pode ser atribuída a presença de polifenóis, os quais são amplamente estudados quanto à sua propriedade antioxidante (HUSSAIN *et al.*, 2016). Tem sido demonstrado que as SFs podem atuar por diferentes mecanismos, com destaque para o nível de formação de EROs, através da inibição de enzimas como a NADPH oxidase (SANDOVAL-ACUNA *et al.*, 2014; KHEMAIS-BENKHIAT *et al.*, 2015). A quercetina e seus metabólitos isorhammetina e kaempferol reduzem a produção de ânion superóxido, através da inibição da NADPH oxidase em CMLVs de ratos normotensos e espontaneamente hipertensos (JIMENEZ *et al.*, 2015).

Dentre as SFs, os taninos se destacam devido a atividade antioxidante mais pronunciada, decorrente da presença do grande número de grupos hidroxila, em especial grupos *orto*-di-hidroxi e galoil (CAI *et al.*, 2006). Tal característica está diretamente relacionada a proporção destes grupos presentes na estrutura, sendo quanto maior o número dos grupos funcionais e o peso molecular, maior a atividade (CAI *et al.*, 2006).

Em SFs isoladas da espécie *Camellia pachysandra* (Theaceae), taninos e a quercetina-3-O-(6-O-galoil)- $\beta$ -D-galactopiranosídeo foram comparados quanto à ação antioxidante. Os taninos apresentaram uma maior atividade antioxidante, com destaque para a melhor atividade do 1,2,3,4,6-O-pentagaloil- $\beta$ -D-glicose, que provocou redução de 50% do radical DDPH na concentração de  $6,3 \pm 0,2 \mu\text{M}$ . A quercetina-3-O-(6-O-galoil)- $\beta$ -D-galactopiranosídeo reduziu 50% do radical DDPH na concentração de  $22,1 \pm 0,4 \mu\text{M}$  (GAO *et al.*, 2010).

Com base na literatura descrita, sugere-se que a ação antioxidante das folhas da *T. guianensis* está em parte relacionada à presença dos flavonóis quercetina e quercetina-3-O-(6-O-galoil)- $\beta$ -D-galactopiranosídeo e do tanino hidrolisável 1,4,6-tri-O-galoil- $\beta$ -D-glicose, indicando o potencial para realização de estudos futuros sobre ação antioxidante destas substâncias na redução de mecanismos envolvidos no estresse oxidativo do microambiente vascular.

## 5.5 Ação das frações biologicamente ativas

Para conhecer as substâncias responsáveis pelo efeito farmacológico do EMT, este foi fracionado de forma biomonitorada pela atividade vasodilatadora. Inicialmente, o extrato foi particionado gerando as frações FH, FD, FA e FB, com formação final da fração FAq. As frações biologicamente ativas passaram por novo processo de fracionamento para o isolamento e identificação de substâncias. Todas as frações, assim como as sub-frações e substâncias isoladas possivelmente promissoras, foram testadas em anéis de aorta de rato com endotélio.

As frações FD e FA apresentaram o melhor perfil vasodilatador, entretanto, a fração FA mostrou-se mais potente, com perfil similar ao EMT. O novo fracionamento das frações FD e FA permitiu o isolamento e a caracterização de um tanino e dois flavonoides após análise por UV, LC-MS e

RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  uni e bidimensionais (descritos e comparados com a literatura no tópico Resultados).

O flavonol quercetina (**FD18**) foi isolado e identificado a partir da fração FD, sendo seu constituinte flavonoídico majoritário correspondendo a 3,35  $\mu\text{g}/\text{mg}$ . A quercetina (**FA16**) também foi isolada e identificada da fração FA, correspondendo a 3,40  $\mu\text{g}/\text{mg}$ . A quercetina é amplamente conhecida e estudada quanto às suas ações vasculares e apresenta ação vasodilatadora dependente e independente do endotélio (DUARTE *et al.*; 1993; AJAY *et al.*; 2003; NISHIDA *et al.*; 2009), com ação pronunciada em vasos de resistência comparado com vasos arteriais de condutância (PEREZ-VIZCAINO *et al.*, 2002). A ação vasodilatadora da quercetina envolve as vias do NO e da  $\text{PGI}_2$  (AJAY *et al.*; 2003), sugerindo que este flavonol presente no EMT e nas frações FD e FA é, em parte, responsável pelo efeito vasodilatador das folhas da *T. guianensis*.

A quercetina (OH *et al.*, 2004; WOUDE *et al.*, 2005), assim como os flavonóis kaempferol e isorhamnetina (OH *et al.*, 2004), a flavanona hesperidina (LIU *et al.*, 2008; KALIL, 2009) e as isoflavonas genistina e daidzina (SLOW *et al.*, 2007), são considerados fitoestrogênios por apresentarem características estruturais e funcionais semelhantes ao estradiol (KUIPER *et al.*, 1998; ANTER *et al.*, 2005; KLINGE *et al.*, 2005). Tais fitoestrogênios podem agir em receptores de estrogênio, que, quando ativados, levam a uma vasodilatação dependente do endotélio através da ativação da via PI3K/Akt, fosforilação e ativação da eNOS, e consequente produção de NO (MENDELSON, 2002; KIM & LEVIN, 2006; KALIL, 2013). Assim, os receptores de estrogênio estão entre os possíveis alvos do EMT, destacando-se a possível ação mediada em parte pelo flavonol quercetina.

Paralelamente ao isolamento da quercetina (**FA16**), foram isolados da fração FA um tanino hidrolisável identificado como 1,4,6-tri-*O*-galoil- $\beta$ -*D*-glicose (**FA10**) e um derivado da quercetina identificado como quercetina 3-*O*-(6''-*O*-galoil)- $\beta$ -*D*-galactopiranosídeo (**FA12.10**). Ambos não apresentaram atividade vasodilatadora nos ensaios realizados em anéis de aorta.

Galoiltaninos e galoilglicosídeos apresentam efeitos vasodilatadores e inibidor da enzima conversora da angiotensina (ECA) (GOTO *et al.*, 1996; KANG *et al.*, 2005; FAN *et al.*, 2011). Os taninos hidrolisáveis 1,2,3,4,6-penta-*O*-galoil- $\beta$ -*D*-glicose e 1,2,3,6-penta-*O*-galoil- $\beta$ -*D*-glicose apresentam ação inibitória da

ECA, sendo tal ação inibitória aumentada com o aumento de unidades de ácido gálico (LIU *et al.*, 2003). O tanino hidrolisável com o máximo de substituição de grupos galoila, o 1,2,3,4,6-penta-*O*-galoil- $\beta$ -*D*-glicose, induz vasodilatação de forma dependente da concentração através de mecanismos envolvendo o NO em anéis de aorta de ratos *Sprague-Dawley* (XIE *et al.*, 2007). Entretanto, a tri-galoil- $\beta$ -*D*-glicose estudada não apresentou ação vasodilatadora em anéis de aorta *Wistar*, sugerindo que o número de grupos galoila altera a ação farmacológica, com possível diferença na afinidade para receptores específicos (ZHU *et al.*, 1997).

Em flavonoides galoilglicosídeos, também foi observada uma relação estrutura-atividade para inibição da ECA, a qual se mostra dependente do número e posição do grupo galoil no poliol central (LEE *et al.*, 2005). A ação vasodilatadora da quercetina 3-*O*-(6''-*O*-galoil)- $\beta$ -*D*-galactopiranosídeo aparenta ser influenciada pela posição e número de grupos galoil, levando em consideração que a quercetina 3-*O*- $\beta$ -*D*-galactopiranosídeo (hiperosídeo) apresentou uma excelente atividade vasodilatadora em artéria basilar de ratos (FAN *et al.*, 2011).

Apesar da ausência de ação vasodilatadora, a possível atividade inibitória da ECA pelo tanino hidrolisável 1,4,6-tri-*O*-galoil- $\beta$ -*D*-glicose e pela quercetina 3-*O*-(6''-*O*-galoil)- $\beta$ -*D*-galactopiranosídeo poderia contribuir para o efeito hipotensor descrito anteriormente por Jiménez e colaboradores (2001).

De acordo com o levantamento bibliográfico realizado, este estudo foi o pioneiro no isolamento e identificação do 1,4,6-tri-*O*-galoil- $\beta$ -*D*-glicose e da quercetina 3-*O*-(6''-*O*-galoil)- $\beta$ -*D*-galactopiranosídeo no gênero *Tapirira*, possuindo uma grande relevância na contribuição de estudos fitoquímicos de espécies da família Anacardiaceae presentes no Brasil. A quercetina 3-*O*-(6''-*O*-galoil)- $\beta$ -*D*-galactopiranosídeo já foi identificada em espécies da família Anacardiaceae, como nas folhas da *Sclerocarya birrea*, sendo as folhas e a polpa da fruta usados na medicina tradicional do Mali no tratamento da hipertensão (BRACA *et al.*, 2003). Também já foi identificada nos frutos da *Rhus parviflora*, utilizados na medicina tradicional do Nepal para tratamento de disenteria (SHRESTHA *et al.*, 2013).

