

Vanessa Aranega Pires

**EFEITO DA PLANTA *VITEX MONTEVIDENSIS* NA  
ATEROSCLEROSE EXPERIMENTAL: UMA ABORDAGEM  
SOBRE O DESENVOLVIMENTO DE UM MEDICAMENTO  
FITOTERÁPICO NA INDÚSTRIA BRASILEIRA**

Tese de doutorado submetida  
apresentado ao Programa de Pós-  
Graduação em Farmacologia da  
Universidade Federal de Santa  
Catarina para a obtenção do grau de  
Doutora em Farmacologia

Orientador: Prof. Dr. Jamil Assreuy

Florianópolis

2014

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,  
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Pires, Vanessa

EFEITO DA PLANTA VITEX MONTEVIDENSIS NA ATEROSCLEROSE  
EXPERIMENTAL: UMA ABORDAGEM SOBRE O DESENVOLVIMENTO DE UM  
MEDICAMENTO FITOTERÁPICO NA INDÚSTRIA BRASILEIRA / Vanessa  
Pires ; orientador, Jamil Assreuy - Florianópolis, SC, 2014.  
154 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa  
Catarina, Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-  
Graduação em Farmacologia.

Inclui referências

1. Farmacologia. 2. Fitoterápicos. 3. Indústria  
farmacêutica. 4. Aterosclerose. 5. Hipocolesterolemia. I.  
Assreuy, Jamil. II. Universidade Federal de Santa  
Catarina. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia. III.  
Título.

**“Efeito da planta *Vitex montevidensis* na aterosclerose experimental: uma abordagem sobre o desenvolvimento de um medicamento fitoterápico na indústria brasileira”.**

por


VANESSA ARANEGA PIRES

Tese julgada e aprovada em sua forma final pelos membros titulares da Banca Examinadora (Port. 14/PPGFMC/2014) do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia - UFSC, composta pelos Professores Doutores:

Orientador:

  
Prof(a). Dr(a). Jamil Assreuy (Presidente/Orientador/FMC/CCB/UFSC)

Banca Examinadora:


  
Prof(a). Dr(a). Maria Teresa Riggio Lima Landman (Depto. Farmacologia/UNIFESP)

  
Prof(a). Dr(a). Edson Luiz da Silva (Depto. de Análises Clínicas/CCS/UFSC)

  
Prof(a). Dr(a). Juliano Ferreira (FMC/CCB/UFSC)

  
Prof(a). Dr(a). Antonio de Pádua Carobrez (FMC/CCB/UFSC)

Coordenadora:

  
Prof(a). Dr(a). Thereza Christina Monteiro De Lima  
Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia

Florianópolis, 04 de abril de 2014.



*Dedico esse trabalho ao homem  
mais incrível do mundo,  
minha fonte inspiradora,  
meu PAI*



*Um dia aprendi que sonhos existem para tornar-se realidade.*

*E, desde aquele dia, já não durmo para descansar.*

*Simplesmente durmo para sonhar.*

*(Walt Disney)*





## **AGRADECIMENTOS**

Aos meus pais Lourdes e Wilson, seres humanos admiráveis, que exalam bondade e sempre abrem mão dos próprios sonhos para realização dos meus. Pessoas especiais que ainda hoje acompanham a minha caminhada e vibram comigo em cada vitória, meu porto seguro, conselheiros e maiores incentivadores;

Ao meu marido Vanderson Galan, por toda a ajuda, companheirismo e compreensão durante todos esses anos de convivência e de desenvolvimento deste trabalho;

Aos meus avôs paternos Terezinha e José, e também aos maternos Nair e Gines, por não terem poupado amor e dedicação durante grande parte da minha criação, eles infelizmente já se foram, mas certamente estão felizes por mais esta etapa vencida;

A minha irmã Izadora, que nasceu para completar a minha vida e me mostrar o quanto o mundo pode ser diferente;

Aos meus padrinhos Fátima e Martin, que sempre foram meus segundos pais e dividiram comigo cada etapa da minha vida, seres iluminados os quais sempre terei respeito e admiração e também a minha prima e afilhada Taciana;

Ao Professor Dr. Jamil Assreuy, o meu muito obrigado por ter aceitado o desafio da minha orientação. Sei que não foi fácil, mas você sempre manteve o equilíbrio nos momentos mais difíceis e sempre esteve pronto para me mostrar o caminho;

Ao Professor Dr. Reinaldo Naoto Takahashi, meu orientador do mestrado, o responsável pelo meu início na carreira científica. Muito obrigada por ter me aceitado em seu laboratório como aluna de iniciação científica e ter me incentivado a continuar e hoje estar aqui;

Aos demais professores do Curso de Pós Graduação em Farmacologia, que sempre me guiaram com entusiasmo e competência;

Aos colaboradores Euclides, Jhonatan, Wagner, Flávio e Carolina pelos ensinamentos e discussões que ajudaram a realizar este trabalho;

Aos meus queridos chefes e proprietários da empresa Prati-Donaduzzi, Dra. Carmen Donaduzzi e Dr. Luiz Donaduzzi, por me incentivar e possibilitar a realização deste trabalho;

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Tecnológico (CNPq) e a empresa Prati - Donaduzzi, pelo apoio financeiro;

Acima de tudo e de todos agradeço a Deus, que em sua onipresença regeu minha vida, dando-me amparo e equilíbrio nos momentos em que mais precisei. Minha eterna gratidão.

## RESUMO

As plantas *Vitex montevidensis*, *Campomanesia xantocarpa* e *Allophylus edulis* são espécies nativas presentes na região Sul do Brasil. Atualmente sua utilização e conhecimento vem quase que inteiramente da cultura popular, que utiliza a infusão de suas folhas para diminuição dos níveis lipídicos. Sendo assim, este estudo teve como objetivo investigar os efeitos anticolesterêmicos e antiaterogênico dos extrato e frações das plantas em camundongos geneticamente modificados tratados com dieta rica em gordura. Após realização das etapas botânica e fitoquímica, as três plantas foram submetidas a realização de testes farmacológicos onde foi possível observar que os extratos e as frações residual e n-butanol da planta *Vitex montevidensis* foram capazes de reduzir os níveis de colesterol total, triglicéridos e LDL-C além de diminuir a área da lesão aterosclerótica e o índice aterogênico. Além disso, o tratamento não mostrou nenhum indício de toxicidade aguda, evidenciado pela ausência de sinais clínicos relevantes, bem como ausência de morte em todo o período de observação. Através de análises fitoquímicas foi possível identificar que a planta é rica em glicoflavonóides sendo a vitexina, isovitexina, orientina e isoorientina, flavonóides presentes em grande quantidade na planta, podendo ser responsáveis pelos efeitos farmacológicos encontrados. Estes resultados suportam o potencial terapêutico do extrato da planta *Vitex montevidensis* para o tratamento de doenças cardiovasculares.

**Palavras chave:** *Vitex montevidensis*, hipocolesterolemia, aterosclerose, flavonóides, camundongos C57/bl6 KO LDLr.



## ABSTRACT

The plants *Vitex montevidensis*, *Campomanesia Xantocarpa* and *Allophylus edulis* species are present in Southern Brazil. Currently their use and knowledge come almost entirely from popular culture, which uses the infusion of its leaves to decrease lipid levels. Therefore, this study aimed to investigate the anticholesteremic and antiatherogenic effects of the plant extract and fractions in genetically modified mice treated with high fat diet. After performing the botanical and phytochemical steps, the three plants were submitted to the pharmacological tests where it was observed that the extracts and fractions of *Vitex montevidensis* were able to reduce levels of total cholesterol, triglycerides and LDL besides reducing the area of atherosclerotic lesion and the atherogenic index. Moreover, this treatment showed no sign of acute toxicity, as evidenced by the absence of relevant clinical signs as well as the absence of death throughout the observation period. Through the phytochemical analysis was possible to identify that the plant is rich in glicoflavonoids being vitexin, isovitexin, orientin and isorientin flavonoids present in large quantities in the plant, and these flavonoids may be responsible for the pharmacological effects here found. These results support the therapeutic potential of the extract of the plant *Vitex montevidensis* for the treatment of cardiovascular diseases.

**Keywords:** *Vitex montevidensis*, hypocholesterolaemia, atherogenic index, flavonoids, C57/bl6 LDLr KO mice.



## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Resultados dos valores médios das análises de controle de qualidade da matéria-prima das plantas *Vitex montevidensis*, *Campomanesia xantocarpa* e *Allophylus edulis*..... 68
- Tabela 2.** Relação entre reações cromáticas e a coloração obtida conforme o tipo de flavonóide presente na amostra analisada. .... 75
- Tabela 3.** Diluição das soluções extrativas, representando a quantidade em ml de solução extrativa e água, por tubo de ensaio, para a realização do teste de permanência de espuma como indicativo para a presença de saponinas ..... 83
- Tabela 4.** Resultado das análises do perfil fitoquímico preliminar das plantas *Vitex montevidensis*, *Campomanesia xantocarpa* e *Allophylus edulis*. .... 86
- Tabela 5.** Resultados das análises de rendimento dos extratos bruto das plantas *Vitex montevidensis*, *Campomanesia xantocarpa* e *Allophylus edulis*. .... 93
- Tabela 6.** Grupos experimentais utilizados na avaliação da eficácia das plantas *Vitex montevidensis*, *Allophylus edulis* e *Campomanesia xantocarpa*..... 98
- Tabela 7.** Representação dos grupos, tratamentos, doses e vias de administração dos animais avaliados no teste de triagem hipocrática. 114
- Tabela 8.** Peso dos órgãos dos animais após realização do teste Hipocrático ou Teste de Irwin. .... 117
- Tabela 9.** Os compostos identificados por UPLC-MS/MS no modo negativo em comparação com flavonóides padrão..... 127





## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Formas farmacêuticas de medicamentos fitoterápicos registradas na Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). ..	33
<b>Figura 2.</b> Imagem da planta <i>Vitex montevidensis</i> .....	41
<b>Figura 3.</b> Imagem da planta <i>Allophylus edulis</i> . .....	43
<b>Figura 4.</b> Imagem da planta <i>Campomanesia xantocarpa</i> .....	45
<b>Figura 5.</b> Representação esquemática do procedimento de quarteamento .....	54
<b>Figura 6.</b> Cortes histológicos das folhas da planta <i>Vitex montevidensis</i> . .....	61
<b>Figura 7.</b> Cortes histológicos das folhas da planta <i>Campomanesia xantocarpa</i> .....	64
<b>Figura 8.</b> Cortes histológicos das folhas da planta <i>Allophylus edulis</i> . .	67
<b>Figura 9.</b> Estrutura básica dos flavonóides.....	74
<b>Figura 10.</b> Efeito do extrato aquoso (EAVM), hidroalcoólico (HEVM) e etanólico (EEVM) das folhas da planta <i>V. montevidensis</i> sobre o perfil lipídico de camundongos C57 bl/6 KO LDLr .....	102
<b>Figura 11.</b> Efeito do extrato aquoso (EACX), hidroalcoólico (HECX) e etanólico (EECX) das folhas da planta <i>C. xantocarpa</i> sobre o perfil lipídico de camundongos C57 bl/6 KO LDLr .....	103
<b>Figura 12.</b> Efeito do extrato aquoso (EAAE), hidroalcoólico (HEAE) e etanólico (EEAE) das folhas da planta <i>A. edulis</i> sobre o perfil lipídico de camundongos C57 bl/6 KO LDLr .....	104
<b>Figura 13.</b> Efeito das frações (residual, n-butanol, acetato de etila, diclorometano e hexano) do extrato das folhas da planta <i>Vitex montevidensis</i> (125 e 250 mg/Kg) nos níveis lipídicos de camundongos C57BL/6 KO LDLr. ....	105

<b>Figura 14.</b> Efeito do extrato hidroalcoólico (HEVM), fração residual (FRVM) e fração n-butanólica (FBUVM) das folhas da planta <i>Vitex montevidensis</i> sobre o perfil lipídico de camundongos C57BL/6 KO LDLr. ....	106
<b>Figura 15.</b> Figuras representativas dos cortes histológicos da área de lesão da raiz da aorta de camundongos C57 bl/6 KO LDLr corados com <i>Oil Red</i> . ....	107
<b>Figura 16.</b> Efeito do extrato hidroalcoólico (HEVM) das folhas da planta <i>Vitex montevidensis</i> na medida da área de lesão dos cortes histológicos da raiz da aorta de camundongos C57 bl/6 KO LDLr ....	108
<b>Figura 17.</b> Efeito do extrato hidroalcoólico (HEVM), fração residual (FRVM) e fração n-butanólica (FBUVM) das folhas da planta <i>Vitex montevidensis</i> sobre o índice aterogênico ( $IA = TC / HDL-C$ ) de camundongos C57BL/6 KO LDLr. ....	109
<b>Figura 18.</b> Cromatogramas dos padrões de flavonoides .....	125
<b>Figura 19.</b> Espectros de massa dos cromatogramas dos padrões de flavonoides .....	126
<b>Figura 20.</b> Cromatogramas de íons totais de: A) pradrões de flavonoides B) extrato hidroalcoólico C) fração n-butanol e D) fração residual. ....	128
<b>Figura 21.</b> Cromatogramas de íons totais e cromatogramas de íons extraídos em 577,0 m/z de vitexina-2-o-rhamnoside, 447,2 m/z de orientina e isorientina, 431,2 m/z vitexina e isovitexina de A) extrato hidroalcoólico B) fração n-butanol e C) fração residual. ....	129
<b>Figura 22.</b> Espectro de massa das amostras A) extrato hidroalcoólico B) fração n-butanol e C) fração residual, picos atribuídos a vitexina-2-o-rhamnoside TR: 57 min, orientina TR: 36,5 min, isorientina TR: 37,9 min, vitexina TR: 47,6 min e isovitexina TR: 54,1 min. ....	130

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

°C	Grau Celsius
ANOVA	Análise de variância
ApoE	Apoliproteína E
AVC	Acidente vascular cerebral
BPF	Boas Práticas de Fabricação
C	Carbono
C57/bl6	Camundongos da linhagem C57/BL6
CCD	Cromatografia de Camada Delgada
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CT	Colesterol total
DAC	Doença arterial coronária
DC	Dieta comercial
DCV	Doenças cardiovasculares
DH	Dieta hipercolesterolêmica
EAAE	Extrato aquoso da planta <i>Allophylus edulis</i>
EACX	Extrato aquoso da planta <i>Campomanesia xantocarpa</i>
EAVM	Extrato aquoso da planta <i>Vitex montevidensis</i>
EEAE	Extrato etanólico da planta <i>Allophylus edulis</i>
EECX	Extrato etanólico da planta <i>Campomanesia xantocarpa</i>
EEVM	Extrato etanólico da planta <i>Vitex montevidensis</i>
ESI	Ionização por electrospray
Est	Estômatos
FACVM	Fração acetato de etila da planta <i>Vitex montevidensis</i>
Fb	Face abaxial
FBUVM	Fração n-butanol da planta <i>Vitex montevidensis</i>
Fd	Face adaxial
FDMVM	Fração diclorometano da planta <i>Vitex montevidensis</i>
FeCl <sub>3</sub>	Cloreto férrico
FHVM	Fração hexano da planta <i>Vitex montevidensis</i>
Flo	Floema

FRVM	Fração residual da planta <i>Vitex montevidensis</i>
HCl	Ácido clorídrico
HDL-C	Proteína de alta densidade
HEAE	Extrato hidroalcoólico da planta <i>Allophylus edulis</i>
HECX	Extrato hidroalcoólico da planta <i>Campomanesia xantocarpa</i>
HEVM	Extrato hidroalcoólico da planta <i>Vitex montevidensis</i>
HMG-CoA redutase	Hidroxi-3-metil-glutaril-CoA redutase
HPLC	<i>High-performance liquid chromatography</i>
i.p.	intraperitoneal
IA	Índice aterogênico
IAM	Infarto Agudo do Miocárdio
ICC	Insuficiência cardíaca congestiva
KO LDLr	Camundongo da linhagem C57/BL6 nocautes para receptor de lipoproteína de baixa densidade
KOH	Hidróxido de potássio
LDL-C	Lipoproteína de baixa densidade
L-NAME	NG-nitro-L-arginina metil ester
MS	<i>Mass Spectrometry</i>
MS SCAN	<i>Mass Spectrometry SCAN</i>
N <sub>2</sub>	Nitrogênio
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	Carbonato de sódio
n°	Número
P&D	Pesquisa & Desenvolvimento
pH	Potencial hidrogeniônico
PI	Parênquima lacunoso
PON1	Paraoxonase
Pp	Parênquima paliçádico
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
RE	Resolução
rpm	Rotação por minuto

SNC	Sistema Nervoso Central
SUS	Sistema Único de Saúde
SVTN	Sinvastatina
TG	Triglicerídeo
TR	Tempo de retenção
UNICAMP	Universidade de Campinas
UPLC-ESI-MS	<i>Ultra-Performance Liquid Chromatography Electrospray Tandem Mass Spectrometry</i>
USP	Farmacopeia dos Estados Unidos
UV	Ultra violeta
V	Volt
v.o.	Via oral
VLDL-C	Lipoproteína de muito baixa densidade
Xil	Xilema



# SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>27</b>
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>31</b>
2.1. O USO DOS MEDICAMENTOS FITOTERÁPICOS .....	31
2.2. O DESENVOLVIMENTO E REGISTRO DE MEDICAMENTOS FITOTERÁPICOS ..	32
2.3. DOENÇAS CARDIOVASCULARES .....	36
2.4. PLANTAS MEDICINAIS UTILIZADAS PARA O TRATAMENTO DE DOENÇAS CARDIOVASCULARES .....	39
2.4.1. <i>Vitex montevidensis</i> .....	39
2.4.2. <i>Allophylus edulis</i> .....	41
2.4.3. <i>Campomanesia xantocarpa</i> .....	43
2.5. O PAPEL DOS FLAVONÓIDES NO TRATAMENTO DA HIPERCOLESTEROLEMIA E DA ATEROSCLEROSE .....	45
<b>3. OBJETIVOS.....</b>	<b>49</b>
3.1. OBJETIVOS GERAIS .....	49
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	49
<b>4. ETAPA BOTÂNICA.....</b>	<b>51</b>
4.1. MATERIAL E MÉTODOS.....	53
4.1.1. <i>Obtenção e identificação do material vegetal</i> .....	53
4.1.2. <i>Amostragem</i> .....	54
4.1.3. <i>Avaliação do Material</i> .....	54
4.1.3.1. <i>Descrição Macroscópica</i> .....	54
4.1.3.2. <i>Descrição Microscópica</i> .....	55
4.1.4. <i>Análises Físico-Química e Instrumental</i> .....	55
4.1.4.1. <i>Determinação de Perdas por Dessecação</i> .....	55
4.1.4.2. <i>Cinzas Totais</i> .....	55
4.1.4.3. <i>Cinzas Insolúveis em Ácido</i> .....	56
4.1.4.4. <i>Substâncias Extraíveis por Álcool</i> .....	57
4.2. RESULTADOS .....	59
4.2.1. <i>Obtenção e identificação do material vegetal da planta <i>Vitex montevidensis</i></i> .....	59
4.2.1.1. <i>Caracterização Macroscópica</i> .....	59
4.2.1.2. <i>Caracterização Microscópica</i> .....	60
4.2.2. <i>Obtenção e Identificação do Material Vegetal da Planta <i>Campomanesia xantocarpa</i></i> .....	62
4.2.2.1. <i>Caracterização Macroscópica</i> .....	62

