

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA**

LIARA MERLUGO

**ANÁLISE CROMATOGRÁFICA, CONSTITUIÇÃO QUÍMICA EM ALCALOIDES E
AVALIAÇÃO DO POTENCIAL HIPOTENSOR DE EXTRATOS VEGETAIS
OBTIDOS DE ESPÉCIES DE ERYTHRINA**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Uruguiana

2015

LIARA MERLUGO

**ANÁLISE CROMATOGRÁFICA, CONSTITUIÇÃO QUÍMICA EM ALCALOIDES E
AVALIAÇÃO DO POTENCIAL HIPOTENSOR DE EXTRATOS VEGETAIS
OBTIDOS DE ESPÉCIES DE ERYTHRINA**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-graduação *Stricto sensu* em Bioquímica da Universidade Federal do Pampa, como requisito parcial para obtenção do Grau de Mestre em Bioquímica.

Orientador: Prof. Dr. Andreas Sebastian Loureiro Mendez

Coorientador: Prof^a. Dr^a. Cleci Menezes Moreira

Uruguaiiana

2015

LIARA MERLUGO

**ANÁLISE CROMATOGRÁFICA, CONSTITUIÇÃO QUÍMICA EM ALCALOIDES E
AVALIAÇÃO DO POTENCIAL HIPOTENSOR DE EXTRATOS VEGETAIS
OBTIDOS DE ESPÉCIES DE ERYTHRINA**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-graduação *Stricto sensu* em Bioquímica da Universidade Federal do Pampa, como requisito parcial para obtenção do Grau de Mestre em Bioquímica.

Área de concentração: Bioprospecção
Molecular

Dissertação defendida e aprovada em: 12 de março de 2015.

Banca examinadora

Prof. Dr. Andreas Sebastian Loureiro Mendez
(orientador)
(UNIPAMPA)

Prof. Dr. Robson Luiz Puntel
(UNIPAMPA)

Prof. Dr. Cháriston André Dal Belo
(UNIPAMPA)

Este trabalho é dedicado a
minha mãe Ana Maria Porsch, pois
sei que essa é a realização do teu
sonho.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, pela vida e pelas oportunidades que vieram ao longo dela. Por sempre ter me mantido forte em todas às vezes que pensei em fraquejar, por ter me dado capacidade de ir tão longe e conseguir chegar a este dia.

A minha mãe, Ana Maria Porsch, que sempre me apoiou em todas as minhas decisões e que sempre me disse que eu tinha nascido para realizar os seus sonhos. Missão cumprida!

Aos meus irmãos, Ariel e Maila Linéia, que são os meus amores e que sempre me apoiaram e se orgulharam de mim.

A princesa linda da tia, Eduarda, que veio ao mundo para nos iluminar e nos encher de alegrias.

Ao meu amigo, namorado e marido, Robson Diogo, pelo apoio incondicional, por abrir mão de muitos momentos juntos, por saber entender as minhas ausências, por nunca ter me deixado desistir e por ter me dado suporte durante esses dois anos de mestrado.

Ao meu orientador prof. Andreas, que me acolheu de braços abertos, que acreditou e confiou em mim, que soube entender todas as minhas angústias, pela paciência e incentivo e pelos infinitos conhecimentos passados. Hoje eu lhe digo professor, com certeza és um grande exemplo a ser seguido e uma fonte de inspiração para mim e muitos alunos que pensam em seguir a vida acadêmica.

A minha coorientadora, professora Cleci, que acreditou em mim desde o primeiro dia em que pisei na Unipampa. Que me acompanha desde a graduação, passando pela especialização até chegar ao mestrado. Muito obrigada pela paciência, amizade, colaboração, incentivo e por todos os conhecimentos passados.

A todos os colegas do Laboratório de Desenvolvimento e Controle de Qualidade, em especial ao Hemerson Rosa, a Lidiane Farias e meus queridos IC's Luiz Batista e Everson Fialho, agradeço por todas as ajudas no decorrer desse trabalho e por terem me dado à honra de conhecê-los.

Ao pessoal do Grupo de Pesquisa em Fisiologia Cardiovascular em especial as amigas Maquelem Blanco, Ana Paula Fuão e Alyne Escobar, obrigada por tudo, vocês são “show”!

A todos os professores que tiveram participação neste trabalho, pela parceria e contribuição.

As duas pessoas que foram essenciais para que esse dia chegasse Marí Castro e Liane Sant'Anna. Vocês conviveram comigo a cada minuto desse mestrado, comemoraram comigo cada experimento certo e se entristeceram a cada erro. Deram-me suporte emocional para que

eu não fraquejasse e seguisse até o fim. Vocês sabem todos os problemas que passei durante esse período, todas as turbulências, todas as doenças, todos os choros desesperados cada vez que achava que não teria condições emocionais de seguir em frente, e sempre estiveram do meu lado, a cada momento, a cada minuto, a cada segundo. Eu agradeço por tudo, por todos os ensinamentos, por todas as ajudas e principalmente, por todos os abraços. Hoje eu sei que tudo valeu a pena. E o que mais valeu foi ter a oportunidade de ter conhecido vocês, que se tornaram muito além de colegas, se tornaram amigas irmãs, pessoas que levarei por toda a vida, pessoas que sei que sempre poderei contar, em qualquer situação. Gurias, obrigada por tudo, obrigada por fazerem parte da minha vida!

Ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica pela oportunidade, a Unipampa e FAPERGS pelo suporte técnico, estrutural e financeiro nesse período.

Obrigada a todos que de alguma forma se fizeram presentes e /ou me ajudaram durante essa caminhada.

...Das vozes dos outros eu levo a palavra.
Dos sonhos dos outros eu tiro a razão.
Dos olhos dos outros eu vejo os meus
erros. Das tantas saudades eu guardo a
paixão...

Gujo Teixeira e Luiz Marengo

RESUMO

ANÁLISE CROMATOGRÁFICA, CONSTITUIÇÃO QUÍMICA EM ALCALOIDES E AVALIAÇÃO DO POTENCIAL HIPOTENSOR DE EXTRATOS VEGETAIS OBTIDOS DE ESPÉCIES DE ERYTHRINA

O gênero *Erythrina* está presente mundialmente nas regiões tropicais e subtropicais. Estudos fitoquímicos utilizando vários órgãos dessas plantas, demonstraram a presença de alcaloides, flavonoides, pterocarpanos e triterpenóides. Várias espécies são encontradas no Brasil, dentre elas *Erythrina falcata* e *Erythrina crista-galli*, conhecidas popularmente como “corticeira” e utilizadas medicinalmente devido à ação sedativa, ansiolítica, anti-inflamatória e anti-hipertensiva. Este trabalho objetivou estudar a composição química de extratos vegetais obtidos de folhas de *E. falcata* e *E. crista-galli* e ainda, avaliar o potencial hipotensor *in vivo* de extratos de *E. falcata*. Inicialmente, após coleta do material, as folhas foram selecionadas, submetidas à secagem e trituradas. Então, foram submetidas à extração por maceração exaustiva utilizando etanol 40% (v/v) e por infusão utilizando água a 100 °C. Para a caracterização em termos de fenólicos totais e conteúdo de flavonoides, os extratos foram quantificados por espectrofotometria. Para o ensaio cromatográfico, os extratos foram analisados por CLAE em sistema de fase reversa, com fase móvel consistindo de acetonitrila:água em eluição por gradiente e fluxo de 1,0 mL/min. Para a análise por CLUE-ESI-MS, a fase móvel foi composta de mistura de acetonitrila:metanol (4:1) e ácido fórmico pH 3,0, com eluição por gradiente e fluxo de 0,2 mL/min. A detecção por espectrometria de massas foi conduzida a partir das seguintes condições: N₂ como nebulizante; energia de colisão 4.0 eV; temperatura da fonte do eletrospray e do gás de solvatação 100°C e 120°C, respectivamente; voltagem do capilar 3000V; voltagem do cone 40V. Os espectros de massas foram obtidos na faixa de *m/z* 200-800. A avaliação dos efeitos hemodinâmicos foi realizada em ratos wistar normotensos, anestesiados com uretana (1,4 mg/Kg), via canulação da artéria carótida (para a verificação da PAS, PAD e FC) e veia jugular (para administração dos extratos e drogas). A avaliação do potencial hipotensor da *E. falcata* foi investigada através da realização de uma curva crescente de administração dos extratos e os possíveis mecanismos de ação envolvidos foram analisados através da administração de diferentes drogas sendo elas: L-NAME (30 mg/kg); losartana (10 mg/Kg); hexametônio (20mg/Kg) e propranolol (5mg/kg). Os teores de fenólicos totais para *E. falcata* e *E. crista-galli* estiveram na faixa de 1,3193 – 1,4989 mgEAG/mL para os extratos obtidos por maceração e de 0,8771 – 0,9506 mgEAG/mL para as infusões. Em flavonoides totais, os conteúdos estiveram na faixa de 7,7829 – 8,1976 ER mg/g para os extratos obtidos por maceração e 9,3471 – 10,4765 ER mg/g para as infusões. Na determinação por CLUE-MS, os dados de íon molecular e fragmentos de massa indicaram a composição predominante em alcaloides, sugerindo-se os componentes erythristemine, 11β-methoxyglucoerysodine, erysothiopine, 11β-hydroxyerysodine–glicose e 11-hydroxyerysotinone-ramnosídeo. O extrato aquoso da *E. falcata* mostrou-se um potente hipotensor dose-dependente, causando uma queda na PAS de 23 a 35% e na PAD de 32 a 49% para ambos os extratos estudados, sem influenciar a FC, podendo este efeito estar relacionado com a via dos receptores β-adrenérgicos.

Palavras-chave: *E. falcata*, *E. crista-galli*, CLAE, CLUE-MS, alcaloides, atividade hipotensora.

ABSTRACT

CHROMATOGRAPHIC DETERMINATION, CHEMICAL CONSTITUENTS IN ALKALOIDS AND EVALUATION OF HYPOTENSIVE POTENTIAL OF EXTRACTS OBTAINED FROM ERYTHRINA

The genus *Erythrina* is present worldwide in tropical and subtropical regions. Phytochemical studies using various organs of these plants demonstrated the presence of alkaloids, flavonoids, pterocarpans and triterpenoids. Several species are found in Brazil, among them *Erythrina falcata* and *Erythrina crista-galli*, which are popularly known as “corticeira” and used medicinally due to its action as sedative, anxiolytic, anti-inflammatory and antihypertensive. The present study aimed to investigate the chemical composition of extracts obtained from leaves of *E. falcata* and *E. crista-galli*, and still, to evaluate the hypotensive potential *in vivo* of *E. falcata* extracts. Initially, after collection of material plant, the leaves were selected, submitted to dryness and powdered. Then, submitted to extraction by exhaustive maceration using ethanol 40% (v/v) and by infusion using water at 100 °C. For characterization in terms of phenolics and flavonoid content, the extracts were quantified by spectrophotometry. For chromatographic assay, the extracts were analysed by HPLC in reversed phase system, with a mobile phase consisting of acetonitrile:water in gradient elution and flow rate of 1.0 mL/min. For analysis by UPLC-ESI-MS, the mobile phase consisted in a mixture of acetonitrile:methanol (4:1) and 0.1% formic acid pH 3.0, with a elution by gradient and flow rate of 0.2 mL/min. The MS detection was performed following the conditions: N₂ as nebulizing; collision energy 4.0 eV; temperature of electrospray source and desolvation gas 100°C and 120°C, respectively; capillary voltage 3000V; sample cone 40V. Mass spectra were recorded in the range of *m/z* 200-800. The evaluation of the hemodynamic effects was performed in normotensive Wistar rats, anesthetized with urethane (1.4 mg/kg) by cannulation of the carotid artery (for verification of SBP, DBP and HR) and jugular vein (for administration of the extracts and drugs). The hypotensive potential of *E. falcata* was investigated by conducting a growing curve administration of the extracts and the possible mechanisms involved were analyzed by administering different drugs such as: L-NAME (30 mg/kg); losartan (10 mg/kg); hexamethonium (20 mg/kg) and propranolol (5 mg/kg). The total phenolics content for *E. falcata* and *E. crista-galli* was from 1.3193 to 1.4989 mgGAE/mL for maceration and 0.8771 to 0.9506 mgGAE/mL for infusions. In total flavonoid, the content was from 7.7829 to 8.1976 mg RE/g for maceration and 9.3471 to 10.4765 RE mg/g for infusions. The molecular ions and mass fragments obtained by UPLC-MS indicated the predominant composition in alkaloids, suggesting the components erythristemine, 11β-methoxyglucoerysodine, erysothiopine, 11β-hydroxyerysodine-glucose and 11-hydroxyerysotinone-rhamnoside. The aqueous extract of *E. falcata* showed to be a potent dose-dependent hypotensive, decreasing the SBP in 23 to 35% and DBP in 32 to 49% for both extracts, without influence in HR, and this effect may be due to the route of β-adrenergic receptors.

Keywords: *E. falcata*, *E. crista-galli*, HPLC, UPLC-MS, alkaloids, hypotensive activity.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Estrutura química do esqueleto clássico de alcalóides eritrínicos.....	22
Figura 2. Estrutura base dos alcaloides (A) Dienoides, (B) Alquenóides e (C) Lactônicos.....	23
Figura 3. Árvore de <i>Erythrina falcata</i> Benth.....	25
Figura 4. Árvore de <i>Erythrina crista-galli</i> L.....	27
CAPÍTULO I	31
Figura 1. Curva analítica para determinação de ácido gálico por método espectrofotométrico no UV-visível, em comprimento de onda de 750 nm.....	35
CAPÍTULO II	38
Figura 1. Cromatograma obtido em análise por CLAE para extratos de <i>E. crista-galli</i> utilizando o método descrito por Queiroz et al. (2002), com detecção em 280 nm.....	41
Figura 2. Cromatograma obtido em análise por CLAE para extratos de <i>E. crista-galli</i> utilizando o método descrito por Soares et al. (2012), com detecção em 280 nm.....	42
Figura 3. Cromatograma obtido em análise por CLAE para extratos de <i>E. crista-galli</i> utilizando o método descrito por Garín-Aguilar et al. (2005), com detecção em 280 nm.....	42
Figura 4. Cromatogramas obtidos por CLAE para extratos hidroetanólicos das folhas de <i>E. falcata</i> . Detecção em 280 nm. (A) Extrato hidroetanólico bruto (B) Fração etanólica residual obtida após purificação líquido-líquido.....	44
Figura 5. Cromatogramas obtidos por CLAE para extratos hidroetanólicos das folhas de <i>E. crista-galli</i> . Detecção em 280 nm. (A) Extrato hidroetanólico bruto (B) Fração etanólica residual após purificação líquido-líquido.....	45
Figura 6. Cromatograma obtido por CLAE na análise da fração final obtida após extração de alcaloides da espécie <i>E. falcata</i> . Detecção em 280 nm.....	46
Figura 7. Cromatograma obtido por CLAE na análise da fração final obtida após a extração de alcaloides da espécie <i>E. crista-galli</i> . Detecção em 280 nm.....	47
Figura 8. Cromatogramas obtidos por CLUE na análise de extratos obtidos de <i>E. falcata</i> . Detecção em 280 nm. (A) Extrato hidroetanólico bruto (B) Fração etanólica residual após purificação líquido-líquido.....	48
Figura 9. Cromatogramas obtidos por CLUE na análise de extratos obtidos de <i>E.</i>	

crista-galli. Detecção em 280 nm. (A) Extrato hidroetanólico bruto (B) Fração etanólica residual após purificação líquido-líquido..... 49

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I	31
Tabela 1. Resultado do teor de fenólicos totais em extratos de <i>E. falcata</i> e <i>E. crista-galli</i> obtidos por maceração e infusão.....	36
Tabela 2. Resultado do teor de flavonoides totais em extratos de <i>E. falcata</i> e <i>E. crista-galli</i> obtidos por maceração e infusão.....	37
CAPÍTULO II	38
Tabela 1. Condições cromatográficas testadas na análise de extratos de <i>E. crista-galli</i> por CLAE-UV-DAD.....	39

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AT1 – Receptor de Angiotensina 1
CLAE – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CLUE – Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência
Da - Dalton
DAD - *Diode array detector*
DBP – *Diastolic Blood Pressure*
DP – Desvio Padrão
EAG – Equivalente de ácido Gálico
ECA – Enzima Conversora de Angiotensina
ER – Equivalente de Rutina
ESI - *Electrospray Ionization*
FC – Frequência Cardíaca
g – Grama
HPLC – *High performance liquid chromatography*
HR- *Heart rate*
HAS – Hipertensão Arterial Sistêmica
i.p. – Intraperitonal
Kg - Quilograma
LC – *Liquid Chromatography*
L-NAME - *L-nitro-arginine methyl ester*
mg – Miligrama
min – minutos
mL – Mililitro
MS – *Mass spectrometry*
nm – Nanômetros
NO – Óxido Nítrico
PAD – Pressão Arterial Diastólica
PAS – Pressão Arterial Sistólica
SBP – *Systolic Blood Pressure*
SEM – *Standard error of mean*
 μ g – microgramas
 μ L – microlitros

UV – Ultravioleta

VIS – Visível

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
2 OBJETIVOS	19
2.1 OBJETIVO GERAL	19
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	19
3 REFERENCIAL TEÓRICO	20
3.1 O USO DE PLANTAS MEDICINAIS	20
3.2 O GÊNERO <i>ERYTHRINA</i> E SEUS CONSTITUINTES QUÍMICOS	21
3.3 A ESPÉCIE <i>Erythrina falcata</i> Benth	24
3.4 A ESPÉCIE <i>Erythrina crista-galli</i> L.....	26
3.5 HIPERTENSÃO ARTERIAL.....	28
CAPÍTULO I - OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DOS EXTRATOS VEGETAIS	31
1 OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DOS EXTRATOS VEGETAIS	32
1.1 TRATAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DO MATERIAL VEGETAL	32
1.1.1 Coleta e identificação botânica	32
1.1.2 Manuseio e Secagem	32
1.1.3 Determinação da perda por dessecação	32
1.2 OBTENÇÃO DOS EXTRATOS	33
1.2.1 Extração por maceração exaustiva	33
1.2.2 Extração por infusão	33
1.3 CARACTERIZAÇÃO DOS EXTRATOS	33
1.3.1 Determinação de fenólicos totais	34
1.3.2 Determinação de flavonoides totais	34
2 RESULTADOS E DISCUSSÃO	34
2.1 PERDA POR SECAGEM E PERDA POR DESSECAÇÃO	34
2.2 FENÓLICOS TOTAIS	35
2.3 FLAVONOIDES TOTAIS	36
CAPÍTULO II - ANÁLISE CROMATOGRÁFICA DOS EXTRATOS VEGETAIS..	38
1 DETERMINAÇÃO CROMATOGRÁFICA	39
1.1 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE)	39
1.1.1 Purificação líquido-líquido	39
1.1.2 Extração de alcaloides	40

1.2 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ULTRA EFICIÊNCIA (CLUE)	40
2 RESULTADOS E DISCUSSÃO	41
2.1 ANÁLISES POR CLAE	41
2.1.1 Purificação líquido-líquido	43
2.1.2 Extração de alcaloides	46
2.2 ANÁLISES POR CLUE	47
CAPÍTULO III - MANUSCRIPT	50
ABSTRACT	51
4 DISCUSSÃO	52
5 CONCLUSÕES	55
6 PERSPECTIVAS	57
REFERÊNCIAS	58
ANEXO A	69

1 INTRODUÇÃO

O uso de plantas com finalidade terapêutica cresce a cada dia e vem desde a antiguidade até os dias atuais. A Organização Mundial da Saúde (OMS, 2002) estima que cerca de 80% da população mundial utiliza-se de plantas medicinais para assistência primária a saúde devido aos benefícios terapêuticos que as mesmas possuem.