A sub-fração **FA11** da fração FA apresentou ação vasodilatadora similar ao EMT nos anéis de aorta, enquanto não foi observado efeito para a **FA14**. A

partir da análise por CLAE-UV-EM da sub-fração **FA11**, foi identificada a presença das duas substâncias previamente isoladas, 1,4,6-tri-O-galoil- $\beta$ -D-glicose e quercetina 3-O-(6''-O-galoil)- $\beta$ -D-galactopiranosídeo, além de outro tanino hidrolisável, galoil-HHDP-hexosídeo, e um flavonoide, a miricetina desoxihexosídeo, os quais até o presente momento ainda não foram encontrados na espécie *T. guianensis*.

A miricetina desoxihexosídeo é um glicosídeo de miricetina (mais encontrado na natureza como miricetina-3-O-raminosídeo, também denominado de miricitrina). Em cardiomiócitos H9c2, a miricitrina reduziu a apoptose induzida por alta concentração de glicose (33,3 mM) através da redução da caspase-3, caspase-9 e Bax, além de atenuar a apoptose de células endoteliais através da via PI3K/Akt, promovendo a expressão de proteínas, como a heme oxigenase-1, que inibem EROs (ZHANG *et al.*, 2016). A miricitrina também provocou uma redução da placa de ateroma em estágio inicial em camundongos, devido a redução da oxidação do LDL, assim como reduziu a apoptose de células endoteliais através da ativação da via PI3K/Akt/eNOS (QIN *et al.*, 2015). A miricitrina ainda foi isolada da planta *Tetraclinis articulata* (Cupressaceae), sendo atribuída a este flavonol parte da ação farmacológica anti-hipertensiva observada em seu uso na medicina tradicional do Marrocos (ZIDANE *et al.*, 2014). Todos estes estudos mostram evidências da ação da miricitrina no SCV, sugerindo que este flavonol é uma possível substância responsável pelo efeito vasodilatador da fração **FA11** obtida a partir da fração FA.

## 6 CONCLUSÕES

- As folhas da *T. guianensis* coletadas no PARNA Jurubatiba apresentam várias SFs, das quais foram isoladas e caracterizados os flavonoides quercetina e quercetina 3-O-(6''-O-galoil)- $\beta$ -D-galactopiranosídeo, e o tanino hidrolisável 1,4,6-tri-O-galoil- $\beta$ -D-glicose. Além das substâncias isoladas, foram identificadas, por CLAE-UV-EM o tanino hidrolisável, o galoil-HHDP-hexosídeo, e um flavonoide, a miricetina deoxihexosídeo;
- O EMT e as frações FD e FA possuem ação vasodilatadora em anéis de aorta de ratos *Wistar*, sendo tal ação dependente do endotélio vascular;
- A ação vasodilatadora do EMT em anéis de aorta de ratos *Wistar* envolve a produção de NO/GMPc, ativada pela via PI3k/Akt, e de PGI<sub>2</sub>;
- A quercetina 3-O-(6''-O-galoil)- $\beta$ -D-galactopiranosídeo e o 1,4,6-tri-O-galoil- $\beta$ -D-glicose isolados não apresentaram ação vasodilatadora em anéis de aorta de ratos *Wistar*. Foi possível identificar na sub-fração ativa, por CLAE-UV-EM a miricetina deoxihexosídeo que pode estar relacionada com a atividade vasodilatadora da FA11;
- Em anéis de artéria coronária de porcos, a ação vasodilatadora do EMT envolve predominantemente a via do NO, com envolvimento da via redox-sensível na ativação de Src quinase e PI3K/Akt;
- O EMT não apresenta ação citotóxica em concentrações abaixo de 30  $\mu$ g/mL em cultura primária de células endoteliais de artéria coronária de porcos, assim como não induz senescência em células jovens P1;
- Em modelo de senescência replicativa de cultura primária de células endoteliais de artéria coronária de porcos, o tratamento com EMT reduziu a atividade SA- $\beta$ gal e a expressão das proteínas p21 e p16 em células senescentes P3;
- O EMT e as suas frações apresentam potente atividade antioxidante *in vitro*;
- As folhas de *T. guianensis* podem ser consideradas uma fonte promissora de novas substâncias com potencial para prevenção e/ou tratamento da disfunção e do envelhecimento vascular associado a DCVs.



## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

**ACOSTA**, J. C.; O'LOGHLEN, A.; BANITO, A.; GUIJARRO, M. V.; AUGERT, A.; RAGUZ, S.; FUMAGALI, M.; COSTA, M.; BROWN, C.; POPOV, N.; TAKATSU, Y.; MELAMED, J.; FAGAGNA, F. A.; BERNARD, D.; HERNANDO, E.; GIL, J. (2008) Chemokine signaling via the CXCR2 receptor reinforces senescence. *Cell*, 133: 1006-1018.

**AGRAWAL**, P. K. (1992) NMR spectroscopy in the structural elucidation of oligosaccharides and glycosides. *Phytochemistry*, 31(10): 3307-3330.

**AJAY**, M.; GILANI, A. S.; MUSTAFA, M. R. (2003) Effects of flavonoids on vascular smooth muscle of the isolated rat thoracic aorta. *Life Sciences*, 603-612.

**ALCORTA**, D. A.; XIONG, Y.; PHELPS, D.; HANNON, G.; BEACH, D.; BARRETT, J. C. (1996) Involvement of the cyclin-dependent kinase inhibitor p16 (INK4a) in replicative senescence of normal human fibroblasts. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93(24): 13742-13747.

**ALLEN**, B. D.; BARKER, A. J.; GABBOUR, M.; MARKL, M.; RIGSBY, C.; ROBINSON, J. D. (2013) Aortic coarctation augments changes in thoracic aortic hemodynamics in pediatric and young adult patients with bicuspid aortic valve. *Journal of Cardiovascular Magnetic Resonance*, 15(supl.1): P300.

**ANACAK**, G. Y.; CATRAVAS, J. D. (2006) Nitric oxide and the endothelium: history and impact in cardiovascular disease, *Vascular Pharmacology*, 45: 268-276.

**ANDERSON**, T. J. (1999) Assessment and treatment of endothelial dysfunction in humans. *Journal of the American College of Cardiology*, 34(3): 631-8.

**ANNAPURNA**, A.; REDDY, C. S.; AKONDI, R. B.; RAO, S. R. C. (2009) Cardioprotective actions of two bioflavonoids, quercetin and rutin, in experimental myocardial infarction in both normal and streptozotocin-induced type I diabetic rats. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 61(10): 1365-1374.

**ANTER, E.;** CHEN, K.; SHAPIRA, O. M.; KARAS, R. H.; KEANEY, J. F. (2005) p38 mitogen-activated protein kinase activates eNOS in endothelial cells by an estrogen receptor  $\alpha$ -dependent pathway in response to black tea polyphenols. *Circulation Research*, DOI: 10.1161/01.RES.0000168807.63013.56.

**ARCE-ESQUIVEL, A. A.;** BUNKER, A. K.; MIKUS, C. R.; LAUGHLIN, M. H. (2013) Insulin Resistance and Endothelial Dysfunction: Macro and Microangiopathy. <http://dx.doi.org/10.5772/56475>.

**AUGUSTIN, H. G.;** KOZIAN, D. H.; JOHNSON, R. C. (1994) Differentiation of endothelial cells: analysis of the constitutive and activated endothelial cell phenotypes. *Bioessays*, 16(12): 901-906.

**BAI, H.;** GAO, Y.; HOYLE, D. L.; CHENG, T.; WANG, Z. Z. (2016) Suppression of transforming growth factor- $\beta$  signaling delays cellular senescence and preserves the function of endothelial cells derived from human pluripotent stem cells. *Stem Cells Translational Medicine*, 5: 1-12.

**BALLIGAND, J. L.;** FERON, O.; DESSY, C. (2009) eNOS activation by physical forces: from short-term regulation of contraction to chronic remodeling of cardiovascular tissues. *Physiological Review*, 89: 481-534.

**BARROS, G. S. G.;** MATOS, F. J. A.; VIEIRA, J. E. V.; SOUSA, M. P.; MEDEIROS, M. C. (1970) Pharmacological screening of some Brazilian plants. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 22:116-122.

**BASSANEZE, V.;** MIYAKAWA, A. A.; KRIEGER, J. E. (2008) A quantitative chemiluminescent method for studying replicative and stress-induced premature senescence in cells cultures. *Analytical Biochemistry*, 372: 198-203.

**BD-Pharmingen™** (2016) Technical data sheet. FITC Annexin V. Disponível em <http://wwwbdbiosciences.com/ds/pm/tds/556419.pdf>. Acesso em 06/2016.