4.2.2.2. Caracterização Microscópica .....	63
4.2.3. <i>Obtenção e identificação do material vegetal da planta <i>Allophylus edulis</i></i> .....	65
4.2.3.1. Caracterização Macroscópica .....	65
4.2.3.2. Caracterização Microscópica .....	66
4.2.4. <i>Padronização de Matéria-Prima - Controle de Qualidade das Plantas</i> .....	68
<b>5. ETAPA FITOQUÍMICA.....</b>	<b>69</b>
5.1. MATERIAL E MÉTODOS .....	71
5.1.1. <i>Análise Fitoquímica Preliminar</i> .....	71
5.1.1.1. Análise Fitoquímica de Cumarinas Voláteis .....	71
5.1.1.2. Análise Fitoquímica de Polifenóis .....	72
5.1.1.3. Análise Fitoquímica de Taninos.....	72
5.1.1.4. Análise Fitoquímica de Catequinas.....	73
5.1.1.5. Análise Fitoquímica de Flavonóides .....	74
5.1.1.6. Análise Fitoquímica de Heterosídeos Antociânicos.....	76
5.1.1.6. Análise Fitoquímica de Antraquinonas .....	77
5.1.1.7. Análise Fitoquímica de Alcalóides .....	79
5.1.1.8. Análise Fitoquímica de Metilxantinas.....	80
5.1.1.9. Análise Fitoquímica de Saponinas .....	81
5.2. RESULTADOS.....	85
5.2.1. <i>Análise Fitoquímica Preliminar</i> .....	85
<b>6. OBTENÇÃO DOS EXTRATOS.....</b>	<b>87</b>
6.1. MATERIAL E MÉTODOS .....	89
6.1.1. <i>Obtenção dos extratos bruto das plantas <i>Vitex montevidensis</i>, <i>Campomanesia xantocarpa</i> e <i>Allophylus edulis</i></i> .....	89
6.1.2. <i>Obtenção das fração a partir do extrato hidroalcoólico da planta <i>Vitex montevidensis</i></i> .....	90
6.1.3. <i>Rendimento dos extratos das plantas <i>Vitex montevidensis</i>, <i>Allophylus edulis</i> e <i>Campomanesia xantocarpa</i></i> .....	91
6.2. RESULTADOS.....	93
6.2.1. <i>Rendimento dos extratos das folhas das plantas <i>Vitex montevidensis</i>, <i>Campomanesia xantocarpa</i> e <i>Allophylus edulis</i></i> .....	93
<b>7. EFICÁCIA FARMACOLOGICA.....</b>	<b>95</b>
7.1. MATERIAIS E MÉTODOS .....	97
7.1.1. <i>Dislipidemias</i> .....	97
7.1.1.1. Animais.....	97



7.1.1.2. Tratamentos.....	97
7.1.1.3. Obtenção do Soro e Determinação de Lipoproteínas .....	99
7.1.2. Aterosclerose .....	99
7.1.2.1. Determinação da Área de Lesão Aterosclerótica .....	99
7.1.2.2. Determinação do Índice Aterogênico (IA) .....	100
7.1.2.3. Estatística .....	100
7.2. RESULTADOS .....	101
7.2.1. Perfil lipídico dos animais tratados com extratos bruto aquoso, hidroalcoólico e etanólicos das plantas <i>Vitex montevidensis</i> , <i>Campomanesia xantocarpa</i> e <i>Allophylus edulis</i> .....	101
7.2.2. Perfil Lipídico dos Animais Tratados com Frações Obtidas do Extrato Hidroalcoólico da Planta <i>Vitex montevidensis</i> .....	104
7.2.3. Aterosclerose .....	107
7.2.3.1. Determinação da Área de Lesão Aterosclerótica .....	107
7.2.3.2. Determinação do Índice Aterogênico .....	109
<b>8. ANÁLISE TOXICOLÓGICA.....</b>	<b>111</b>
8.1. MATERIAL E MÉTODOS .....	113
8.1.1. Teste hipocrático ou Teste de Irwin.....	113
8.2. RESULTADOS .....	115
8.2.1. Teste Hipocrático ou Teste de Irwin.....	115
<b>9. CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA.....</b>	<b>119</b>
9.1. MATERIAL E MÉTODOS.....	121
9.1.1. Reagentes.....	121
9.1.2. Preparo das Soluções Padrão e Amostras para Análise Instrumental.....	121
9.1.3. Equipamento e Colunas.....	121
9.1.4. Procedimento.....	122
9.2. RESULTADOS .....	123
9.2.1. Identificação e caracterização de possíveis marcadores dos extratos e frações da planta <i>Vitex montevidensis</i> .....	123
<b>10. DISCUSSÃO.....</b>	<b>131</b>
<b>11. CONCLUSÕES.....</b>	<b>139</b>
<b>12. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>141</b>



## 1. INTRODUÇÃO

Desde a pré-história, o homem vem utilizando os recursos da flora no tratamento de diversas patologias. Registros fósseis datam o uso humano de plantas como medicamento há pelo menos 60.000 anos (Fabricant e Farnsworth, 2001). Foi através da observação animal e da experimentação pelos povos primitivos que as propriedades terapêuticas de determinadas plantas foram descobertas e propagadas de geração em geração, integrando-se a cultura popular (Tyler, 1996; Ko, 1999).

Na antiguidade, na busca pela cura das doenças, as pessoas utilizavam as opções disponíveis na natureza. Os primórdios da utilização das plantas medicinais eram instintivos, já que neste contexto não haviam informações suficientes sobre as possíveis razões e curas das doenças. Com o tempo as razões para o uso de plantas medicinais foram sendo descobertas. Assim, o uso das plantas medicinais abandonou gradualmente o quadro empírico e tornou-se fundamentado em fatos. Estima-se que cerca de 25% dos fármacos empregados nos países industrializados advêm, direta ou indiretamente, de produtos naturais, especialmente de plantas superiores (Calixto, 2001; Funari e Ferro, 2005)

Galeno, no século II d.C; divulgou o uso de extratos vegetais para a cura de diversos males, emprestando seu nome às formulações farmacêuticas, denominadas fórmulas galênicas. Por volta do século XV, com a invenção da imprensa, suas teorias foram divulgadas e surgiram os primeiros embriões das farmacopeias - os herbários - reunindo o conhecimento acumulado sobre o uso dos medicamentos de origem vegetal (Barreiro e Fraga, 2001).

Enquanto os povos antigos usavam plantas medicinais, principalmente como formas farmacêuticas simples (infusões, decocções e macerações), na Idade Média, e em particular entre os séculos 16 e 18, a demanda por medicamentos foi aumentando. Em 10 de agosto de 1897 o químico alemão Felix Hoffman transformou o ácido salicílico (extraído da casca do salgueiro ó *Salix alba*), em ácido acetilsalicílico através de uma reação de esterificação, que foi patenteado em 1899 pelo laboratório farmacêutico da Alemanha (Bayer) e é conhecido mundialmente como ASPIRINA (Sneader, 2000).

Este capítulo da evolução da química, que marcou a revolução científica e tecnológica, levou ao desenvolvimento de técnicas de

isolamento de substâncias ativas presentes nas plantas, além de fomentar o desenvolvimento de rotas de síntese de novas entidades químicas e os extratos vegetais, até então utilizados, foram substituídos por fármacos sintéticos fabricados por grandes companhias farmacêuticas, que passaram a realizar grandes investimentos em Pesquisa & Desenvolvimento (P&D) voltados ao desenvolvimento de novos fármacos (OMS, 2007). Mesmo com o desenvolvimento de grandes conglomerados farmacêuticos e o advento dos fármacos sintéticos, as plantas medicinais permaneceram como uma forma alternativa de tratamento em várias partes do mundo devido ao difícil acesso a medicamentos em algumas regiões e também devido à forte cultura popular.

Nas últimas décadas, observou-se uma revalorização da utilização de preparações fitoterápicas. O novo avanço nesta classe de medicamentos, longe de ser uma volta ao passado, caracteriza-se pela busca de uma produção em escala industrial, diferentemente das formas artesanais que caracterizaram os estágios iniciais de sua utilização (Sharma *et. al.*, 2008). O valor comercial deste mercado está cada vez maior, fazendo com que a segurança, eficácia e qualidade dos produtos naturais sejam preocupações constantes das autoridades reguladoras (OMS, 2002; Carvalho *et al.*, 2008).

Estratégias de busca de medicamentos com base em plantas ditas medicinais têm sido aplicadas no tratamento de diferentes doenças, tais como o câncer (Jang *et al.*, 2003; Balunas e Kinghorn, 2005). A utilização das plantas medicinais, a partir da adoção por sociedades autóctones de tradição oral, pode ser útil na elaboração de estudos farmacológicos, fitoquímicos e agrônômicos sobre elas, evitando perdas econômicas e de tempo, além de demonstrar que é possível planejar a pesquisa a partir do conhecimento tradicional sobre plantas medicinais, consagrado pelo uso contínuo nas sociedades tradicionais (Brasil, 2012).

Assim o renascimento dos fitoterápicos cria oportunidades para a indústria farmacêutica brasileira, pois desde a expansão dos fármacos sintéticos a partir de grandes laboratórios que os produzem em escala mundial, o Brasil esteve à margem do processo de desenvolvimento de novos fármacos. Nas últimas décadas, a indústria farmacêutica instalada no Brasil se desenvolveu na produção de especialidades farmacêuticas, mas é ausente em desenvolvimento e produção de novos fármacos, já que o elevado volume de capital envolvido nesta área está concentrado em grandes companhias de base mundial de produção, o que impõe barreiras de difícil transposição à entrada de novas empresas. Para o desenvolvimento de fitofármacos,

entretanto, a situação pode ser diferente. O país dispõe da maior biodiversidade do planeta, além de capacidade científica que poderá permitir o seu avanço em direção a esse segmento promissor da indústria farmacêutica. Por essa razão, as plantas medicinais possuem hoje um papel muito importante na pesquisa farmacológica e/ou farmacêutica, não apenas pela utilização direta de seus constituintes como agente terapêutico, mas como precursores na síntese de novas drogas e de compostos farmacologicamente ativos.

O mercado mundial de medicamentos fitoterápicos foi estimado em 14 bilhões dólares anuais em 2008, e continua com taxa de crescimento exponencial (OMS, 2011). No Brasil, o setor fitoterápico conta com duzentas empresas que movimentam em torno de US\$ 400 milhões, o que representa 6,7% das vendas de medicamentos em toda cadeia produtiva, e emprega mais de cem mil pessoas no país (Alves *et. al*, 2008). O fator de atração é o ritmo de crescimento das vendas, mais de 15% anuais, contra 4% do que evoluem as vendas dos medicamentos sintéticos (FEBRAFARMA, 2007).



## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. O uso dos medicamentos fitoterápicos

Os fitoterápicos são amplamente utilizados em grande parte do planeta. Na África, por exemplo, 70-80% da população consulta õmédicos tradicionaisõ que empregam somente fitoterápicos em seus tratamentos, os quais representam uma alternativa frente ao alto custo dos fármacos sintéticos (Cunningham, 1993). Já nos países mais desenvolvidos, o uso de fitoterápicos é igualmente significativo: Canadá, França, Alemanha e Itália, por exemplo, relatam que entre 70% a 90% de suas populações fazem uso de fitoterápicos sob título de tratamentos complementares ou alternativos (OMS, 2011).

Além disso, as plantas medicinais desempenham um papel muito importante na medicina, pois podem fornecer fármacos extremamente importantes, os quais dificilmente seriam obtidos via síntese química, como por exemplo, os alcaloides obtidos da *Papaver somniferum* e os glicosídeos cardiotônicos da *Digitalis sp.* As fontes naturais fornecem compostos que podem ser modificados, tornando-os mais eficazes e/ou menos tóxicos. Portanto, baseado nisso os produtos naturais podem ser utilizados como protótipos para obtenção de fármacos com atividades terapêuticas semelhantes a dos compostos originais (Robbers *et al.*, 1996).

Segundo a definição da Organização Mundial de Saúde (OMS, 2011), os medicamentos fitoterápicos são produtos medicinais que contém como princípio ativo plantas ou partes de plantas em seu estado natural ou em estado processado, na forma de extratos, tinturas, gomas, óleos essenciais, entre outros. Podem ser constituídos de misturas complexas de uma ou mais plantas, além de excipientes, solventes, diluentes ou conservantes. A associação destes produtos medicinais com substâncias ativas quimicamente definidas não é considerada um medicamento fitoterápico.

Entre as principais características dos medicamentos obtidos a partir de fontes naturais está a presença de uma grande variedade de princípios ativos e outras substâncias em uma mesma planta. Os efeitos terapêuticos são provenientes da ação sinérgica destas substâncias ativas, e não das substâncias isoladas. Pode-se citar como exemplo o *Hypericum perforatum*, conhecido popularmente como Erva-de-São João, com eficácia comprovada na depressão leve a moderada em numerosos estudos pré-clínicos e clínicos (Reis *et al.*, 2013, Russo *et*

*al.*, 2013, Gastpar, 2013). Diversos estudos fitoquímicos, bioquímicos e farmacológicos foram realizados com o *Hypericum perforatum*, sendo identificados diversos grupos de substâncias naturais como as naftodiantronas, os flavonóides, entre outros. Os grupos responsáveis pelos efeitos no sistema nervoso central são as naftodiantronas, que inclui a hipericina e a hiperforina, principais responsáveis pelos efeitos antidepressivos (Yunes *et al.*, 2001).

As substâncias provenientes o metabolismo secundário presentes nas plantas medicinais também têm papel importante nos efeitos farmacológicos. Elas podem aumentar a estabilidade da substância ativa, possibilitando um melhor efeito terapêutico, com menor ocorrência de efeitos indesejáveis, como fazem os polissacarídeos na camomila (*Matricaria recutita*), os quais aumentam a atividade anti-inflamatória da apigenina, luteolina e outras flavonas (Lipp, 1996).

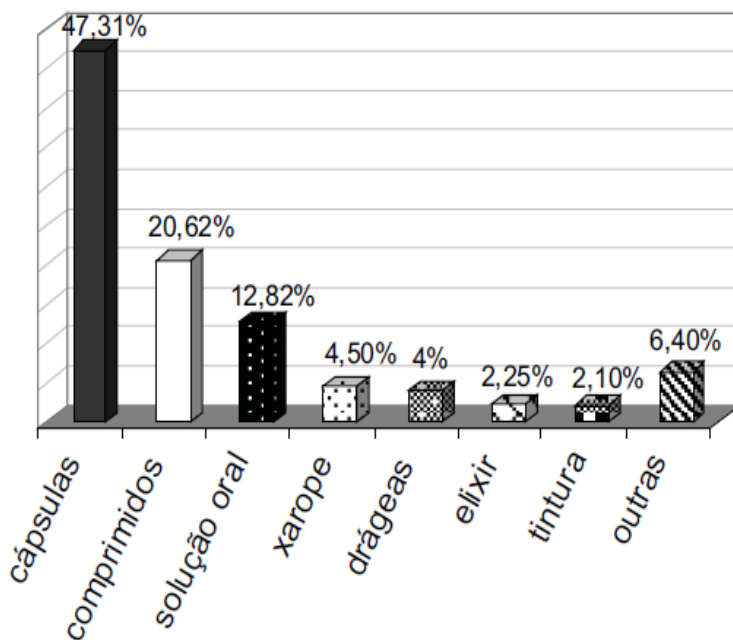
## 2.2. O desenvolvimento e registro de medicamentos fitoterápicos

O Brasil é o país com a maior biodiversidade do mundo, contando com um valor aproximado de mais de 20% do número total de espécies vegetais do planeta, com um número de espécies superior a 55 mil descritas o que corresponde a 22% do total mundial (Brandão *et al.*, 2006; Ferro *et al.*, 2006). Esta rica biodiversidade é acompanhada por uma longa aceitação de uso de plantas medicinais e conhecimento tradicional associado (Rodrigues, 2006; Veiga e Melli, 2008). O Brasil possui ainda uma experiente classe científica que há muito estuda e publica artigos sobre plantas medicinais. Reflexo disso é o crescente aumento no número de artigos publicados envolvendo plantas medicinais no país que vem crescendo muito mais que outras áreas de pesquisa (Calixto e Siqueira, 2008). Porém, percebemos uma grande contradição quando observamos o número de medicamentos fitoterápicos registrados no país, principalmente quando avaliamos a origem geográfica dos mesmos.

Existem atualmente 512 medicamentos fitoterápicos registrados na Anvisa, sendo 80 associados e 432 simples. Dentre os medicamentos fitoterápicos registrados as principais formas farmacêuticas foram as cápsulas (47,1%) e os comprimidos (20,6%). Observamos ainda que existe 162 espécies vegetais com derivados registrados na Anvisa, sendo que destes 28% são de origem asiática, 27% européia, 34% da América



do Sul (incluindo 55 espécies com distribuição no Brasil), 20% originárias da América do Norte e/ou Central e 8% africanas. Dentre as espécies de origem brasileira as que possuem maior número de registro são a *Mikania glomerata* (guaco) - 14 registros cuja principal indicação é como expectorante e bronco dilatador, *Maytenus officinalis* (espineira santa) - 13 registros cujo como principal indicação coadjuvante no tratamento de úlceras gástricas e a *Paullinia cupana* (guaraná) - 12 registros com indicação principal como estimulante do Sistema Nervoso Central (SNC). Nesta pesquisa foi observado também que o único medicamento fitoterápico registrado atualmente no Brasil para o tratamento das dislipidemias é derivado da planta *Allium sativum* (alho) com 8 registros (Carvalho *et al.*, 2008).



**Figura 1.** Formas farmacêuticas de medicamentos fitoterápicos registradas na Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Fonte: Carvalho *et al.*, (2008)

A pesquisa de novas plantas para o desenvolvimento de medicamentos fitoterápicos é um processo moroso e custoso. Dentre as

350.000 a 550.000 espécies de plantas conhecidas, apenas uma pequena fração destas foi investigada fitoquimicamente e um número ainda menor tem sido apropriadamente estudado quanto a suas propriedades farmacológicas (Nodari e Guerra, 2000).