O gênero *Erythrina* contém cerca de 110 espécies, presentes nas regiões quentes da América, África, Ásia e Oceania (NEILL, 1993; VASCONCELOS et al., 2003). Muitas espécies já foram identificadas, porém em maioria são nativas do continente americano (VASCONCELOS et al., 2003) e cerca de 27 espécies são conhecidas no México (NEILL, 1988). No Brasil, são encontradas 11 espécies de *Erythrina*, sendo hoje *Erythrina mulungu*, a que tem maior ocorrência no país (FEITOSA et al., 2012).

Quanto a sua composição fitoquímica, o gênero *Erythrina* apresenta uma predominância de alcaloides e flavonoides, sendo a principal fonte de alcaloides tetracíclicos do tipo eritrina (AMER; SHAMMA; FREYER, 1991). Podemos citar alguns exemplos de alcaloides encontrados no gênero *Erythrina*, tais como, erisotrina, erisodina, erisovina e eritralina (NKENGFACK et al., 1994; FARIA et al., 2007).

Em relação aos flavonoides, nas últimas décadas mais de cinquenta componentes desta classe já foram isolados de várias espécies desse gênero, observando-se a larga ocorrência de flavonas, isoflavonas e pteropcarpanos (NKENGFACK et al., 1994; CABRAL, 2009). Estudos também já relataram a presença de saponinas, triterpenoides e cumarinas (SINGH et al., 1981; NKENGFACK et al., 1994).

A importância das propriedades medicinais do gênero *Erythrina* no Brasil pode ser comprovada pela menção da espécie *E. mulungu* na primeira Farmacopeia Brasileira (SILVA, 1929; DIAS et al., 2013). Este gênero caracteriza-se pela presença de alcaloides em sua composição, acumulados principalmente nas sementes e na casca. Contudo, algumas espécies têm elevado teor e outras, ao contrário, são muito pobres em alcaloides (COSTA, 1982).

Na medicina popular brasileira o gênero *Erythrina* é conhecido pelo seu uso relacionado a tratamentos de distúrbios do sistema nervoso central e insônia, especialmente a espécie *Erythrina velutina* (DANTAS et al., 2004). Na Argentina, as propriedades dessa planta estão relacionadas ao seu uso como analgésico, sendo a espécie mais utilizada a *Erythrina crista-galli* (ETCHEVERRY et al., 2003).

As espécies *Erythrina falcata* Benth e *Erythrina crista-galli* L. são árvores pertencentes à família Fabaceae, subfamília Papilionoideae, e conhecidas popularmente como corticeira, muchoqueiro, mulungu ou sapatinho-de-judeu, bastante comum em florestas da região sul e sudeste do Brasil (ALMEIDA, 2010, LORENZI, 1992). Pesquisas etnobotânicas têm relatado as propriedades medicinais dessas espécies, como em outras espécies deste gênero, sendo principalmente usadas como sedativo, ansiolítico, anti-inflamatório e anti-hipertensivo (ALMEIDA, 2010; BOTREL et al., 2006, ETCHEVERRY et al., 2003; ROSA et al., 2012). Já em sua composição química estudos demonstraram a presença de taninos, alcaloides, glicosídeos antraquinônicos, glicosídeos flavonoídicos e pterocarpanos (ALMEIDA, 2010, OZAWA et al., 2010; TANAKA, TANAKA; ETOH, 1997).

Segundo a descrição popular, a espécie *E. falcata*, dentre muitos usos já citados, desempenha funções relacionadas ao tratamento da hipertensão arterial. A incidência da hipertensão arterial vem crescendo gradativamente e cada vez mais se torna um problema de saúde mundial. Muito identificada na população, essa patologia pode levar ao desencadeamento de várias outras doenças, além de colaborar na progressão da doença renal crônica e contribuir para morbidade e mortalidade cardiovascular (GORZALCZANY, MOSCATELLI, FERRARO, 2013).

Para que seja possível a ocorrência de mudanças nesses quadros patológicos, medidas farmacológicas e não farmacológicas devem ser aplicadas, utilizando-se também de mudanças no estilo de vida, uma dieta balanceada e a prática de exercícios físicos (VIECILI et al., 2009; GORZALCZANY, MOSCATELLI, FERRARO, 2013).

Grande número de fármacos anti-hipertensivos já foram desenvolvidos e são utilizados no controle da hipertensão arterial. Porém, o alcance do sucesso no tratamento ainda se torna difícil. Sendo assim, o desenvolvimento e pesquisa de novas ferramentas farmacológicas auxiliam na melhora da gestão clínica dessa patologia (LAURENT, SCHLAICH, ESLER, 2012).

Considerando a medicina popular e a descrição de que espécies do gênero *Erythrina* possuem propriedades medicinais, este estudo propõe realizar a análise fitoquímica dos extratos obtidos de *E. falcata* e *E. crista-galli* a fim de investigar a sua composição química, e ainda avaliar a ação hipotensora dos extratos de *E. falcata* e seu possível mecanismo de ação, contribuindo para um melhor conhecimento e entendimento das propriedades biológicas e composição química dessas espécies.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Estudar a composição química de extratos vegetais obtidos de folhas de *E. falcata* e *E. crista-galli* e investigar o potencial hipotensor e a via de ação dos extratos vegetais obtidos de *E. falcata*.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Caracterizar a droga vegetal quanto à perda por secagem e perda por dessecação;
- ✓ Obter extratos vegetais líquidos de folhas de *E. falcata* e de *E. crista-galli* através de técnicas por maceração e infusão;
- ✓ Caracterizar os extratos vegetais obtidos de *E. falcata* e de *E. crista-galli* quanto à composição fenólica através da determinação do teor de fenólicos totais e flavonoides totais.
- ✓ Separar os componentes presentes nos extratos vegetais de *E. falcata* e de *E. crista-galli* através do método por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) acoplada a detector UV-DAD;
- ✓ Identificar os componentes presentes nos extratos vegetais de *E. falcata* e *E. crista-galli* através do método de Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência (CLUE) acoplado a detector de Espectrometria de Massas;
- ✓ Avaliar o potencial hipotensor dos extratos das folhas de *E. falcata*;
- ✓ Investigar a via de ação hipotensora dos extratos das folhas de *E. falcata*.

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 O USO DE PLANTAS MEDICINAIS

O uso de plantas para o tratamento e cura de enfermidades vem desde a antiguidade. Apesar do não conhecimento de seus constituintes químicos, as observações populares sobre o uso e eficácia de plantas medicinais têm contribuído muito para a divulgação das virtudes terapêuticas dos vegetais que são indicados com frequência devido a seus efeitos medicinais (MACIEL et al., 2002).

Outrora o uso de plantas medicinais era mais empregado pelas populações carentes, tanto da área rural quanto na área urbana, devido à alta disponibilidade e baixos custos (DUARTE, 2006). Porém, nos dias atuais, o uso de plantas como fonte de medicamentos é predominante em países em desenvolvimento e tem sido considerada uma solução alternativa para problemas de saúde, além de estar bem estabelecido em algumas culturas e tradições, especialmente na Ásia, América Latina e África (BANQUAR, 1993 apud SHALE; STIRK; STADEN, 1999).

O conhecimento empírico foi o responsável pela descoberta das propriedades úteis ou nocivas dos vegetais. Isso é fundamentado pelas observações dos povos antigos, que analisavam o comportamento de animais e a verificação empírica dos efeitos da ingestão deste ou daquele vegetal no organismo humano. Um grande exemplo foi a observação em rituais religiosos sobre os efeitos excitantes dos cafeeiros selvagens (*Coffea arábica L.*), nos herbívoros domésticos. Essas observações desencadearam ao uso dos vegetais pelos povos para prolongar o estado de vigília a que eram submetidas devido às suas piedosas ocupações (TOMAZZONI; NEGRELLE; CENTA, 2006).

A Organização Mundial da Saúde (OMS), em maio de 1978, por meio de uma resolução da XXXI Assembleia Geral determinou o início de programa mundial visando o uso e avaliação dos métodos da chamada “medicina tradicional”. Essa prática tem sido reconhecida como um pilar essencial nos cuidados primários de saúde, sendo sua principal contribuição com referência à descoberta de plantas medicinais (TOMAZZONI; NEGRELLE; CENTA, 2006).

Esse reconhecimento pela OMS fez com que o aproveitamento das plantas medicinais fosse ressaltado como parte do Programa Saúde Para Todos no ano 2000 recomendando-se, inclusive, a realização de mais estudos e a divulgação do uso das plantas medicinais regionais como uma maneira de diminuir custos dos programas de saúde pública (YAMADA, 1998).

No Brasil, até o século XX, o uso de plantas no tratamento e cura de inúmeras doenças era muito evidente, porém, o aumento da industrialização e o aumento das tecnologias na elaboração de fármacos sintéticos fez com que a população deixasse de lado o conhecimento tradicional das plantas medicinais e estas passassem a serem vistas como um atraso tecnológico, levando em parte a sua substituição (LORENZI; MATOS, 2002).

Porém, por um longo período de tempo, as plantas têm sido uma grande fonte de agentes medicinais, pois muitos produtos naturais têm servido como base de vários medicamentos (BALANDRIN; KINGHORN; FARNSWORTH, 1993 apud SHALE; STIRK; STADEN, 1999). Devido a isso, com o passar dos anos houve um grande avanço científico em estudos químicos e farmacológicos envolvendo plantas medicinais na tentativa de obter novos compostos com propriedades terapêuticas, pois os constituintes presentes nas plantas e em seus extratos são inúmeros e quando testados podem desencadear respostas sinérgicas entre os diferentes princípios ativos devido à presença de compostos de classes ou estruturas diferentes que contribuem para esta atividade (MACIEL et al., 2002; FILHO; YUNES, 1998).

Portanto, essa cultura medicinal tem despertado o interesse de pesquisadores em áreas multidisciplinares, como botânica, farmacologia e fitoquímica, que juntas tem o poder de enriquecer os conhecimentos sobre a inesgotável fonte de medicina natural: a flora mundial (MACIEL et al., 2002).

3.2 O GÊNERO ERYTHRINA E SEUS CONSTITUINTES QUÍMICOS

O gênero *Erythrina*, pertencente à família Fabaceae, abrange cerca de 110 espécies que estão distribuídas em todas as regiões tropicais do mundo. Dentre sua distribuição, 70 espécies estão localizadas na América Central e do Sul, 31 na África e 12 na Ásia e Oceania. Todas as espécies possuem como característica flores vistosas de cor vermelha ou laranja que são polinizadas por pássaros e ocorrem em uma ampla variedade de *habitats*, desde bosques tropicais chuvosos de terras baixas a desertos subtropicais muito áridos e até em bosques montanhosos de coníferas acima de 3.000 m (NEILL, 1993; VASCONCELOS et al., 2003).

No Brasil, podemos encontrar 11 espécies de *Erythrina* que são muito utilizadas no paisagismo, uma vez que, suas flores vermelho-alaranjadas são atraentes, vistosas e de longa duração (FEITOSA et al., 2012; GRATIERI-SOSSELLA; PETRY; NIENOW, 2008;

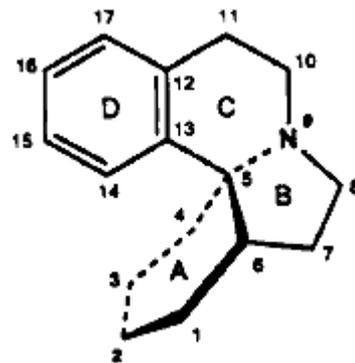
CARVALHO, 2003). Essas flores são uma referência alusiva à denominação deste gênero, que vem do grego *erythros*, e significa vermelho (NEILL, 1993; CARVALHO, 2008).

No Rio Grande do Sul, o corte de espécies de *Erythrina* é proibido perante a Lei Estadual 9.519/92 (Art. 33º), que protege figueiras e corticeiras em todos os casos, exigindo imediata reposição da espécie em caso de corte (RIO GRANDE DO SUL, 1992).

Diversos estudos fitoquímicos de espécies do gênero demonstraram a presença de alcaloides, flavonoides, pterocarpanos e triterpenoides sendo que muitos destes apresentaram diferentes atividades como antibacteriana, antifúngica e anti-inflamatória (MITSCHKE, 1988; VIRTUOSO et al., 2005; QUEIROZ et al., 2002).

O gênero é conhecido devido a sua grande produção de alcaloides, sendo que é a principal fonte de alcaloides tetracíclicos do tipo Erythrina. A nomenclatura dos tipos de alcaloides eritrínicos se deve ao prefixo “eryso-” que denota a presença de uma função fenólica, ao prefixo “erythroi-” que indica que o anel D do esqueleto é lactônico, e ao prefixo “erythra-” que demonstra que o anel D do esqueleto é o clássico (Figura 1) (AMER; SHAMMA; FREYER, 1991).

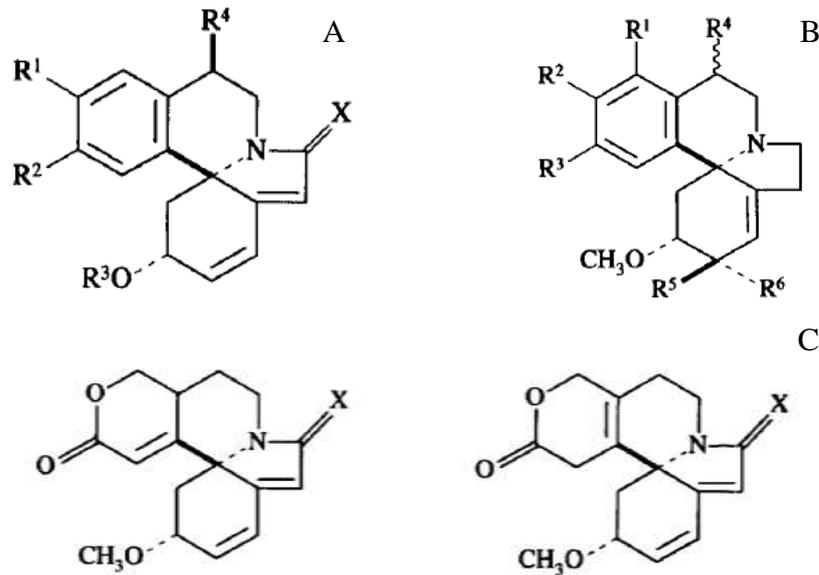
Figura 1. Estrutura química do esqueleto clássico de alcaloides eritrínicos.



Fonte: AMER; SHAMMA; FREYER, 1991.

Segundo Chawla e Kapoor (1995) os alcalóides de *Erythrina sp.* são geralmente classificados em três grupos principais: dienoides (Figura 2 A), alquenoides (Figura 2 B) e lactônicos (Figura 2 C).

Figura 2. Estrutura base dos alcaloides (A) Dienoides, (B) Alquenoides e (C) Lactônicos.



Fonte: Chawla e Kapoor (1995)

Uma das primeiras descobertas frente a esses constituintes químicos ocorreu em 1937 quando FOLKERS e MAJOR, através da investigação química das sementes da *E. americana* isolaram um alcaloide, o Eritroidina, que demonstrou ter atividade semelhante ao curare (SOTO-HERNÁNDEZ et al., 2012). A partir de então muitos alcaloides passaram a ser isolados de diversas espécies do gênero (FARIA et al., 2007; FEITOSA et al., 2012; OZAWA et al., 2008; TANAKA; TANAKA; ETOH, 1998).

Estudos recentes confirmaram os efeitos farmacológicos de alcaloides isolados de espécies de *Erythrina*. Rosa et al. (2012) isolaram o Erysothrine a partir das flores de *E. mulungu* e demonstraram que o mesmo possui um grande potencial ansiolítico e anticonvulsivante. Esse potencial ansiolítico também foi confirmado por Serrano et al. (2011) através da análise de alcaloides de *E. suberosa*. Juma e Majinda (2004) isolaram alcaloides de *E. lysistemon* e Estrada et al. (2011) de *E. americana*, e confirmaram que os mesmos possuem atividade antioxidante.

Outra classe muito presente em espécies de *Erythrina* são os flavonoides. Esses componentes também já demonstraram exercer muitas atividades biológicas. Kumar et al. (2013) isolaram três flavonoides da casca do caule de *E. suberosa*, sendo eles, 4'-Metoxilicoflavanone, Alpinumisoflavone e Wightone, e demonstraram que os mesmos possuem atividade anti-cancerígena. Atividade antiespasmódica de flavonoides isolados da

casca da raiz de *E. abyssinica* e *E. burttii* também foi comprovada através de estudos realizados por Yenesew et al. (2003) e Yenesew et al. (2012).

Outros trabalhos demonstraram diferentes atividades de flavonoides erythrinicos, como por exemplo, os estudos de Yenesew et al. (2005), que demonstram que os isolados da casca do caule de *E. burttii* desempenharam atividades antimicrobianas frente a bactéria *Staphylococcus aureus*.

Chacha, Moleta e Majinda (2005) comprovaram que isolados a partir do tronco de *E. latissima* apresentam atividade antimicrobiana contra *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* e *Candida mycoderma*.