**BEN-PORATH, I.;** WEINBERG, R. A. (2005) The signals and pathways activating cellular senescence. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 37: 961-976.

**BOSCOLO**, O. H.; MENDONÇA-FILHO, R. F. W.; MENEZES, F. S.; SENNA-VALLE, L. (2007) Potencial antioxidante de algumas plantas de restinga citadas como medicinais. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, 9(1): 8-12.

**BOSCOLO**, O. H.; VALLE, L. S. (2008) Plantas de uso medicinal em Quissamã, Rio de Janeiro, Brasil. *Iheringia*, 63(2): 263-277.

**BRACA**, A.; POLITI, M.; SANOGO, R.; SANOU, H.; MORELLI, I.; PIZZA, C.; TOMMASI, N. (2003) Chemical composition and antioxidant activity of phenolic compounds from wild and cultivated *Sclerocarya birrea* (Anacardiaceae) leaves. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51: 6689-6695.

**BRANDÃO**, V.; CRISTINA, A.; GONÇALVES, B. (2006) Brasil inovador: o desafio empreendedor: 40 histórias de sucesso de empresas que investem em inovação coordenação, Brasília, DF, Brasil, 37-39.

**BRASIL** (2011) Ministério da Saúde: Plano de Ações Estratégicas para o enfrentamento das doenças crônicas não transmissíveis (DCNT) no Brasil 2011-2022 / Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Análise de Situação de Saúde. – Brasília: Ministério da Saúde, 2011. 160 p.: il. – (Série B. Textos Básicos de Saúde).

**BRYAN**, R. M.; YOU, J.; GOLDING, E. M.; MARRELLI, S. P. (2005) Endothelium-derived hyperpolarizing factor. *Anesthesiology*, 102: 1261-77.

**BUETLER**, T. M.; KRAUSKOPF, A.; RUEGG, U. T. (2004) Role of superoxide as a signaling molecule. *News in Physiological Science*, 19: 120-123.

**BURGER**, D.; KWART, D. G.; MONTEZANO, A. C.; READ, N. C.; KENNEDY, C. R. J.; THOMPSON, C. S.; TOUYZ, R. M. (2012) Microparticles induce cell cycle arrest through redox-sensitive processes in endothelial cells: implications in vascular senescence. *Journal American Heart Association*, 1:e001842.

**BUSSE**, R.; EDWARDS, G.; FELETOU, M.; FLEMING, I.; VANHOUTE, P. M.; WESTON, A. H. (2002) EDHF: bringing the concepts together. *Trends in Pharmacology Science*, 23: 374-380.

**CAI**, H.; LI, Z.; DAVIS, M. E.; KANNER, W.; HARRISON, D. G.; DUDLEY, S. C. (2003) Akt-dependent phosphorylation of serine 1179 and mitogen-activated

protein kinase kinase/extracellular signal-regulated kinase 1/2 cooperatively mediate activation of the endothelial nitric-oxide synthase by hydrogen peroxide. *Molecular Pharmacology*, 63(2): 325-331.

**CAI, Y.;** SUN, M.; XING, J.; LUO, Q.; CORKE, H. (2006) Structure–radical scavenging activity relationships of phenolic compounds from traditional Chinese medicinal plants. *Life Sciences*, 78: 2872-2888.

**CALABRESE, V.;** MANCUSO, C.; CALVANI, M.; RIZZARELLI, E.; BUTTERFIELD, D. A.; STELLA, A. M. G. (2007) Nitric oxide in the central nervous system: neuroprotection versus neurotoxicity. *Nature Reviews: Neuroscience*, v. 8, p. 766-775.

**CALDERONE, V.;** CHERICONI, S.; MARTINELLI, C.; TESTAI, L.; NARDI, A.; MORELLI, I.; BRESCHI, M. C.; MARTINOTTI, E. (2004) Vasorelaxing effects of flavonoids: investigation on the possible involvement of potassium channels. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacology*, 370: 290-298.

**CAMPISI, J.;** FAGAGNAF., F. (2007) Cellular senescence: when bad things happen to good cells. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 8: 729-740.

**CARRIZO, A.;** PUCA, A.; DAMATO, A.; MARINO, M.; FRANCO, E.; POMPEO, F.; TRAFICANTE, A.; CIVITILLO, F.; SANTINI, L.; TRIMARCO, V.; VECCHIONE, C. (2013b) Resveratrol improves vascular function in patients with hypertension and dyslipidemia by modulating NO metabolism. *Hypertension*, 62(2): 359-366.

**CARRIZO, A.;** FORTE, M.; DAMATO, A.; TRIMARCO, V.; SALZANO, F.; BARTOLO, M.; MACIAG, A.; PUCA, A. A.; VECCHIONE, C. (2013a) Antioxidant effects of resveratrol in cardiovascular, cerebral and metabolic diseases. *Food and Chemical Toxicology*, 61: 215-226.

**CHATTERJEE, A.;** CATRAVAS, J. D. (2008) Endothelial nitric oxide (NO) and its pathophysiologic regulation. *Vascular Pharmacology*, 49: 134-140.

**CHEN, J.;** HUANG, X.; HALICKA, D.; BRODSKY, S.; AVRAM, A.; ESKANDER, J.; BLOOMGARDEN, N. A.; DARZYNKIEWICZ, Z.; GOLIGORSKY, M. S. (2006) Contribution of p16<sup>INK4a</sup> and p21<sup>CIP1</sup> pathways to induction of premature senescence of human endothelial cells: permissive role of p53.

American Journal of Physiology. Heart Circulation and Physiology, 290: H1575-H1586.

**CHEN, Z.;** KONG, S.; SONG, F.; LI, L.; JIANG, H. (2012) Pharmacokinetic study of luteolin, apigenin, chrysoeriol and diosmetin after oral administration of Flos Chrysanthemi extract in rats. *Fitoterapia*, 83(8): 1616-1622.

**CHILDS, B. G.;** DURIK, M.; BAKER, D. J.; van DEURSEN, J. M. (2015) Cellular senescence in aging and aged-related disease: from mechanisms to therapy. *Nature Medicine*, 21(12): 1424-1435.

**CINES, D. B.;** POLLAK, E. S.; BUCK, C. A.; LOSCALZO, J.; ZIMMERMAN, G. A.; McEVER, R. P.; POBER, J. S.; WICK, T. M.; KONKLE, B. A.; SCHWARTZ, B. S.; BARNATHAN, E. S.; McCRAE, K. R.; HUG, B. A.; SCHMIDT, A. M.; STERN, D. M. (1998) Endothelial cells in physiology and in the pathophysiology of vascular disorders. *Blood*, 91(10): 3527-3561.

**CLARK, J. F.;** PYNE-GEITHMAN, G. (2005) Vascular smooth muscle function: The physiology and pathology of vasoconstriction. *Pathophysiology*, 12: 35-45.

**COELHO-FERREIRA, M.** (2009) Medicinal knowledge and plant utilization in an Amazonian coastal community of Marudá, Pará State (Brazil). *Journal of Ethnopharmacology*, 126: 159-175.

**CONSOLINI, A. E.;** SARUBBIO, M. G. (2002) Pharmacological effects of *Eugenia uniflora* (Myrtaceae) aqueous crude extract on rat's heart. *Journal of Ethnopharmacology*, 81: 57-63.

**COPPÉ, J. P.;** PATIL, C. K.; RODIER, F.; SUN, Y.; MUNÓZ, D. P.; GOLDSTEIN, J.; NELSON, P. S.; DESPREZ, P. Y.; CAMPISI, J. (2008) Senescence-associated secretory phenotypes reveal cell-nonautonomous functions of oncogenic RAS and the p53 tumor suppressor. *Plos Biology*, 6(12): e301.

**CORADA, M.;** MORINI, M. F.; DEJANA, E. (2014) Signaling pathways in the specification of arteries and veins. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology*, 34: 2372-2377.

**CORREIA, S. J.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P.; CHAI, H. B.; PEZZUTO, J. M.; CORDELL, G. A. (2001)** Alkyl phenols and derivatives from *Tapirira obtusa*. *Phytochemistry*, 56: 781-784.

**CORREIA, S. J.; DAVID, J. M.; SILVA, E. P.; DAVID, J. P.; LOPES, L. M. X.; GUEDES, M. L. S. (2008)** Flavonóides, norisoprenóides e outros terpenos das folhas de *Tapirira guianensis*. *Química Nova*, 31 (8): 2056-2059.

**CORREIA, S. J.; DAVID, J. M.; SILVA, E. P.; DAVID, J. P.; LOPES, L. M. X.; GUEDES, M. L. S. (2008)** Flavonoides, norisoprenóides e outros terpenos das folhas de *Tapirira guianensis*. *Química Nova*, 31 (8): 2056-2059.

**CORREIA, S. J.; DAVID, J. P.; DAVID, J. M. (2003)** Constituintes das cascas de *Tapirira guianensis* (ANACARDIACEAE). *Química Nova*, 26 (1): 36-38.