Os investimentos em Pesquisa & Desenvolvimento na indústria farmacêutica dependem, em geral, da proteção da inovação através do reconhecimento de patentes. Isto porque o desenvolvimento de novos produtos e processos está sujeito a pequena probabilidade de sucesso e, em geral, requer um grande número de tentativas frustradas para cada acerto. O alto custo dessas tentativas só pode ser arcado pela indústria quando há proteção temporária de seu mercado através do reconhecimento de uma patente. Portanto o desenvolvimento de um medicamento fitoterápico é um processo lento e bastante difícil, pois exige conhecimento amplo de diversas áreas da ciência e com isso torna indispensável uma equipe multidisciplinar totalmente focada neste processo. Entre as principais etapas estão a botânica, química, farmacotécnica e etapas de estudos pré-clínico e clínico.

A etapa botânica é a etapa onde se faz a seleção do material que será utilizado. A verificação botânica e a identificação da espécie da planta utilizada são importantes para garantir a estabilidade e a uniformidade do material utilizado durante todas as etapas da pesquisa, além das partes da planta utilizadas para preparação e informações detalhadas sobre as condições de plantio, colheita e armazenamento (OMS, 2000). Já na etapa farmacêutica, que é constituída pelas fases química e farmacotécnica, determina-se e identifica-se as substâncias presentes na planta e desenvolve-se a formulação do medicamento. É nesta etapa também que são realizados os estudos de estabilidade do produto. Na etapa dos estudos pré-clínicos, o possível medicamento é testado em ensaios farmacodinâmicos, farmacocinéticos e toxicológicos em animais de laboratório. Após passagem e aprovação por todas as fases anteriormente citadas o medicamento é submetido a fase de estudo clínico. Esta fase é dividida em quatro seguimentos: na primeira etapa o medicamento é testado em um pequeno número de pessoas sadias e o objetivo principal é investigar a segurança do produto; a segunda etapa testa o medicamento em doentes e visa avaliar a eficácia da medicação, isto é, se apresenta ação frente a determinada patologia, e também obter informações mais detalhadas sobre a segurança; na terceira etapa prolonga-se o tempo de uso e o novo tratamento testado é comparado frente ao tratamento padrão existente. Geralmente, os estudos desta fase são randomizados; e na quarta e última etapa são realizados estudos para confirmar se os resultados obtidos na fase anterior (fase III) são

aplicáveis em uma grande parte da população doente. Nesta fase, o medicamento já foi aprovado para ser comercializado (Simões *et al.*, 2007).

Uma estratégia de busca bastante utilizada na seleção etnofarmacológica é a observação do uso popular, pois ela nos fornece indícios das possíveis indicações terapêuticas e facilita o processo de escolha do melhor solvente extrator e via de administração. Porém, somente as informações relacionadas ao uso popular não são suficientes para garantir a eficácia e segurança de um novo medicamento fitoterápico e estudos de eficácia e segurança devem ser realizados, assim como são realizados para os medicamentos sintéticos. Entretanto, a realização destes estudos para medicamentos fitoterápicos enfrenta muitas dificuldades, principalmente na padronização da preparação dos extratos e na ausência de legislações específicas (Calixto, 2000).

Com o crescimento do uso de produtos obtidos de plantas medicinais, ocorreu também a preocupação com a regulamentação do setor no Brasil. A primeira legislação brasileira específica para medicamentos fitoterápicos foi estabelecida em 1967, a Portaria 22, que embora não apresentasse o detalhamento técnico dos instrumentos regulatórios atuais, continha todos os aspectos essenciais ao registro de fitoterápicos, exigindo identificação botânica das espécies vegetais utilizadas, padrão de qualidade e identidade além de provas de segurança e eficácia que validassem as indicações terapêuticas (Brasil, 1967). Essa portaria não teve muita aceitação das indústrias e a fiscalização não era suficientemente efetiva para que incentivasse essa aderência.

Em 1995, o Ministério da Saúde republicou a norma para registro de medicamentos fitoterápicos, na forma da Portaria 06/1995, que apresentou um novo conceito para os produtos fitoterápicos, semelhante ao adotado atualmente. Ele estabeleceu prazos para realização e apresentação de estudos científicos que comprovassem a segurança de uso (cinco anos) e a eficácia terapêutica (10 anos). Outra novidade desta portaria foi dividir o registro de fitoterápicos em diferentes classes: fitoterápicos isentos de registro, que eram os constantes nos códigos oficiais, fitoterápico novo e fitoterápico similar, que eram aqueles que comprovassem ação similar a outro previamente registrado. Naquela época já era exigida a reprodutibilidade e a constância da qualidade dos fitoterápicos a partir da análise de marcadores vegetais, substâncias utilizadas para avaliar o controle de qualidade dos fitoterápicos (Brasil, 1995).

Com a criação da Anvisa em 1999, a norma para registro de medicamentos fitoterápicos foi novamente atualizada em 2000 através da RDC 17/2000. Nesta resolução apareceu pela primeira vez a figura do medicamento fitoterápico tradicional, sendo aplicados critérios diferenciados no registro desses produtos. Havia ainda a isenção de registro para as formulações oficializadas no país pela Farmacopeia Brasileira (Brasil, 1998; Brasil, 1999; Brasil, 2000). A RDC trazia uma lista com 11 espécies de registro simplificado, ou seja, para as quais já havia comprovação de segurança e eficácia suficiente, não sendo necessárias informações adicionais. Trazia ainda uma lista de 15 referências científicas que poderiam ser utilizadas para comprovação da segurança e eficácia dos medicamentos fitoterápicos (Brasil, 2000).

A RDC 17/2000 exerceu um papel educativo importante, porém, não teve uma boa adesão por parte das empresas, considerando que a fiscalização sanitária era quase inexistente. Assim, em 2004, foi novamente publicada como RDC 48/2004 que foi complementada por várias resoluções, como; a RE 88/2004 que atualizou a lista de referências bibliográficas para avaliação de segurança e eficácia; a RE 89/2004 que continha a lista de registro simplificado de fitoterápicos, ampliando o anexo já existente na RDC 17/2000, que compreendeu 34 derivados vegetais para os quais já havia sido comprovada a segurança e eficácia de uso (Brasil, 2004); a RE 90/2004 que trazia o guia para realização dos testes de toxicidade pré-clínica de fitoterápicos e que está ainda vigente. A RDC 48/2004 trouxe ainda como novidade a exigência de que a produção de fitoterápicos seguisse as Boas Práticas de Fabricação (BPF), regulamentadas na época pela RDC 210/2003 (Brasil, 2003). Em 2010, foi publicada a RDC 14/2010 para atualizar o regulamento para registro e as principais modificações propostas foram em relação à adequação relativa aos conceitos e à adoção de alternativas ao controle de qualidade (Brasil, 2009).

### **2.3. Doenças cardiovasculares**

Doenças cardiovasculares (DCV), como a doença arterial coronária (DAC) e acidente vascular cerebral (AVC), estão intimamente associados aos efeitos da aterosclerose e das dislipidemias (Insul, 2009; Weber, 2011; Libby, 2011). Estudos recentes sugerem que hipercolesterolemia e HDL-C-colesterol diminuído aumentam o risco de AVC e de DAC. Estes fatores também favorecem a formação de placas

aterogênicas, cuja patogênese inicial ocorre a partir de lesões do endotélio vascular. Doenças cardiovasculares respondem por 20-30% de todas as mortes no mundo, o que significa mais ou menos 14 milhões por ano (Luisi, 2000; Lewis, 2009; Laslett *et. al.*, 2012). No Brasil, elas estão em terceiro lugar como causa de morte, tendendo a ocupar o primeiro lugar. As doenças cardiovasculares, que incluem o Infarto Agudo do Miocárdio (IAM), as doenças isquêmicas, a insuficiência cardíaca congestiva (ICC), entre outras são a principal causa de mortalidade nos países desenvolvidos e em desenvolvimento, sendo um evento de grande relevância clínica que requer internação hospitalar (Mussi *et. al.*, 2007; Azambuja, 2008; Borghi-Silva *et. al.*, 2013). O setor público brasileiro é o principal financiador das internações hospitalares e estima-se que, com variações regionais, 70 a 80% dessas internações sejam financiadas pelo Sistema Único de Saúde (SUS) (Melo *et. al.*, 2004). Sendo assim, a prevenção e o tratamento das DCV representam um importante problema econômico, pois estas doenças comprometem os orçamentos para o sistema de seguridade com o aumento do pagamento de pensões e diminuem os anos de vida produtiva da população. Os estudos apontam que, tal fato afete igualmente homens e mulheres, além de que a doença coronariana tem afetado nos últimos anos indivíduos cada vez mais jovens (Santiago, 2002).

A hipercolesterolemia é caracterizada pelo aumento do colesterol total circulante no sangue e pode ser associada à obesidade, alta ingestão de alimentos ricos em colesterol, baixa ingestão de fibras, devido à alimentação inadequada ou ainda ser um problema de ordem genética, manifestado por uma maior produção endógena de colesterol (Chacra *et. al.*, 2005; Libby *et. al.*, 2002). Ela é um dos principais fatores de risco das doenças cardiovasculares (Lewis *et. al.*, 2009; Weber *et. al.*, 2011) e sua prevalência está crescente em crianças e adolescentes nos últimos anos. Este fato explica-se pelo novo estilo de vida dos jovens, que se traduz num aumento do sedentarismo, da ingestão de gorduras e da obesidade infantil (Santiago, 2002). O maior fator de risco para a doença coronariana é um elevado nível de LDL colesterol plasmático que em conjunto com baixas concentrações de HDL-C colesterol (Insull, 2009; Lewis, 2009; Weber, 2011) e com outros fatores de risco como: hipertensão arterial, a obesidade, o sedentarismo e o tabagismo podem favorecer o desenvolvimento da aterosclerose (Brandão, 2008).

Aterosclerose é uma terminologia empregada para descrever o espessamento e endurecimento das lesões nas artérias musculares de grande e médio calibre (como carótidas e coronárias) e nas artérias elásticas (como aorta e ilíacas). É uma doença inflamatória crônica que leva à obstrução das artérias e evolui com formação de placas no interior das mesmas. Começa quando os monócitos migram da corrente sanguínea para a parede da artéria. Com o tempo, eles se acumulam e provocam o espessamento, formando o ateroma que consiste, então, em uma placa fibro gordurosa localizada na íntima, tendo em seu núcleo lipídeos. Geralmente os ateromas se formam nos locais de ramificação das artérias e as paredes vão se tornando frágeis. À medida que a doença avança, o calibre das artérias vai diminuindo, comprometendo o fluxo arterial. Esse processo dinâmico é caracterizado por remodelamento na parede arterial que pode permanecer silencioso por muito tempo, ou pode manifestar-se como um evento vascular agudo, tornando-se clinicamente aparente (Libby *et. al.*, 2011; Weber *et. al.*, 2011). Muitos fatores contribuem para a patogênese da aterosclerose incluindo disfunção endotelial, dislipidemia, fatores inflamatórios e imunológicos, ruptura de placa e fumo. As manifestações clínicas de aterosclerose são bem conhecidas e incluem doença coronariana, acidente vascular encefálico e doença vascular periférica (Rackley, 2006).

A lipoproteína de baixa densidade (LDL-C) oxidada possui um papel importante na aterogênese, já que possui ação citotóxica na célula endotelial. Essas células por sua vez atraem monócitos que vão fagocitar a LDL-C oxidada formando, assim, células espumosas, que vão constituir a lesão inicial do processo de aterosclerose (Insull, 2009; Libby *et. al.*, 2011).

Apesar da importância destas patologias no quadro atual e futuro de mortalidade no Brasil e no mundo, ainda é pequena a diversidade de opções terapêuticas para tratamento destas patologias. A principal família de compostos que buscam a diminuição do colesterol são as estatinas, seguidas de outros medicamentos como fibratos, ezetimibe, colestiramina, ácido nicotínico e probucol.

Os medicamentos atualmente utilizados têm mostrado benefícios na prevenção de complicações cardiovasculares, tanto pela ação hipolipemiante como pela proteção do endotélio vascular. Porém, há inúmeras restrições principalmente quanto aos efeitos colaterais e a falta de mecanismos de ação específicos na prevenção da formação da placa aterosclerótica (Saini, 2005; Lewis, 2009).

Já as estatinas são substâncias originárias de culturas de fungos, sendo a primeira substância desta família isolada, em 1976, de uma cultura de *Penicillium citrinum* e batizada de Compactina (Fonseca, 2005). Todas as estatinas são substâncias com a propriedade comum de inibir a síntese de colesterol intracelular, por competição com a enzima HMG-CoA redutase, impedindo a transformação da HMG-CoA em ácido mevalônico. Ao ocorrer uma redução intracelular de colesterol, há estímulo à formação de LDL-receptores na membrana da célula. A presença de um maior número de receptores de LDL determina uma maior captação das LDL-C em circulação, com diminuição de seu nível plasmático. Há também evidências que demonstram que a diminuição da síntese do colesterol leva à menor produção hepática das VLDL-C, pois este esteróide é usado na formação dessas partículas. Portanto, as estatinas têm efeito hipolipemiante semelhante, em função do maior catabolismo das LDL-C e da menor síntese endógena das VLDL-C. O resultado mais marcante é o de redução da LDL-C plasmática, com menor repercussão sobre a concentração sanguínea das VLDL-C (Saini, 2005; Lewis, 2009).

Até o momento apenas um medicamento fitoterápico teve o seu registro aprovado pela ANVISA. Esse medicamento é derivado da planta *Allium sativum* popularmente conhecido como alho. Existem, até o momento, onze registros de medicamentos derivados desta planta sendo o seu mercado de aproximadamente 0,15 % do mercado das estatinas (ANVISA, 2013 e IMS HEALTH, 2013). Medicamentos derivados da planta fazem parte da lista RENISUS e são utilizados como coadjuvante no tratamento da hiperlipidemia e hipertensão arterial leve, além de auxiliar na prevenção da aterosclerose.

## **2.4. Plantas medicinais utilizadas para o tratamento de doenças cardiovasculares**

### **2.4.1. *Vitex montevidensis***

A planta *Vitex montevidensis*, ou sua sinonímia *Vitex megapotamica*, pertence à família *Verbenaceae* e caracteriza-se como uma árvore de 3 a 10 metros de altura, com casca acinzentada escura,

que desprende-se com lâminas longitudinais. Apresenta folhas compostas, digitadas, em geral com 5 folíolos elípticos-ovalados e de ápice agudo e pecíolo longo. Possui flores numerosas, pequenas terminais ou axilares, branco arroxeadas. É uma espécie que perde parcialmente as folhas na seca, seus nomes populares variam de tarumã, azeitona do mato, azeitona brava, sombra de touro, cinco folhas a copiúba. É encontrada desde Minas Gerais até o Rio Grande do Sul, Uruguai, Paraguai e Argentina. Os frutos são comestíveis, adocicados, muito procurados pela fauna e usados até como isca para pescaria. As folhas em infusão são usadas como diurético e depurativo do sangue. Floresce de setembro a janeiro e frutifica de dezembro a fevereiro (ESALQ, 2013).

De acordo com Alice *et al.*, (1991), as folhas da *V. montevidensis* apresentam flavonóides em grande quantidade, saponinas e quantidade não detectáveis de alcalóides, cumarinas, antraquinonas ou taninos.

Brandt *et al.* (2009) demonstraram o potencial hipocolesterolêmico da *Vitex montevidensis*. Para tanto, foi realizada indução hiperlipidêmica usando um modelo que preconiza o emprego de propiltiuracil 1,25 mg/300g de peso e colesterol 200mg/kg de peso, administrados via oral em ratos machos. A administração do extrato bruto hidroalcoólico das folhas (300 mg/Kg) e aquoso (decoção a 1%) das cascas, também foi via oral (gavagem) para o extrato hidroalcoólico e troca da água pelo decocto no bebedouro das gaiolas para o extrato aquoso. Já Zanatta *et al.* (2007), avaliaram o efeito do extrato bruto e das frações acetato de etila e n-butanol da *Vitex montevidensis* sobre a hiperglicemia em ratos diabéticos. Os extratos foram administrados nas doses de 400 e 800 mg/Kg, via oral. O extrato bruto foi capaz de reduzir os níveis de glicose tanto nos ratos normais como nos diabéticos, já as frações acetato de etila e n-butanol reduziram a glicemia apenas nos ratos diabéticos, sendo que a fração acetato de etila apresentou efeito mais potente.





**Figura 2.** Imagem da planta *Vitex montevidensis*. A: Árvore, B e C: Folhas e frutos

#### 2.4.2. *Allophylus edulis*

*Allophylus edulis*, pertencente à família Sapindaceae, é conhecida popularmente como vacum, vacunzeiro, chal-chal, baga de morcego, fruto do pombo, murta vermelha, entre outros nomes específicos para cada comunidade. No Brasil é encontrada no Ceará, Amazonas, Bahia, Mato Grosso, Paraná, Minas Gerais, Rio de Janeiro, São Paulo, Santa Catarina e Rio Grande do Sul e também faz parte da flora nativa das Guianas, Paraguai, Bolívia, Uruguai e Argentina. Ocorre na floresta Ombrófila Mista Montana e Aluvial, tanto em locais com luminosidade intensa como à sombra, predominando no interior da floresta (Biondi *et al.*, 2007).

Esta planta é de fácil reconhecimento no campo pois apresenta tronco geralmente tortuoso, ramificação dicotômica, copa fechada em função da abundante ramificação, folhas trifolioladas, pecioladas, de

bordo serrado e geralmente glabro, em contraste a sua copa de coloração verde escuro, apresenta intensa floração branca e frutos vermelhos (Klauber *et al.*, 2009). Possui pequeno porte, chegando até 10 metros de altura, com fuste (tronco) de até 45 centímetros de diâmetro. O florescimento ocorre durante os meses de setembro a novembro e a frutificação de novembro a dezembro, anualmente produz grande quantidade de frutos, e é possível observar frutos com diferentes estágios de maturação em uma mesma árvore (BIONDI, *et al.*, 2007).

Segundo Barbosa Filho *et al.*, (2006), esta planta apresenta catequinas, flavonóides, compostos fenólicos, heterosídeos cianogênicos, naftoquinonas, antraquinonas, alcalóides e triterpenóides. As folhas têm propriedades medicinais e quando cozidas são utilizadas para limpeza de ferimentos e contra pressão alta. O chá das folhas é muito utilizado em inflamações da garganta, problemas intestinais, digestivos e diarreias (KLAUBERG, *et al.*, 2009).