Outras classes de componentes também já foram identificadas no gênero, dentre eles diversos pterocarpanos isolados de *E. crista-galli* e *E. fusca* (TANAKA; TANAKA; ETOH, 1997, INNOK et al., 2010), triterpenóides isolados de *E. sigmoidea* e *E. eriotriocha* (KOUAM et al., 2008, MBAFOR; NDOM; FOMUM, 1997, KOUAM et al. 2007 NKENGFACK et al., 1990) e ainda cumarinas isoladas de *E. indica* (NKENGFACK et al., 2000).

Esses resultados fornecem evidências dos efeitos exercidos por essas classes de componentes e gera, com isso, o interesse e a necessidade de investigações que envolvam a confirmação de outras atividades biológicas que possam ser desempenhadas.

3.3 A ESPÉCIE *Erythrina falcata* Benth

Conhecida pela sinonímia popular de muchoqueiro, mulungu, sapatinho-de-judeu, ou ainda como corticeira-da-serra (ALMEIDA, 2010; NEVES, 2006), a *E. falcata* é uma espécie arbórea encontrada no Brasil, Argentina, Bolívia, Paraguai e Peru (CARVALHO, 2003; NEVES, 2006) e está incluída na lista de espécies nativas endêmicas em extinção (EMBRAPA, 2004).

No Brasil, sua ocorrência vai desde a Bahia até o Rio Grande do Sul, em ecossistemas que variam de florestas úmidas a decíduas e semidecíduas, e também no cerrado (NEVES, 2006). Essa espécie tem grande interesse devido ao seu valor ornamental, pois, suas flores vermelhas a alaranjadas são produtoras de néctar e atrativas à avifauna, para utilização em vias públicas, parques e jardins (CARVALHO, 2003). Também pode ser usada em sistemas agroflorestais, na recuperação de matas ciliares e ecossistemas degradados, e em locais com frequente inundação durante o ano devido ao seu rápido crescimento (NEVES, 2006).

Essa espécie é arbórea espinhenta, de porte grande, chegando a 20 m de altura, com um tronco de cerca de 90 cm de diâmetro, de coloração cinzenta, suberosa, com muitas fendas verticais (Figura 3). Suas flores florescem durante o mês de junho, e se prolongam até o mês de novembro, quando aparecem também as novas folhas, que são trifolioladas, com pecíolos desprovidos de pelos, porém com espinhos que seguem até as nervuras dos folíolos. Seus frutos são do tipo legume e amadurecem em setembro-novembro, mas se mantêm sobre a árvore por mais alguns meses (ALMEIDA, 2010). Sua propagação por sementes é difícil, uma vez que, em condições naturais, somente 20% dos óvulos disponíveis produzem sementes e a relação de flores para frutos é muito baixa (em torno de 1%) (ETCHEVERRY; ALEMÁN, 2005).

Figura 3. Árvore de *Erythrina falcata* Benth.



Fonte: Almeida (2010)

É uma planta decídua, heliófita, seletiva higrófila, característica de várzeas e início de encosta (LORENZI, 2000). Sua madeira é branca, leve e de baixa densidade, empregada para confecção de palitos de fósforo, forros, brinquedos, caixotaria, etc (ALMEIDA, 2010).

Frequentemente utilizada por populares no tratamento de doenças do aparelho respiratório, como sedativo e ansiolítico (ALMEIDA, 2010), *E. falcata* já é alvo de diferentes estudos que envolvem desde a sua caracterização fitoquímica até a comprovação de suas atividades biológicas.

Quanto a sua composição fitoquímica, Almeida (2010) em seu estudo observou a presença de taninos, alcaloides, glicosídeos antraquinônicos e glicosídeos flavonoídicos em

extratos da casca de *E. falcata*. Oliveira et al. (2014), em um estudo recente, identificaram flavonas presentes no extrato da casca do caule de *E. falcata*, realizando ainda a avaliação da bioatividade em memória do medo condicionado. Dentre seus resultados foi possível identificar vicenina-2, vicenina-1, vitexina, isovitexina, diosmetina-6-C-glicosídeo e apigenina. Em relação aos resultados em ensaios específicos para a investigação da memória do medo foi observado que vitexina, isovitexina e diosmetina-6-C-glicosídeo e ainda frações flavonoidínicas de *E. falcata* levaram a uma retenção significativa de memória do medo, sugerindo que o tratamento com flavonoides puros ou frações ricas dos mesmos possam representar um potencial terapêutico para o tratamento de distúrbios cognitivos, de melhoria da capacidade de memorização e recuperação espontânea do medo.

Dias et al. (2013) realizaram uma avaliação neurocomportamental e da atividade genotóxica de extratos etanólicos de *E. falcata* em ratos. Suas observações relatam que os extratos afetaram a locomoção, exploração e motivação dos animais, sugerindo uma atividade no sistema nervoso central e, quando realizado o tratamento agudo, o mesmo não exerceu efeito ansiolítico, que segundo o protocolo experimental sugere uma ação depressora no sistema nervoso central. Quando avaliado a atividade genotóxica, o extrato não exerceu efeito genotóxico no sangue e em amostras de tecido cerebral. Os autores recomendam o desenvolvimento de mais estudos frente a esta espécie para avaliar diferentes doses e parâmetros comportamentais, a fim de confirmar o efeito depressor no sistema nervoso central.

Trabalho realizado por Orihuela e Ishiyama (2006) demonstrou o efeito do extrato aquoso de *E. falcata* na prevenção da gestação em ratas. O extrato foi administrado na água de beber do primeiro ao quarto dia de gravidez e os resultados demonstraram que, quando ingerido durante o início da gestação, causa distúrbios no desenvolvimento embrionário sugerindo a possível presença de compostos contraceptivos.

3.4 A ESPÉCIE *Erythrina crista-galli* L.

E. crista-galli (Figura 4) é uma árvore que ocorre em terrenos muito úmidos, sendo nativa do Brasil e Argentina, e encontrada em várzeas pantanosas ou alagadiças desde o Maranhão até o Rio Grande do Sul (LORENZI, 1992; GRATIERI-SOSSELLA, 2005). Porém, essa espécie tem a capacidade de tolerar ambientes drenados, permitindo que seu uso seja incrementado no paisagismo. Seu interesse se deve ao fato de ser uma árvore nativa, às suas características ornamentais do caule, das folhas e das flores, ao belo arranjo espacial

arquitetônico, e à alta importância ecológica, abrigando plantas epífitas e atraindo várias aves e insetos (GRATIERI-SOSSELLA, 2005).

Figura 4. Árvore de *Erythrina crista-galli* L.



Fonte: Foto do arquivo pessoal

Conhecida popularmente como corticeira do banhado, é uma árvore regular, medindo de 6 a 8 metros de altura, seu caule é grosso, com cerca de 60 cm de diâmetro, armado de acúleos, podendo ser poucos ou até mesmo completamente ausentes em plantas adultas, tortuoso e suberoso de coloração acastanhada. Suas folhas apresentam pecíolos longos, inermes ou com acúleos, pinadas, compostas por três folíolos peciolados rígidos, verde escuro dependendo da idade da planta e da luminosidade do ambiente (CORRÊA, 1984).

Quanto aos seus pedúnculos florais, os mesmos podem se apresentar solitários ou fasciculados, com flores de coloração que vai de rósea, em ambientes quentes, a vermelho vivo em locais mais frios. O fruto é uma vagem pedunculada medindo até 15 cm de comprimento, aguda nas extremidades, contendo 6-12 sementes oblongas de cor castanha (LORENZI, 1992). Floresce predominantemente durante os meses de setembro a dezembro, sendo a época de floração intimamente ligada ao clima e à temperatura (LORENZI, 1992; BRANDÃO, 2002).

E. crista-galli foi reconhecida como a flor nacional da República Argentina e considerada a árvore nacional da Argentina e do Uruguai (CORRÊA, 1984; LORENZI, 1992). Na medicina popular é utilizada para o tratamento de infecções fúngicas, dores musculares, inflamações, dores reumáticas, gripe e ainda gastrite (FENNER et al., 2006; BALDAUF et al., 2009; BARATA-SILVA; MACEDO; GOMES, 2005).

Considerando a composição fitoquímica da espécie *E. crista-galli*, a presença de alcaloides já foi evidenciada por vários autores e podemos citar a identificação de 8-oxo-erythralina e crystamidina (MAIER et al. 1999; MANTLE; LAWS; WIDDOWSO 1984; MANTLE; COLEMAN, 1984). Ozawa et al. (2010) isolaram os alcaloides cristanina A, cristanina B, erythratina, crystamidina, erysovine, erythralina, 8-oxoerythralina, erythrinine, 8-oxo-erythrinine, erythratidine e epi-erythratidine a partir da casca da espécie e demonstraram que alguns deles possuem efeitos sobre a inibição da produção de NO induzida por polissacarídeos e não exerceram nenhuma atividade citotóxica frente a macrófagos.

Outra classe de componentes também identificados se refere aos pterocarpanos. Tanaka, Tanaka e Etoh (1997) isolaram e identificaram erystagallina A, erystagallina B, erystagallina C, cristacarpina, phaseollidin e 2(7,7-dimetilalil)-6ahydroxyphaseollidin a partir da madeira dessa espécie. Iinuma, Okawa e Tanaka (1994) isolaram e identificaram cianofenois também a partir da madeira de *E. crista galli*. Redko et al. (2007) identificaram isoflavonoides a partir dos ramos dessa espécie.

3.5 HIPERTENSÃO ARTERIAL

De acordo com as Diretrizes Brasileiras de Hipertensão (2010), a Hipertensão Arterial Sistêmica (HAS) é uma condição clínica multifatorial que se caracteriza por níveis elevados e sustentados de pressão arterial. Frequentemente pode estar associada a alterações funcionais e/ou estruturais dos órgãos-alvo (coração, encéfalo, rins e vasos sanguíneos) e a alterações metabólicas, com consequente aumento do risco de eventos cardiovasculares fatais e não-fatais (SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA, 2010; WILLIAMS, 2010).

Por constituir um grave problema de saúde pública e estar relacionada a uma das mais importantes causas de morbidade e mortalidade no mundo, a HAS é um dos principais fatores de risco para o desenvolvimento de doença arterial coronariana, acidente vascular cerebral, doença vascular periférica, insuficiência renal e insuficiência cardíaca congestiva (BURT et al., 1995 apud ANDRADE et al., 2002; MACMAHON et al. 1990)

Segundo Riera (2000), no Brasil, entre 15 a 30 milhões de pessoas são hipertensas, ou seja, 10 a 20% da população, porém conforme as Diretrizes Brasileiras de Hipertensão (2010) essa prevalência está acima de 30%, segundo foi apontado por inquéritos populacionais realizados em cidades brasileiras nos últimos 20 anos.

As Diretrizes Brasileiras de Hipertensão (2010) também relatam que a HAS apresenta uma alta prevalência e baixas taxas de controle, tornando-a um dos mais importantes problemas de saúde pública no Brasil e os principais fatores envolvidos são, além da idade, o excesso de peso e obesidade, a ingestão excessiva de sal, a ingestão de álcool, o sedentarismo, a genética e ainda alguns fatores socioeconômicos.

Quanto ao tratamento da hipertensão, o início é a tentativa de mudanças no estilo de vida, a suspensão do tabagismo, a diminuição da ingestão de álcool e também a redução do peso, quando necessário, incluindo ainda, a prática de exercícios físicos e a redução da ingestão de sal. Porém, quando apenas essas modificações não são suficientes e eficientes, várias drogas podem ser prescritas, incluindo drogas diuréticas, que aumentam o volume urinário e, como consequência, diminuem o volume sanguíneo e a pressão arterial. Outra classe bem empregada são os bloqueadores β -adrenérgicos (como o atenolol) que agem reduzindo a pressão arterial e diminuindo a frequência cardíaca. Os inibidores da ECA, antagonistas do cálcio e vários vasodilatadores também podem ser utilizados em situações específicas (FOX, 2007).

Mesmo com esse grande número de fármacos desenvolvidos e utilizados no controle da hipertensão, o sucesso do tratamento ainda se torna difícil. Em vista disso, o desenvolvimento e pesquisa de novas ferramentas farmacológicas podem auxiliar na melhora da gestão clínica dessa patologia (LAURENT, SCHLAICH, ESLER, 2012).

Silva e Hahn (2011) apontam o crescimento considerável frente à procura por tratamentos alternativos ou adicionais ao farmacológico, e o uso de chás e plantas medicinais vem se tornado cada vez mais frequente. A utilização de plantas medicinais na prevenção e/ou cura de enfermidades é um hábito histórico da humanidade sendo uma das mais antigas armas empregadas nos tratamentos de diversas doenças. Com isso, a fitoterapia é encarada como uma opção na busca de soluções terapêuticas por se tratar de uma alternativa eficiente, barata e culturalmente difundida (OLIVEIRA; ARAÚJO, 2007).

De acordo com a medicina popular, algumas espécies do gênero *Erythrina* são utilizadas no tratamento da hipertensão arterial desde a antiguidade até os dias atuais, possuindo relatos em estudos etnobotânicos (SILVA, 2012; CABRAL; MACIEL, 2011). Franco e Fontana (2005) descreveram que a espécie *E. falcata* é usada popularmente por

possuir atividade hipotensiva. Um estudo realizado por Silva (2012), onde foram entrevistados raizeiros do município de Campina Grande-PB, descreveu a utilização da espécie *E. mulungu*, muito encontrada no Brasil, para o tratamento de distúrbios cardíacos. Já Albuquerque, Figueredo e Cerqueira (2011) e Cabral e Maciel (2011) atribuem essa atividade hipotensiva a espécie *E. velutina*.

Outros trabalhos também indicaram a utilização das folhas das espécies *E. arborescens*, *E. suberosa* e *E. fusca* no tratamento da hipertensão arterial (UNAKUL, 1950; DHAR et al., 1968).

Lehman (1937) comprovou os efeitos hipotensores de *E. americana*, uma vez que demonstrou que extratos alcoólicos obtidos dessa planta, quando administrados via intravenosa, em cães, ratos e coelhos causavam uma diminuição da pressão sanguínea de 10 a 20%. Hargreaves (1974) também evidenciou os efeitos de *E. americana*, demonstrando que alcaloides extraídos da mesma possuem dentre vários efeitos, atividades hipotensoras.

O fato de que grande parte da população faz o uso de plantas medicinais devido à crença de seus efeitos sobre as doenças, pode tornar essa utilização um auxílio no tratamento farmacológico. Mas deve-se ressaltar que, mesmo sendo substâncias naturais, são substâncias químicas e pouco se sabe sobre os reais efeitos no organismo humano, sendo necessária cautela na sua utilização, desde a escolha da planta e a parte a ser utilizada até seu modo de preparo (SILVA; HAHN, 2011).

CAPÍTULO I

OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DOS EXTRATOS VEGETAIS

1 OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DOS EXTRATOS VEGETAIS

1.1 TRATAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DO MATERIAL VEGETAL

1.1.1 Coleta e identificação botânica

As amostras de *Erythrina crista-galli* foram coletadas no município de Uruguaiana e as amostras de *Erythrina falcata* no município de Porto Alegre, ambos localizados no estado do Rio Grande do Sul, Brasil. A espécie *E. crista-galli* foi coletada em maio de 2013 e a espécie *E. falcata* foi coletada nos períodos de outubro de 2013 e fevereiro de 2014, sendo um exemplar de cada espécie enviado para o Departamento de Botânica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, identificado e depositado em herbário sob os números ICN 183940 e ICN 177665, respectivamente.

1.1.2 Manuseio e Secagem

Após a identificação botânica, as amostras foram coletadas e as folhas submetidas à secagem em estufa a uma temperatura de 40 °C por um período de 5 dias. As mesmas foram pesadas antes e após o processo de secagem para determinação do rendimento da massa fresca e seca, e determinação do conteúdo de água.

1.1.3 Determinação da perda por dessecação

A determinação da perda por dessecação foi realizada através do método gravimétrico descrito na Farmacopeia Brasileira (2010). Em balança analítica, pesou-se cerca de 2 g do material vegetal das duas espécies estudadas, em pesa-filtro previamente dessecado. O material foi levado à estufa a uma temperatura de 100 ± 5 °C por um período de 2 horas. Após o resfriamento em dessecador, pesou-se novamente, repetindo-se a operação até peso constante. O teor de umidade foi obtido em triplicata.

O cálculo para determinação da perda por dessecação foi realizado conforme a seguinte equação:

$$\text{Equação da porcentagem da perda por dessecação: } \frac{P_u - P_s}{P_a} \times 100 \quad \text{em que:}$$

Pa = peso da amostra,

Pu = peso do pesa-filtro contendo a amostra antes da dessecação,

Ps = peso do pesa-filtro contendo a amostra após a dessecação.

1.2 OBTENÇÃO DOS EXTRATOS

Após o processo de secagem, o material vegetal foi moído e submetido a dois processos extrativos, maceração e infusão. Para a maceração, o líquido extrator utilizado foi etanol 40% (v/v), e a infusão foi obtida por procedimento usual, em água a 100 °C. Na maceração, empregou-se a relação droga:solvente 1:10, e na infusão 1:15.

1.2.1 Extração por maceração exaustiva

Para a extração através do processo de maceração exaustiva foram pesados 50 g de cada material vegetal e colocados em frascos âmbar, juntamente com 500 mL de etanol 40% (v/v) por um período de 5 dias, ao abrigo da luz e com agitação a cada 24 horas. Após esse período, o material foi filtrado e o extrato armazenado em freezer. Foram adicionados mais 500 mL aos frascos contendo o mesmo material vegetal por mais um período de 5 dias, novamente ao abrigo da luz e com agitação a cada 24 horas. Ao final foram filtrados e misturados nos frascos com os extratos obtidos anteriormente. Parte do extrato (50 mL) foi armazenado em freezer para as análises cromatográficas posteriores e o restante foi levado a evaporador rotatório para retirada do solvente alcoólico. O material concentrado foi levado à estufa a 40°C até secagem, tornando-se um pó de coloração marrom escura.

1.2.2 Extração por infusão

Pesou-se 50 g dos materiais vegetais, os quais foram submetidos à extração com 750 mL de água a uma temperatura de 100 °C por aproximadamente 30 minutos. Após, foram filtrados com o auxílio de papel filtro. Desses extratos, armazenou-se 50 mL em freezer para posterior análise e o restante foi submetido à secagem em estufa a 40°C, tornando-se um pó de coloração marrom escura, porém de menor intensidade que o pó obtido pela maceração.