**CORREIA, S. J.; DAVID, J. P.; DAVID, J. M. (2006)** Metabólitos secundários de espécies de Anacardiaceae. *Química Nova*, 29 (6): 1287-1300.

**COSSON, E.; HERISSE, M.; LAUDE, D.; THOMAS, F.; VALENSI, P.; ATTALI, J. R.; SAFAR, M. E.; DABIRE, H. (2007)** Aortic stiffness and pulse pressure amplification in Wistar-Kyoto and spontaneously hypertensive rats. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory*, 292: H2506-H2512.

**DAVID, J. M.; CHÁVEZ, J. P.; CHAI, H. B.; PEZZUTO, J. M.; CORDELL, G. A. (1998)** Two new cytotoxic compounds from *Tapirira guianensis*. *Journal of Natural Products*, 61: 287-289.

**DIMRI, G. P.; LEE, X.; BASILE, G.; ACOSTA, M.; SCOTT, G.; ROSKELLEY, C.; MEDRANOS, E. E.; LINSKENS, M.; RUBELJ, I.; PEREIRA-SMITH, O.; PEACOCKE, M.; CAMPISI, J. (1995)** A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 92: 9363-9367.

**DONATO, A. J.; MORGAN, R. G.; WALKER, A. E.; LESNIEWSKI, L. A. (2015)** Cellular and molecular biology of aging endothelial cells. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 89: 122-135.

**DUARTE, J.; PÉREZ-VIZCAÍNO, F.; ZARZUELO, A.; JIMÉNEZ, J.; TAMARGO, J. (1993)**. *European Journal of Pharmacology*, 239: 1-7.

**EDWARDS, G.;** FÉLÉTOU, M.; WESTON, A. H. (2010) Endothelium-derived hyperpolarizing factors and associated pathways: a synopsis. *European Journal of Biochemistry*, 459: 863-879.

**EMENDÖRFER, F.;** EMENDÖRFER, F.; BELLATO, F.; NOLDIN, V. F.; NIERO, R.; CECHINEL-FILHO, V. (2005) Evaluation of the relaxant action of some Brazilian medicinal plants in isolated guinea-pig ileum and rat duodenum. *Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 8: 63-68.

**ERBEL, R.** (2001) Diseases of the thoracic aorta. *Heart*, 86: 227-234.

**ESTEVES, F. A.** (2011) Do índio goitacá à economia do petróleo: uma viagem pela história e ecologia da maior restinga protegida do Brasil. Campos dos Goytacazes (RJ): Essencia Editora, 231 p.

**EVANS, D. H.;** GUNDERSON, M. P. (1998) A prostaglandin, not NO, mediates endothelium-dependent dilation in ventral aorta of shark (*Squalus acanthias*). *American Physiological Society*, R1050:R1057.

**EVGENOV, O. V.;** PACHER, P.; SCHMIDT, P. M.; HASHO, G.; SCHMIDT, H. H. W.; STASCH, J. P. (2006) NO-independent stimulators and activators of soluble guanylate cyclase: discovery and therapeutic potential. *Nature*, 5: 755-768.

**EVORA, P. R. B.;** CABLE, D. G.; CHUA, Y. L.; RODRIGUES, A. J.; PEARSON, P. J.; SCHAFF, H. V. (2007) Nitric oxide and prostacyclin-dependent pathways involvement on *in vitro* induced hypothermia. *Cryobiology*, 54: 106-113.

**FAN, Y.;** CHEN, Z.; GUO, Y.; WANG, Q.; SONG, B. (2011) Cellular mechanisms underlying Hyperin-induced relaxation of rat basilar artery. *Fitoterapia*, 82: 626-631.

**FELETOU, M.;** KOHLER, R.; VANHOUTTE, P. M. (2010) Endothelium-derived vasoactive factors and hypertension: possible roles in pathogenesis and as treatment targets. *Current Hypertension Reports*, 12: 267-275.

**FÉLÉTOU, M.;** KÖHLER, R.; VANHOUTTE, P. M. (2010) Endothelium-derived vasoactive factors and hypertension: possible roles in pathogenesis and as treatment targets. *Current Hypertension Reports*, 12: 267-275.

**FELETOU**, M.; VANHOUTTE, P. M. (2006) Endothelial dysfunction: a multifaceted disorder. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology*, 291(3): H985-H1002.

**FÉLÉTOU**, M.; VANHOUTTE, P. M. (2006) Endothelial-dysfunction: a multifaceted disorder. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 291: H985-H1002.

**FÉLÉTOU**, M.; VANHOUTTE, P. M. (2009) EDHF: an update. *Clinical Science*, 117(4): 139-55.

**FERRARI**, E.; TAILLAN, B.; DRAI, E.; MORAND, P.; BAUDOY, M. (1998) Investigation of the thoracic aorta in cholesterol embolism by transoesophageal echocardiography. *Heart*, 79: 133-136.

**FISH**, J. E.; WYTHER, J. D. (2015) The molecular regulation of arteriovenous specification and maintenance. *Developmental Dynamics*, 244: 391-409.

**FÖRSTERMANN**, U.; MULSCH, A.; BOHME, E.; RUSSE, R. (1986) Stimulation of soluble guanylate cyclase by an acetylcholine-induced endothelium-derived factor from rabbit and canine arteries. *Circulation Research*, 58: 531-538.

**FUGITA**, S.; ROERIG, D. L.; BOSNJAK, Z. J.; STOWE, D. F. (1998) Effects of vasodilators and perfusion pressure on coronary flow and simultaneous release of nitric oxide from guinea pig isolated hearts. *Cardiovascular Research*, 38: 655-667.

**FURCHGOTT**, R. F.; VANHOUTTE, P. M. (1989) Endothelium-derived relaxing and contracting factors. *The FASEB Journal*, 3:2007-2018.

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

**FÖRSTERMAN**, U. (2010) Nitric oxide and oxidative stress in vascular disease. *Pflügers Archiv. European Journal of Physiology*, 459: 923-939.

**FÖRSTERMAN**, U.; SESSA, W. C. (2012) Nitric oxide synthase: regulation and function. *European Heart Journal*, 33: 829-837.



**GALON**, M. Z.; **TAKIMURA**, C. K.; **CHAVES**, M. J. F.; **CAMPOS**, J. C.; **GUTIERREZ**, P. S.; **LAURINDO**, F. R. M.; **FILHO**, R. K.; **NETO**, P. A. L. (2013). Porcine model for the evaluation and development of catheter-based coronary devices: an essential preclinical tool. *Revista Brasileira de Cardiologia Invasiva*, 21(4): 378-83.

**GAO**, D.; **XU**, M.; **YANG**, C.; **XU**, M.; **ZHANG**, Y. (2010) Phenolic antioxidants from the leaves of *Camellia pachyandra* Hu. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58: 8820-8824.

**GARLAND**, C. J.; **HILEY**, C. R.; **DORA**, K. A. (2011). EDHF: spreading the influence of the endothelium. *British Journal of Pharmacology*, 164: 839-852.

**GHAYUR**, M. N.; **KHAN**, H.; **GILANI**, A. H. (2007) Antispasmodic, bronchodilator and vasodilator activities of (+)-catechin, a naturally occurring flavonoid. *Archives of Pharmacal Research*, 30(8): 970-975.

**GIULIETTI**, A. M.; **HARLEY**, R. M.; **QUEIROZ**, L. P.; **WANDERLEY**, M. G. L.; **BERG**, C. V. D. (2005) Biodiversidade e conservação de plantas no Brasil. *Megadiversidade*, 1(1): 52-61.

**GOODMAN**, S. L. (1999) Sheep, pig, human platelet-material interactions with model cardiovascular biomaterials. *Journal of Biomedical Material Research*, 45(3): 240-50.

**GOTO**, H.; **SHMADA**, Y.; **AKECHI**, Y.; **KOHTA**, K.; **HATTORI**, M.; **TERASAWA**, K. (1996) Endothelium-dependent vasodilator effect of extract prepared from roots of *Paeonia lactiflora* on isolated rat aorta. *Planta Medica*, 62: 436-439.

**GRAGG**, G. M.; **NEWMAN**, D. J. (2013) Natural products: a continuing source of novel drugs leads. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1830(6): 3670-95.

**GRASSI**, D.; **DESIDERI**, G.; **FERRI**, C. (2010) Flavonoids: antioxidants against atherosclerosis. *Nutrients*, 2(8): 889-902.

**HALL**, J. E. (2011) *Gyton & Hall: Tratado de fisiologia médica*. Elsevier: Rio de Janeiro, 12 ed., 1151 p.

**HARA, E.; SMITH, R.; PARRY, D.; TAHARA, H.; STONE, S.; PETERS, G.** (1996) Regulation of p16 $CDKN2$  expression and its implications for cell immortalization and senescence. *Molecular and Cellular Biology*, 16(3): 859-867.