Diaz *et al.*, (2008) relatam pela primeira vez o isolamento de I-quebrachitol da planta *Allophylus edulis*. Durante a revisão literária os autores destacam que a planta possui atividade anti-hepatotóxica e atividade sobre a enzima conversora de angiotensina, afirmando novamente as atividades contra a hipertensão. É utilizada como fonte de taninos presentes no seu córtex e óleos essenciais nas suas folhas. Possui efeito positivo quando usado na forma de infusão no controle da diabetes, também demonstraram o efeito hipoglicemiante em testes pré-clínicos utilizando ratos. Barbosa Filho *et al.*, (2006) também relataram em seu estudo que foi possível observar que o extrato etanólico a 70% e o butanólico possui efeito na inibição da enzima conversora de angiotensina, sendo que o extrato aquoso, hexânico e clorofórmio não possuíram efeito.

Yajía *et al.* (1999), avaliaram o potencial genotóxico do extrato aquoso (decoção) de *Allophylus edulis* nas seguintes concentrações: 12, 6, 3, 1,5 e 0,75 g de planta/L de água. Para o teste foi utilizada a metodologia do teste de toxicidade em *Allium cepa L*, através da qual verifica-se o desenvolvimento da planta, avaliando-se possíveis alterações celulares ou metabólicas. Assim, observou-se que os efeitos sobre o crescimento da raiz se mostraram dependente da concentração do extrato, assim como as anomalias macroscópicas, tais como tumores e necrose, sendo que o ensaio de índice mitótico diminuiu significativamente, em relação aos controles. Desta forma nota-se que

quanto maior a concentração do extrato, mais tóxica foi sua ação, quando avaliada sobre a espécie *Allium cepa* L.



**Figura 3.** Imagem da planta *Allophylus edulis*. A: Árvore, B: Folhas e frutos, C: Folhas

### 2.4.3. *Campomanesia xantocarpa*

A planta *Campomanesia xantocarpa* pertence à família Myrtaceae, que compreende cerca de 3500 espécies. Esta família apresenta dois centros principais de desenvolvimento: a América tropical e a Austrália. Dentre seus nomes populares destacam-se ôguabirobeiraõ, ôguabirobaõ, ôguabirovaõ, ôguabirobeira-do-matoõ (KLAFKE *et al.*, 2009).

A planta é decídua (não perde as folhas facilmente), mesófito até heliófito (desenvolve-se na presença de luz), e seletivo higrófito, sendo abundante nas partes úmidas das matas de altitude. Ocorre em Minas Gerais, São Paulo e do Mato Grosso do Sul até o Rio Grande do Sul, estando presente em quase todas as formas florestais. Floresce

abundantemente durante os meses de setembro a novembro e os frutos amadurecem entre novembro a dezembro. A planta frutifica a partir de um a dois anos após o plantio (KLAFKE *et al.*, 2009).

A *Campomanesia xantocarpa* apresenta taninos, ferro, glicose, sais minerais, vitamina A e C, matéria amarela amarga, clorofila e ácido tânico. O óleo volátil das folhas apresenta rendimento de 0,2% e é rico em sesquiterpenos, destacando-se dentre eles o espatulenol (9,9%), o globulol (6,2%) e o epi-globulol (2,0%); e entre os monoterpenos, destaca-se o linalol (17,2%). As folhas desta planta possuem flavonóides, entre os quais pode-se citar quercetina e rutina, além de saponinas e taninos. Apesar de seu uso medicinal, há poucos relatos das propriedades farmacológicas desta planta (KLAFKE *et al.*, 2009).

No estudo realizado por Biavati *et al.*, (2004), com a infusão de *Campomanesia xantocarpa* verificou-se o potencial desta planta na diminuição dos níveis de colesterol e triglicerídeos. Tais efeitos foram avaliados em ratos que receberam dieta hipercalórica e o extrato aquoso desta planta por 30 dias. A administração oral do extrato reduziu significativamente os níveis glicêmicos em comparação ao grupo controle, além de atuar como agente emagrecedor, entretanto não foram verificadas diminuições significativas nos níveis séricos de lipídeos. Essa planta é popularmente conhecida pela sua utilização como depurativo, diurético, antirreumático e na diminuição do colesterol do sangue. Já no trabalho de Klafke (2009) que foi baseado no conhecimento popular, e utilizou a mesma planta para analisar parâmetros bioquímicos, hematológicos, antropométricos e de estresse oxidativo em pacientes hipercolesterolêmicos. Neste estudo foram selecionados 33 pacientes, e divididos em grupo controle, grupo experimental 1 e 2, verificou-se redução significativa no colesterol total e do LDL-C e a diminuição da taxa de estresse oxidativo no grupo hipercolesterolêmico que recebeu 500mg de pó da planta seca encapsulada. Ao verificar *in vitro* a atividade antioxidante e atividade inibitória da 3-hidroxi-metilglutaril coenzima A redutase o estudo concluiu que a planta possui um elevado potencial antioxidante.

Markman *et al.*, (2004) através da administração oral do extrato hidroalcoólico das folhas da ôguabirobaõ verificaram que este mostrou-se efetivo na prevenção de ulceração gástrica em ratos, não produzindo sintomas tóxicos em camundongos em uma dose de 500 mg/Kg. Os

autores atribuíram a atividade gastroprotetora à propriedade antioxidante dos flavonóides e taninos, haja visto que os flavonóides apresentaram atividade citoprotetora em vários modelos



**Figura 4.** Imagem da planta *Campomanesia xantocarpa*. A: Árvore, B: Folhas e frutos

## 2.5. O papel dos flavonóides no tratamento da hipercolesterolemia e da aterosclerose

Os flavonóides ocorrem nas plantas em uma variedade de formas estruturais, todas contendo 15 átomos de carbono em seu núcleo básico arranjado na configuração C6 óC3- C6, isto é, são dois anéis aromáticos ligados por 3 carbonos unitários que podem ou não formar um terceiro anel, ligados a vários substituintes. Eles podem ocorrer de forma livre (agliconas) ou ligados a açúcares (glicosídeos). São classificados em 10 classes de compostos, de acordo com seu processo de formação: antocianinas, proantocianidinas, flavonois, flavonas, glicoflavonas, biflavonilas, chalconas, auronas, flavononas e isoflavonas (Harborne *et. al.*, 1975), sendo que mais de 4000 flavonóides já foram identificados em plantas (Beecher, 1999).

Os flavonóides podem desempenhar importantes papéis na ecologia das plantas: atuam como sinais visuais para polinização, são um sistema de defesa contra insetos nocivos e protegem contra radiação solar na região UV. Além do seu papel fisiológico nas plantas, os flavonóides são importantes substâncias na dieta humana, apresentando diversos efeitos biológicos e farmacológicos, incluindo atividade antibacteriana, antiviral, anti-inflamatória, antialérgica, anti-hipertensiva, hipoglicemiantes e vasodilatadora (Havsteen, 1983; Cook e Samman, 1996; Hollman e Katan, 1999; Konaté *et. al.*, 2014) Além disso, estas substâncias inibem a peroxidação lipídica e reduzem o risco de doenças cardiovasculares, efeitos estes relacionados a sua atividade antioxidante, caracterizada pela capacidade de sequestrar radicais em organismos vivos (Sangkitikomol *et. al.*, 2014; Pirie *et. al.*, 2014).

Segundo Oliveira *et al.*, (2002), os flavonóides são eficientes no controle da hipercolesterolemia. De acordo com o mesmo autor, diversos mecanismos podem ser atribuídos aos flavonóides para explicar seus efeitos no metabolismo lipídico. Já MacDonald *et al.*, (1983) sugerem que as ações dos flavonóides no aumento de sais biliares nas fezes e a capacidade de elevar a atividade do sistema microsomal hepático, aumentam o metabolismo lipídico. Kirki *et al.*, (1998) sugerem que o aumento da atividade dos receptores de LDL, provocado por esses compostos, seja um dos responsáveis pela redução nos níveis de colesterol. Em modelos animais, as atividades antioxidantes dos flavonoides presentes na uva, suco de uva e vinho tinto reduzem os níveis lipídicos e previnem a formação das lesões ateroscleróticas (Stein *et. al.*, 1999).

Juzwiak *et al.*, (2005) também demonstraram que o flavonóide quercetina foi associado com a redução de placa aterosclerótica em artéria carótida e aorta em animais alimentados com dieta rica em lipídios. Já que um dos passos chaves no desenvolvimento da aterosclerose é a modificação oxidativa das LDLs, eliminadas por macrófagos, levando à formação de células espumosas na parede dos vasos (Esterbauer *et al.*, 1992). O mecanismo antiaterosclerótico da quercetina pode ser devido às propriedades antioxidantes já que se evidenciou uma redução da formação de MDA em animais co-administrados com flavonóides e dietas ricas em lipídios.

Durkar *et al.* (2014), mostraram o efeito hipolipemiante e antioxidante do extrato etanólico da planta *Symplocos racemosa* em

modelos de ratos hiperlipidêmicos. Neste estudo o extrato, assim como a sinvastatina (10 mg / kg) administrados por via oral, foram capazes de reduzir os níveis de lipídicos elevados (TC, TG, VLDL-C, LDL), restabelecer a diminuição do HDL-C e melhorar o índice aterogênico. O tratamento também foi capaz de reduzir o aumento do colesterol no fígado, a atividade da HMG - CoA e o peso corporal dos ratos que foi aumentado com a indução da dieta. Estes resultados demonstram que a atividade anti hiperlipidemia e a atividade antioxidante pode ser direta ou indiretamente relacionados à sua atividade antioxidante. Já que o extrato possui compostos fenólicos, flavonóides e esteroides.





### 3. OBJETIVOS

#### 3.1. Objetivos Gerais

Avaliar a atividade inibidora da aterogênese de três espécies nativas da flora brasileira: *Vitex montevidensis*, *Campomanesia xantocarpa* e *Allophylus edulis*, a partir de estudos fitoquímicos e farmacológicos.

#### 3.2. Objetivos Específicos

- Realizar a coleta na região do Oeste do Paraná e identificação botânica das plantas *Vitex montevidensis*, *Campomanesia xantocarpa* e *Allophylus edulis*;
- Obter extratos das folhas das plantas *Vitex montevidensis*, *Campomanesia xantocarpa* e *Allophylus edulis*;
- Realizar análises fitoquímicas nos extratos obtidos das folhas das plantas *Vitex montevidensis*, *Campomanesia xantocarpa* e *Allophylus edulis*;
- Avaliar por meio de testes bioquímicos a atividade anti-colesterolêmica, dos extratos bruto e frações das plantas *Vitex montevidensis*, *Campomanesia xantocarpa* e *Allophylus edulis*, administrado por via oral em camundongos C57BL/6 LDL KO;
- Avaliar por meio de testes bioquímicos e histológicos a atividade antiaterogênica, dos extratos bruto e frações da planta *Vitex montevidensis*, administrado por via oral em camundongos C57BL/6 LDL KO;
- Avaliar por meio de testes comportamentais, bioquímicos e patológicos a toxicidade aguda dos extratos e frações obtidos a partir das folhas da planta *Vitex montevidensis*;
- Realizar a caracterização química dos principais compostos presentes nos extratos e frações da planta *Vitex montevidensis*;



## **4.ETAPA BOTÂNICA**



## 4.1. Material e Métodos

As plantas selecionadas para o desenvolvimento deste estudo foram *Vitex montevidensis*, *Campomanesia xantocarpa* e *Allophylus edulis* e seguiram os seguintes critérios de escolha:

- Origem a partir dos biomas característicos da flora brasileira;
- Experiência reconhecida de utilização a partir do conhecimento tradicional e popular;
- Citação na literatura científica quanto aos aspectos farmacológicos;
- Facilidade na produção racional de matéria prima;

Com o material oriundo destas espécies medicinais foram desenvolvidas as etapas botânica e fitoquímica laboratorial. A partir dos resultados obtidos nestas etapas foi selecionada a espécie mais promissora para o desenvolvimento das etapas subsequentes. Para extração e isolamento das frações a parte da planta utilizada foram as folhas.

### 4.1.1. Obtenção e identificação do material vegetal

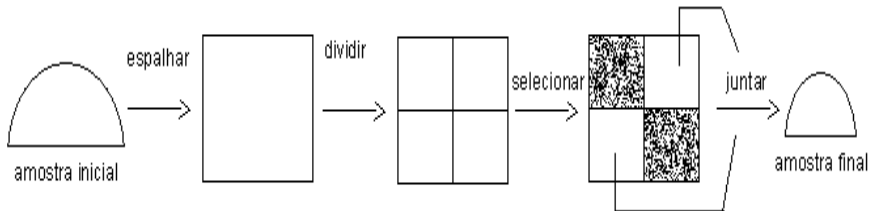
As folhas das plantas *Vitex montevidensis*, *Campomanesia xantocarpa* e *Allophylus edulis* foram coletadas nos municípios de Vera Cruz do Oeste e Foz do Iguaçu, Paraná, Brasil, entre dezembro de 2009 e março de 2010. Foram feitas exsiccatas contendo ramos e folhas das espécies vegetais (planta estéril). As mesmas foram entregue ao Museu Botânico Municipal de Curitiba-PR.

Foram selecionadas as folhas íntegras das espécies estudadas para realização deste estudo, sendo estas secas à temperatura ambiente por 30 dias. Em seguida, o material foi armazenado à temperatura ambiente, em recipiente fechado e identificado, até o momento de sua utilização.

### 4.1.2. Amostragem

Esta etapa teve como objetivo examinar a integridade dos recipientes e embalagens e a natureza da planta neles contida. Para isso a amostragem foi realizada manualmente retirando porções iguais do fundo, meio e de cima da embalagem, até completar 500g, tomando-se a precaução de não aumentar seu grau de fragmentação durante a manipulação.

Para a realização das análises, foi realizado quartearmento a partir da amostra obtida, até obter a quantidade de amostra necessária para a análise.



**Figura 5.** Representação esquemática do procedimento de quartearmento (Simões *et. al.*, 2007)

### 4.1.3. Avaliação do Material

#### 4.1.3.1. Descrição Macroscópica

A descrição macroscópica consiste na visualização da folha da planta (limbo e pecíolo) a olho nu ou com o auxílio de uma lente de aumento. Foi observado as características da amostra tais como: consistência, cor, tamanho, forma, lâmina foliar além do odor e sabor:

#### **4.1.3.2. Descrição Microscópica**

Para realização da análise microscópica foi colocado a amostra seca em um vidro de relógio com água deionizada. Aqueceu-se esse conjunto até a amostra apresentar-se hidratada. Realizou-se cortes transversais, com auxílio de uma lâmina de barbear, de forma que o corte abranja todos os tecidos. Em seguida, realizou-se cortes paradérmicos, com a finalidade de visualizar a epiderme abaxial e adaxial da mesma. Transferiu-se os cortes para um vidro de relógio contendo hipoclorito de sódio para ser realizado a descoloração, até ficarem esbranquiçadas; e depois foram corados de azul com o corante safrablau. O corte foi transferido para uma lâmina e coberto por uma lamínula para que fosse possível com o auxílio de um microscópio visualizar os tecidos internos da folha.

#### **4.1.4. Análises Físico-Química e Instrumental**

##### **4.1.4.1. Determinação de Perdas por Dessecação**

Foi pesado 4,0 g de amostras da droga vegetal, que foi submetido ao aquecimento (110 °C), em balança com fonte de aquecimento que utiliza raios infravermelhos, pelo período de 1 h. Foi realizada a leitura da massa inicial, e leituras posteriores em intervalos de 1 h até que a massa das amostras não variasse mais do que 0,25%. Os valores foram expressos em porcentagem (% p/p), da média das determinações.

##### **4.1.4.2. Cinzas Totais**

Esse teste permite a verificação de impurezas inorgânicas não voláteis que podem estar presentes como contaminantes. Para isso, as folhas das plantas foram trituradas com o auxílio de um liquidificador, e passadas por um tamis de malha 40 *mesh*. Cadinhos previamente calcinados e resfriados foram pesados e 3g da planta foi transferida para cada cadinho. Com o auxílio de uma chapa de aquecimento, as amostras

foram incineradas aumentando gradativamente a temperatura, não ultrapassando 450°C. Quando a amostra ficou toda queimada foi transferida para a mufla para incinerar por aproximadamente 3 h a 450°C. Os cadinhos foram novamente pesados após resfriamento à temperatura ambiente

A porcentagem de cinzas em relação à amostra pesada inicialmente foi calculada utilizando a equação:

$$\% \text{ cinzas} = \frac{\text{Resíduo} \times 100}{\text{Amostra}}$$

#### 4.1.4.3. Cinzas Insolúveis em Ácido

Nessa análise foram utilizadas as cinzas obtidas do ensaio anterior. Inicialmente o cadinho contendo as cinzas foi lavado com 25mL de HCl 7% e o material transferido para uma cápsula de porcelana. A cápsula foi coberta com vidro de relógio e fervida a uma temperatura aproximada de 100°C, por aproximadamente 45 min. Foi filtrado o resíduo insolúvel em ácido em papel de filtro faixa preta lavando-o com água deionizada até que o filtrado se mostrasse com o mesmo pH da água deionizada utilizada.

O papel filtro contendo o resíduo foi transferido para o cadinho original que foi seco sobre a chapa quente, aumentando gradativamente a temperatura, e iniciando a carbonização do mesmo. Na sequência, o material foi transferido para a mufla e incinerado a cerca de 500°C por aproximadamente 2 h. Após esta etapa o cadinho foi retirado da mufla e resfriado à temperatura ambiente para realização de sua pesagem. A operação foi repetida várias vezes até que duas pesagens consecutivas não ultrapassassem uma diferença de peso de 5%.

A porcentagem de cinzas insolúveis em ácido em relação à droga foi calculada utilizando a equação:

$$\% \text{ cinzas insolúveis} = \frac{\text{Resíduo} \times 100}{\text{Amostra}}$$



#### 4.1.4.4. Substâncias Extraíveis por Álcool

As folhas das plantas foram trituradas com o auxílio de um liquidificador e passadas por um tamis de malha 40 *mesh*. Em uma balança foi colocado um becker, tarado e pesado o cartucho de soxhlet previamente seco e resfriado, anotou-se o peso exato do cartucho, tarou-se e pesou-se 2g da droga vegetal triturada e tamisada, anotando o peso exato da amostra. No balão do extrator foi colocado 200 mg de hidróxido de sódio e 150 ml de etanol absoluto e pérolas de vidro. O cartucho com as amostras foi introduzido no extrator *Soxhlet* onde permaneceu extraindo por 5 h. Após finalizada a extração, o cartucho com o resíduo foi retirado e seco em estufa a 105°C por 30 min. Em seguida, foi transferido para um dessecador, resfriando por aproximadamente 1 h. O cartucho com o resíduo seco foi pesado para realização do cálculo do teor de substâncias extraíveis por etanol, referindo o resultado ao peso da droga seca (descontando o valor da umidade, em %, do peso da amostra inicial), através da diferença entre o peso da amostra e o peso do resíduo seco, utilizando a equação:

$$\% \text{ substâncias extraíveis por álcool} = \frac{[(\text{Amostra} \cdot \text{umidade}) \cdot \text{resíduo}]}{(\text{Amostra} \cdot \text{umidade})} \times 100$$



## 4.2. Resultados

### 4.2.1. Obtenção e identificação do material vegetal da planta *Vitex montevidensis*

A coleta da planta *Vitex montevidensis* foi realizada dia 26 de Janeiro de 2010 no interior do município de Vera Cruz do Oeste-PR. A coleta procedeu-se às 14 h, a temperatura ambiente foi de 32 °C sem registro de chuvas nos últimos 6 dias. O local de coleta está localizado na região Oeste Paranaense, com uma altitude de 560 metros, latitude 25° 03' 28" S e longitude 53° 52' 37" W. O clima é subtropical úmido, a vegetação é composta em sua maioria por florestas tropicais perenes, a textura do solo é predominantemente argilosa.