1.3 CARACTERIZAÇÃO DOS EXTRATOS

1.3.1 Determinação de fenólicos totais

A determinação do conteúdo de fenólicos totais nos extratos foi realizada através de método colorimétrico utilizando o reagente de Folin-Ciocalteu. Em tubos de ensaio foram adicionados 100 µL das amostras, misturados a 500 µL do reagente de Folin-Ciocalteu e acrescentados 6 mL de água, agitando-se e deixando-se em repouso por 1 min. Após, foram adicionados 500 µL de carbonato de sódio a 15% e o restante de volume (10 mL) completado com água. As amostras foram mantidas à temperatura ambiente e ao abrigo da luz por 30 minutos. Então, foram realizadas as leituras em Espectrofotômetro UV-VIS Lambda 35 Perkin Elmer® (Norwalk, CT, USA) no comprimento de onda de 750 nm.

Para a determinação dos resultados foi construída uma curva padrão de ácido gálico, na qual foram utilizadas as concentrações de 2,0; 4,0; 6,0; 8,0 µg/mL. Alíquotas de 50 µL dessas soluções foram submetidas ao protocolo descrito acima e os resultados foram expressos em mgEAG/mL de extrato, utilizando a média de três determinações.

1.3.2 Determinação de flavonoides totais

Para determinação do teor de flavonoides totais utilizou-se o protocolo descrito por Chang et al. (2002) que se baseia na utilização de metodologia colorimétrica. Em balão volumétrico de 25 mL foram transferidos 500 µL da amostra e completado o volume com o solvente correspondente. Na sequência, adicionou-se 500 µL do reagente de cloreto de alumínio 0,5%. As amostras foram então deixadas em repouso por 30 minutos à temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Posteriormente, foi realizada leitura em Espectrofotômetro UV-VIS Lambda 35 Perkin Elmer® (Norwalk, CT, USA) em comprimento de onda de 415 nm. Os resultados foram expressos em mg/g de droga vegetal seca, para equivalentes de rutina.

2 RESULTADOS E DISCUSSÃO

2.1 PERDA POR SECAGEM E PERDA POR DESSECAÇÃO

Na perda por secagem os valores obtidos para as espécies *E. falcata* e *E. crista-galli* foram de 64,54% e 63,77%, respectivamente. O processo de secagem é um procedimento crucial para as análises de materiais vegetais, pois faz com que ocorra uma diminuição da velocidade de deterioração do material através da redução do conteúdo de água, atuando

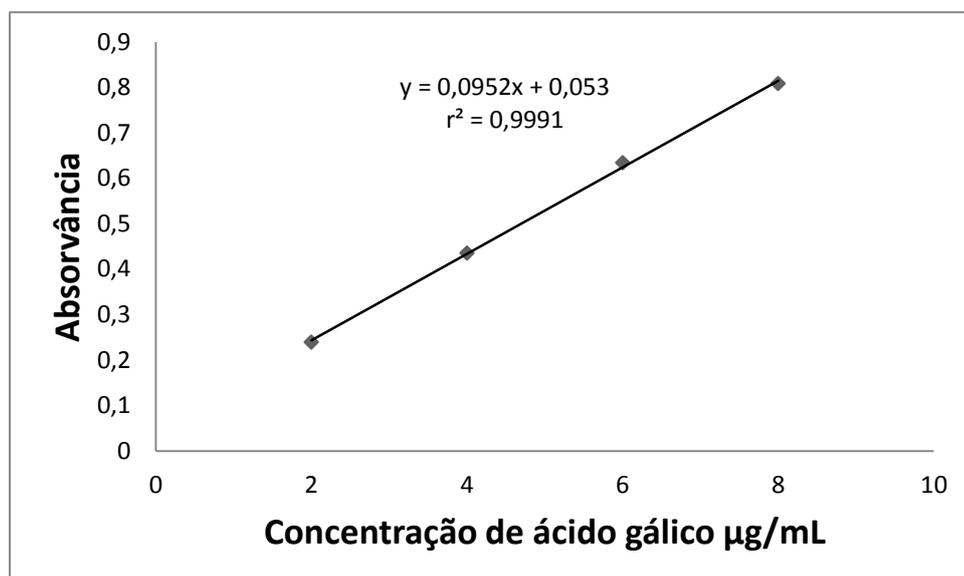
assim regressivamente na ação das enzimas e ainda possibilitando a conservação das plantas por maior período de tempo. Além disso, a redução do teor de água ainda aumenta a quantidade de princípios ativos em relação à massa seca (SILVA; CASALI, 2000).

Na determinação da perda por dessecação os valores encontrados para as espécies *E. falcata* e *E. crista-galli* foram de $6,1338 \pm 5,42\%$ e $7,0170 \pm 1,20\%$, respectivamente. Segundo a Farmacopeia Brasileira (2010) o ensaio de perda por dessecação se destina a determinar a quantidade de substância volátil de qualquer natureza eliminada pela planta, podendo ser apenas a água, sendo que o teor recomendado para amostras vegetais é de 8 a 14%. Podemos observar que os resultados encontrados estão abaixo da referência especificada. Em um estudo realizado por Silva (2010), que analisou a perda por dessecação em estufa de diversas espécies vegetais, dentre elas a *E. mulungu*, a mesma encontrou uma umidade residual de 5,94%, também inferior ao valor recomendado.

2.2 FENÓLICOS TOTAIS

Para determinação do conteúdo de fenólicos totais nos extratos vegetais primeiramente traçou-se uma curva padrão de solução de ácido gálico com concentrações variando de 2,0 a 8,0 $\mu\text{g/mL}$, pela qual se obteve um coeficiente de correlação (r^2) de 0,9991 e equação da reta $y = 0,0952x + 0,053$ (Figura 1).

Figura 1. Curva analítica para determinação de ácido gálico por método espectrofotométrico no UV-visível, em comprimento de onda de 750 nm.



Seguindo a metodologia, utilizou-se o reagente de Folin-Ciocalteu, que é composto por dois ácidos, o fosfotungstúico e o fosfomolibdúico, cujo tungstênio e molibdênio apresentam um estado de oxidação 6⁺. Na presença de agentes redutores, como os compostos fenólicos, a média do estado de oxidação desses dois íons encontra-se entre 5 e 6, formando os chamados tungstênio e molibdênio de coloração azul, cuja intensidade é medida por espectrofotometria (COTTON; WILKINSON, 1980; IKAWA et al., 2003).

Na tabela 1 estão descritos os resultados obtidos na análise de fenólicos totais em extratos de *E. falcata* e *E. crista-galli* obtidos por maceração e infusão.

Tabela 1. Resultado do teor de fenólicos totais em extratos de *E. falcata* e *E. crista-galli* obtidos por maceração e infusão.

Teor de fenólicos totais expressos em mgEAG/mL de extrato (CV%)		
	Maceração	Infusão
<i>E. falcata</i>	1,3193 (4,80%)	0,8771 (3,80%)
<i>E. crista-galli</i>	1,4989 (4,29%)	0,9506 (5,09%)

*Coeficiente de variação. Resultados expressos através da média de três determinações.

É possível observar que em ambos os processos de extração a espécie *E. crista-galli* apresentou um maior teor de fenólicos totais quando comparado a *E. falcata*. Mas levando em consideração o método extrativo, nas condições descritas neste trabalho, a maceração foi mais eficiente, pois foi capaz de extrair um conteúdo superior quando comparado à infusão.

2.3 FLAVONOIDES TOTAIS

Algumas técnicas são utilizadas para determinação de flavonoides totais em amostras vegetais. Na metodologia utilizada neste trabalho foi empregado o reagente de Cloreto de Alumínio (AlCl₃). Esse reagente ajuda a eliminar a interferência de outros compostos fenólicos, pois o cátion Al³⁺ age formando complexos estáveis com as hidroxilas livres presentes nos flavonoides, originando assim uma extensão do sistema conjugado e um desvio batocrômico, ou seja, um deslocamento dos seus máximos de absorção para regiões de maior comprimento de onda (WOISKY; SALATINO, 1998).

Para a determinação analítica dos teores de flavonoides totais utilizou-se como referência uma solução padrão de rutina e os resultados obtidos estão descritos na Tabela 2.

Tabela 2. Resultado do teor de flavonoides totais em extratos de *E. falcata* e *E. crista-galli* obtidos por maceração e infusão.

Teor de flavonoides totais expressos em ER mg/g de droga vegetal seca (CV%)		
	Maceração	Infusão
<i>E. falcata</i>	7,7829 (0,85%)	9,3471 (1,27%)
<i>E. crista-galli</i>	8,1976 (1,29%)	10,4765 (1,50%)

*Coeficiente de variação. Resultados expressos através da média de três determinações.

É possível observar que os extratos obtidos da espécie *E. crista-galli* apresentaram um teor de flavonoides totais superior quando comparado aos extratos de *E. falcata*. Porém avaliando o conteúdo flavonoídico, o método de maior eficiência na extração foi o processo de infusão.

Estudo realizado por Sakat e Juvekar (2010) utilizando extrato aquoso e o extrato metanólico de folhas de *E. indica*, encontraram um teor de fenólicos totais de 24,91 e 25,62 mg/EqAG/g do extrato seco e de flavonoides totais de 357,55 e 524,22 mg/EqR/g de extrato, respectivamente. Sowndhararajan, Joseph e Rajendrakumaran (2012) também avaliaram o teor de compostos fenólicos em *E. indica*, utilizando extratos metanólicos obtidos por maceração das cascas do caule e das folhas e obtiveram valores de 412,8 e 184,3 mg EAG/g extrato.

Já Júnior et al. (2011) avaliaram o teor de fenólicos totais em extratos etanólicos e hidroetanólicos de semestres de *E. velutina*, onde os resultados encontrados foram 423,6 e 236,3 mg.100g⁻¹ de catequina, respectivamente.

Os resultados obtidos nestes estudos diferem dos apresentados em nosso trabalho. Porém devem-se levar em consideração os processos extrativos e os solventes utilizados, os quais podem ter influenciado nos teores obtidos. Outro interferente pode ser o teor de metabólitos secundários nas plantas, esses sofrem a influência dos fatores ambientais na sua biossíntese, como clima, tipo de solo e época de coleta (GOBBO-NETO; LOPES, 2007), podendo também ocasionar divergências nos valores encontrados.

CAPÍTULO II

ANÁLISE CROMATOGRÁFICA DOS EXTRATOS VEGETAIS

1 DETERMINAÇÃO CROMATOGRÁFICA

1.1 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE)

Após a obtenção dos extratos, os mesmos foram investigados quanto à sua composição química em ensaios por CLAE. Para tal, iniciou-se a pesquisa por sistemas cromatográficos que permitissem a separação dos constituintes químicos presentes nas amostras vegetais. Diferentes sistemas de eluição foram testados a fim de determinar o melhor método de separação dos componentes presentes nos extratos obtidos por maceração. Na Tabela 1 estão descritas as condições cromatográficas testadas.

Tabela 1. Condições cromatográficas testadas na análise de extratos de *E. crista-galli* por CLAE-UV-DAD.

Modo de eluição	Fase móvel	Fluxo (mL/min)	Deteção (nm)	Referência
Gradiente	Acetonitrila e Água	1,0	280	Queiroz et al. (2002)
Isocrático	Metanol e Acetonitrila	1,0	280	Soares et al. (2012)
Gradiente	Acetato de Amônio (pH 7,4), Metanol e Acetonitrila	1,0	280	Garín-Aguílar et al. (2005)

As análises foram efetuadas em equipamento Cromatógrafo Líquido Prominence Shimadzu® (Kioto, Japão), equipado com bomba LC-20AT, auto-injetor SIL-20A, detector SPD-20AT, forno de coluna CTO-20A e software LC Solution V. 1.24 SP1. A separação cromatográfica foi realizada em coluna C18, de fase reversa, Hypersil C18 Thermo-Scientific (250 x 4,0 mm, 5 µm). As amostras foram filtradas em membrana de nylon de 0,45 µm. A fase móvel pronta foi também filtrada e sonicada em ultrassom, por 20 minutos.

1.1.1 Purificação líquido-líquido

A fim de purificar os extratos vegetais realizou-se um procedimento de extração líquido-líquido. Em funil de separação foram adicionados 50 mL do extrato vegetal obtido por maceração, sendo então particionado a partir da adição de solventes em ordem crescente de polaridade. Esses solventes foram adicionados em volumes iguais ao do extrato, porém a

extração ocorreu em duas etapas, utilizando um volume total de 50 mL de cada solvente, dividido em duas partes. Os solventes utilizados foram hexano, diclorometano, acetato de etila e metanol.

Após esta purificação, as frações de hexano, diclorometano, acetato de etila e metanol foram concentradas em evaporador rotatório e analisadas por CLAE.

1.1.2 Extração de alcaloides

Devido ao gênero *Erythrina* ser amplamente descrito na literatura pela sua bioprodução significativa de alcaloides, realizou-se um procedimento para purificação dos extratos vegetais obtidos por maceração, com foco nos componentes alcaloides.

Seguiu-se a metodologia descrita por Feitosa et al. (2012) com algumas modificações. Primeiramente, 25 mL de cada extrato foram concentrados em evaporador rotatório e redissolvidos em uma solução contendo diclorometano:metanol (8:2), sendo então submetidos a partição com solução de HCl 5% (v/v, pH 2,0). A seguir, a fração aquosa foi alcalinizada com NH₄OH em volume suficiente para atingir pH 10,0 e novamente particionada com diclorometano. A fração final foi concentrada em evaporador rotatório e analisada por CLAE utilizando as condições cromatográficas pré-definidas.

1.2 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ULTRA EFICIÊNCIA (CLUE)

Com o intuito de realizar análises em sistema de espectrometria de massas, foram estudadas condições cromatográficas para ensaio dos extratos vegetais por CLUE, técnica esta que se apresentava disponível com detector por espectrometria de massas.

Preliminarmente, foi utilizado o equipamento cromatógrafo a líquido Prominence Shimadzu® (Kioto, Japão), equipado com bomba LC-20AD, auto-injetor SIL-20AC HT, detector SPD-M20A e software LC Solution V. 1.24 SP1. A separação cromatográfica foi efetuada em coluna analítica *fast* C18 Shim-Pack XR-ODS (50 x 2 mm, 2,1 μm).

Seguiu-se a metodologia descrita por Yang et al. (2012) com algumas modificações, onde as condições cromatográficas testadas utilizavam-se de uma eluição gradiente com fase móvel composta por acetonitrila:metanol (4:1) e ácido fórmico 0,1% (pH 3,0), com fluxo de 0,2 mL/minuto e detecção em 280 nm.

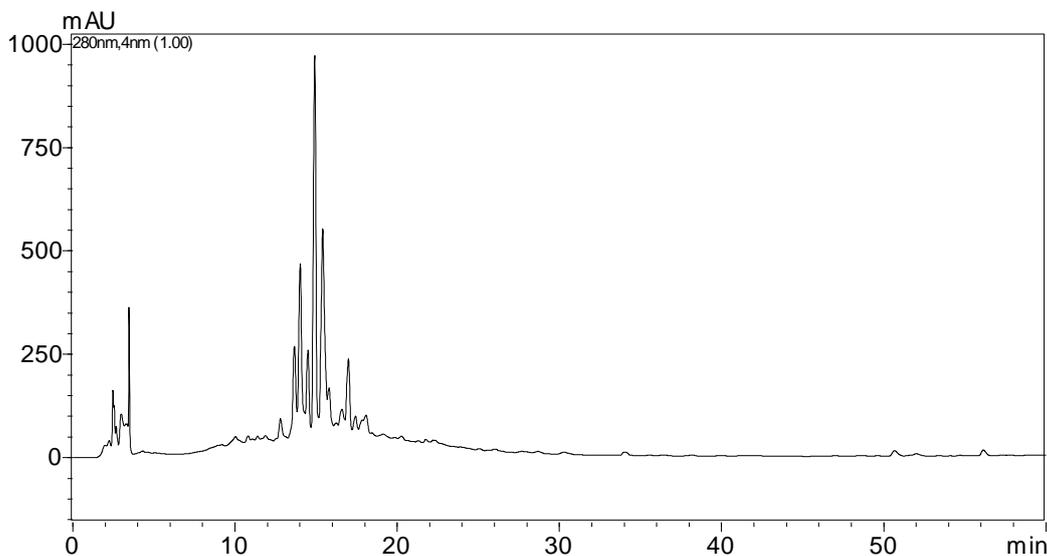
2 RESULTADOS E DISCUSSÃO

2.1 ANÁLISES POR CLAE

Diferentes condições cromatográficas foram testadas com o objetivo de propiciar a separação dos constituintes presentes na matriz vegetal. Os resultados apresentados indicam melhor análise e separação para os extratos vegetais obtidos da espécie *E. crista-galli*, para maceração das folhas.

A condição inicialmente testada foi a descrita por Queiroz et al. (2002) que em seu estudo objetivou a identificação de constituintes antifúngicos das cascas de *E. vogelli*. O sistema testado utilizou eluição por gradiente, obtendo-se o perfil cromatográfico ilustrado na Figura 1.

Figura 1. Cromatograma obtido em análise por CLAE para extratos de *E. crista-galli* utilizando o método descrito por Queiroz et al. (2002), com detecção em 280 nm.

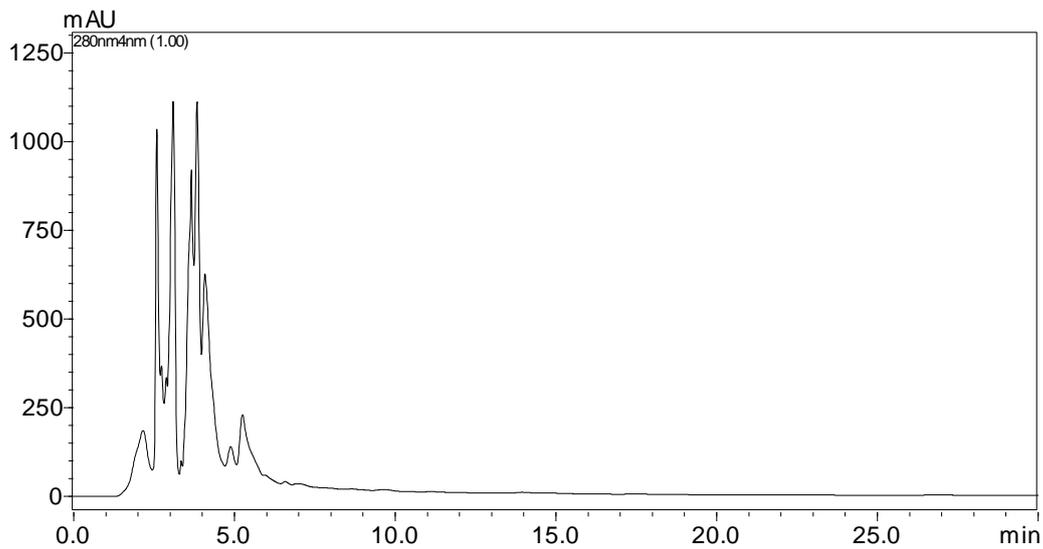


Observa-se que os componentes majoritários apresentaram-se retidos, na faixa de tempo de 12,0 a 18,0 minutos. Neste caso, discutiu-se a possibilidade de separação em maior faixa de tempo, melhorando-se a resolução entre os picos detectados.