**HARVEY, A.; MONTEZANO, A. C.; TOUYZ, R. M.** (2015) Vascular biology of ageing—Implications in hypertension. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 83: 112-121.

**HAYASHI, T.; MATSUI-HIRAI, H.; MIYAZAKI-AKITA, A.; FUKATSU, A.; FUNAMI, J.; DING, Q.; KAMALANATHAN, S.; HATTORI, Y.; IGNARRO, L. J.; IGUCHI, A.** (2006) Endothelial cellular senescence is inhibited by nitric oxide: Implications in atherosclerosis associated with menopause and diabetes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(45): 17018-23.

**HAYASHI, T.; YAMAGUCHI, T.; SAKAKIBARA, Y.; TAGUCHI, K.; MAEDA, M.; KUZUYA, M.; HATTORI, Y.** 2014. *Plos One*, 9(2): e88391.

**HAYFLICK, L.; MOORHEAD, P. S.** (1961) The serial cultivation of human diploid cell strains. *Experimental Cell Research*, 25: 585-621.

**HECKER, M.** (2000) Endothelium-derived hyperpolarizing factor – fact or fiction? *News Physiology Sciences*, 15.

**HECKER, M.** (2000) Endothelium-derived hyperpolarizing factor – fact or fiction? *News in Physiological Sciences*, 15: 1-5.

**HEISS, C. et al.** (2015) Impact of cocoa flavanol intake on age dependent vascular stiffness in healthy men: a randomized, controlled, double-masked trial. *Age*, 37: 56.

**HU, Z.; CHEN, J.; WEI, Q.; XIA, Y.** (2008) Bidirectional actions of hydrogen peroxide on endothelial nitric oxide synthase phosphorylation and function: co-commitment and interplay of Akt and AMPK. *The American Society for Biochemistry and Molecular Biology*, disponível em : <http://www.jbc.org/content/early/2008/07/10/jbc.M802455200.full.pdf>.

**HUANG**, W.; WAN, C.; ZHOU, S. (2013) Quercetin – a flavonoid compound from *Sarcopyramis bodinieri* var *delicate* with potential apoptotic activity in HepG2 liver cancer cells. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 12(4): 529-533.

**HUANG**, P.; RIORDAN, S. M.; HERUTH, D. P.; GRIGORYEV, D. N.; ZHANG, L. Q.; YE, S. Q. (2015) A critical role of nicotinamide phosphoribosyltransferase in human telomerase reverse transcriptase induction by resveratrol in aortic smooth muscle cells. *Oncotarget*, 6(13): 10812-10824.

**HUBER**, L. S.; RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. (2008) Flavonóis e flavonas: fontes que influenciam a composição em alimentos. *Alimentos e Nutrição*, Araraquara, 19(1): 97-108.

**HUSSAIN**, T.; TAN, B.; YIN, Y.; BLACHIER, F.; TOSSOU, M. C. B.; RAHU, N. (2016) Oxidative stress and inflammation: what polyphenols can do for us? *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, doi.org/10.1155/2016/7432797.

**IADECOLA**, C. (1997) Bright and dark sides of nitric oxide in ischemic brain injury. *Trends Neuroscience*, v. 20, p. 132-139.

**IMANISHI**, T.; TSUJIOKA, H.; AKASAKA, T. (2008) Endothelial progenitor cells dysfunction and senescence: contribution to oxidative stress. *Current Cardiology Reviews*.

**JAFFE**, E. A. (1987) Cell biology of endothelial cell. *Human Pathology*, 18(3): 234-239.

**JAMAL**, J.; MUSTAFA, M. R.; WONG, P. (2014) Paeonol protects against premature senescence in endothelial cells by modulating Sirtuin 1 pathway. *Journal of Ethnopharmacology*, doi.org/10.1016/j.jep.2014.04.025i.

**JIANG**, H.; CAI, J.; XU, J.; ZHOU, X.; XIA, Q. (2005) Endothelium-dependent and direct relaxation induced by ethyl acetate extract from *Flos Chrysanthemi* in rat thoracic aorta. *Journal of Ethnopharmacology*, 101: 221-226.

**JIMÉNEZ**, G.; HASEGAWA, M.; RODRÍGUEZ, M.; ESTRADA, O.; MÉNDEZ, J.; CASTILLO, A.; GONZALEZ-MUJICA, F.; MOTTA, N.; VÁSQUEZ, J.; ROMERO-VECCHIONE, E. (2001) Biological screening of plants of the Venezuelan Amazons. *Journal of Ethnopharmacology*, 77:77-83.

**JIMENEZ**, R.; LOPEZ-SEPULVEDA, R.; ROMERO, M.; TORAL, M.; COGOLLUDO, A.; PEREZ-VIZCAINO, F.; DUARTE, J. (2015) Quercetin and its metabolites inhibit the membrane NADPH oxidase activity in vascular smooth muscle cells from normotensive and spontaneously hypertensive rats. *Food and Function*, 6: 409-414.

**JOHNSON**, M.; DIMITROV, D.; VOJTA, P. J.; BARRETT, J. C.; NODA, A.; PEREIRA-SMITH, O. M.; SMITH, J. R. (1994) Evidence for a p53-independent pathway for upregulation of *SD//C/PI/ WAF Vp2 I* RNA in human cells. *Molecular Carcinogenesis*, 11: 59-64.

**JUNQUEIRA**, L. C. U.; CARNEIRO, J. *Histologia Básica*. 10<sup>a</sup> Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. 489 p.

**KAEBERLEIN**, M. (2013) Longevity and aging. *F1000 Prime Reports*, 5:5.

**KANG**, D. G.; MOON, M. K.; CHOI, D. H.; LEE, J. K.; KWON, T. O.; LEE, H. S. (2005) Vasodilatory and anti-inflammatory effects of the 1,2,3,4,6-penta-O-galloyl- $\beta$ -D-glucose (PGG) via a nitric oxide-cGMP pathway. *European Journal of Pharmacology*, 524: 111-119.

**KHALIL**, R. A. (2013) Estrogen, vascular estrogen receptor and hormone therapy in postmenopausal vascular disease. *Biochemical Pharmacology*, 86(12): 1627-1642.

**KHALIL**, R. A. (2010) Potential approaches to enhance the effects of estrogen on senescent blood vessels and postmenopausal cardiovascular disease. *Cardiovascular & Hematological Agents in Medicinal Chemistry*, 8(1): 29-46

**KHEMAIS-BENKHIAT**, S.; IDRIS-KHODJA, N.; RIBEIRO, T. P.; SILVA, G. C.; ABBAS, M.; KHELOUFI, M.; LEE, J.; TOTI, F.; AUGER, C.; SCHINI-KERTH, V. B. (2015) The redox-sensitive induction of the local angiotensin system promotes both premature and replicative endothelial senescence: preventive effect of a standardized *Crataegus* extract. *Journals of Gerontology: Biological Sciences*, 00(00): 1-10.

**KIM**, J. K.; LEVIN, E. R. (2006) Estrogen signaling in the cardiovascular system. *Nuclear Receptor Signaling*, 4: e013.

**KLINGE**, C. M.; **BLANKENSHIP**, K. A.; **RISINGER**, K. E. (2005) Resveratrol and estradiol rapidly activate MAPK signaling through estrogen receptors  $\alpha$  and  $\beta$  in endothelial cells. *The Journal of Biological Chemistry*, 280(9): 7460-7468.

**KOEPPEN**, B. M.; **STANTON**, B. A. (2009) *Berne & Levy: Fisiologia*. Elsevier: Rio de Janeiro, 6 ed., 844 p.

**KOSHLAND**, D. E. (1992) The molecule of the year. *Science*, v. 258, p. 1861.

**KOTSIS**, V.; **STABOULI**, S.; **KARAFILLIS**, I.; **NILSSON**, P. (2011) Early vascular aging and the role of central blood pressure. *Journal of Hypertension*, 29: 1847-1853.

**KOVACIC**, J. C.; **MORENO**, P.; **NABEL**, E. G.; **HACHINSKI**, V.; **FUSTER**, V. (2011) Cellular senescence, vascular disease, and aging part 2 of a 2-part Review: clinical vascular disease in the elderly. *Circulation*, 123: 1900-1910.

**KUILMAN**, T.; **MICHALOGLOU**, C.; **MOOI**, W. J.; **PEEPER**, D. S. (2010) *Genes & Development*, 24: 2463-2479.

**KUIPER**, G. G. J. M.; **LEMMEN**, J. G.; **CARLSSON**, B.; **CORTON**, J. C.; **SAFE**, S. H.; **SAAG**, P. T.; **BURG**, B.; **GUSTAFSSON**, J. (1998) Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with estrogen receptor  $\beta$ . *Endocrinology*, 139(10).

**KURZ**, D. J.; **DECARY**, S.; **HONG**, Y.; **ERULIMSKY**, J. D. (2000) Senescence-associated  $\beta$ -galactosidase reflects an increase in lysosomal mass during replicative ageing of human endothelial cells. *Journal of Cell Science*, 113: 3613-3622.