A árvore tem altura média de 4 m, possui tronco cilíndrico, com diâmetro de 20 cm e com copa em forma de taça. A casca é acinzentada e escura de onde se desprende lâminas longitudinais.

A folha da planta é verde escura, possui uma nervura central visível de onde saem nervuras secundárias, sendo do tipo penínérvea. A folha é composta, com folíolos de consistência rígida e áspera, de aproximadamente 7 cm de comprimento por 3 cm de largura. A face abaxial dos folíolos é mais clara assim como a nervura. A margem do folíolo é lisa simétrica com limbo íntegro, o seu contorno é lanceolado com o ápice agudo e a base cuneada. As folhas composta são do tipo digitadas e possui de 3 a 5 folíolos. O pecíolo é cilíndrico, longo, reto e com inserção lateral e aspecto da secção transversal é obtuso triangular. As folhas são opostas e cruzadas. As folhas da planta apresentam odor intenso que lembra ácido salicílico e sabor suave.

#### 4.2.1.1. Caracterização Macroscópica

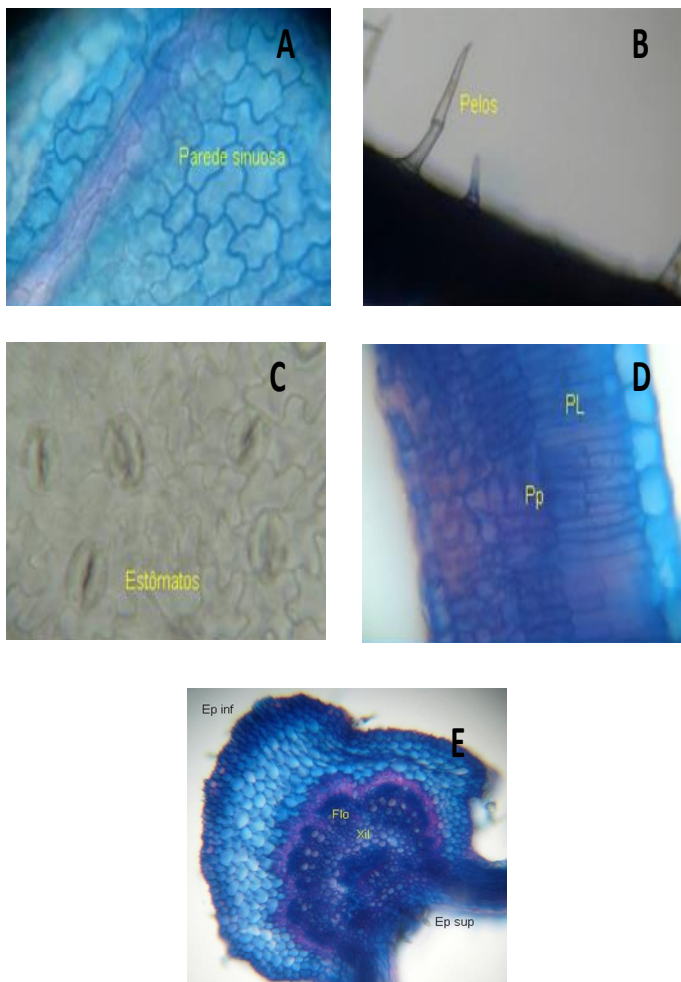
A folha da planta é verde escura, possui uma nervura central visível de onde saem nervuras secundárias, sendo do tipo penínérvea. A folha é composta, com folíolos de consistência rígida e áspera, de aproximadamente 7 cm de comprimento por 3 cm de largura. A face abaxial dos folíolos é mais clara assim como a nervura. A margem do

folíolo é lisa simétrica com limbo íntegro, o seu contorno é lanceolado com o ápice agudo e a base cuneada. As folhas composta são do tipo digitadas e possui de 3 a 5 folíolos. O pecíolo é cilíndrico, longo, reto e com inserção lateral e aspecto da secção transversal é obtuso triangular. As folhas são opostas e cruzadas. As folhas da planta apresentam odor intenso que lembra ácido salicílico e sabor suave.

#### **4.2.1.2. Caracterização Microscópica**

A epiderme adaxial é formada por uma camada de células grandes, com cutícula lisa e sem a presença de estômatos (Est) (Figura 6A). Apresenta pêlos tectores unisseriados, com parede finamente espessada e superfície lisa (Figura 6B) e pelos secretores com pedículo unicelular assim como a glândula globosa. A epiderme abaxial é formada por células menores apresentando grande quantidade de estômatos anomocíticos (Figura 6C) e pêlos tectores semelhante aos visualizados na face superior. Em corte paradérmico as células epidérmicas possuem a parede sinuosa em ambas as superfícies.

O mesófilo é heterogêneo assimétrico, formado por duas camadas de células do parênquima paliçádico (Pp) relativamente longas e sem espaçamento. Três a quatro camadas de parênquima lacunoso (Pl), pouco compactado (Figura 6D). Os feixes vasculares podem ser observados na nervura mediana, internamente xilema (Xil) radial circundado por pequena camada de floema (Flo) e esclerênquima do tipo fibras com intensa lignificação (Figura 6E). Envolvendo essas células pode-se observar uma espessa camada de parênquima com células isodiamétricas e colênquima angular de células arredondadas. A nervura central em secção transversal apresenta-se ligeiramente côncava do lado superior, e convexa do lado inferior. Apresenta uma fina camada monoestratificada de células epidérmicas pequenas nas faces superior e inferior.



**Figura 6.** Cortes histológicos das folhas da planta *Vitex montevidensis*. **A:** Corte paradermico com células de parede sinuosa. **B:** Presença de pelos unisseriados. **C:** Corte paradermico, vista abaxial com presença de estômatos anomocíticos. **D:** Corte transversal do limbo foliar, visualização do parênquima lacunoso (PL) e parênquima paliçádico (Pp). **E:** Corte transversal da nervura central da folha, visualização da (Ep sup): Epiderme Superior; (Xil): Xilema; (Flo): Floema; (Ep Inf): Epiderme Inferior.

#### **4.2.2. Obtenção e Identificação do Material Vegetal da Planta *Campomanesia xantocarpa***

A coleta da planta *Campomanesia xantocarpa* foi realizada no dia 13 de Outubro de 2009 no Horto Florestal no município de Vera Cruz do Oeste, localizado na região Oeste Paranaense, a uma altitude de 560 metros, latitude 25° 03' 28" S e longitude 53° 52' 37" W. O clima é subtropical úmido, a vegetação é composta em sua maioria por floresta tropical perenes, a textura do solo é predominantemente argilosa. A coleta procedeu-se às 13 h e 30 min, a temperatura média era de 30° C, sem registro de chuvas nos últimos 4 dias.

A árvore é uma planta heliófila que tem altura média de 6 m, o tronco é cilíndrico, ereto, com casca descamante e intenso esgalhamento a com diâmetro de 30 cm. A copa é globosa e densa, as folhas são simples, decíduas, glandulares, membranácea, pecioladas de superfície lisa, limbo inteiro de ápice cuspidado, possuem largura média de 4 cm e comprimento médio de 8 cm. As flores são pequenas, pediceladas que brotam de um nó de onde saem em média 5 flores hermafroditas, com corola pentâmera e pétalas dialipétala, actinomorfas, dialipétala, caduca, de coloração creme-esbranquiçada, os estames são livres, heterodínamos, dialistêmone e polistêmone.

##### **4.2.2.1. Caracterização Macroscópica**

As folhas da planta *Campomanesia xantocarpa* possuem de 4 a 8 cm de comprimento, 3 a 5 cm de largura e pecíolo de 6 a 11 cm. O odor é aromático de forte intensidade e ausência de sabor, sua cor é verde oliva na face adaxial e um pouco mais clara na face abaxial, são membranáceas, opostas, simples, elípticas e ovaladas. Apresentam o bordo ondulado, com ápice acuminado, unifoliadas e são opostas (Figura 4).

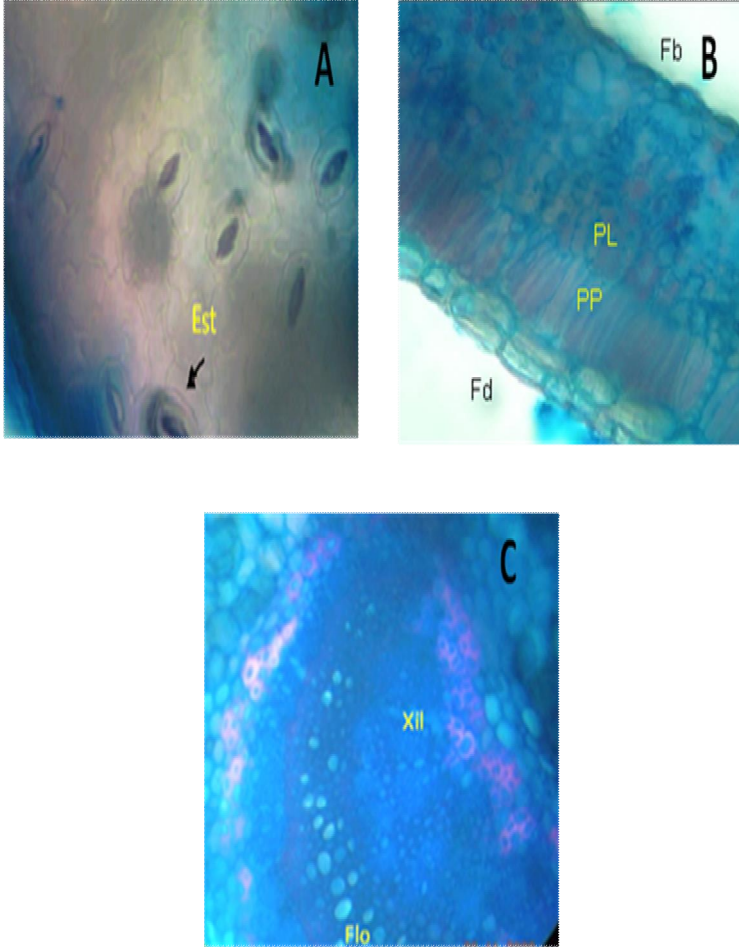
#### 4.2.2.2. Caracterização Microscópica

A epiderme da folha é constituída de uma única camada de células tanto na face adaxial (Fd) como na face abaxial (Fb), em ambas as epidermes observa-se também tricomas tectores unicelulares (Figura 7B).

Os estômatos (Est) são do tipo paracítico e foram visualizados apenas na epiderme abaxial (Figura 7A). Na epiderme adaxial observam-se células paraciticas com parede ondulada, podendo conter prismas de oxalato de cálcio.

O mesófilo é heterogêneo assimétrico e diferenciado em paliçádico e lacunoso, as células do parênquima paliçádico (Pp) são alongadas dispostas em uma única camada. As folhas são dorsiventrals, pois o paliçádico aparece somente na superfície adaxial. O parênquima lacunoso (Pl) consiste de células irregulares, disposto em sete a nove camadas, ramificadas e com espaços intercelulares (Figura 7B).

Na região da nervura principal do limbo observa-se tecido colenquimático do tipo lacunar, localizado logo abaixo das epidermes adaxial e abaxial. Em seguida podem-se visualizar células lignificadas, sendo o tecido esclerenquimático, circundando os feixes vasculares, xilema (Xil) e floema (Flo) (Figura 7C) e em seguida, novamente tem-se a presença de células lignificadas.



**Figura 7.** Cortes histológicas das folhas da planta *Campomanesia xantocarpa*. **A:** Vista adaxial da planta, presença de estômatos (Est). **B:** Corte transversal do limbo foliar da planta, visualização de células do parênquima paliçádico (Pp) e lacunoso (Pl). **C:** Corte transversal da nervura central da folha, (Xil): Xilema; (Flo): Floema



### **4.2.3. Obtenção e identificação do material vegetal da planta *Allophylus edulis***

A coleta da planta *Allophylus edulis* foi realizada no dia 13 de novembro de 2009 no Refúgio Biológico Bela Vista, no município de Foz do Iguaçu - PR. O Refúgio Biológico Bela Vista encontra-se às margens do reservatório da Central Hidrelétrica de Itaipu. A área do Refúgio compreende uma extensão de 1.920 ha, tendo como limite sul a barragem de terra, à leste a Vila "C", à oeste o reservatório e a norte áreas de reflorestamento e preservação. A coleta procedeu-se às 9 h, com temperatura média de 30°C sem registros de chuvas nos últimos dois dias. O local de coleta está localizado na região Oeste Paranaense, com longitude oeste 54° 35' 07ö e latitude sul 25° 32' 45ö e altitude média de 192 metros. O clima de Foz de Iguaçu é subtropical úmido mesotérmico, a vegetação é composta em sua maioria por floresta estacional semidecidual.

A árvore tem uma altura média de 2,5 m. Possui tronco ereto, descamante em placas, casca fina, pardo-escura, ramos acinzentado com lenticelas. Folhas compostas, trifoliadas, de 10 a 15 cm de comprimento, folíolos oblongo-lanceolados, glabros ou pubescentes próximo às nervuras principais, margem serreada, ápice acuminado, pecíolo com canal bem definido, de 3 a 5 cm de comprimento. Inflorescência composta, com ramos centrais mais longos, terminais ou na axila das folhas do ápice dos ramos vegetativos. Flores pediceladas, branco-esverdeadas, de 2 a 5 mm de comprimento.

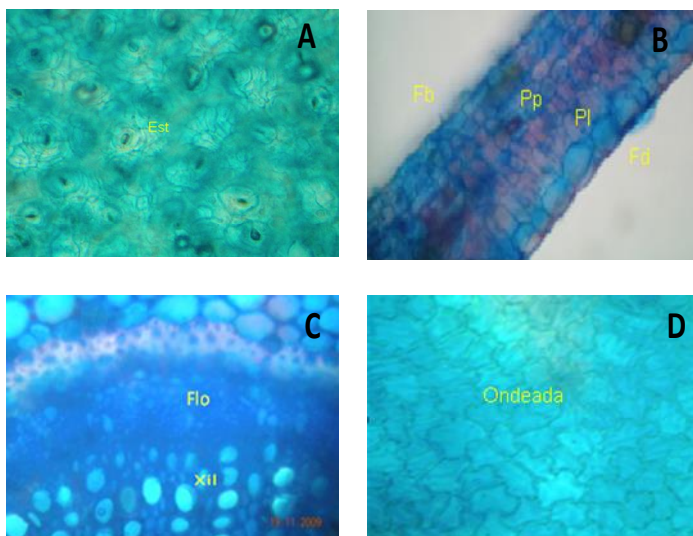
#### **4.2.3.1. Caracterização Macroscópica**

A folha possui de 7 a 10 cm de comprimento com coloração verde escuro na face adaxial e verde claro na face abaxial, o odor é adocicado e com sabor indefinido. É uma folha peciolada, de consistência membranácea, de superfície lisa, limbo elíptico com bordo dentado, ápice acuminado e base oblíqua. É composta, trifoliada com disposição alternada.

#### 4.2.3.2. Caracterização Microscópica

O tecido da epiderme foliar é constituído por uma única camada de células cutinizadas e em ambas as faces, adaxial e abaxial, não se observou a presença de tricomas. As folhas possuem estômatos (Est) hipoestomáticos anomocíticos (Figura 8A). O mesófilo é heterogêneo assimétrico, sendo as células parenquimáticas do tipo clorofiliano, diferenciadas em paliçádico e lacunoso. O parênquima paliçádico (Pp) é constituído por células alongadas e reunidas em duas camadas, sendo dorsiventrais. O parênquima lacunoso (Pl) consiste de células irregulares, ramificadas e dispostas em quatro a cinco camadas, separadas por grandes espaços (Figura 8B).

O feixe vascular do tipo bicolateral é observado na nervura central. Na face adaxial (Fd) observa-se uma protuberância com células colenquimáticas bem desenvolvidas, sendo bem característico da planta. No corte transversal do feixe vascular, pode-se observar o xilema (Xil) internamente e circundado pelo floema (Flo) ambos circundado pelo esclerênquima seguido de colênquima (Figura 8C). No corte paradérmico adaxial observa-se células com paredes ondeadas (Figura 8D).



**Figura 8.** Cortes histológicas das folhas da planta *Allophylus edulis*. **A:** Vista adaxial da planta, presença de estômatos (Est). **B:** Corte transversal do limbo foliar da planta, (Fd) face adaxial, (Fb) face abaxial; (Pp) parênquima paliádico; (Pl) parênquima lacunoso. **C:** Corte transversal da nervura central da folha: (Xil): Xilema; (Flo): Floema. **D:** Estrutura da epiderme da planta com células de parede ondeada.

#### 4.2.4. Padronização de Matéria-Prima - Controle de Qualidade das Plantas

Os ensaios físico-químicos de perdas por dessecação, cinzas totais, cinzas insolúveis em ácido e substâncias extraíveis por álcool foram realizados de acordo com metodologia previamente descrita. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

A Tabela 1 apresenta os resultados do controle de matéria prima das plantas *Vitex montevidensis*, *Campomanesia xantocarpa* e *Allophylus edulis*.

A Farmacopeia Brasileira 5<sup>o</sup> edição não apresenta valores limites para os ensaios de controle de qualidade com matéria-prima de origem vegetal, sendo que apenas para o teor de umidade é estabelecido uma faixa entre 8 a 14%, que é um nível de umidade aceitável para que não ocorra proliferação de microrganismos.

**Tabela 1.** Resultados dos valores médios das análises de controle de qualidade da matéria-prima das plantas *Vitex montevidensis*, *Campomanesia xantocarpa* e *Allophylus edulis*.