Outro sistema testado, foi descrito por Soares et al. (2012), utilizado para avaliação de extratos das folhas de *E. speciosa*. Em eluição isocrática, os resultados ilustraram uma separação não promissora, com concentração dos componentes em tempo de retenção abaixo

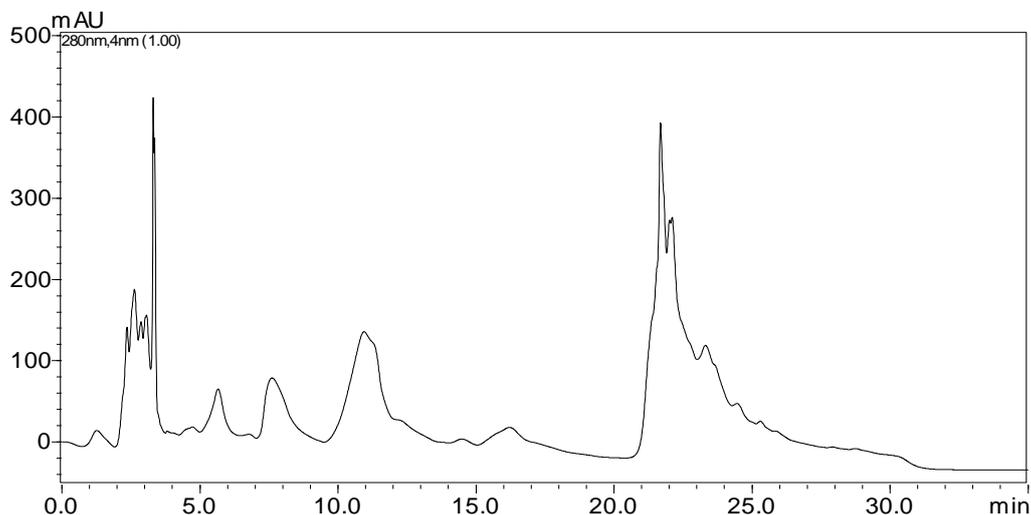
de 5,0 minutos, o que demonstra não haver interação da matriz com a fase estacionária (Figura 2).

Figura 2. Cromatograma obtido em análise por CLAE para extratos de *E. crista-galli* utilizando o método descrito por Soares et al. (2012), com detecção em 280 nm.



O cromatograma representativo obtido em análise de extratos de *E. crista-galli* com a metodologia descrita por Garín-Aguilar et al. (2005), que foi desenvolvida para análise de extratos obtidos de sementes de *E. herbacea*, está apresentado na Figura 3.

Figura 3. Cromatograma obtido em análise por CLAE para extratos de *E. crista-galli* utilizando o método descrito por Garín-Aguilar et al. (2005), com detecção em 280 nm.



Avaliando-se o perfil cromatográfico, as substâncias eluíram-se ao longo do tempo de análise (35 minutos), porém com picos largos e não reprodutíveis.

Rodrigues et al. (2006) descreveram a dificuldade de obtenção do perfil metabólico de extratos brutos devido a grande diversidade de estruturas químicas que estão presentes nas plantas. Porém, os autores consideram que o avanço tecnológico de técnicas analíticas, sobretudo das técnicas hífenadas, está proporcionando um importante papel na elucidação de composições químicas complexas dos produtos de origem vegetal, com níveis de sensibilidade e seletividade impensáveis até poucos anos atrás.

A cromatografia líquida acoplada ao detector de arranjo de diodos (LC-DAD) tem sido uma técnica muito utilizada na análise de produtos naturais, mas para que seja bem sucedida, o analito deve apresentar grupos cromóforos que propiciem a absorção de luz na região de UV-VIS (RODRIGUES et al., 2006).

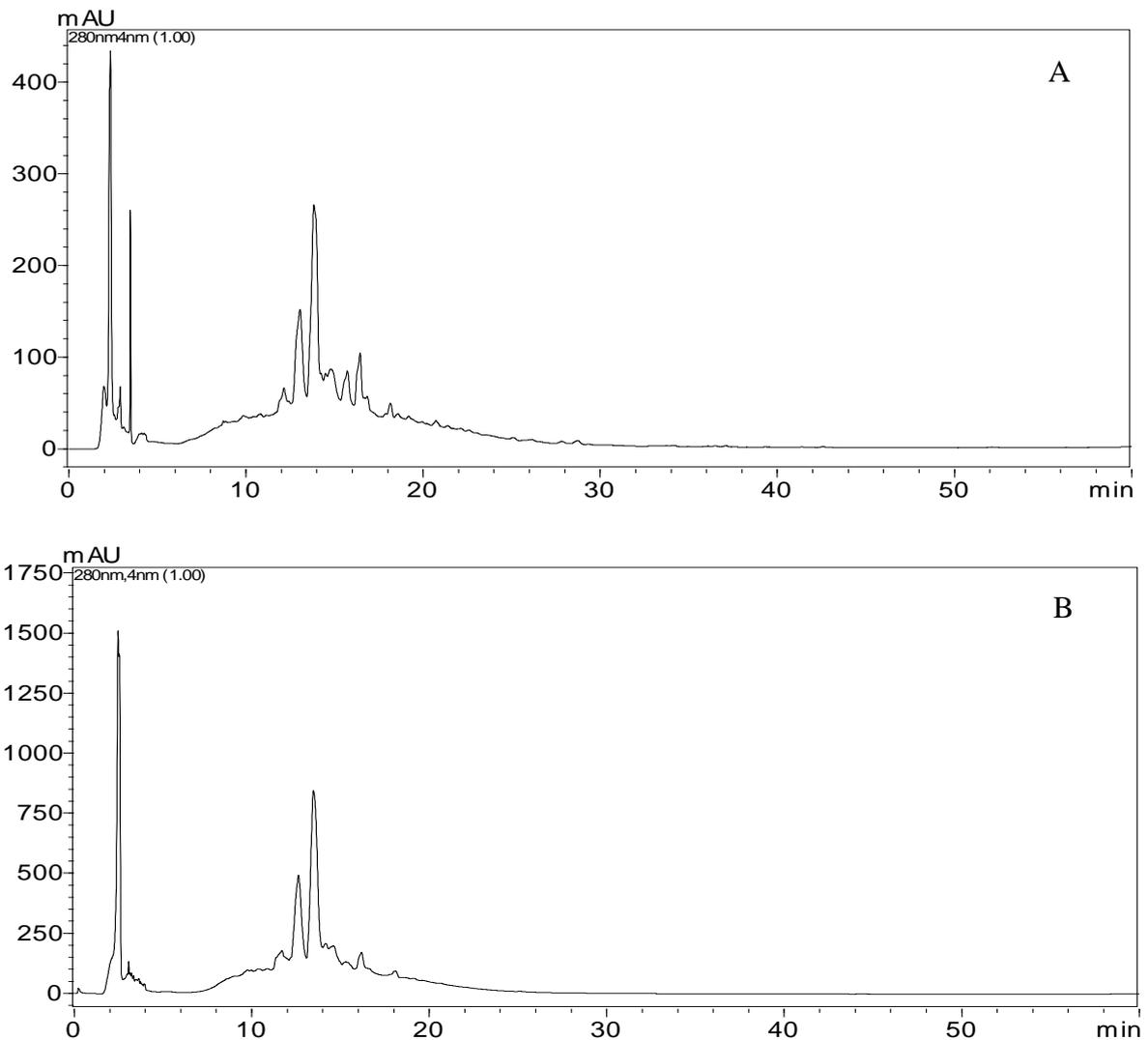
A partir dos resultados obtidos através das análises cromatográficas utilizando diferentes metodologias e avaliando diferentes sistemas de eluição foi possível observar que a metodologia proposta por Queiroz et al. (2002) foi a que proporcionou um melhor perfil de separação dos componentes majoritários, sendo essa a condição selecionada para ser utilizada ao longo dos experimentos.

2.1.1 Purificação líquido-líquido

A fim de purificar as amostras os extratos obtidos pelo método de extração por maceração foram submetidos à extração por partição líquido-líquido. Segundo Queiroz et al. (2001) nesse processo ocorre a partição da amostra entre duas fases imiscíveis (orgânica e aquosa), sendo que a afinidade do soluto pelo solvente, bem como a razão entre as fases e o número de extrações, irá indicar a eficiência do processo.

Neste experimento foi realizada a partição líquido-líquido com solventes de polaridade crescente, sendo eles, hexano, diclorometano, acetato de etila e metanol. Após esse processo as frações resultantes foram analisadas por CLAE utilizando as condições cromatográficas pré-definidas acima. Pode-se observar na Figura 4 os cromatogramas obtidos para a espécie *E. falcata*, representando-se o extrato bruto (A) e a fração etanólica residual (B) após o processo de partição.

Figura 4. Cromatogramas obtidos por CLAE para extratos hidroetanólicos das folhas de *E. falcata*. Detecção em 280 nm. (A) Extrato hidroetanólico bruto (B) Fração etanólica residual obtida após purificação líquido-líquido.

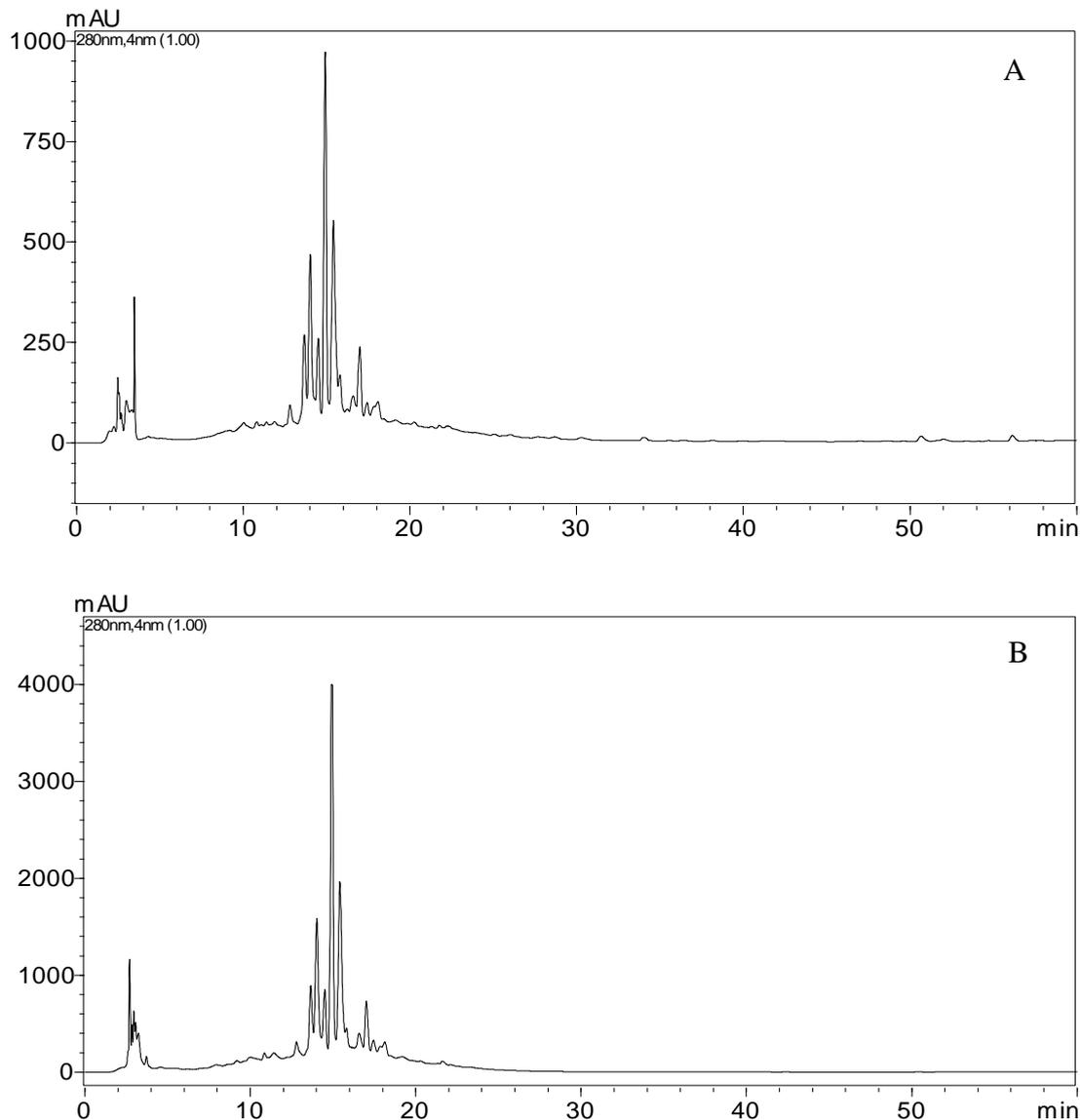


Os perfis cromatográficos apresentam-se similares no comparativo entre o extrato bruto e a fração residual etanólica, tendo os picos correspondentes aos componentes majoritários presentes no extrato aparecido na faixa de 12,0 e 15,0 minutos, porém, estes apresentaram-se mais intensos na fração quando em comparação com o extrato bruto.

O mesmo pode ser observado quando analisados os cromatogramas obtidos dos extratos da espécie *E. crista-galli* (Figura 5), pelos quais observou-se que a fração etanólica

residual apresentou maior intensidade dos picos dos componentes majoritários, apresentando-se na faixa de tempo de retenção de 13,0 a 16,0 minutos.

Figura 5. Cromatogramas obtidos por CLAE para extratos hidroetanólicos das folhas de *E. crista-galli*. Detecção em 280 nm. (A) Extrato hidroetanólico bruto (B) Fração etanólica residual após purificação líquido-líquido.



Segundo Filho e Yunes (1998), o processo de extração líquido-líquido aplicado a extratos vegetais visa uma semi-purificação das substâncias através de suas polaridades, e quando se quer localizar os princípios ativos, todos os extratos semi-puros devem ser testados quanto ao efeito biológico de interesse, e aquele que apresentar resultados satisfatórios deverá

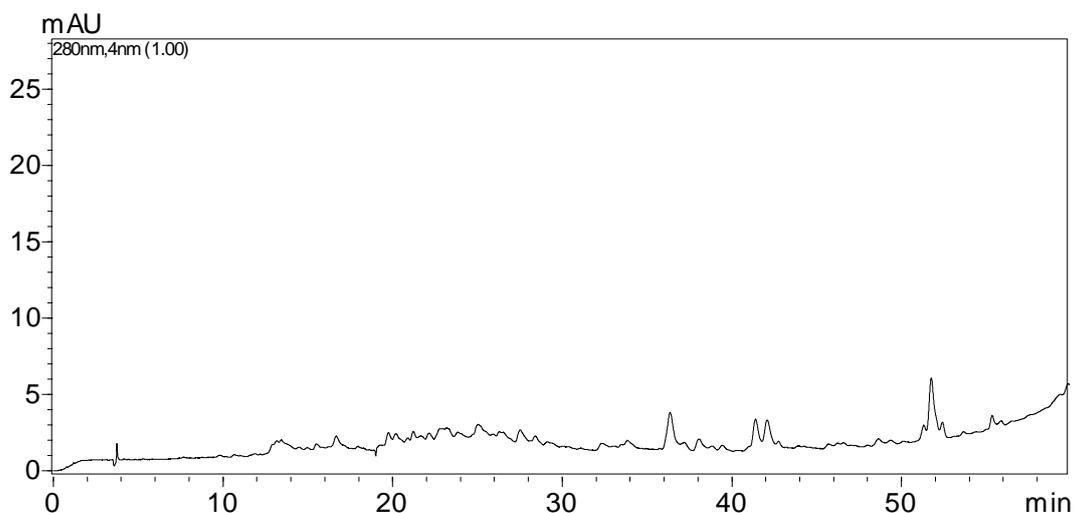
ser submetido aos procedimentos cromatográficos para o isolamento e a purificação dos compostos.

2.1.2 Extração de alcaloides

As análises por CLAE da fração final obtida após a execução do procedimento extrativo para alcaloides ilustram a presença de constituintes químicos que podem se referir à classe desejada.

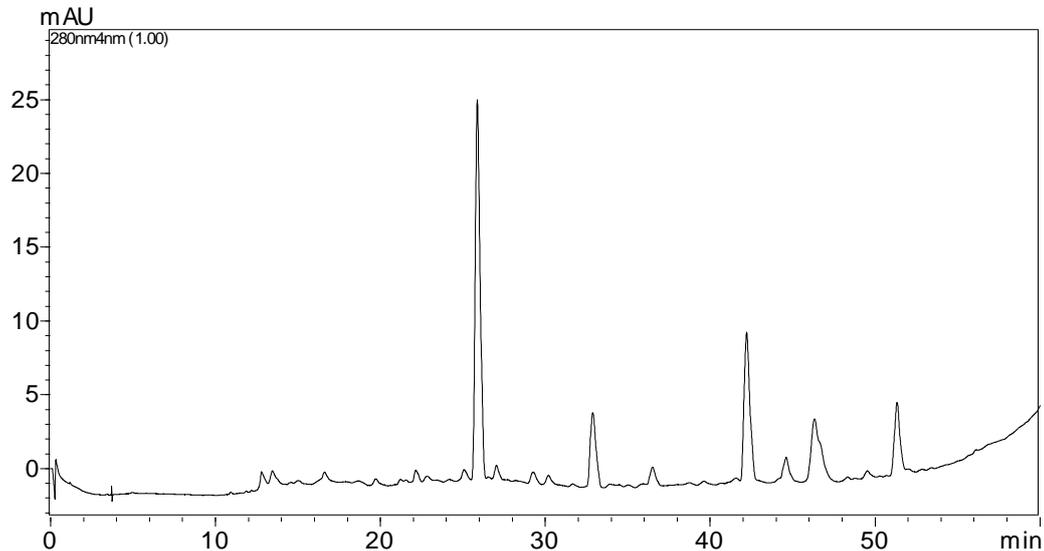
Na Figura 6, está ilustrado o cromatograma obtido na análise da fração final de extração de alcaloides, para a espécie *E. falcata*. É possível observar a presença de inúmeros componentes, com perfil de separação inadequado e em concentração reduzida.