**KURZ**, D. J.; **DECARY**, S.; **HONG**, Y.; **TRIVIER**, E.; **AKHMEDOV**, A.; **ERUSALIMSKY**, J. D. (2004) Chronic oxidative stress compromises telomere integrity and accelerates the onset of senescence in human endothelial cells. *Journal of Cell Science*, 117: 2417-2426.

**LEDOUX**, J.; **WERNER**, M. E.; **BRAYDEN**, J. E.; **NELSON**, M. T. (2006) Calcium-activated potassium channels and the regulation of vascular tone. *Physiology*, 21: 69-79.

**LEE**, B. Y.; HAN, J. A.; IM, J. S.; MORRONE, A.; JOHUNG, K.; GOODWIN, E. C.; KLEIJER, W. J.; DIMAIO, D.; HWANG, E. S. (2006) Senescence-associated  $\beta$ -galactosidase is lysosomal  $\beta$ -galactosidase.

**LEE**, T.; LIU, D.; HU, F.; WU, W.; HOU, W. (2005) Structure-activity relationships of five myricetin galloylglycosides from leaves of *Acacia confusa*. Botanical Studies, disponível em: research.net, acesso em: 09/2016.

**LI**, A.; LI, S.; ZHANG, Y.; XU, X.; CHEN, Y.; LI, H. (2014) Resources and biological activities of natural polyphenols. Nutrients, 6: 6020-6047.

**LIBBY**, P. (2001) Current concepts of the pathogenesis of the acute coronary syndromes. Circulation, 104: 365-372.

**LISMONT**, C.; NORDGREN, M.; VELDHOVEN, P. P. V.; FRANSEN, M. (2015) Redox interplay between mitochondria and peroxisomes. Frontiers in Cell and Developmental Biology, 3, article 35.

**LIU**, J.; HU, F.; TSAI, J.; CHAN, P.; LIU, J. Y.; THOMAS, G. N.; TOMLINSON, B.; LO, M.; LIN, J. (2003) Antihypertensive effects of tannins isolated from traditional Chinese herbs as non-specific inhibitors of angiotensin converting enzyme. Life Sciences, 73: 1543-1555.

**LIU**, L.; XU, D.; CHENG, Y. (2008) Distinct effects of narigenin and hesperetin on nitric oxide production from endothelial cells. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 56(3): 824-829.

**LOPES**, R. M.; OLIVEIRA, T. T.; NAGEM, T. J.; PINTO, A. S. Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento, disponível em [http://www.biotecnologia.com.br/revista/bio17/17\\_f.pdf](http://www.biotecnologia.com.br/revista/bio17/17_f.pdf), acesso em 10/03/16.

**LÓPES-OTIN**, C.; BLASCO, M. A.; PARTRIDGE, L.; SERRANO, M.; KROEMER, G. (2013) The hallmarks of aging. Cell, 153: 1194: 1217.

**LOWENSTEIN**, C. J.; DINERMAN, J. L.; SNYDER, S. H. (1994) Nitric oxide: a physiologic messenger. Annals of Internal Medicine, v. 120, p. 227-237.

**LUCAS**, K. A. *et al.* (2000) Guanylyl cyclases and signaling by cyclic GMP. Pharmacological Reviews, 52: 375-413.

**LUM**, H.; ROEBUCK, K. A. (2001) Oxidant stress and endothelial cell dysfunction. *The American Physiology Society*, 280: C719-C741.

**LUNA-VÁZQUEZ**, F.; IBARRA-ALVARADO, C.; ROJAS-MOLINA, A.; ROJAS-MOLINA, I.; ZAVALA-SÁNCHEZ, M. A. (2013) Vasodilator compounds derived from plants and their mechanisms of action. *Molecules*, 18: 5814-5857.

**MAESO**, R.; RODRIGO, E.; MUÑOZ-GARCIA, R.; NAVARRO-CID, J.; RUILOPE, L. M.; CACHOFEIRO, V.; LAHERA, V. (1998). *Journal of Hypertension*, 16(5): 665-72.

**MENDELSON**, M. E. (2002) Genomic and nongenomic effects of estrogen in the vasculature. *The American Journal of Cardiology*, 90(1): F3-F4.

**MINAMINO**, T.; KOMURO, I. (2007) Vascular cell senescence. Contribution of atherosclerosis. *Circulation Research*, 100: 15-26.

**MMA**, Ministério do Meio Ambiente – Secretaria de Biodiversidade e Florestas (2002) Biodiversidade brasileira: avaliação e identificação de áreas e ações prioritárias para a conservação, utilização sustentável e repartição dos benefícios da biodiversidade nos biomas brasileiros, Brasília, DF, p. 12.

**MOISÉIS**, V. A.; FERREIRA, R. L.; NOZAWA, E.; KANASHIRO, R. M.; CAMPOS, O.; ANDRADE, J. L.; CARVALHO, A. C. C.; TUCCI, P., J. F. (2000) Aspectos estruturais e funcionais de ratos com e sem infarto do miocárdio. Experiência inicial com ecocardiografia doppler. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*, 75(2): 125-130.

**MONTEZUMA**, R. C. M.; ARAUJO, D. S. D. (2007) Estrutura da vegetação de uma restinga arbustiva inundável no Parque Nacional da Restinga de Jurubatiba, Rio de Janeiro. *Pesquisas, Botânica*, 58: 157-176.

**NAKAMURA**, Y.; MATSUMOTO, H.; TADOKI, K. (2002) Endothelium-dependent vasorelaxation induced by black currant concentrate in rat thoracic aorta. *The Japanese Journal of Pharmacology*, 89: 29-35.

**NASCIMENTO**, J. C.; LAGE, L. F. O.; CAMARGOS, C. R. D.; AMARAL, J. C.; COSTA, L. M.; SOUSA, A. N.; OLIVEIRA, F. Q. (2011) Determinação da atividade antioxidante pelo método DPPH e doseamento de flavonoides totais

em extratos de folhas da *Bauhinia variegata* L.. Revista Brasileira e Farmácia, 92(4): 327-332.

**NASEEM**, K. M. (2005) The role of nitric oxide in cardiovascular diseases. Molecular Aspects of Medicine, 26 (1-2): 33-65.

**NATHAN**, C. (1997) Perspectives series: nitric oxide and nitric oxide synthases. Journal Clinical Investigation, v. 100, n. 10, p. 2417-2423.

**NAWWAR**, M. A. M.; **HUSSEIN**, S. A. M.; **MERFORT**, I. (1994) NMR spectral analysis of polyphenols from *Punica granatum*. Phytochemistry, 36(3): 793-798.

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

**NEWMANN**, D. J.; **CRAGG**, G. M. (2012) Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. Journal of Natural Products, 75: 311-335.

**NISHIDA**, S.; **SATOH**, H. (2009) Possible involvement of Ca<sup>2+</sup> activated K<sup>+</sup> channels, SK channel, in the quercetin-induced vasodilation. Korean J Physiology and Pharmacology, 13: 361-365.

**OH**, S.; **CHUNG**, K. (2004) Estrogenic activities of *Ginkgo biloba* extracts. Life Sciences, 74: 1325-1335.

**OHTANI**, N.; **YAMAKOSHI**, K.; **TAKAHASHI**, A.; **HARA**, E. (2004) The p16<sup>INK4a</sup>-RB pathway: molecular link between cellular senescence and tumor suppression. The Journal of Medical Investigation, 51: 146-153.

**PALMER**, R. M. J.; **REES**, D. D.; **ASHTON**, D. S.; **MONCADA**, S. (1988) L-arginine is the physiological precursor for the formation of nitric oxide in endothelium-dependent relaxation. Biochemical and Biophysical Research Communications, 153(3): 1251-1256.

**PÉREZ-VIZCAÍNO**, F.; **IBARRA**, M.; **COGOLLUDO**, A. L.; **DUARTE**, J.; **ZARAGOZA-ARNAEZ**, F.; **MORENO**, L.; **LÓPEZ-LÓPEZ**, G.; **TAMARGO**, J.



(2002) Endothelium-independent vasodilator effects of the flavonoid quercetin and its methylated metabolites in rat conductance and resistance arteries. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 302(1): 66-72.

**PONGPRAYOON**, U.; BAECKSTRÖM, P.; JACOBSSON, U.; LINDSTRÖM, M.; BOHLIN, L. (1991). Compounds inhibiting prostaglandin synthesis isolated from *Ipomoea pes-caprae*. *Planta Medica*, 57: 515-518.

**QIN**, M.; LUO, Y.; MENG, X.; WANG, M.; WANG, H.; SONG, S.; Y., J.; PAN, R.; P., R.; YAO, F.; WU, P.; SUN, G.; SUN, X. (2015) Myricitrin attenuates endothelial cell apoptosis to prevent atherosclerosis: an insight into PI3K/Akt activation and STAT3 signaling pathway. *Vascular Pharmacology*, 70: 23-34.