Planta	Perdas por dessecação	Cinzas Totais	Cinzas insolúveis em ácido	Substâncias extraíveis por álcool
<i>Vitex montevidensis</i>	10,09%	5,86%	0,32%	12,54%
<i>Allophylus edulis</i>	9,86%	5,92%	0,60%	14,99%
<i>Campomanesia xantocarpa</i>	9,73%	7,09%	0,05%	8,65%

## **5. ETAPA FITOQUÍMICA**



## 5.1. Material e Métodos

### 5.1.1. Análise Fitoquímica Preliminar

No presente trabalho, as classes fitoquímicas pesquisadas nas folhas das plantas *Vitex montevidensis*, *Campomanesia xantocarpa* e *Allophylus edulis* foram cumarinas voláteis, polifenóis (taninos, catequinas, flavonóides, heterosídeos antociânicos e antraquinonas), alcalóides, metilxantinas e saponinas, conforme descrito abaixo:

#### 5.1.1.1. Análise Fitoquímica de Cumarinas Voláteis

As cumarinas são caracterizadas pela observação sob luz ultravioleta (360 nm), pois a maioria possui fluorescência azul brilhante ou verde. As cumarinas em solução alcalina desenvolvem cor amarela, devido ao rompimento do anel lactônico. Essa reação é revertida pela adição de uma solução ácida.

A pesquisa baseia-se na conversão em sal alcalino fluorescente do ácido hidroxi cinâmico, por meio da dissolução das cumarinas em álcali cáustico com clivagem do anel pirrólico e consequente formação do ácido hidroxi cinâmico ou sais de seu ânion. Ao irradiar luz ultravioleta, a forma *cis* migra para forma *trans*, que exhibe coloração azul ou verde amarelada em poucos minutos (COSTA, 2000; SIMÕES *et. al.*, 2007).

*Procedimento experimental:* Em um tubo de ensaio, pesou-se 1 g da planta, previamente triturada. O mesmo foi coberto com papel filtro umedecido com uma solução de hidróxido de sódio a 5% (p/v). Aqueceu-se o tubo de ensaio em banho-maria fervente por 5 min. Retirou-se o papel filtro e o mesmo foi observado em luz ultravioleta, observando-se a coloração formada. O aparecimento de coloração azul ou verde amarelada indica a presença de cumarinas voláteis (COSTA, 2000; SIMÕES *et. al.*, 2007).

### 5.1.1.2. Análise Fitoquímica de Polifenóis

Os polifenóis são substâncias redutoras, oxidando-se com facilidade e resultando em substâncias coradas. A cor desses produtos de oxidação deve-se ao elevado grau de conjugação. Oxidantes como cloreto férrico ( $\text{FeCl}_3$ ), são empregados para a caracterização de polifenóis em geral. Neste caso, considera-se positivo quando é observada a coloração azul ou verde-azulada. Para melhor caracterizar a classe específica a que pertencem, passa-se a realizar reações particulares para cada grupo.

*Procedimento experimental:* Preparou-se uma solução extrativa com 2 g da planta previamente triturada e 100 ml de água destilada, deixando-a sob fervura por 5 min, e em seguida filtrada. Realizaram-se as reações abaixo:

- *Reação de precipitação com cloreto férrico:*

Separou-se dois tubos de ensaio, um para a solução extrativa e o outro para o controle positivo. Em um dos tubos, adicionou-se 1 ml de solução extrativa, 10 ml de água deionizada e uma gota de cloreto férrico a 1% (p/v), homogeneizando lentamente. A formação de precipitado é indicativa da presença de compostos fenólicos.

### 5.1.1.3. Análise Fitoquímica de Taninos

Os taninos são classificados em dois grupos segundo a sua estrutura química, sendo os taninos hidrolisáveis e os taninos condensados.

Os taninos, de modo geral, podem ser caracterizados por reações de coloração ou de precipitação. As reações comumente utilizadas são de precipitação com gelatina ou pó de pele, sais de alcaloides e metais pesados. Taninos hidrolisáveis e condensados podem ser diferenciados através da reação de Stiasny (HCl concentrado e formol), ocorrendo precipitação destes últimos. No sobrenadante, pode-se detectar a presença de taninos hidrolisáveis através da reação de cloreto férrico, desenvolvendo coloração azul (SIMÕES *et. al.*, 2007).



*Procedimento experimental:* Preparou-se uma solução extrativa com 2 g da planta previamente triturada e 100 ml de água destilada, deixando-a sob fervura por 5 min e, em seguida, filtrada. Realizaram-se as reações abaixo:

- *Reação de precipitação com gelatina:*

Separou-se dois tubos de ensaio, um para a solução extrativa e o outro para o controle positivo. Em um dos tubos, adicionou-se 1 ml de solução extrativa e uma gota de ácido clorídrico a 20% (v/v). Adicionou-se gota-a-gota a solução de gelatina a 25% (p/v). A formação de precipitado é indicativo da presença de taninos.

- *Reação de precipitação com alcaloides:*

Separou-se dois tubos de ensaio, um para a solução extrativa e o outro para o controle positivo. Em um dos tubos, adicionou-se 1 ml de solução extrativa e uma gota de ácido clorídrico a 20% (v/v). Adicionou-se 2 gotas de uma solução de sal de alcaloides a 0,1% (p/v) (atropina). A formação de precipitado é indicativa da presença de taninos.

#### **5.1.1.4. Análise Fitoquímica de Catequinas**

As catequinas são classificadas como sendo taninos condensados. As mesmas são sintetizadas a partir das leucoantocianidinas para, posteriormente, sofrerem redução na posição C-4. Essa reação é catalisada pela flavan-3,4-*cis*-diol-redutase (SIMÕES *et. al.*, 2007).

Catequinas são compostos cristalinos, ligeiramente solúveis na água fria e no éter e insolúveis no clorofórmio e benzeno. Coram-se de verde pelo cloreto de ferro, porém não são observadas outras propriedades dos taninos (como a reação com pó de pele).

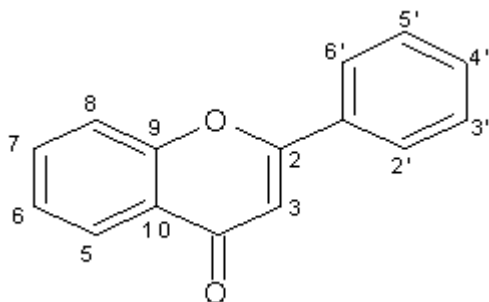
*Procedimento experimental:* Preparou-se uma solução extrativa com 1 g da planta, previamente triturada, e 100 ml de uma solução etanólica a 70% (v/v). Deixou-se em agitação por 3 h. Filtrou-se em seguida. Um palito de madeira foi embebido na solução extrativa por 3 h. Evaporou-se o solvente até a quase seca do palito. Em seguida, foi umedecido uma das extremidades do palito com ácido clorídrico

concentrado. Secou-se o palito ao calor de uma chama forte, evitando a sua carbonização. O aparecimento de coloração vermelha ou pardo-avermelhado indica a presença de catequinas.

### 5.1.1.5. Análise Fitoquímica de Flavonóides

Os flavonóides são biossintetizados a partir da via dos fenilpropanóides. Eles constituem uma importante classe de polifenóis, presentes em relativa abundância entre os metabólitos em plantas, responsáveis por diversas funções, como proteção dos vegetais contra a incidência de raios ultravioleta e visível, além da proteção contra insetos, fungos, vírus e bactérias; atração de animais com finalidade de polinização; antioxidantes; controle da ação de hormônios vegetais e inibidores de enzimas (SIMÕES *et. al.*, 2007).

Podem ser encontradas diversas formas estruturais de flavonóides. Entretanto, a maioria dos representantes desta classe possui 15 átomos de carbono em seu núcleo fundamental, constituído de duas fenilas ligadas por uma cadeia de três carbonos entre elas, conforme ilustrado na Figura 9 (SIMÕES *et. al.*, 2007).



**Figura 9.** Estrutura básica dos flavonóides. Fonte: Simões *et. al.*, (2007)

Para a caracterização de flavonóides, podem ser utilizadas diversas reações, sendo que uma complementa a outra. A reação da cianidina ou Shinoda (HCl concentrado e magnésio em pó) é o mais comumente utilizada, uma vez que é característico para a maioria das substâncias desta classe que apresentam núcleo -benzopirona,

produzindo coloração laranja. Esse teste apresenta uma limitação, pois chalconas e isoflavonas não produzem coloração.

Além das reações citadas acima, tem-se também a realização de reações com o cloreto de antimônio, com hidróxidos alcalinos, com cloreto férrico e com cloreto de alumínio, cada qual com suas particularidades (COSTA, 2000). Na Tabela 2 tem-se um resumo das colorações originadas em algumas reações cromáticas conforme o composto presente na amostra.

**Tabela 2.** Relação entre reações cromáticas e a coloração obtida conforme o tipo de flavonóide presente na amostra analisada. Fonte: Costa (2000).

<b>Reação</b>	<b>Flavonas</b>	<b>Flavonois</b>	<b>Flavanonas</b>	<b>Chalconas</b>	<b>Isoflavonas</b>
Cianidina	Laranja	Vermelha	Violeta	----	----
Oxalo-Bórica	----	Fluorescência Amarelo-verde	----	----	----
Cloreto de antimônio	Amarela	Amarela	Amarela	Vermelha ou violeta	Amarela
Hidróxido de sódio	Amarela	Amarelo-escura	Amarela	Amarela	Amarela
Cloreto Férrico	Verde	Verde-castanha	Verde-castanha-	Amarela	Verde
Cloreto de alumínio	Amarelo-verde	Amarela	Fluorescência azul-verde (UV)	Amarela	Amarelo-castanha

*Procedimento experimental:* Preparou-se um extrato vegetal aquecendo em banho-maria 2 g de planta previamente triturada com 50 ml de álcool 70% por 10 min. Filtrou-se à quente. Separou-se o extrato para realizar os seguintes ensaios:

- *Reação de Cianidina/Shinoda:*

Adicionou-se 5 ml do extrato em um tubo de ensaio. Em seguida, adicionou-se 100 mg de magnésio em fita (pequenos pedaços) e 1 ml de ácido clorídrico concentrado pelas paredes do tubo inclinado. A formação de coloração avermelhada é indicativa da presença de flavonóides.

- *Reação de Oxalo-Bórica:*

Colocou-se 8 ml do extrato em uma cápsula de porcelana, levando a secura em banho-maria. Adicionou-se ao resíduo 3 ml de uma solução de ácido bórico a 3% (p/v) e 1 mL de ácido oxálico a 1% (p/v). Evaporou-se novamente até resíduo. Deixou-se esfriar. Na cápsula fria, dissolveu-se o resíduo com 10 ml de éter etílico. Transferiu-se a solução etérea através de pipeta de Pasteur, para um tubo de ensaio. Verificou-se a presença de fluorescência na solução.

- *Reação com Hidróxido de Sódio:*

Colocou-se 5 ml do extrato em uma cápsula de porcelana, levando a secura em banho-maria. Deixou-se esfriar e adicionou-se 3 ml de uma solução de hidróxido de sódio a 5% (p/v). Na presença de Flavonóides a solução adquire coloração amarela.

- *Reação com Cloreto Férrico:*

Colocou-se 5 ml do extrato em uma cápsula de porcelana, levando a secura em banho-maria. Deixou-se esfriar e adicionaram-se algumas gotas de uma solução de cloreto férrico a 4,5% (p/v). Observou-se a coloração obtida.

#### **5.1.1.6. Análise Fitoquímica de Heterosídeos Antociânicos**

Heterosídeos são compostos resultantes da ligação covalente formada entre uma ou mais unidades de açúcar e outra estrutura diferente, chamada de aglicona. As antocianidinas (forma livre) são flavonóides que podem ser encontrados nas plantas na forma de

heterosídeos, sendo a sua forma mais estável. Esta forma é conhecida como heterosídeos antociânicos ou antocianosídeos (SIMÕES *et. al.*, 2007).

Pigmentos antocianosídeos são responsáveis pelas cores vermelho, azul e violeta das flores, frutos e também das cascas das plantas. Estes são muito solúveis em água e em álcool, porém são insolúveis no clorofórmio, éter ou benzeno. Por hidrólise, resultam em antocianóis ou antocianidinas facilmente solúveis no álcool, porém muitas vezes insolúvel na água.

Os heterosídeos antociânicos, com sais de chumbo, formam precipitados insolúveis de cor azul-esverdeado, vermelho ou amarelo. Com a adição de ácido sulfúrico diluído, tem-se a decomposição da estrutura, regenerando os antocianosídeos. A cor das soluções dos compostos antociânicos varia conforme os valores de pH: vermelho em meio ácido, violeta em meio próximo a neutralidade e azul em meio alcalino.

São poucas as técnicas para a caracterização de antocianóis e seus heterosídeos, pois a maioria baseia-se pela solubilidade. Algumas técnicas baseiam-se na decomposição das moléculas de heterosídeos antociânicos e identificação dos seus respectivos produtos. Isto pode ser obtido pela reação com ácido fórmico diluído.

*Procedimento experimental:* Preparou-se uma solução extrativa com 1 g de planta, previamente triturada, e 15 ml de solução de ácido fórmico a 5% (v/v), deixando sob agitação por 1 h. Em seguida, aqueceu-se a solução em banho-maria fervente por 5 min. Na presença de compostos antociânicos observa-se, dentro de um curto espaço de tempo, a cor rosa ou vermelha.

#### **5.1.1.6. Análise Fitoquímica de Antraquinonas**

As quinonas são compostos orgânicos que podem ser considerados como produtos de oxidação de fenóis, podendo as quinonas serem reduzidas e originarem os fenóis. Sua principal característica é a presença de dois grupos carbonílicos que formam um sistema conjugado com pelo menos duas ligações duplas C-C. Em

função do tipo de ciclo no qual o sistema de ligas duplas e cetonas conjugadas estão inseridos, têm-se três grupos principais de quinonas: naftoquinonas, antraquinonas e benzoquinonas.

Como os derivados antraquinônicos ocorrem nos vegetais em vários níveis de oxidação, o material deve ser tratado para que ocorra a oxidação total destes até antraquinonas. Para isto, o material vegetal deve ser submetido ao aquecimento com mistura de KOH 0,5M e peróxido de hidrogênio diluído (reação de Bornträeger). Pelo fato do meio dessa reação ser apolar, ela é direcionada para a detecção de compostos antraquinônicos livres através da solubilidade destes constituintes nos solventes orgânicos e na solubilidade dos respectivos fenatos alcalinos na água, em solução de amônia. Os derivados 1,8-dihidroxi-antraquinonas coram-se em vermelho (COSTA, 2000; SIMÕES *et. al.*, 2007).

*Procedimento experimental:* Para a análise fitoquímica de antraquinonas, realizou-se o ensaio em 3 etapas:

- *Etapa 1:*

Em um tubo de ensaio adicionou-se 0,1 g de planta previamente triturada e 10 ml de uma solução de hidróxido de sódio 2 M. Ferveu-se em banho-maria por 2 min. Deixou-se resfriar, decantar e filtrou-se. Considera-se positivo quando a solução apresenta coloração vermelha.

- *Etapa 2:*

Em um segundo tubo de ensaio, transferiu-se 5 ml da solução da Etapa 1, e adicionou-se 10 ml de uma solução de ácido clorídrico a 20% (v/v). Considera-se positivo quando ocorrer a formação de um precipitado amarelo de compostos antraquinônicos.

- *Etapa 3:*

No tubo de ensaio da Etapa 1, adicionou-se 5 ml de tolueno, agitando-se lentamente. Decantou-se parte da solução toluênica corada de amarelo. Transferiu-se 2 ml desta para um terceiro tubo de ensaio, adicionando 2 ml de uma solução de hidróxido de amônio a 50% (v/v). O aparecimento de coloração rosa ou vermelho-cereja na fase amoniacal - indica a presença de compostos antraquinônicos reduzidos - e a permanência de coloração amarela na fase toluênica indica a presença de antraquinonas livres.

### 5.1.1.7. Análise Fitoquímica de Alcalóides

Alcalóides são compostos nitrogenados farmacologicamente ativos, de estrutura química complexa, sendo difícil a separação entre alcalóides propriamente ditos e aminas complexas de ocorrência natural. Desta forma, classificam-se como alcalóides substâncias orgânicas, de origem natural, cíclica, contendo um nitrogênio em um estado de oxidação negativo e cuja distribuição é sob a forma de sais de ácidos orgânicos, solubilizados no suco celular, predominante em plantas angiospermas (COSTA, 2000; SIMÕES *et. al.*, 2007).

As reações gerais para alcalóides baseiam-se na formação de complexos insolúveis (precipitados). Como resultados falso-positivos são bastante comuns para essas reações, previamente à análise, o material a ser analisado deve ser submetido a extrações ácido/base. As reações gerais empregam os reagentes de Dragendorff (iodo-bismuto de potássio), Mayer (iodo-mercurato de potássio), Wagner (iodo-iodeto de potássio) e Bertrand (ácido sílico-túngstico) (COSTA, 2000; SIMÕES *et. al.*, 2007).

*Procedimento experimental:* Preparou-se uma solução extrativa levando-se à fervura 2 g de planta previamente triturada, juntamente com 20 ml de ácido clorídrico a 10% (v/v). A mesma foi filtrada, e posteriormente alcalinizada com uma solução de hidróxido de amônio a 50% (pH 10). Transferiu-se a solução para um funil de separação e adicionou-se 10 ml de clorofórmio, agitando delicadamente e deixando em repouso. Separou-se a solução clorofórmica e repetiu-se este processo por mais 2 vezes. As soluções clorofórmicas foram juntadas e colocou-se 20 ml da solução extrativa em uma cápsula e evaporou-se o clorofórmio em banho-maria até a secura. Adicionou-se 15 ml de ácido clorídrico a 10% (v/v) e transferiu-se o líquido para tubos de ensaios numerados, prosseguindo conforme descrito abaixo:

- *Tubo 1:*

Adicionou-se 3 gotas do reagente de Dragendorff. Em caso de reação positiva para alcalóides, a solução se torna turva ou com precipitado;

- *Tubo 2:*

Adicionou-se 3 gotas do reagente de Mayer. Em caso de reação positiva para alcalóides, a solução se torna turva ou com precipitado;

- *Tubo 3:*

Adicionou-se 3 gotas do reagente de Bertrand. Em caso de reação positiva para alcalóides, a solução se torna turva ou com precipitado.

### 5.1.1.8. Análise Fitoquímica de Metilxantinas

As metilxantinas são constituintes químicos importantes de várias bebidas alimentícias ou estimulantes não alcoólicas, como café, chá-da-índia, guaraná, cola e chocolate, consumidos em todo o mundo, com grande importância econômica e cultural. As metilxantinas mais abundantes são a cafeína, teofilina e teobromina (SIMÕES *et. al.*, 2007).