Figura 6. Cromatograma obtido por CLAE na análise da fração final obtida após extração de alcaloides da espécie *E. falcata*. Detecção em 280 nm.



A Figura 7 ilustra o cromatograma obtido da análise da fração final obtida após extração de alcaloides da espécie *E. crista-galli*. É notório que os picos apresentaram um perfil de separação mais adequado e a presença de constituintes químicos ao longo da corrida cromatográfica.

Figura 7. Cromatograma obtido por CLAE na análise da fração final obtida após a extração de alcaloides da espécie *E. crista-galli*. Detecção em 280 nm.



De acordo com a literatura, as espécies do gênero *Erythrina* são conhecidas pela sua bioprodução significativa de alcaloides e são a principal fonte de alcaloides tetracíclicos do tipo erythrina (AMER; SHAMMA; FREYER, 1991). Almeida (2010) verificou através de testes fitoquímicos a presença de alcaloides para a espécie *E. falcata*. Para a espécie *E. crista-galli* diversos alcaloides já foram isolados segundo estudos realizados por Maier et al. (1999) e Mantle et al. (1984).

A importância das análises desta classe de componentes é fundamentada pelo fato de que vários trabalhos têm demonstrado que esses alcaloides isolados de espécies de *Erythrina* possuem diversas atividades biológicas como ação ansiolítica, anticonvulsivante e antioxidante (FLAUSINO JUNIOR et al., 2007, FAGGION et al., 2011; JUMA; MAJINDA, 2004).

2.2 ANÁLISES POR CLUE

A técnica por cromatografia líquida de ultra eficiência (CLUE) acoplada a detector de espectrometria de massas foi realizada com o propósito de identificar os componentes presentes nos extratos. Em virtude disso, com o intuito de garantir uma boa separação para esta análise, as amostras foram ensaiadas em metodologia por CLUE-UV-DAD, a qual já havia sido utilizada com sucesso em trabalhos anteriores.

As análises foram realizadas com os extratos brutos e com as frações obtidas pelo processo de extração líquido-líquido. Pode-se observar na Figura 8 e Figura 9 que os extratos brutos de *E. falcata* e *E. crista-galli* e ambas frações etanólicas residuais apresentaram um perfil de separação semelhante, com a presença de um componente majoritário em tempo de aproximadamente 16,0 minutos.

Figura 8. Cromatogramas obtidos por CLUE na análise de extratos obtidos de *E. falcata*. Detecção em 280 nm. (A) Extrato hidroetanólico bruto (B) Fração etanólica residual após purificação líquido-líquido.

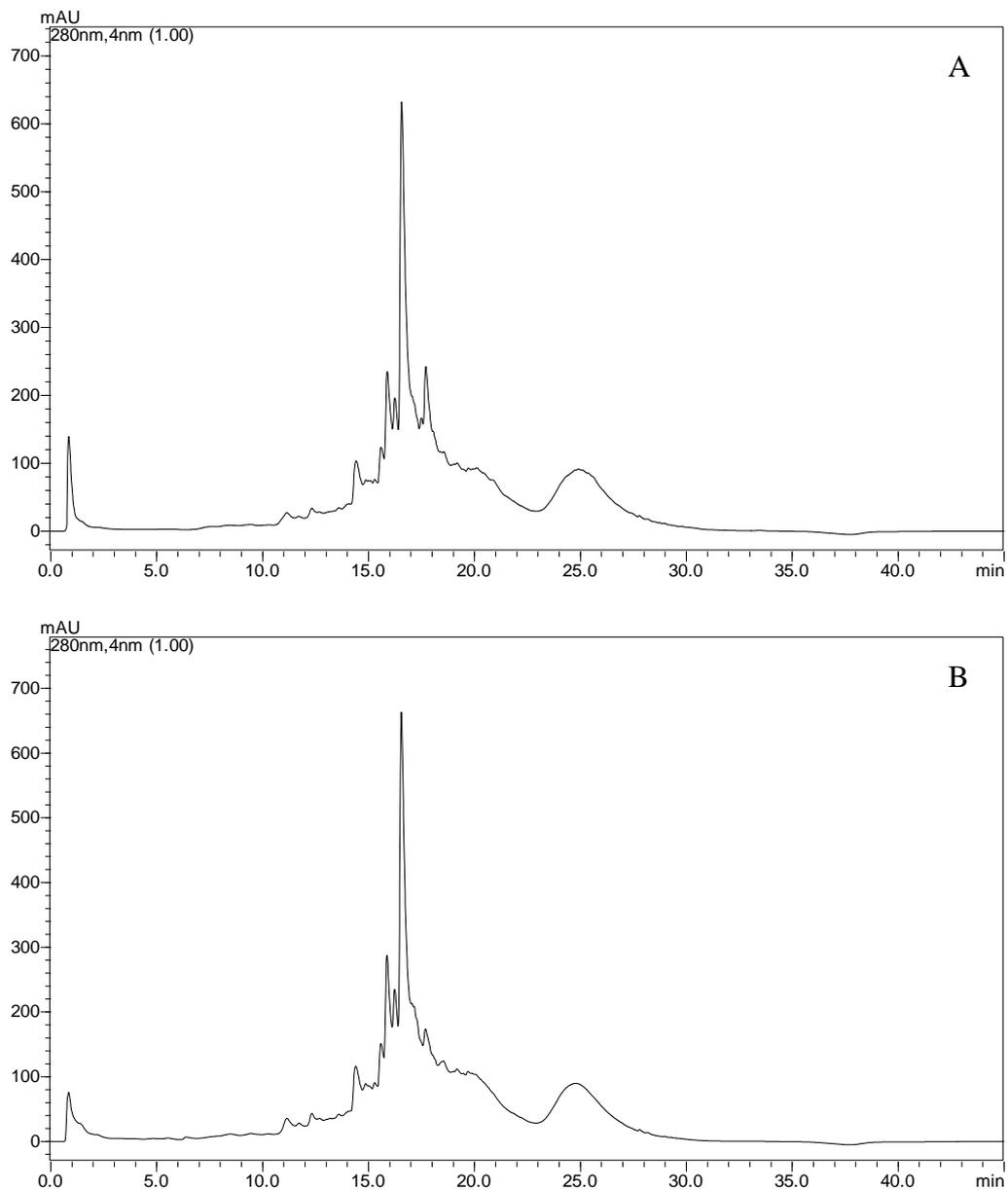
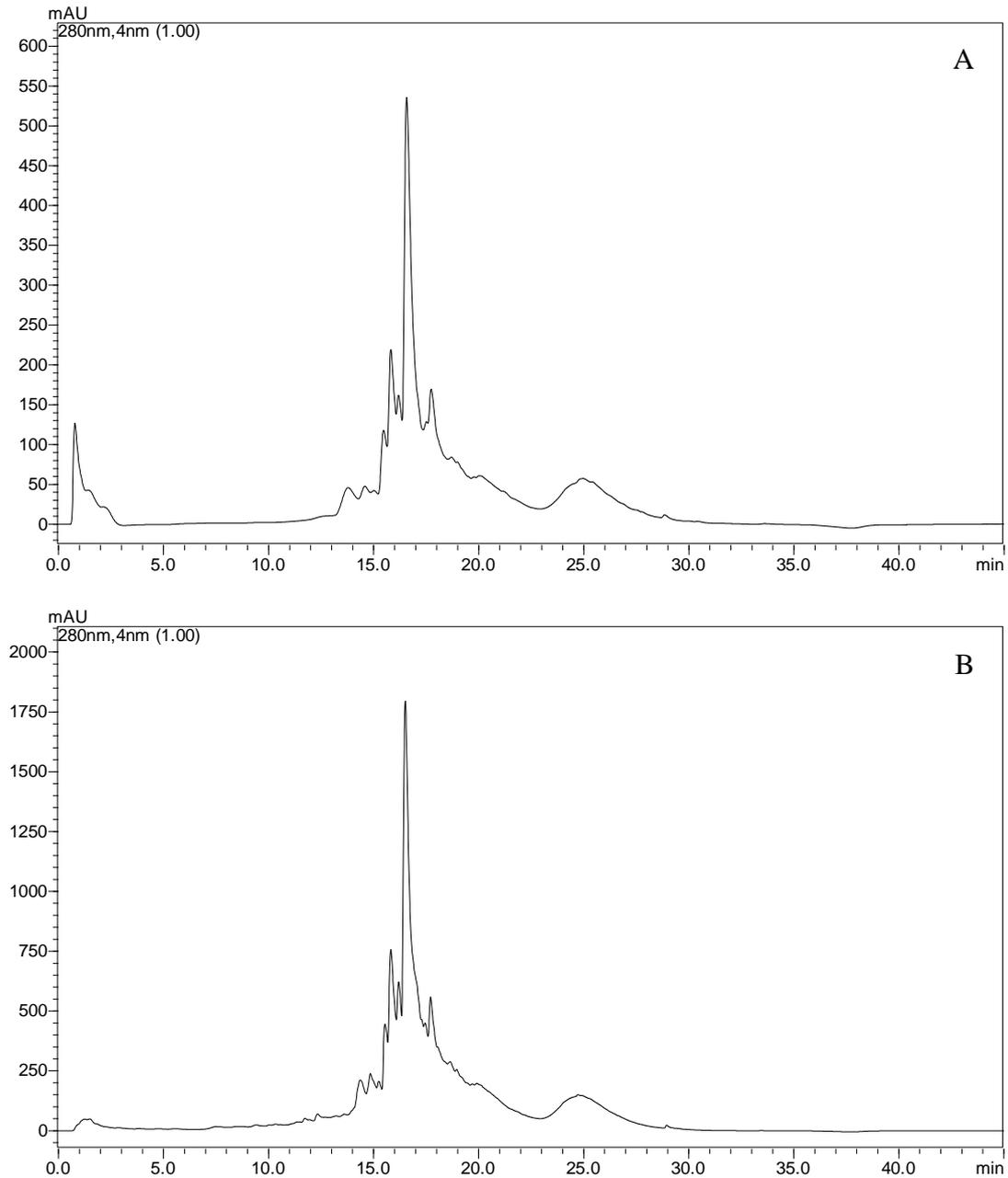


Figura 9. Cromatogramas obtidos por CLUE na análise de extratos obtidos de *E. crista-galli*. Detecção em 280 nm. (A) Extrato hidroetanólico bruto (B) Fração etanólica residual após purificação líquido-líquido.



A partir destes resultados, as frações etanólicas residuais resultantes do procedimento de purificação líquido-líquido foram encaminhadas à análise por CLUE-MS.

CAPÍTULO III

MANUSCRIPT

ABSTRACT

Erythrina species are used in popular medicine as sedative, anxiolytic, anti-inflammatory and anti-hypertensive. In this work, we investigated the chemical composition of extracts obtained from leaves of *E. falcata* and *E. crista-galli*, also assessed the hypotensive potential of *E. falcata* and the possible mechanism involved. The extracts were prepared by maceration and infusion. The total content of phenolic compounds and flavonoids were estimated by spectrophotometric methods. The chemical constituents were studied performing a chromatographic analysis by UPLC-ESI-MS, using reversed-phase system. For *in vivo* protocols, blood pressure and heart rate were measured by the invasive hemodynamic monitoring method. It was administrated *i.v.* different concentrations of the extracts and drugs such as L-NAME, losartan, hexamethonium and propranolol. The results showed total phenolics content for *E. falcata* and *E. crista-galli* was 1.3193 - 1.4989 mgGAE/mL for maceration extracts and 0.8771 - 0.9506 mgGAE/mL for infusions. In total flavonoid, the content was 7.7829 - 8.1976 mg RE/g for maceration and 9.3471 - 10.4765 RE mg/g for infusions. The major composition showed alkaloids, suggesting the compounds erythristemine, 11 β -methoxyglucoerysodine, erysothiopine, 11 β -hydroxyerysodine-glucose and 11-hydroxyerysotinone-rhamnoside. A potent dose-dependent hypotensive effect was observed for *E. falcata*, which may be related to the route of β -adrenergic receptors.

Keywords: *E. falcata*, *E. crista-galli*, UPLC-MS, alkaloids, hypotensive activity.

4 DISCUSSÃO

O presente trabalho estudou as espécies *E. falcata* e *E. crista-galli* com foco na caracterização dos extratos vegetais e na determinação de seus constituintes químicos. Ainda, propôs a investigação da atividade hipotensora *in vivo* para os extratos de *E. falcata* e dos possíveis mecanismos de ação envolvidos nesta resposta. Para a preparação dos extratos vegetais foram utilizadas as folhas empregando-se as técnicas extrativas de maceração exaustiva e infusão.

Na análise do conteúdo fenólico total, observou-se uma maior concentração desta classe de componentes nos extratos obtidos por maceração. No tocante aos flavonoides totais, as infusões apresentaram maior teor. Os compostos fenólicos são substâncias que possuem anel aromático com um ou mais substituintes hidroxílicos, incluindo também seus grupos funcionais, que são originados do metabolismo secundário das plantas e são essenciais para o seu crescimento e reprodução (SARTORI, 2012).

No geral, os resultados das análises do conteúdo de fenólicos e flavonoides totais demonstraram valores relevantes para as espécies estudadas, porém inferiores aos encontrados em estudos realizados com outras espécies (SAKAT; JUVEKAR, 2010; SOWNDHARARAJAN; JOSEPH; RAJENDRAKUMARAN, 2012; JÚNIOR et al., 2011).

Gobbo-Neto e Lopes (2007) relatam que as plantas, em seu habitat, estão expostas à intensa radiação solar e com isso ocorre degradação de moléculas de extrema importância nos processos fotossintéticos. Com o objetivo de se protegerem desta degradação, as plantas sintetizam compostos de origem fenólica que irão atuar na absorção da radiação. Sendo assim, a concentração desses compostos no material vegetal pode ser influenciada por diversos fatores como as condições edafoclimáticas, ciclo circadiano e desenvolvimento vegetal.

Na determinação cromatográfica obteve-se um perfil de separação adequado e com reprodutibilidade. Quanto à composição química dos extratos, os mesmos apresentaram uma predominância em alcaloides, o que corrobora os dados de Amer, Shamma e Freyer (1991), o qual relatam que o gênero *Erythrina* é conhecido pelo sua bioprodução significativa de alcaloides e que o mesmo é a principal fonte de alcaloides tetracíclicos do tipo *erythrina*. Segundo Soto-Hernandez e Jackson (1994) há grande estímulo aos estudos destes alcaloides por possuírem estrutura tipo base terciária, uma vez que os alcaloides com atividade farmacológica semelhante são sais quaternários.

Chawla e Kapoor (1995) descrevem que as sementes das plantas do gênero *Erythrina* geralmente são a fonte mais prolífica (variando de 0,1-1% da massa seca) de alcaloides,

porém, os mesmos também estão presentes na raiz, caule, cascas, folhas e flores de muitas espécies, ocorrendo tanto na forma de base livre e também na forma "combinada", com glicosídeos ou com ésteres de ácido tioacético.

Os alcaloides sugeridos neste trabalho como presentes nas espécies *E. falcata* e *E. crista-galli* já foram identificados em diversas espécies do gênero e nas diferentes partes das plantas analisadas (CHAWLA et al., 1992; AMER et al., 1991; JUMA; MAJINDA, 2004; JACKSON, CHAWLA, 1982; GRACIA-MATEOS, 1999; FOLKER et al., 1944).

Quanto aos resultados obtidos frente à avaliação da atividade hipotensora dos extratos de *E. falcata*, os mesmos apresentam-se promissores, uma vez que a administração tanto da infusão, quanto da maceração, reduziu significativamente a PAS e a PAD de forma dose dependente, sem exercer influência sobre a FC, comprovando assim o uso empírico pela população.

Como citado anteriormente, diversas espécies deste gênero são utilizadas segundo a medicina popular para o tratamento de hipertensão (UNAKUL, 1950; DHAR et al., 1968; ROSA et al., 2012), porém é a primeira vez que este efeito é demonstrado a partir de estudo aplicado a extratos obtidos de *E. falcata*.

São frequentes os experimentos que envolvem a administração de extratos vegetais e observação da pressão arterial e FC em ratos (KANG et al., 2002; JIMÉNEZ-FERRER et al., 2010; SUÁREZ; ULATE; CICCIO, 2000; DIMO et al., 2003; ZHANG; TAN, 1997). Estes estudos têm o intuito de comprovar cientificamente o uso da medicina popular e, numa perspectiva promissora, propor novos medicamentos ou novas substâncias a base de plantas para o tratamento da hipertensão.

No Brasil, o Ministério da Saúde, dispõe de uma lista que inclui 71 espécies que poderão ser usadas como medicamentos fitoterápicos pelo Sistema Único de Saúde (SUS), sendo que essa ideia é fundamentada para que a relação sirva de base para uma ampliação do número de fitoterápicos que hoje são financiados com recurso federal. Dentro dessa listagem, estão incluídas espécies para serem usadas no tratamento da hipertensão arterial, sendo elas *Allium sativum* e *Alpinia spp* (*A. zerumbet* ou *A. speciosa*) (PINHO; PICHONELLI, 2009).

Também nesta listagem está inclusa a espécie *E. mulungu*, porém sua descrição está relacionada ao cuidado do sistema nervoso de uma maneira geral. Esse fato remete ao grande interesse na investigação de diversas atividades biológicas das espécies do gênero, uma vez que suas composições químicas são bastante ricas e a descrição de seu uso popular dispõe de

muitas atividades biológicas, gerando com isso a necessidade de novos estudos para comprovação dos efeitos citados.

Na tentativa de elucidação do possível mecanismo de ação hipotensor dos extratos de *E. falcata*, testou-se a administração de diferentes drogas, sendo elas, L-NAME, losartana, hexametônio e propranolol. Dentre as drogas testadas, apenas o propranolol demonstrou relação com uma possível via de ação dos extratos. O propranolol é um antagonista β -adrenérgico, que bloqueia igualmente os receptores β_1 e β_2 , exercendo funções frente ao sistema cardiovascular e desempenhando ação anti-hipertensiva. Seu mecanismo complexo consiste em uma redução do débito cardíaco, uma redução de liberação de renina pelas células justaglomerulares do rim e ainda uma ação central, reduzindo a atividade simpática (RANG et al., 2007).

Os resultados obtidos demonstraram que a administração de propranolol (5 mg/kg) foi capaz de influenciar a PAD para a infusão, bem como a PAS e PAD para a maceração, inibindo o efeito do extrato e evidenciando com isso que uma possível via de ação dos mesmos estaria relacionada com o bloqueio β -adrenérgico.