**RAIMUNDO**, J. M.; SUDO, R. T.; PONTES, L. B.; ANTUNES, F.; TRACHES, M. M.; SUDO, G. Z. (2006) In vitro and in vivo vasodilator activity of racemic tramadol and its enantiomers in Wistar rats. *European Journal of Pharmacology*, 530(1-2): 117-123.

**RAJENDRAN**, P.; RENGARAJAN, T.; THANGAVEL, J.; NISHIGAKI, Y.; SAKTHISEKARAN, D.; SETHI, G.; NISHIGAKI, I. (2013) The vascular endothelium and human diseases. *International Journal of Biological Sciences*, 9(10): 1057-1069.

**RATTMANN**, Y. D.; ANSELM, E.; KIM, J.; DAL-ROS, S.; AUGER, C.; MIGUEL, O. G.; SANTOS, A. R. S.; CHATAIGNEAU, T.; SCHINI-KERTH, V. B. (2010) Natural product extract of *Dicksonia sellowiana* induces endothelium-dependent relaxations by a redox-sensitive Src- and Akt-dependent activation of eNOS in porcine coronary arteries. *Journal of Vascular Research*, DOI: 10.1159/000336647.

**REGITZ-ZAGROSEK**, V. *et al.* (2011) ESC guidelines on the management of cardiovascular diseases during pregnancy. *European Heart Journal*, 32: 3147-3197.

**RIBEIRO**, T. P.; OLIVEIRA, A. C.; MENDES-JUNIOR, L. G.; FRANÇA, K. C.; NAKAO, L. S.; SCHINI-KERTH, V. B.; MEDEIROS, I. A. (2016) Cardiovascular effects induced by northeastern Brazilian red wine: role of nitric oxide and redox sensitive pathways. *Journal of Functional Foods*, 22: 82-92.

**ROBERTS**, R. E.; ALLEN, S.; CHANG, A. P.Y.; HENDERSON, H.; HOBSON, G. C.; KARANIA, B.; MORGAN, K. N.; PEK, A. S. Y.; RAGHVANI, K.; SHEE, C. Y.; SHIKOTRA, J.; STREET, E.; ABBAS, Z.; ELLIS, K.; HEER, J. K.; ALEXANDER, S. P. H. (2013) Distinct mechanisms of relaxation to bioactive components from chamomile species in porcine isolated blood vessels. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 272: 797-805.

**ROOS**, C. M. (2016) Chronic senolytic treatment alleviates established vasomotor dysfunction in aged or atherosclerotic mice. *Aging Cell*, 1-5.

**SALVAMANI**, S.; GUNASEKARAN, B.; SHAHARUDDIN, N. A.; AHMAD, S. A.; SHUKOR, M. Y. (2014) Antiatherosclerotic effects of plant flavonoids. *Biomed Research International*, 2014.

**SANDOVAL-ACUNA**, C.; FERREIRA, J.; SPEISKY, H. (2014) Polyphenols and mitochondria: An update on their increasingly emerging ROS-scavenging independent actions. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 559: 75-90.

**SANTOS**, M. A. S.; OLIVEIRA, M. M.; ANDRADE, S. S. C. A.; NUNES, M. L.; MALTA, D. C.; MOURA, L. (2015) Tendências da Morbidade Hospitalar por doenças crônicas não transmissíveis no Brasil, 2002 a 2012. *Epidemiologia e Serviços de Saúde*, 24 (3): 389-398.

**SCHMIDT**, M. I.; DUNCAN, B. B.; SILVA, G. A.; MENEZES, A. M.; MONTEIRO, C. A.; BARRETO, S. M.; CHOR, D.; MENEZES, P. R. (2011) Doenças crônicas não transmissíveis no Brasil: carga e desafios atuais. *The Lancet*, doi:10.1016/S0140-6736(11)60135-9. Disponível em [www.thelancet.com](http://www.thelancet.com). Acesso em: 03/2013.

**SCHNABEL**, R.; BLANKENBERG, S. (2007) Oxidative stress in cardiovascular disease: successful translation from bench to bedside? *Journal of the American Heart Association*, 116: 1338-1340.

**SEALS**, D. R.; JABLONSKI, K. L.; DONATO, A. J. (2011) Aging and vascular endothelial function in humans. *Clinical Sciences*, 120(9): 357-375.

**SEIDEL**, B.; STANARIUS, A.; WOLF, G. (1997) Differential expression of neuronal and endothelial nitric oxide synthase in blood vessels of the rat brain. *Neuroscience Letters*, v. 239, p. 109-112.

**SHIMOKAWA, H.** (2014) 2014 Williams Harvey lecture: importance of coronary vasomotion abnormalities – from bench to bedside. *European Heart Journal*, 35: 3180-3193.

**SHIMOKAWA, H.** (2014) 2014 Williams Harvey lecture: importance of coronary vasomotion abnormalities – from bench to bedside. *European Heart Journal*, 35: 3180-3193.

**SHRESTHA, S.; NATARAJAN, S.; PARK, J.; LEE, D.; CHO, J.; KIM, G.; JEON, Y.; YEON, S.; YANG, D.; BAEK, N.** (2013) Potential neuroprotective flavonoid-based inhibitors of CDK5/p25 from *Rhus parviflora*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 23: 5150-5154.

**SIKORA, E.; ARENDT, T.; BENNETT, M.; NARITA, M.** (2011) Impact of cellular senescence signature on ageing research. *Ageing Research Reviews*, 10: 146-152.

**SIOW, R. C. M.; LI, F. Y. L.; ROWLANDS, D. J.; WINTER, P.; MANN, G. E.** (2007) Cardiovascular targets for estrogens and phytoestrogens: transcriptional regulation of nitric oxide synthase and antioxidant defense genes. *Free Radical Biology and Medicine*, 42(7): 909-925.

**SOCESP**, (2007). SOCESPE 30 anos: instantes de sua história, 1997-2007. Barueri, SP: Minha Editora: Manole: SOCESP, 2007.

**SOUZA, C. D.; FELFILI, J. M.** (2006) Uso de plantas medicinais na região de Alto Paraíso de Goiás, GO, Brasil. *Acta Botânica Brasileira*, 20(1): 135-142.

**SPENCER, G.** (2012) Scientists compare rat genome with human, mouse. Analysis yields new insights into medical model, evolutionary process. Disponível em [www.genome.gov/11511308](http://www.genome.gov/11511308).

**STAFFORD, H. A.** (1991) Flavonoid evolution: an enzymic approach. *Plant Physiology*, 96(3): 680-685.

**STOCLET, J.; CHATAIGNEAU, T.; NDIAYE, M.; OAK, M.; BEDOUI, J.; CHATAIGNEAU, M.; SCHINI-KERTH, V. B.** (2004) Vascular protection by dietary polyphenols. *European Journal of Pharmacology*, 500: 299-313.

**SUN, C.;** FAN, S.; WANG, X.; LU, J.; ZHANG, Z.; WU, D.; SHAN, Q.; ZHENG, Y. (2015) Purple sweet potato color inhibits endothelial premature senescence by blocking the NLRP3 inflammasome. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 26(10): 1029-40.

**SUZUKI, Y.;** YEUNG, A. C.; IKENO, F. (2011) The representative porcine model for human cardiovascular disease. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, doi: 10.1155/2011/195483.

**TADEI, S.;** VIRDIS, A.; MATTEI, P.; GHIADONI, L.; SUDANO, I.; SALVETTI, A. (1996) Defective L-arginine-nitric oxide pathway in offspring of essential hypertensive patients. *Circulation*, 94: 1298-1303.

**TAPAS, A. R.;** SAKARKAR, D. M.; KAKDE, R. B. (2008) Flavonoids as nutraceuticals. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 7(3): 1089-1099.

**TCHKONIA, T.;** ZHU, Y.; DEURSEN, J.; CAMPISI, J.; KIRKLAND, J. L. (2013) Cellular senescence and the senescent secretory phenotype: therapeutic opportunities. *The Journal of Clinical Investigation*, 123(3): 966-972.

**THOMAS, S. R.;** CHEN, K.; KEANEY, J. F. (2002) Hydrogen peroxide activates endothelial nitric-oxide synthase through coordinated phosphorylation and desphosphorylation via a phosphoinositide 3-kinase-dependent signaling pathway. *The Journal of Biological Chemistry*, 277(8): 6017-6024.

**TOTZECK, M.;** KELM, M.; RASSAF, T. (2011) Endothelial damage after resuscitation: reactive oxygen species as possible therapeutic targets. *Critical Care Medicine*, 39 (7): 1837-1838.

**TRIGGLE, C. R.;** SAMUEL, S. M.; RAVISHANKAR, S.; MAREI, I.; ARUNACHALAM, G.; DING, H. (2012) The endothelium: influencing vascular smooth muscle in many ways. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*, 90: 713-738.