Por tratarem-se de alcalóides, as metilxantinas são extraídas do mesmo modo que os alcalóides. A reação de caracterização desta classe é conhecida como ensaio de murexida, que se baseia na oxidação das metilxantinas nos derivados metilados do ácido purpúrico, que apresentam coloração vermelha. Isto pode ser feito através de diversas técnicas, como por aquecimento com ácido azótico, por evaporação a temperatura moderada de água saturada de bromo ou cloro e por umas gotas de peróxido de hidrogênio ou de solução de clorato de potássio em meio acidulado pelo ácido clorídrico. Por adcionamento de amônia, forma-se o respectivo sal de amônio, conhecido por murexido, de coloração púrpura (COSTA, 2000).

*Procedimento experimental:* Preparou-se uma solução extrativa levando-se à fervura 2 g de planta previamente triturada, juntamente com 20 ml de ácido clorídrico a 10% (v/v). A mesma foi filtrada, e posteriormente alcalinizada com uma solução de hidróxido de amônio a 50% (pH 10). Transferiu-se a solução para um funil de separação e adicionou-se 10 ml de clorofórmio, agitando delicadamente e deixando em repouso. Separou-se a solução clorofórmica. Repetiu-se este processo por mais 2 vezes. Juntaram-se as soluções clorofórmica. Colocou-se 10 ml da solução extrativa em uma cápsula e evaporou-se o clorofórmio em banho-maria até a *secura*. Adicionou-se 5 gotas de uma solução de ácido clorídrico 6 M e 5 gotas de uma solução de peróxido



de hidrogênio a 50% (v/v). Evaporou-se em banho-maria. Adicionaram-se ao resíduo da evaporação algumas gotas de hidróxido de amônio a 50% (v/v). Na reação positiva para metilxantinas o líquido adquire coloração púrpura.

### 5.1.1.9. Análise Fitoquímica de Saponinas

Saponinas são glicosídeos de esteróides ou de terpenos policíclicos. Sua estrutura apresenta parte com característica lipofílica (triterpeno ou esteróide) e outra parte hidrofílica (açúcar), proporcionando a propriedade de redução da tensão superficial da água e suas ações detergentes e emulsificantes (SIMÕES *et. al.*, 2007).

As reações para caracterização de saponinas são restritas, sendo normalmente associadas a reações gerais para a detecção de triterpenos e esteróides. A reação de Liebermann-Burchard (anidrido acético-ácido sulfúrico concentrado) é empregada para a detecção de esteróides e triterpenos. Para a detecção de esteróides insaturados, também pode ser empregada a reação de Salkowsky (ácido sulfúrico concentrado). Para detectar saponinas emprega-se o teste de formação de espuma, sendo que esta deverá permanecer estável na presença de ácidos minerais diluídos.

*Procedimento experimental:* Para a avaliação de saponinas, realizou-se as reações descritas abaixo:

- *Reação de Liebermann-Buchard:*

Preparou-se uma solução extrativa com 1 g de planta, previamente triturada, e 50 ml de água deionizada, levando à fervura por 30 min. Deixou-se esfriar e filtrou-se. Transferiu-se a solução para um balão volumétrico, completando o volume com água deionizada até 50 ml, homogeneizando em seguida. Transferiu-se 10 ml da solução extrativa para uma cápsula de porcelana, evaporando o solvente em banho-maria até a secura. Depois de frio, adicionou-se na cápsula 1,0 ml de anidrido acético. Transferiu-se o conteúdo da cápsula para um tubo de ensaio. Adicionou-se ao tubo de ensaio 1,0 ml de ácido sulfúrico concentrado pelas paredes do tubo, sem agitar. A presença de coloração azul ou verde é indicativa da presença de núcleo esteroidal. Coloração vermelha, rosa, púrpura ou violeta é indicativa de núcleo terpênico.

- *Reação de Salkowski:*

Preparou-se uma solução extrativa com 1,0 g de planta, previamente triturada, e 50 ml de água deionizada, levando à fervura por 30 min. Deixou-se esfriar e filtrou-se. Transferiu-se a solução para um balão volumétrico, completando o volume com água deionizada até 50 ml, homogeneizando em seguida. Transferiu-se 10 ml da solução extrativa para uma cápsula de porcelana, evaporando o solvente em banho-maria até a secura. Depois de frio, adicionou-se 1 ml ácido sulfúrico concentrado. O aparecimento de coloração castanho-escuro-avermelhado indica a presença de núcleo esteroidal.

- *Presença e permanência de espuma:*

Preparou-se uma solução extrativa com 1 g de planta, previamente triturada, e 100 ml de água deionizada, levando à fervura por 30 min. Durante a fervura, adicionou-se gota-a-gota de uma solução de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  a 10% (p/v), para neutralizar a solução. Deixou-se resfriar a solução. Em seguida, filtrou-se e transferiu-se a mesma para um balão volumétrico, completando o volume com água deionizada para 100 ml. Homogeneizou-se. Separou-se e numerou-se 10 tubos de ensaio idênticos (de 1 a 10). Adicionou-se solução extrativa e água nos mesmos, obtendo-se um volume total de 10 ml para cada tubo, conforme representado na Tabela 3. Agitou-se cada tubo durante 15 segundos com a mesma frequência. Deixou-se em repouso por 15 min. Após o repouso, anotaram-se as alturas das espumas para cada tubo. Adicionou-se 1,0 ml de uma solução de ácido clorídrico a 20% (v/v) e observou-se a permanência da espuma. Anotaram-se as alturas das espumas para cada tubo após a adição do ácido. A presença de espuma, mesmo com a presença de ácido mineral diluída indica a presença de saponinas.





## 5.2. Resultados

### 5.2.1. Análise Fitoquímica Preliminar

Na Tabela 4 são apresentados os resultados para os testes realizados para a avaliação fitoquímica preliminar de grupos químicos de metabólitos encontrados nas folhas das plantas *Vitex montevidensis*, *Campomanesia xantocarpa* e *Allophylus edulis*. Como pode ser observado, para a *Vitex montevidensis* as reações foram positivas para catequinas, flavonóides, saponinas e taninos. Já para a planta *Campomanesia xantocarpa* as reações foram positivas para flavonóides, heterosídeos cardioativos, saponinas e taninos. Na planta *Allophylus edulis* os grupos encontrados foram catequinas, flavonóides, heterosídeos cardioativos, heterosídeos cianogênicos, saponinas e taninos.

**Tabela 4.** Resultado das análises do perfil fitoquímico preliminar das plantas *Vitex montevidensis*, *Campomanesia xantocarpa* e *Allophylus edulis* ( - ausente; + presente).

Ensaio Fitoquímico	<i>Vitex montevidensis</i>	<i>Allophylus edulis</i>	<i>Campomanesia xantocarpa</i>
Antraquinonas	-	-	-
Alcalóides	-	-	-
Metilxantina	-	-	-
Catequinas	+	+	-
Cumarinas Voláteis	-	-	-
Flavonóides	++	+	++
Heterosídeos Antociânicos	-	-	-
Heterosídeos Cardioativos	-	+	+
Heterosídeos Cianogênicos	-	++	-
Saponinas	++	++	+++
Taninos	+	++	+++

## **6. OBTENÇÃO DOS EXTRATOS**





## 6.1. Material e Métodos

### 6.1.1. Obtenção dos extratos bruto das plantas *Vitex montevidensis*, *Campomanesia xantocarpa* e *Allophylus edulis*

Neste trabalho foram produzidos 3 tipos de extratos: Etanólico utilizando etanol à 96 % (p/v), Hidroalcoólico utilizando etanol à 70 % (p/v) e aquoso à quente (infusão). Para todos os extratos fixou-se a proporção planta/extrator em 7,0% (p/v), ou seja, 7,0 g de planta para cada 100 ml de extrator.

Inicialmente, produziram-se extratos em pequena escala (200 ml) para a previsão de rendimento. As condições de extração em pequena escala foram transpostas para média escala (2000 ml) e modificadas a fim de obter-se um rendimento similar.

Os extratos produzidos em média escala foram os utilizados nos tratamentos para verificação de eficácia e segurança das plantas. Nestes tratamentos foram administrados os extratos secos tanto hidroalcoólicos quanto etanólicos. Os extratos aquosos não foram liofilizados, sendo então administrados na forma de chá. Apenas para os ensaios em pequena escala, os extratos aquosos foram liofilizados com o objetivo de se verificar o rendimento prático. Para os extratos hidroalcoólicos e etanólicos, as doses administradas foram baseadas na massa de extrato seco, já os extratos aquosos foram relacionados com a massa de planta.

Os extratos aquosos foram feitos pelo método de infusão, que consiste em adicionar água fervente em uma determinada certa quantidade de planta, e abafar o recipiente por 15 minutos. Decorrido este tempo, filtra-se o extrato e verifica-se seu volume final, retirando uma alíquota de 10 ml para determinação do rendimento. Este procedimento foi realizado em triplicata. Os extratos foram congelados a -20 °C por 3 dias e liofilizados por 55 horas.

Para os extratos etanólicos e hidroalcoólicos foi utilizado o método de turbo extração. Em média escala, fixou-se a velocidade 5 (24.000 rpm) por 18 min no aparelho Turrax (responsável pela turbo extração). Após extração os solventes foram evaporados por um rotaevaporador, congelados a -20 °C por 3 dias e liofilizados por 55 h.

### **6.1.2. Obtenção das fração a partir do extrato hidroalcoólico da planta *Vitex montevidensis***

No tratamento farmacológico realizado com as plantas *Vitex montevidensis*, *Allophylus edulis* e *Campomanesia xantocarpa*, observou-se uma diminuição nos níveis de colesterol no grupo que recebeu o extrato hidroalcoólico da planta *Vitex montevidensis* na dose de 500 e 1000 mg/Kg. Sendo assim, desenvolveu-se e validou-se uma metodologia para o fracionamento deste extrato, que posteriormente teve as frações testadas em um novo ensaio pré-clínico para avaliação da eficácia das partições. Inicialmente, foram realizados testes em pequena escala com o objetivo de definir o líquido usado na dissolução do extrato seco e padronizar o fracionamento.

A quantidade de extrato hidroalcoólico usada no fracionamento dependerá da planta, no caso da planta *Vitex montevidensis* foram utilizados 1,5 g de extrato seco para cada 100 ml de solvente (água), ou seja, 1,5% (m/v).

Para os testes de fracionamento em pequena escala, utilizou-se uma proporção de 1:1, ou seja, 50 ml de solução de extrato hidroalcoólico para 50 ml de solvente. Os solventes utilizados no fracionamento foram hexano, diclorometano, acetato de etila e n-butanol e a técnica utilizada de fracionamento foi partição líquido-líquido.

A partição líquido-líquido consiste em agitar uma solução do extrato bruto com um solvente orgânico em um funil de separação, realizando a separação do extrato através da superfície de contato entre os dois solventes (formação de duas fases). Aqueles compostos que têm maior afinidade com o solvente orgânico passarão para esta fase, ficando no extrato somente os compostos que não tem afinidade com o solvente da partição, com isso, pode-se realizar nova partição com outro solvente, para que este possa também separar outros componentes.

São utilizados solventes com polaridades crescentes: hexano, diclorometano, acetato de etila e n-butanol, para o fracionamento do extrato bruto. A partição com cada solvente é realizada com repetições, até que todas as substâncias com afinidade aos solventes se esgotem na amostra.

Para isto realizou-se o acompanhamento das amostras de cada repetição das partições por Cromatografia de Camada Delgada (CCD),

verificando em qual das repetições já não se tornam mais visíveis as manchas presentes nas primeiras extrações, demonstrando assim que o solvente já haviam esgotado toda a substância do extrato bruto, podendo este ser particionado com outro solvente.

### **6.1.3. Rendimento dos extratos das plantas *Vitex montevidensis*, *Allophylus edulis* e *Campomanesia xantocarpa***

Após preparação dos extratos das folhas das plantas *Vitex montevidensis*, *Allophylus edulis* e *Campomanesia xantocarpa*, conforme técnica descrita anteriormente, anotou-se o volume final obtido. Transferiu-se 10 ml do extrato para cápsula de porcelana nº 80, previamente seco e pesado. Em seguida, deixou-se em banho-maria até *secura*. Transferiu-se a cápsula de porcelana para dessecador, deixando em repouso até resfriar. Pesou-se a cápsula de porcelana e calculou-se o rendimento do extrato, sendo o resultado expresso em porcentagem. O experimento foi realizado em triplicata



## 6.2. Resultados

### 6.2.1. Rendimento dos extratos das folhas das plantas *Vitex montevidensis*, *Campomanesia xantocarpa* e *Allophylus edulis*.

A Tabela 5 apresenta os rendimentos das frações aquosa, hidroalcoólica e etanólica das folhas das plantas *Vitex montevidensis*, *Campomanesia xantocarpa* e *Allophylus edulis*. O rendimento foi calculado após a padronização do processo de extração. Conhecer o rendimento prático das plantas que estão em estudo é bastante importante para prever a quantidade de material necessário para realização dos ensaios assim como para planejar o plantio e o consumo da planta para um possível desenvolvimento de um medicamento.

**Tabela 5.** Resultados das análises de rendimento dos extratos bruto das plantas *Vitex montevidensis*, *Campomanesia xantocarpa* e *Allophylus edulis*.

Extratos	Plantas		
	<i>Vitex montevidensis</i>	<i>Campomanesia xantocarpa</i>	<i>Allophylus edulis</i>
Aquoso	8,66%	10,37%	10,71%
Hidroalcoólico	17,70%	15,26%	20,98%
Etanólico	7,10%	6,90%	15,78%



## **7. EFICÁCIA FARMACOLÓGICA**





## **7.1. Materiais e Métodos**

### **7.1.1. Dislipidemias**

#### **7.1.1.1. Animais**

Foram utilizados camundongos C57BL/6 ó LDLr KO (homozigotos com deficiência para receptores de lipoproteína de baixa densidade), obtidos do Jackson Laboratories (Bar Harbor, Maine), com 12 semanas, que foram alojados em gaiolas plásticas, mantidos em temperatura ambiente controlada ( $22 \pm 2$  °C), com ciclo claro/escuro de 12 h. Os animais foram divididos em grupos ( $n = 10$ ) e receberam dieta hipercolesterolêmica (DH) (contendo 1,25% de colesterol) obtida do departamento de nutrição da Universidade de Campinas (UNICAMP), ou dieta comercial, durante 30 dias concomitantemente com o tratamento com diferentes doses de extratos brutos, frações, veículo (água) ou sinvastatina (10 mg/kg). O protocolo com os procedimentos experimentais realizados foi submetido à Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Santa Catarina e aprovado pelo protocolo número PP00572/CEUA.

#### **7.1.1.2. Tratamentos**

O tratamento dos animais com diferentes concentrações de extrato bruto (500 e 1000 mg/kg) ou frações (125 e 250 mg/kg) foi realizado diariamente (sempre entre 8 e 9 h da manhã), durante 30 dias, por via oral (gavagem). O tratamento ocorreu simultaneamente à exposição à dieta hipercolesterolêmica (DH) ou comercial (DC). O peso dos animais foi avaliado duas vezes por semana e a ingestão de água e comida foi avaliada diariamente.

Os grupos experimentais para cada extrato ou frações das plantas avaliadas foram os seguintes:

**Tabela 6.** Grupos experimentais utilizados na avaliação da eficácia das plantas *Vitex montevidensis*, *Allophylus edulis* e *Campomanesia xantocarpa*

Grupo	Dieta	Tratamento	Dose	Código
G1	Comercial	Veiculo	-	DC
G2	DH	Veiculo	-	DH
G3	DH	extrato aquoso <i>V. montevidensis</i>	500 mg/kg	EAVM
G4	DH	extrato aquoso <i>V. montevidensis</i>	1000mg/kg	EAVM
G5	DH	extrato hidroalcoólico <i>V. montevidensis</i>	500 mg/kg	HEVM
G6	DH	extrato hidroalcoólico <i>V. montevidensis</i>	1000mg/kg	HEVM
G7	DH	extrato etanólico <i>V. montevidensis</i>	500 mg/kg	EEVM
G8	DH	extrato etanólico <i>V. montevidensis</i>	1000mg/kg	EEVM
G9	DH	extrato aquoso <i>C. xantocarpa</i>	500 mg/kg	EACX
G10	DH	extrato aquoso <i>C. xantocarpa</i>	1000mg/kg	EACX
G11	DH	extrato hidroalcoólico <i>C. xantocarpa</i>	500 mg/kg	HECX
G12	DH	extrato hidroalcoólico <i>C. xantocarpa</i>	1000mg/kg	HECX
G13	DH	extrato etanólico <i>C. xantocarpa</i>	500 mg/kg	EECX
G14	DH	extrato etanólico <i>C. xantocarpa</i>	1000mg/kg	EECX
G15	DH	extrato aquoso <i>A. edulis</i>	500 mg/kg	EAAE
G16	DH	extrato aquoso <i>A. edulis</i>	1000mg/kg	EAAE
G17	DH	extrato hidroalcoólico. <i>edulis</i>	500 mg/kg	HEAE
G18	DH	extrato hidroalcoólico. <i>edulis</i>	1000mg/kg	HEAE
G19	DH	extrato etanólicos <i>A. edulis</i>	500 mg/kg	EEAE
G20	DH	extrato etanólicos <i>A. edulis</i>	1000mg/kg	EEAE
G21	DH	Fração hexano <i>V. montevidensis</i>	125mg/kg	FHVM
G22	DH	Fração hexano <i>V. montevidensis</i>	250mg/kg	FHVM
G23	DH	Fração diclorometano <i>V. montevidensis</i>	125mg/kg	FDMVM
G24	DH	Fração diclorometano <i>V. montevidensis</i>	250mg/kg	FDMVM
G25	DH	Fração acetato de etila <i>V. montevidensis</i>	125mg/kg	FACVM
G26	DH	Fração acetato de etila <i>V. montevidensis</i>	250mg/kg	FACVM
G27	DH	Fração n-butanol <i>V. montevidensis</i>	125mg/kg	FBUVM
G28	DH	Fração n-butanol <i>V. montevidensis</i>	250mg/kg	FBUVM
G29	DH	Fração residual <i>V. montevidensis</i>	125mg/kg	FRVM
G30	DH	Fração residual <i>V. montevidensis</i>	250mg/kg	FRVM
G31	DH	Sinvastatina	10mg/kg	SVTN

### 7.1.1.3. Obtenção do Soro e Determinação de Lipoproteínas

Após o término do tratamento os animais foram anestesiados com uma mistura de quetamina e xilazina (90/15 mg/kg, i.p.). Em seguida, foi realizada uma laparotomia e a veia cava inferior foi localizada e o sangue do animal foi removido e transferido para um eppendorf. Após coagulação, o sangue foi centrifugado durante 15 min e o soro obtido foi posteriormente utilizado para as dosagens bioquímicas (colesterol total, fração HDL-C-C, fração LDL-C, triglicerídeos).