Em resumo, os resultados obtidos nesse trabalho fundamentam a composição química das espécies estudadas e o seu uso empírico pela população no controle e/ou combate à hipertensão arterial, traçando com isso perspectivas para realização de estudos futuros através do desenvolvimento de técnicas voltadas à extração de alcaloides e a confirmação dos compostos sugeridos até então, bem como, a elucidação da ação biológica desempenhada pelos extratos de *E. falcata*.

5 CONCLUSÕES

- ✓ Na caracterização do material vegetal, as espécies *E. falcata* e *E. crista-galli* apresentaram conteúdo de água semelhante;
- ✓ Os teores de fenólicos totais, nas condições utilizadas neste estudo, apresentaram maiores concentrações nas preparações extrativas obtidas por maceração;
- ✓ Os teores de flavonoides totais, nas condições utilizadas neste estudo, apresentaram maiores concentrações nos extratos obtidos por infusão;
- ✓ A espécie *E. crista-galli* apresentou maior conteúdo de fenólicos e flavonoides totais quando comparada à espécie *E. falcata*.
- ✓ A metodologia para determinação por CLAE, com fase móvel composta por acetonitrila e água, em sistema de eluição gradiente, apresentou-se adequada para a separação de compostos presentes em extratos de *E. falcata* e *E. crista-galli*, sendo selecionada para a continuidade de determinação da composição química dos extratos;
- ✓ O método de purificação líquido-líquido por afinidade de solventes apresentou-se apropriado para a proposta de eliminação de compostos lipofílicos e concentração dos compostos majoritários nos extratos em estudo;
- ✓ Os extratos obtidos por maceração das folhas de *E. falcata* e *E. crista-galli* apresentaram perfis cromatográficos semelhantes;
- ✓ A técnica de extração ácido-base para alcaloides, conduzida experimentalmente, demonstrou factibilidade de execução e potencial para rotina de obtenção destes constituintes em espécies de *Erythrina*;
- ✓ A metodologia empregada nas análises por CLUE, com fase móvel composta por acetonitrila:metanol (4:1) e ácido fórmico a 0,1% (pH 3,0) em sistema gradiente, demonstrou eficiência na separação dos componentes do extrato bruto e das frações etanólicas residuais de *E. falcata* e *E. crista-galli*.

- ✓ As análises cromatográficas por CLUE-MS permitiram a proposição de cinco compostos pertencentes à classe de alcaloides, sendo eles erythristemine, 11 β -methoxyglucoerysodine, erysothiopine, 11 β -hydroxyerysodine-glicose e 11-hydroxyerysotinone-ramnosídeo;
- ✓ Os extratos hidroetanólicos e aquosos obtidos das folhas de *E. falcata* apresentaram atividade hipotensora *in vivo*, dose-dependente, quando administrados por via intravenosa em ratos anestesiados;
- ✓ O mecanismo de ação relacionado à atividade hipotensora de extratos obtidos de *E. falcata* não parece estar diretamente ligado a via do NO, não ser mediado pelo sistema renina-angiotensina, mais especificamente aos receptores AT1 e também não estar relacionado com o bloqueio ganglionar, porém pode ter relação com a via dos receptores β -adrenérgicos.

6 PERSPECTIVAS

Tendo em vista os resultados obtidos neste trabalho, as perspectivas para trabalhos posteriores são:

- ✓ Realizar estudos através do desenvolvimento de técnicas voltadas à extração de alcaloides;
- ✓ Avaliar o potencial hipotensor dos extratos das folhas de *E. crista-galli*;
- ✓ Investigar a via de ação hipotensora dos extratos de *E. crista-galli*;
- ✓ Testar um modelo crônico de tratamento com extratos de *E. falcata* e *E. crista-galli*;
- ✓ Avaliar o potencial hipotensor dos extratos de *E. falcata* e *E. crista-galli* em ratos SHR.

REFERÊNCIAS

- ALBUQUERQUE, H. N.; FIGUÊREDO, D. J. C.; CERQUEIRA, J. S. Os vegetais com potencial fitoterápico do complexo Aluizio Campos, Campina Grande-PB. **Revista Brasileira de Informações Científicas**, v. 3, n. 2, p. 17-26, 2011.
- ALMEIDA, Emanuel Eustáquio; Caracterização Farmacognóstica da espécie *Erythrina falcata* Benth, Fabaceae; **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n. 1, p. 100-105, 2010.
- AMER, M. E.; EL-MASRY, S.; SHAMMA, M.; FREYER A.J. Three novel glycodienoid alkaloids from *Erythrina lysistemon*. **Journal of Natural Products**, v. 54, n. 1, p. 161 – 166, 1991.
- AMER, M. E.; SHAMMA, M.; FREYER, A. J. The tetracyclic *erythrina* alkaloids. **Journal of Natural Products**, v. 54, n. 2, p. 329-363, 1991.
- BALANDRIN, M. F.; KINGHORN, A. D.; FARNSWORTH, N. R. **Plant-derived natural products in drug discovery and development**, 1993 apud SHALE, T. L.; STIRK, W. A.; STADEN, J. V. Screening of medicinal plants used in Lesotho for anti-bacterial and anti-inflammatory activity. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 67, p. 347–354, 1999.
- BALDAUF, C.; KUBO, R. R.; SILVA, F.; IRGANG, B. E. “Ferveu, queimou o ser da erva”: conhecimentos de especialistas locais sobre plantas medicinais na região Sul do Brasil. **Revista Brasileira Plantas Mediciniais**, v.11, n.3, p. 282-291, 2009.
- BANQUAR, S.R. **The role of traditional medicine in a rural medicine**, 1993 apud SHALE, T. L.; STIRK, W. A.; STADEN, J. V. Screening of medicinal plants used in Lesotho for anti-bacterial and anti-inflammatory activity. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 67, p. 347–354, 1999.
- BARATA-SILVA, A. W.; MACEDO, R. L. G.; GOMES, J. E. Potencial de utilização de espécies arbóreas Mediciniais no rio grande do sul. **Revista científica eletrônica de engenharia florestal**, v. 3, n. 6, 2005.
- BOTREL, R. T.; RODRIGUES, L. A.; GOMES, L. J.; CARVALHO, D. A.; FONTES M. A. L. Uso da vegetação nativa pela população local no município de Ingaí, MG, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, v. 20, n. 1, p. 143-156, 2006.
- BRANDÃO, M. **Árvores nativas e exóticas do Estado de Minas Gerais**. Belo Horizonte: Epamig, p. 528, 2002.
- BURT, V. L.; WHELTON, P.; ROCELLA, E. J., et al. Prevalence of Hypertension in the US adult Population: results from the Third National Health and Nutrition Examination Survey, 1988-1991. **Hypertension**, v. 25, p. 305-313, 1995 apud ANDRADE, J. P., VILAS-BOAS, F.; CHAGAS, H.; ANDRADE, M. Aspectos Epidemiológicos da Aderência ao Tratamento da

Hipertensão Arterial Sistêmica. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 79, n. 4, p. 375-379, 2002.

CABRAL, A. G. S. **Constituintes químicos de *Erythrina velutina* Willd (Fabaceae)**. Dissertação (Mestrado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos) - Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2009.

CABRAL, G. A. L.; MACIEL, J. R. Levantamento etnobotânico da coleção de plantas medicinais do jardim botânico do Recife, PE. **Revista de Biologia e Farmácia**, v. 6, n. 2, p.121 – 129, 2011.

CARVALHO, P. E. R. **Espécies arbóreas brasileiras**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica; Colombo: Embrapa Florestas, v. 2, 2003.

CARVALHO, Paulo Ernani Ramalho. **Mulungu (*Erythrina velutina*)**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica; Colombo: Embrapa Florestas, v. 3, p. 1 – 8, 2008.

CHACHA, M.; MOLETA, G. B.; MAJINDA, R. R.T. Antimicrobial and radical scavenging flavonoids from the stem wood of *Erythrina latissima*. **Phytochemistry**, v. 66, p. 99–104, 2005.

CHANG C, YANG M, WEN H, CHERN J. Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. **Journal of Food Drug Analysis**, v. 10, p. 178-182, 2002.

CHAWLA, A. S.; KAPOOR, V. K. Cap. 3 *Erythrina* Alkalods In WILLIAM P. **Alkaloids: Chemical and biological perspectives**, v. 9, p. 1 – 286, 1995.

CHAWLA, A. S.; SOOD, A.; KUMAR, M.; JACKSON, A.H. Alkaloid constituents from *Erythrina xbidwillii* flowers. **Phytochemistry**, v. 31, n. 1, p. 372-374, 1992.

CORRÊA, M. P. **Dicionário das plantas úteis do Brasil**. Rio de Janeiro: Imprensa Nacional, v. 2, 1984.

COSTA, A. F.; **Farmacognosia**. 2. Ed. Lisboa: Calouste Gulbenkian, 1982.

COTTON, F. A.; WILKINSON, G. **Advanced Inorganic Chemistry A Comprehensive Text**, 4th ed.; **Wiley**: New York, p. 848, 1980.

DANTAS, M. C.; OLIVEIRA, F. S.; BANDEIRA, S. M.; BATISTA, J. S.; SILVA, Jr. C. D.; ALVES, P. B.; ANTONIOLLI, A. R.; MARCHIORO, M.; Central nervous system effects of the crude extract of *Erythrina velutina* on rodents. **Journal Ethnopharmacology**, v. 94, n. 1, p. 129-133, 2004.

DHAR, M. L.; DHAR, M. M.; DHAWAN, B. N.; MEHROTRA, B. N.; RAY, C. Screening of indian plants for biological activity: part I. **Indian Journal of Experimental Biology**, v. 6, p. 232-247, 1968.

DIAS, S. A.; NEVES, A. E. O.; FERRAZ, A. B. F.; PICADA, J. N.; PEREIRA, P. Neuropharmacological and genotoxic evaluation of ethanol extract from *Erythrina falcata* leaves, a plant used in Brazilian folk medicine. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 23, n. 2, p. 335-341, 2013.

DIMO, T.; NGUELEFACK T. B.; TAN, P. V.; YEWAH, M. P.; DONGO E.; RAKOTONIRINA, S. V.; KAMANYI, A.; BOPELET, M. Possible Mechanisms of Action of the Neutral Extract from *Bidens pilosa* L. Leaves on the Cardiovascular System of Anaesthetized Rats. **Phytotherapy Research**, v. 17, p. 1135–1139, 2003.

DUARTE, M. C. T. Atividade Antimicrobiana de Plantas Mediciniais e Aromáticas Utilizadas no Brasil. **Construindo a História dos Produtos Naturais**, v. 7, 2006.

EMBRAPA. **Corticeira-do-seco *Erythrina falcata* Benth.** Embrapa Florestas, tiragem: 25, 2004.

ESTRADA, E. I.; SÁNCHEZ, M. P.; MATEOS, R. G.; CHÁVEZ, R. S. M.; VALVERDE, G. R.; SOTO HERNÁNDEZ, R. M. Actividad antioxidante de alcaloides de *Erythrina americana* Miller. **Revista Fitotecnia Mexicana**, v. 34, n. 4, p. 241 - 246, 2011.

ETCHEVERRY, A. V.; ALEMÁN, C. E. T. Reproductive biology of *Erythrina falcata* (Fabaceae: Papilionoideae). **Biotrópica**, v. 37, n. 1, p. 54-63, 2005.

ETCHEVERRY, S. R.; FERNÁNDEZ, M. A.; RATES, S. K.; PARRILLO, S.; VÁSQUES, A.; HEINZEN, H. A.; Pharmacological Activity and Phytochemical Studies of *Erythrina crista-galli* Extracts. **Molecular Medicinal Chemistry**, v. 1, p. 8-12, 2003.

FAGGION, S. A.; CUNHA, A. O. S.; FACHIM, H. A.; GAVIN, A. S.; SANTOS, W. F.; PEREIRA, A. M. S.; BELEBONI, R. O. Anticonvulsant profile of the alkaloids (+)-erythravine and (+)-11- α -hydroxy-erythravine isolated from the flowers of *Erythrina mulungu* Mart ex Benth (Leguminosae–Papilionaceae). **Epilepsy & Behavior**, v. 20, p. 441–446, 2011.

FARIA, T. J.; CAFÊU, M. C.; AKIYOSHI, G.; FERREIRA, D. T.; GALÃO, O. F.; ANDREI, C. C.; FILHO, P. P.; PAIVA M. R. C.; BARBOSA, A. M.; BRAZ-FILHO, R. Alcalóides de folhas e flores de *Erythrina speciosa* Andrews. **Revista Química Nova**, v. 30, n. 3, p. 525-527, 2007.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária: ANVISA. 5ª ed. V. 1. Brasília, 2010.

FEITOSA, L. G. P.; GUARATINI, T.; LOPES, J. L. C.; LOPES, N. P.; BIZARO, A. C.; SILVA, D. B. Aplicação de espectrometria de massas com ionização por elétron na análise de alcaloides do mulungu. **Revista Química Nova**, v. 35, n. 11, p. 2177-2180, 2012.

FENNER, R.; BETTI, A. H.; MENTZ, L. A.; RATES, S. M. K.. Plantas utilizadas na medicina popular brasileira com potencial atividade antifúngica. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 42, n. 3, p. 369 – 394, 2006.

FILHO, V. C.; YUNES, R. A. Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais. Conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividade. **Química Nova**, v. 21, n. 1, p. 99 – 105, 1998.

FLAUSINO JUNIOR, O.; SANTOS, L.Á.; VERLI, H.; PEREIRA, A.M.; BOLZANI, V. S.; SOUZA, R. L. N. Anxiolytic Effects of Erythrinian Alkaloids from *Erythrina mulungu*. **Journal of Natural Products**, v. 70, n. 1, p. 48 – 53, 2007.

FOLKERS, K; KONIUSZY, F; SHAVEL, J. Erythrina Alkaloids. XIV. Isolation and Characterization of Erysothiovine and Ergsothiopine, New Alkaloids Containing Sulfur **Journal of the American Chemical Society**, v. 66, p. 1083 – 1087, 1944.

FOX, SI. **Fisiologia Humana**. 7ª Ed. Manole, Barueri, SP, p. 726, 2007.

FRANCO, I. J. P.; FONTANA, V. L. **Ervas & plantas: a medicina dos simples**. 10 Ed. Erechim: Vida, 2005.

GARCÍA-MATEOS, R.; SOTO-HERNÁNDEZ, M.; MARTÍNEZ-VÁZQUEZ, M.; VILLEGAS-MONTER, A. Isolation of Alkaloids of *Erythrina* from Tissue Culture, **Phytochemical Analysis**, vol. 10, p. 12-16, 1999.

GARÍN-AGUILAR, M. E., VALENCIA DEL TORO, G.; SOTO-HERNÁNDEZ, M.; KITE, G. High-performance Liquid Chromatography–Mass Spectrometric Analysis of Alkaloids Extracted from Seeds of *Erythrina herbácea*. **Phytochemical analysis**, v. 16, p. 302–306, 2005.

GOBBO-NETO, L.; LOPES, N.P. Plantas medicinais: fatores de influencia no conteúdo de metabolitos secundários. **Química Nova**, v. 30, n. 2, 374-381, 2007.

GORZALCZANY, S.; MOSCATELLI, V.; FERRARO, G.. Artemisia copa aqueous extract as vasorelaxant and hypotensive agent. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 148, n. 1, p. 56 – 61, 2013.

GRATIERI-SOSSELLA, A. **Potencialidade ornamental e paisagística, caracterização morfo-anatômica e propagação de *Erythrina crista-galli* L.** 2005. 162f. Dissertação (Mestrado em Agronomia/ Produção Vegetal) - Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo, 2005.

GRATIERI-SOSSELLA, A.; PETRY, C.; NIENOW A. A. Propagação da corticeira do banhado (*Erythrina crista-galli* L.) (Fabaceae) pelo processo de estaquia. **Revista Árvore**, v.32, n.1, p.163-171, 2008.

HARGREAVES, R.; JONSON, D.; MILLINGTON, D.; MONDAL, M.; BEAVERS, W.; BECKER, L.; YOUNG, C.; RINEHARI, K. L. Alkaloids of American species of *Erythrina*. **Lloydia**, v. 37, p. 569- 580, 1974.

IINUMA, M.; OKAWA, Y.; TANAKA, T. Three new cinnamylphenols in heartwood of *Erythrina crista-galli*. **Phytochemistry**, v. 37, n. 4, p. 1153-1155, 1994.

IKAWA, M.; SCHAPER, T. D., DOLLARD, C. A.; SASNER, J. J. Utilization of Folin-Ciocalteu Phenol Reagent for the Detection of Certain Nitrogen Compounds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, p. 1811-1815, 2003.

INNOK, P.; RUKACHAISIRIKUL, T.; PHONGPAICHIT, S.; SUKSAMRARN, A. Fuscacarpans A–C, new pterocarpanes from the stems of *Erythrina fusca*. **Fitoterapia**, v. 81, p. 518–523, 2010.

JACKSON, A. H.; CHAWLA, A.S. Studies of *Erythrina* alkaloids. IV. G.C./M.S. investigations of alkaloids in the leaves of *Erythrina poeppigiana*, *Erythrina macrophylla*, *Erythrina berteroana*, and *Erythrina salviiflora*. **Allorionia**, v. 3, p. 39 - 45, 1982.

JIMÉNEZ-FERRER, E., BADILLO, F. H., GONZÁLEZ-CORTAZAR, M., TORTORIELLO, J., HERRERA-RUIZ, M.: Antihypertensive activity of *Salvia elegans* Vahl. (Lamiaceae): ACE inhibition and angiotensin II antagonism. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 130, n. 2, p. 340–346, 2010.

JUMA, B. F.; MAJINDA, R. R.T.; Erythraline alkaloids from the flowers and pods of *Erythrina lysistemon* and their DPPH radical scavenging properties. **Phytochemistry**, v. 65, p. 1397–1404, 2004.

JÚNIOR, N. O. R.; FERNANDEZ, L. G.; CASTRO, R. D.; SILVA, L. C.; GUALBERTO, S. A.; PEREIRA, M. L. A.; SILVA, M. V. Bioactive compounds and antioxidant activity of crude extracts of brushwood vegetable species. **Brazilian Journal Food Technology**, v. 14, n. 1, p. 50-57, 2011.

KANG, D. G.; HUR, T. Y.; LEE, G. M.; OH, H.; KWON, T. O.; SOHN, E. J.; LEE, H. S. Effects of *Cudrania tricuspidata* water extract on blood pressure and renal functions in NO-dependent hypertension. **Life Sciences**, v. 70, p. 2599–2609, 2002.