**UNGVARI, Z.;** KALEY, G.; CABO, R.; SONNTAG, W. E.; CSISZAR, A. (2010) Mechanisms of vascular aging: new perspectives. *Journal of Gerontology*, 65A(10): 1028-1041.

**UNTERLUGGAUER, H.; HAMPEL, B.; ZWERSCHKE, W.; JANSEN-DURR, P.** (2003) Senescence-associated cell death of human endothelial cells: the role of oxidative stress. *Experimental Gerontology*, 38: 1149-1160.

**URAKAMI-HARASAWA, L.; SHIMOKAWA, H.; NAKASHIMA, M.; EGASHIRA, K.; TAKESHITA, A.** (1997) Importance of endothelium-derived hyperpolarizing factor in human arteries. *Journal of Clinical Investigation*, 100(11): 2793-2799.

**VALLANCE, P.; CHAN, N.** (2001) Endothelial function and nitric oxide: clinical relevance. *Heart*, 85: 342-350.

**VALLANCE, P.; COLLIER, J.; MONCADA, S.** (1989) Effects of endothelium-derived nitric oxide on peripheral arteriolar tone in man. *The Lancet*, 997-1000.

**VANHOUTTE, P. M.** (2009) Endothelial dysfunction. *Circulation Journal*, 73: 595-601.

**VANHOUTTE, P. M.; SHIMOKAWA, H.; TANG, E. H. C.; FELETOU, M.** (2009) Endothelial dysfunction and vascular disease. *Acta Physiologica*, 196: 193-222.

**VINCENT, V. A. M.; TILDERS, F. J. H.; DAM, A-M. V.** (1998) Production, regulation and role of nitric oxide in glial cells. *Mediators of Inflammation*, v. 7, p. 239-255.

**VIRDIS, A.; SANTINI, F.; COLUCCI, R.; DURANTI, E.; SALVETTI, G.; RUGANI, I.; SEGNANI, C.; ANSELMINO, M.; BERNARDINI, N.; BLANDIZZI, C.; SALVETTI, A.; PINCHERA, A.; TADDEI, S.** (2011) Vascular generation of tumor necrosis factor- $\alpha$  reduces nitric oxide availability in small arteries from visceral fat of obese patients. *Journal of the American College of Cardiology*, 58 (3): 238-47.

**WAGNER, H.; BLADT, S.** (1995) *Plant Drug Analysis: A thin layer chromatography atlas*. Berlin: Springer, 2 ed, 384 p.

**WAGNER, M.; HAMPEL, B.; BERNHARD, D.; HALA, M.; ZWERSCHKE, W.; JANSEN-DURR, P.** (2001) Replicative senescence of human endothelial cells in vitro involves G1 arrest, polyploidization and senescence-associated apoptosis. *Experimental Gerontology*, 36: 1327-1347.

**WEBER**, M. A. *et al.* (2013) Clinical practice guidelines for the management of hypertension in the community. A statement by the American Society of Hypertension and the International Society of hypertension. The Journal of Clinical Hypertension, doi: 10.1111/jch.12237.

**WHO** (2015) Global atlas on cardiovascular disease prevention and control. Disponível em: [www.who.int](http://www.who.int). Acesso em: 01/2016.

**WIDLANSKY**, M. E.; **GOKCE**, N.; **KEANEY**, J. F.; **VITA**, J. A. (2003) The clinical implications of endothelial dysfunction. Journal of the American College of Cardiology, 42(7): 1149-60.

**WINKEL-SHIRLEY**, B. (2001) Flavonoid biosynthesis. A colorful model for genetics, biochemistry, cell biology and biotechnology. Plant Physiology, 126(2): 485-493.

**WOUDE**, H.; **VELD**, M.; **JACOBS**, N.; **SAAG**, P. T.; **MURK**, A. J.; **RIETJENS**, I. M. C. M. (2005) The stimulation of cell proliferation by quercetin is mediated by the estrogen receptor. Molecular Nutrition & Food Research, 49(8): 763-771.

**WU**, J.; **XU**, X.; **LI**, Y.; **KOU**, J.; **HUANG**, F.; **LIU**, B.; **LIU**, K. (2014) Quercetin, luteolin and epigallocatechin gallate alleviate TXNIP and NLRP3-mediated inflammation and apoptosis with regulation of AMPK in endothelial cells. Molecular and Cellular Pharmacology, 745(15): 59-68.

[www.tropicos.org](http://www.tropicos.org). Acesso em 09/2013.

[www.zipcodezoo.com](http://www.zipcodezoo.com). Acesso em 09/2013.

**XIAO**, H. *et al.* (2009) Protective effects of kaempferol against endothelial damage by an improvement in nitric oxide production and a decrease in asymmetric dimethylarginine level. European Journal of Pharmacology, 616: 213-222.

**XIE**, Y.; **XU**, H.; **DONG**, H.; **FISCUS**, R. R.; **BUT**, P. P. H. (2007) Role of nitric oxide in the vasorelaxant and hypotensive effects of extracts and purified tannins from *Geum japonicum*. Journal of Ethnopharmacology, 109: 128-133.

**XU**, Y. C.; YEUNG, D. K. Y.; MAN, R. Y. K.; LEUNG, S. W. S. (2006) Kaempferol enhances endothelium-independent and dependent relaxation in the porcine coronary artery. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 287: 61-67.

**YANG**, H. H.; HWANGBO, K.; ZHENG, M. S.; CHO, J. H.; SON, J.; KIM, H. Y.; BAEK, S. H.; CHOI, H. C.; PARK, S. Y.; KIM, J. (2014b) Quercetin-3-O-b-D-glucuronide isolated from *Polygonum aviculare* inhibits cellular senescence in human primary cells. *Archives of Pharmacology Research*, 37: 1219-1233.

**YANG**, H. H.; HWANGBO, K.; ZHENG, M. S.; SON, J.; KIM, H. Y.; BAEK, S. H.; CHOI, H. C.; PARK, S. Y.; KIM, J. (2014a) Inhibitory effects of juglanin on cellular senescence in human dermal fibroblasts. *Journal of Nature Medicines*, Doi 10.1007/s11418-014-0817-0.

**YANG**, H. H.; ZHANG, H.; SON, J. K.; KIM, J. R. (2015) Inhibitory effects of quercetagenin 3,4'dimethyl ether purified from *Inula japonica* on cellular senescence in human umbilical vein endothelial cells. *Archives of Pharmacology Research*, 38(10): 1857-64.

**YDO**, Y.; DURANTON, A.; LAN, F.; WEIKEL, K. A.; BRETON, L.; RUDERMAN, N. B. (2015) Resveratrol prevents oxidative stress-induced senescence and proliferative dysfunction by activating the AMPK-FOXO3 cascade in cultured primary human keratinocytes. *PlosOne*, 10(2): e0115341.

**YILDIZ**, O. (2007) Vascular smooth muscle and endothelial functions in aging. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1100: 353-360.

**ZARAGOVA**, C.; GOMEZ-GUERRERO, C.; MARTIN-VENTURA, J. L.; BLANCO-COLIO, L.; LAVIN, B.; MALLAVIA, B.; TARIN, C.; MAS, S.; ORTIZ, A.; EGIDO, J. (2011) Animal models of cardiovascular diseases. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, doi: 10.1155/2011/497841.

**ZHANG**, B.; CHEN, Y.; SHEN, Q.; LIU, G.; YE, J.; SUN, G.; SUN, X. (2016) Myricitrin attenuates high glucose-induced apoptosis through activating Akt-Nrf2 signaling in H9c2 cardiomyocytes. *Molecules*, 21, doi:10.3390/molecules21070880.

**ZHAO**, H.; DARZYNKIEWICZ, Z. (2013) Biomarkers of cell senescence assessed by imaging cytometry. *Methods of Molecular Biology*, 965: 83-92.

**ZHAO, S.;** GU, L. (2014) Implementation and validation of aortic remodeling in hypertensive rats. *Journal of Biomechanical Engineering*, 136:091007-1:8.

**ZHU, M.;** PHILLIPSON, D.; GREENGRASS, P. M.; BOWERY, N. E.; CAI, Y. (1997) Plants polyphenols: biologically active compounds or non-selective binders to proteins? *Phytochemistry*, 44(3): 441-447.

**ZHU, Y. et al.** (2015) The Achilles' heel of senescent cells: from transcriptome to senolytic drugs. *Aging Cell*, 14: 644-658.

**ZIDANE, A.;** TITS, M.; ANGENOT, L.; WAUTERS, J. N.; FREDERICH, M.; DIB, I.; MEKHFI, H.; AZIZ, M.; BNOUHAM, M.; LEGSSYER, A.; ZIYYAT, A. (2014) Phytochemical analysis of *Tetraclinis articulata* in relation to its vasorelaxant property. *Journal of Materials*, 5(5): 1368-1375.