KOUAM J., NOUNDOU, X. S.; MABEKU, L.B. K.; MELI LANNANG, A., M.; CHOUDHARY, M. I.; FOMUM, Z.T. Sigmoidic e: a new antibacterial triterpenoid saponin from *Erythrina sigmoidea* (HUA). **Bulletin of the Chemical Society of Ethiopia**, v. 21, n 3, p. 373-378, 2007.

KOUAM, J.; MELI, A. L.; CHOUDHARY, M. I.; FOMUM, Z. T. Sigmoiside F and Propyloxyamyryn, Two New Triterpenoid Derivatives from *Erythrina sigmoidea* (Fabaceae). **Verlag der Zeitschrift für Naturforschung**, v. 63, p. 101 – 104, 2008.

KUMAR, S.; PATHANIA, A.S.; SAXENA, A.K.; VISHWAKARMA, R.A.; ALI, A.; BHUSHAN, S. The anticancer potential of flavonoids isolated from the stem bark of *Erythrina suberosa* through induction of apoptosis and inhibition of STAT signaling pathway in human leukemia HL-60 cells. **Chemico-Biological Interactions**, v. 205, p. 128–137, 2013.

LAURENT, S.; SCHLAICH, M.; ESLER M. New drugs, procedures and devices for hypertension. **The Lancet**, v. 380, p. 591–600, 2012.

LEHMAN, A. J. Actions of *Erythrina americana*, a possible curare substitute. **Journal Pharmacology**, v. 60, p. 69 – 81, 1937.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação de plantas arbóreas nativas do Brasil**. Nova Odessa: Plantarum, p. 352, 1992.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. Nova Odessa: Plantarum, 2000.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas**. São Paulo: Instituto Plantarum, 2002.

MACIEL, M. A. M.; PINTO, A. C.; VEIGA JR., V. F.; GRYNBERG, N. F.; ECHEVARRIA, A.. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Química Nova**, v. 25, n. 3, p. 429-438, 2002.

MACMAHON, S.; PETO, R.; COUTLER, J.; COLLINS, R.; SORLIE, P.; NEATON, P.; ABBOTT, R.; GODWIN, J.; DYER, A.; STAMLER, J. Blood pressure, stroke, and coronary heart disease. **Lancet**, v. 335, p. 765 – 774, 1990.

MAIER, U.H.; RÖDL, W.; NEUMANN, B. D.; ZENK, M. H. Biosynthesis of *Erythrina* alkaloids in *Erythrina crista-galli*. **Phytochemistry**, v.52, p. 373-382, 1999.

MANTLE, P. G.; COLEMAN, M. J. Biosynthesis of radiolabelled alkaloids from ¹⁴C-tyrosine in *Erythrina crista-galli*. **Phytochemistry**, v. 23, n. 8, p. 1617- 1618, 1984.

MANTLE, PETER G.; LAWS, IAN; WIDDOWSON, DAVID A. 8-oxo-erythraline, a naturally-occurring principal alkaloid from *Erythrina crista-galli*. **Phytochemistry**, v. 23, n.6, p. 1336- 1338, 1984.

MBAFOR, J. T.; NDOM, J. C.; FOMUM, T. Triterpenoid saponins from *Erythrina sigmoidea*. **Phytochemistry**, v. 44, n. 6, p. 1151-1155, 1997.

MITSCHER, L. A.; GOLLAPUDI, S.R.; GERLACH, D.C.; DRAKE, S.D.; VELIZ, E. A.; WARD, J. A. Erycristin, a new antimicrobial petrocarpan from *Erythrina crista-galli*. **Phytochemistry**, v. 27, n. 2, p. 381-385, 1988.

NEILL, D. A. The genus *Erythrina*: taxonomy, distribution and ecological differentiation. *Erythrina* in the new and old worlds. **Missouri Botanical Garden Bulletin**, St Louis, n. 63, p. 166, 1993.

NEILL, D. A.; Experimental studies on species relationships in *Erythrina* (Leguminosae: Papilionoideae). **Annals of the Missouri Botanical Garden**, v. 75, p. 886-969, 1988.
NEVES, T. S.; CARPANEZZI, A. A.; RIBAS, K. C. Z.; MARENCO, R. A. Enraizamento de corticeira-da-serra em função do tipo de estaca e variações sazonais. **Pesquisa agropecuária brasileira**, v. 41, n. 12, p. 1699-1705, 2006.

NKENGFAK, A. E.; KOUAM, J.; VOUFFO, T. W.; MEYER, M.; TEMPESTA, M. S.; FOMUM, Z. Tane. An isoflavanone and a coumestan from *Erythrina sigmoidea*. **Phytochemistry**, v. 35, p. 521, 1994.

NKENGFAK, A.E.; WAFFO, A. K.; AZEBAZE, G. A.; FOMUM, Z. T.; MEYER, M.; BODO, B.; HEERDEN, F. R. Indicanine A, a New 3-Phenylcoumarin from Root Bark of *Erythrina indica*. **Journal of Natural Products**, v. 63, n. 6, p. 855 – 856, 2000.

NKENGFAK, A.E.; FOMUM, Z. T.; UBILLAS, R.; TEMPESTA, M. S. A New Prenylated Isoflavone and Triterpenoids from *Erythrina eriotriocho*. **Journal of Natural Products**, p. 53, n. 6, p.1552–1556, 1990.

OLIVEIRA, C. J.; ARAUJO, T. L. Plantas medicinais: usos e crenças de idosos portadores de hipertensão arterial. **Revista Eletrônica de Enfermagem**, v. 09, n. 01, p. 93 - 105, 2007.

OLIVEIRA, D. R.; ZAMBERLAM, C. R.; GAIARDO, R. B.; RÊGO, G. M.; CERUTTI, J. M.; CAVALHEIRO, A. J.; CERUTTI, S. M. Flavones from *Erythrina falcata* are modulators of fear memory. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 14, n. 288, p. 2 – 17, 2014.

OMS. Organização Mundial da Saúde. Estratégia de Medicina 2002 - 2005. Geneva: Organização Mundial da Saúde, p. 74, 2002.

ORIHUELA, P. A.; ISHIYAMA, V. Postcoital ingestion of the aqueous extract of *Erythrina falcata* Benth prevents pregnancy in the mouse. **Contraception**, v. 73, p. 307– 310, 2006.

OZAWA, M.; HONDA, K.; NAKAI, I.; KISHIDA, A.; OHSAKI, A. Hypaphorine, an indole alkaloid from *Erythrina velutina*, induced sleep on normal mice. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 18, p. 3992–3994, 2008.

OZAWA, M.; KAWAMATA, S.; ETOH, T.; HAYASHI, M.; KOMIYAMA, K.; KISHIDA, A.; KURODA, C.; OHSAKI, A. Structures of New Erythrinan Alkaloids and Nitric Oxide

Production Inhibitors from *Erythrina crista-galli*. **Chemical & pharmaceutical bulletin**, v. 58, n. 8, p. 1119—1122, 2010.

PINHO, A.; PICHONELLI, M. Governo lista plantas que poderão virar fitoterápicos. **Jornal Folha de São Paulo**, 14 de fevereiro de 2009.

QUEIROZ, E. F.; WOLFENDERA, J. L.; ATINDEHOVA, K. K.; TRAOREB D.; HOSTETTMANNA, K. On-line identification of the antifungal constituents of *Erythrina vogelii* by liquid chromatography with tandem mass spectrometry, ultraviolet absorbance detection and nuclear magnetic resonance spectrometry combined with liquid chromatographic micro-fractionation. **Journal of Chromatography A**, v. 974, p. 123–134, 2002.

QUEIROZ, S. C. N.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F. Métodos de extração e/ou concentração de compostos encontrados em fluídos biológicos, para posterior determinação cromatográfica. **Química Nova**, v. 24, n. 1, p. 68 – 76, 2001.

REDKO, F.; CLAVIN, M. L.; WEBER, D.; RENE, F.; ANKE, T.; MARTINO, V. Antimicrobial Isoflavonoids from *Erythrina crista-galli* Infected with *Phomopsis* sp. **Verlag der Zeitschrift für Naturforschung**, v. 62, p. 164-168, 2007.

RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M.; FLOWER, R. J. **RANG & DALE Farmacologia**, 6 Ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2007.

RIERA, A. R. P. **Hipertensão arterial - conceitos práticos e terapêutica**. São Paulo: Atheneu; 2000.

RIO GRANDE DO SUL. **Lei Estadual 9.519/92**, de 21 de janeiro de 1992. Institui o Código Florestal do Estado do Rio Grande do Sul e dá outras providências. Porto Alegre, 21 de janeiro de 1992. Disponível em: <http://www.mprs.mp.br/ambiente/legislacao/id606.htm>. Acesso em: 15 out. 2014.

RODRIGUES, M. V. N.; REHDER, V. L. G.; SARTORATTO, A.; JÚNIOR, S. B.; SANTOS, A. S. O emprego de técnicas hífenadas no estudo de plantas medicinais. **Construindo a História dos Produtos Naturais**, v. 7, 2006.

ROSA, D. S.; FAGGION, S. A.; GAVIN, A. S.; SOUZA, M. A.; FACHIM, H. A.; SANTOS, W. F.; PEREIRA, A. M. S.; CUNHA, A. O. S.; BELEBONI R.O.. Erysothrine, an alkaloid extracted from flowers of *Erythrina mulungu* Mart. ex Benth: Evaluating its anticonvulsant and anxiolytic potential. **Epilepsy & Behavior**, v. 23, p. 205–212, 2012.

SARTORI, C. J. **Avaliação dos teores de compostos fenólicos nas cascas de *Anadenanthera peregrina* (Angico-vermelho)**. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia da Madeira) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2012.

SAKAT, S. S.; JUVEKAR, A. R. Comparative Study of *Erythrina indica* Lam. (Fabaceae) Leaves Extracts for Antioxidant Activity. **Journal of Young Pharmacists**, v. 2, n. 1, p. 63-67, 2010.

SERRANO, M. A. R.; BATISTA, A. N. L.; BOLZARI, V. S.; SANTOS, L. Á.; NOGUEIRA, P. J. C.; SOUZA, R. L. N.; LATIF, A.; ARFAN, M. Anxiolytic-like effects of erythrinian alkaloids from *Erythrina suberosa*. **Química Nova**, v. 34, n. 5, p. 808-811, 2011.

SILVA, B. Q.; HAHN, S. R. Uso de plantas medicinais por indivíduos com hipertensão arterial sistêmica, diabetes mellitus ou dislipidemias. **Revista Brasileira de Farmácia Hospitalar e Serviços de Saúde**, v.2, n.3, p. 36-40, 2011.

SILVA, D. S. **Comparação de métodos de determinação de umidade em matérias-primas de uso farmacêutico**. Trabalho de Conclusão de Curso, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2010.

SILVA, F.; CASALI, V.W.D. **Plantas medicinais e aromáticas: pós-colheita e óleos essenciais**. Viçosa: Arte e Livros, p. 13, 2000.

SILVA, M. N. **Da terra para o coração: a utilização de plantas medicinais em distúrbios cardíacos**. Trabalho de Conclusão de Curso, Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande, 2012.

SILVA, R.; **Farmacopéia dos Estados Unidos do Brasil**. São Paulo: Companhia Editora Nacional, 1929.

SINGH, H.; CHAWLA, A. S.; KAPOOR, V.; KUMAR, N. Investigation of *Erythrina* spp. Ix. Chemical constituents of *Erythrina stricta* Bark. **Journal of Natural Products**, v. 44, n. 5, p. 526 – 529, 1981.

SOARES, P. K.; BRUNS, R. E.; SCARMINIO, I. S. Principal component and Tucker3 analyses of high performance liquid chromatography with diode-array detection fingerprints of crude extracts of *Erythrina speciosa* Andrews leaves. **Analytica Chimica Acta**, v. 736, p. 36– 44, 2012.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA / SOCIEDADE BRASILEIRA DE HIPERTENSÃO / SOCIEDADE BRASILEIRA DE NEFROLOGIA. VI Diretrizes Brasileiras de Hipertensão. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**. v. 95, n. 1, p. 1-51, 2010.

SOTO-HERNANDEZ, M.; JACKSON, A. H.; *Erythrina* Alkaloids: Isolation and Characterisation of Alkaloids from Seven *Erythrina* Species. **Planta Medica**, v. 60, n. 2, p. 175 – 177, 1994.

SOTO-HERNÁNDEZ, R. M.; GARCÍA-MATEOS, R.; MIGUEL-CHÁVEZ R. S.; KITE, G.; MARTÍNEZ-VÁZQUEZ, M.; RAMOS-VALDIVIA A. C. *Erythrina*, a Potential Source of Chemicals from the Neotropics. Bioactive Compounds. **Phytomedicine**, p. 163 – 185, 2012.

SOWNDHARARAJAN, K.; JOSEPH, J. M.; RAJENDRAKUMARAND. In vitro xanthine oxidase inhibitory activity of methanol extracts of *Erythrina indica* Lam. leaves and stem bark. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, p. 1415-1417, 2012.

SUÁREZ, A., ULATE, G., CICCIO J.F. Hypotensive action of an aqueous extract of *Pimenta dioica* (Myrtaceae) in rats. **Revista de Biología Tropical**. v. 48, n. 01, p. 53 – 58, 2000.

TANAKA, H.; TANAKA, T.; ETOH, H. Erythrinan alkaloid from *Erythrina x bidwillii*. **Phytochemistry**, v. 48, n. 8, p. 1461-1463, 1998.

TANAKA, H.; TANAKA, T.; ETOH, H. Three pterocarpanes from *Erythrina crista-galli*. **Phytochemistry**, v. 45, n. 4, p. 835–838, 1997.

TOMAZZONI, M. I.; NEGRELLE, R. R. B.; CENTA, M. L. Fitoterapia popular: a busca instrumental enquanto prática Terapêutica. **Texto Contexto Enfermagem**, v. 15, n.1, p. 115-121, 2006.

UNAKUL, S. Pharmacological studies. 2. Study of the leaves of *Erythrina fusca* Lour. **Siriraj Hospital Gazette**, v. 2, n. 4, p. 177-189, 1950.

VASCONCELOS, S. M. M.; OLIVEIRA, G. R.; CARVALHO, M. M.; RODRIGUES, A. C. P.; SILVEIRA, E. R.; FONTELES, M. M. F.; SOUSA, F. C. F. Antinociceptive activities of the hydroalcoholic extract from *Erythrina velutina* and *Erythrina mulungu* in Mice. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 26, n. 7, p. 946-949, 2003.

VIECILI, P.R.N.; BÜNDCHEN, D. C.; RICHTER, C. M.; DIPP, T.; LAMBERTI, D. B.; PEREIRA, A. M. R.; BARBOSA, L. C.; RUBIN, A. C.; BARBOSA, E. G.; PANIGAS, T. F. Curva Dose-resposta do exercício em hipertensos: Análise do número de sessões para efeito hipotensor. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 92, p. 393-399, 2009.

VIRTUOSO, S.; DAVET, A.; DIAS, J. F. G.; CUNICO, M. M.; MIGUEL, M. D.; OLIVEIRA, A. B.; MIGUEL, O.G. Estudo preliminar da atividade antibacteriana das cascas de *Erythrina velutina* Willd., Fabaceae (Leguminosae). **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 15, n. 2, p. 137-142, 2005.

WILLIAMS, B. **The year in hypertension**, v. 55, n. 1, p. 66–73, 2010.

WOISKY, R. G.; SALATINO, A. Analysis of propolis: some parameters and procedures for chemical quality control. **Journal of Apicultural Research**, v. 37, p. 99-105, 1998.

YAMADA C. S. B. Fitoterapia sua história e importância. **Racine**, p. 50-51, 1998.

YANG, B; KORTESNIEMI, M.; LIU, P.; KARONEN, M.; JUHA, P.S. Analysis of Hydrolyzable Tannins and Other Phenolic Compounds in Emblic Leafflower (*Phyllanthus emblica* L.) Fruits by High Performance Liquid Chromatography–Electrospray Ionization

Mass Spectrometry. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, p. 8672-8683, 2012.

YENESEW, A.; AKALA, H. M.; TWINOMUHWEZI, H.; CHEPKIRUI, C.; IRUNGU, B. N.; EYASE, F. L.; KAMATENESI-MUGISHA, M.; KIREMIRE, B. T.; JOHNSON, J. D.; WATERS, N. C. The antiplasmodial and radical scavenging activities of flavonoids of *Erythrina Burtii*. **Acta Tropica**, v. 123, p. 123– 127, 2012.

YENESEW, A.; DERESE, S.; IRUNGU, B.; MIDIWO, J. O.; WATERS, N. C.; LIYALA, P.; AKALA, H.; HEYDENREICH, M.; PETER, M. G. Flavonoids and isoflavonoids with antiplasmodial activities from the root bark of *Erythrina abyssinica*. **Planta Medica** v. 69, p. 658 – 661, 2003.

YENESEW, A.; DERESE, S.; MIDIWO, J. O.; BII, C. C.; HEYDENREICH, M.; PETER, M. G. Antimicrobial flavonoids from the stem bark of *Erythrina burtii*. **Fitoterapia**, v. 76, p. 469– 472, 2005.

ZHANG, C. Y.; TAN, B. K. H. Mechanisms of cardiovascular activity of *Andrographis paniculata* in the anaesthetized rat. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 56, p. 97 – 101, 1997.

ANEXO A – Certificado de aprovação de protocolo para uso de animais em pesquisa

MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA
(Lei nº 11.840, de 11 de janeiro de 2008)

Pró-Reitoria de Pesquisa

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS - CEUA

Fone: (55) 3413 4321, E-mail: ceua@unipampa.edu.br

**CERTIFICADO DE APROVAÇÃO DE PROTOCOLO PARA USO
DE ANIMAIS EM PESQUISA**

Número de protocolo da CEUA: 030/2013

**Título: ANÁLISE FITOQUÍMICA E AVALIAÇÃO DO POTENCIAL HIPOTENSOR DE
EXTRATOS VEGETAIS OBTIDOS DE ESPÉCIES DE *Erythrina***

Data da aprovação: 20/12/2013

Período de vigência do projeto: De: 12/2013 Até: 12/2016

Pesquisador: **ANDREAS SEBASTIAN LOUREIRO MENDEZ**

Campus: **URUGUAIANA**

Telefone: (55) 96011850

E-mail: andreaslmendez@yahoo.com.br

Alessandra S. K. Tamajusuku Neis
Professor Adjunto
Coordenadora da CEUA/UNIPAMPA