A determinação do colesterol total, da fração HDL-C-C e triglicerídeos no soro dos camundongos foram realizados utilizando-se reagentes comerciais (Gold Analisa, Belo Horizonte, MG). Já a determinação da fração LDL-C foi realizada indiretamente, através da equação de Friedewald :

$$\text{LDL-C} = \text{Colesterol Total} - \text{HDL-C} - \text{TG}/5$$

### 7.1.2. Aterosclerose

#### 7.1.2.1. Determinação da Área de Lesão Aterosclerótica

Os animais foram anestesiados com uma mistura de quetamina e xilazina (90/15 mg/kg, i.p.). Após a retirada da aorta o coração foi perfundido através do ventrículo direito com salina seguido de formaldeído 10%. O coração foi removido e fixado por 24 h em formalina 10% e então embebido em gelatina 5, 10 e 25%. O processamento histológico e coloração dos cortes foram realizados como descrito por Paigen *et al.*, (1987). Resumidamente, após a aplicação de Tissue Freezing Médium nos blocos de gelatina contendo os corações, este foi cortado transversalmente em criostato a uma temperatura de -25 °C com uma espessura de 20 µm cada corte, a partir do início da aorta, totalizando uma área de 480 µm, utilizando-se para a localização desta área a visualização microscópica das válvulas semilunares. Os cortes serão então corados com Oil Red e contra corados com Light Green e Hematoxilina de Harris. As áreas de lesões

foram expressas como a somatória das lesões em 6 cortes, com 80  $\mu\text{m}$  de distância entre os cortes, em uma área total de 480  $\mu\text{m}$ .

#### **7.1.2.2. Determinação do Índice Aterogênico (IA).**

O índice aterogênico (IA), é o calculo da extensão da lesão aterosclerótica com base nos lipídeos do soro. A medida foi determinada nos animais dos grupos controle positivo e negativo, extrato bruto hidroalcoólico e fração butanólica, já que esses grupos experimentais foram que os demonstraram efeitos mais significativos nas análises anteriormente realizadas. O índice aterogênico é calculada utilizando-se a fórmula  $IA = CT / HDL-C$  (Balogun e Adebayo, 2007).

#### **7.1.2.3. Estatística.**

Os resultados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM) de 10 animais por grupo. As análises estatísticas foram realizadas utilizando a análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de Dunnett. Um valor de p inferior a 0,05 foi considerado estatisticamente significativo. Os gráficos foram desenhados utilizando GraphPad Prism versão 5.0 para Windows (GraphPad Software, San Diego, CA, EUA).

## 7.2. Resultados

### 7.2.1. Perfil lipídico dos animais tratados com extratos bruto aquoso, hidroalcoólico e etanólicos das plantas *Vitex montevidensis*, *Campomanesia xantocarpa* e *Allophylus edulis*

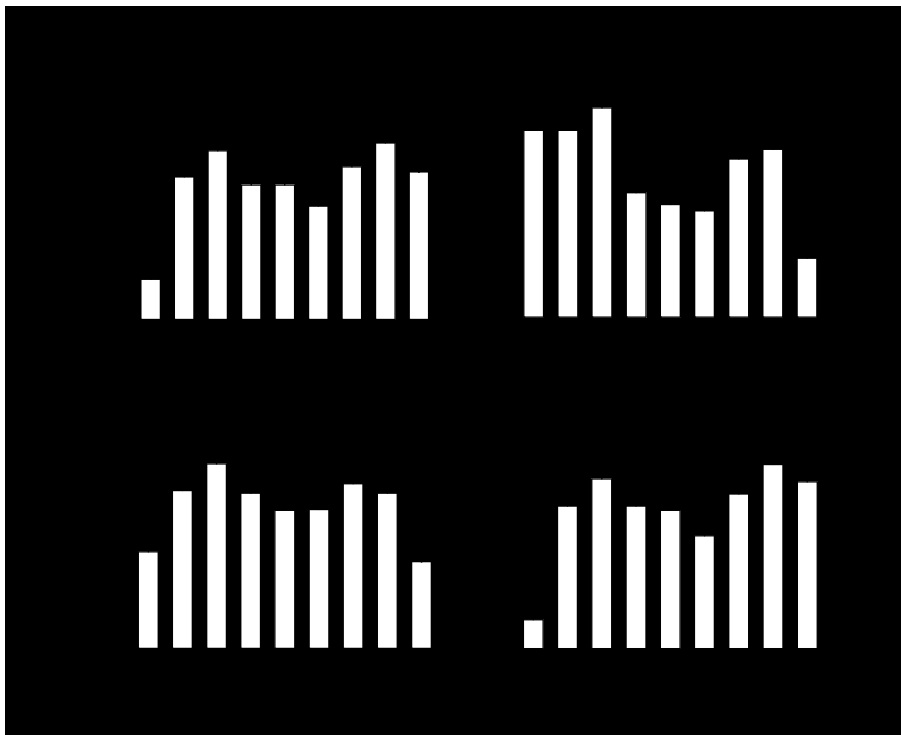
As plantas utilizadas para o desenvolvimento dos estudos de eficácia farmacológica para o tratamento do colesterol e da aterosclerose foram selecionadas por originarem-se a partir de biomas característicos da flora brasileira e ter experiência reconhecida de utilização a partir do conhecimento tradicional e popular. Após realização das etapas farmacobotânica e fitoquímica laboratorial as espécies *Vitex montevidensis*; *Campomanesia xantocarpa* e *Allophylus edulis* foram submetidas a etapa farmacológica e apresentaram os resultados demonstrados abaixo.

Através dos resultados demonstrados na figura 10 é possível observar o aumento nos níveis de colesterol total dos animais tratados com dieta DH ( $1076 \pm 66$  mg/dL) quando comparado com os animais do grupo controle ( $244 \pm 15$  mg/dL -  $p < 0,0001$ ). Após o final do tratamento foi possível observar que os camundongos que foram tratados concomitantemente com dieta DH e extratos bruto hidroalcoólico da planta *Vitex montevidensis* (HEVM) nas doses de 500 e 1000 mg / kg tiveram uma significativa redução nos níveis do colesterol total ( $682 \pm 27$  e  $882 \pm 27$  mg / dl ó  $p < 0.05$ ), triglicerídeos (controle positivo:  $103 \pm 11$ ; HEVM:  $41 \pm 5,8$  e  $38 \pm 3,9$  -  $p < 0.001$ ) e LDL-C (controle positivo:  $1018 \pm 74$ ; HEVM:  $839 \pm 16$  e  $864 \pm 25$  ó  $p < 0.001$ ). No entanto, ao analisar os efeitos dos tratamentos sobre os níveis de HDL-C, nenhum efeito significativo foi encontrado. Foi possível observar ainda que os níveis de CT, TG e LDL-C dos animais dos grupos HEVM 500 e 1000 mg/kg são muito parecidos com os níveis encontrados no soro dos animais tratados com sinvastatina (Figura 10).



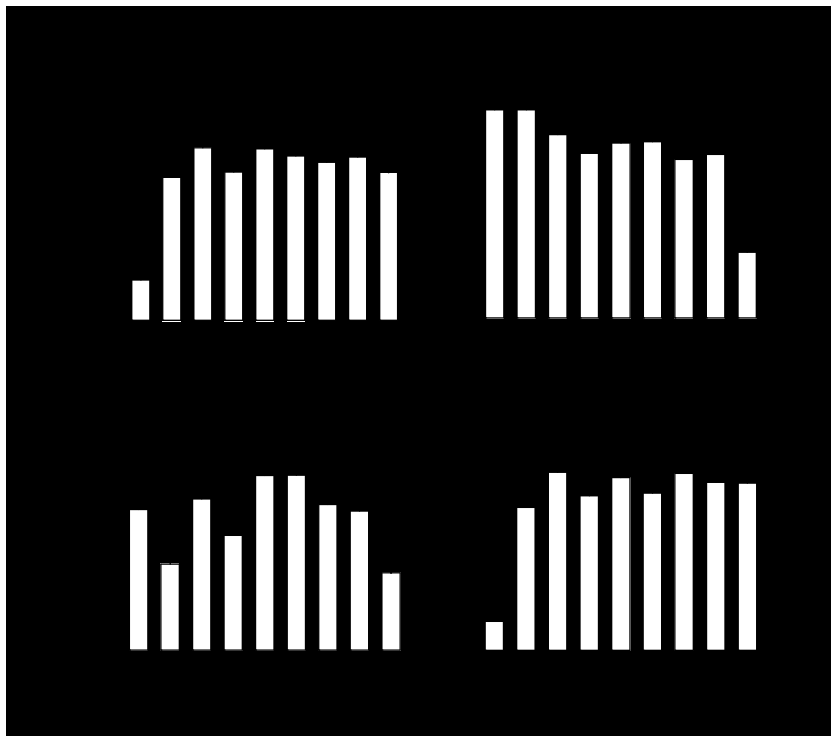
**Figura 10.** Efeito do extrato aquoso (EAVM), hidroalcoólico (HEVM) e etanólico (EEVM) das folhas da planta *V. montevidensis* sobre o perfil lipídico de camundongos C57 bl/6 KO LDLr. # diferença significativa entre o grupo controle tratado com dieta DC e o grupo controle tratado com deita DH ( $p < 0,05$ ; ANOVA seguida pelo teste de Dunnett). \* diferença significativa entre o grupo controle tratado com dieta DH e os diferentes extratos da planta *Vitex montevidensis* ( $p < 0,05$ ; ANOVA seguida pelo teste de Dunnett).

Já ao avaliar os mesmos parâmetros nos animais tratados com extratos da planta *Campomanesia xantocarpa* observamos apenas uma discreta diminuição nos níveis de CT e TG dos animais tratados com extrato hidroalcoólico (HECX) na dose de 1000 mg/kg. Nenhum efeito significativo foi observado nos níveis de HDL-C e LDL-C (Figura 11).



**Figura 11.** Efeito do extrato aquoso (EACX), hidroalcoólico (HECX) e etanólico (EECX) das folhas da planta *C. xantocarpa* sobre o perfil lipídico de camundongos C57 bl/6 KO LDLr. # diferença significativa entre o grupo controle tratado com dieta DC e o grupo controle tratado com deita DH ( $p < 0,05$ ; ANOVA seguida pelo teste de Dunnett). \* diferença significativa entre o grupo controle tratado com dieta DH e os diferentes extratos da planta *Campomanesia xantocarpa* ( $p < 0,05$ ; ANOVA seguida pelo teste de Dunnett).

O mesmo procedimento experimental foi realizado para avaliação do efeito do tratamento com a planta *Allophylus edulis*, porém nenhuma diferença significativa foi encontrada nos níveis de CT, TG, HDL-C e LDL-C (Figura 12).



**Figura 12.** Efeito do extrato aquoso (EAAE), hidroalcoólico (HEAE) e etanólico (EEAE) das folhas da planta *A. edulis* sobre o perfil lipídico de camundongos C57 bl/6 KO LDLr. # diferença significativa entre o grupo controle tratado com dieta DC e o grupo controle tratado com deita DH ( $p < 0,05$ ; ANOVA seguida pelo teste de Dunnett). \* diferença significativa entre o grupo controle tratado com dieta DH e os diferentes extratos da planta *Allophylus edulis* ( $p < 0,05$ ; ANOVA seguida pelo teste de Dunnett).

### 7.2.2. Perfil Lipídico dos Animais Tratados com Frações Obtidas do Extrato Hidroalcoólico da Planta *Vitex montevidensis*

Após a obtenção dos resultados demonstrados na figura 13 o extrato bruto hidroalcoólico da planta *Vitex montevidensis* foi então fracionado através da técnica de partição sendo as frações butanólica, acetato de etila, diclorometano e hexano, utilizadas nas doses 125 mg/Kg e 250 mg/Kg para verificação da potencialização do efeito e/ou



para ajudar no direcionamento dos possíveis princípios ativos presentes na planta. Foi observado, que assim como, o extrato HEVM, as frações residual (FRVM) e n-butanol (FBUVM) nas doses de 150 e 250 mg/kg causaram redução nos níveis de CT, (FBUVM:  $710 \pm 40$  e  $535 \pm 22$  mg/dl -  $p < 0.001$ ); (FRVM:  $777 \pm 57$  e  $672 \pm 73$  -  $p < 0,01$ ) respectivamente quando comparados ao grupo controle tratados com dieta HD.



**Figura 13.** Efeito das frações (residual, n-butanol, acetato de etila, diclorometano e hexano) do extrato das folhas da planta *Vitex montevicensis* (125 e 250 mg/Kg) nos níveis lipídicos de camundongos C57BL/6 KO LDLr. # diferença significativa entre o grupo controle tratado com dieta DC e o grupo controle tratado com dieta DH ( $p < 0,05$ ; ANOVA seguida pelo teste de Dunnett). \* diferença significativa entre o grupo controle tratado com dieta DH e os diferentes extratos da planta *Vitex montevicensis* ( $p < 0,05$ ; ANOVA seguida pelo teste de Dunnett).

Da mesma forma, as frações FBUVM ( $77 \pm 3,6$  e  $68 \pm 5,2$  -  $p < 0.0001$ ) e FRVM ( $105 \pm 18$  e  $75 \pm 3,4$  -  $p < 0,05$ ) causaram redução expressiva nos níveis de TG e também nos níveis de LDL-C (controle positivo:  $889 \pm 47$ ; FBUVM:  $650 \pm 41$  e  $459 \pm 25$  ó  $p < 0,01$  FRVM:  $719 \pm 58$  e  $614 \pm 78$  ó  $p < 0,01$ ). No entanto, ao analisar os efeitos dos tratamentos sobre os níveis de HDL-C, nenhum efeito foi encontrado (Figura 14). Além disso, os níveis de CT e LDL-C encontrados nos grupos FBUVM 125 e 250 mg/kg, foi significativamente menor do que os encontrados nos grupos HEVM 1000 mg/kg e sinvastatina ( $p < 0.005$ ).



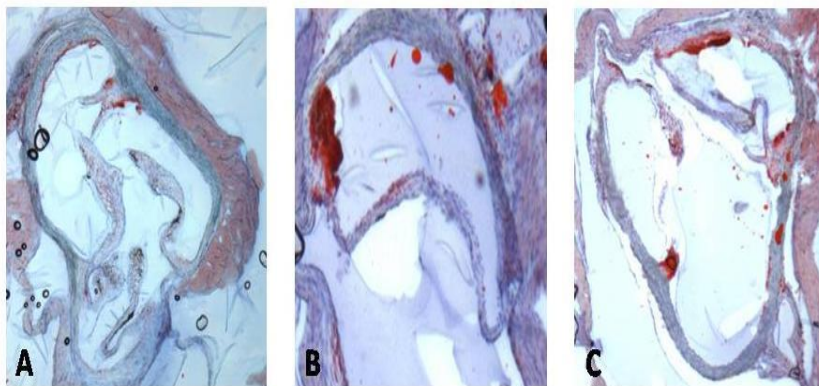
**Figura 14.** Efeito do extrato hidroalcoólico (HEVM), fração residual (FRVM) e fração n-butanólica (FBUVM) das folhas da planta *Vitex montevidensis* sobre o perfil lipídico de camundongos C57BL/6 KO LDLr. # diferença significativa entre o grupo controle tratado com dieta DC e o grupo controle tratado com dieta DH ( $p < 0,05$ ; ANOVA seguida por teste de Dunnett). \* diferença significativa entre o grupo controle tratado com dieta DH e os diferentes

extratos e frações da planta *Vitex montevidensis* ( $p < 0,05$ ; ANOVA seguida pelo teste de Dunnett). + diferença significativa entre o grupo tratado com as frações RFVM ou n-BFVM e os grupos tratados com HEVM 1000 mg/kg ou sinvastatina ( $p < 0,05$ ; ANOVA seguida pelo teste de Dunnett).

### 7.2.3. Aterosclerose

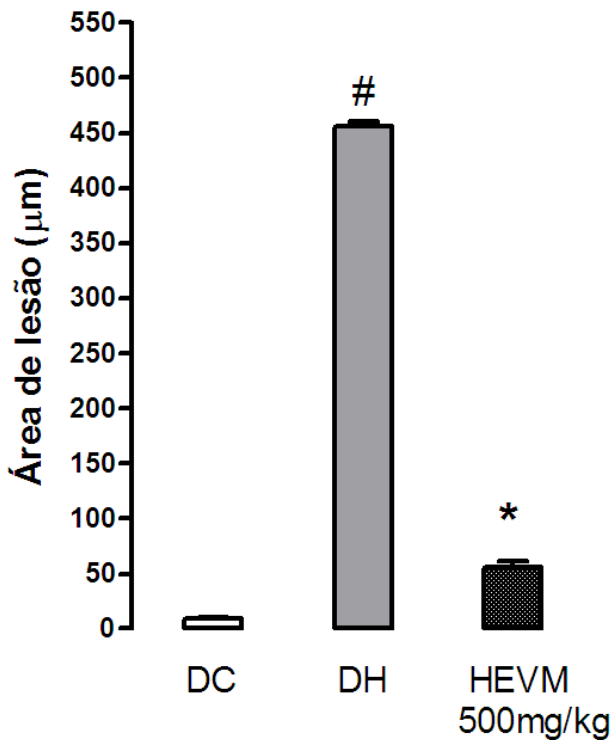
#### 7.2.3.1. Determinação da Área de Lesão Aterosclerótica

O desenvolvimento da lesão aterosclerótica foi quantificada após 30 dias de tratamento com dieta DH. As áreas de lesões ateroscleróticas são predominantemente composta de macrófagos espumosos. Como pode ser observado os animais tratados com dieta rica em gordura (DH) apresentaram uma proeminente formação da placa aterosclerótica quando comparado com o grupo controle. Já os animais que receberam o tratamento com o extrato HEVM 500mg/kg concomitantemente com a dieta DH apresentaram uma redução significativa da área de lesão quando comparado com os animais que receberam a dieta DH e veículo ( $p < 0,0001$ ).



**Figura 15.** Figuras representativas dos cortes histológicos da área de lesão da raiz da aorta de camundongos C57 bl/6 KO LDLr corados com *Oil Red*. A marcação em vermelho representa as áreas de deposição de lipídios na luz do vaso. (A): Corte representativo do grupo controle que recebeu dieta DC; (B): Corte representativo do grupo controle que recebeu dieta DH; (C): Corte representativo do grupo controle que recebeu dieta DH;

representativo do grupo tratado com extrato hidroalcoólico da planta *Vitex montevidensis* na dose de 500mg/kg.



**Figura 16.** Efeito do extrato hidroalcoólico (HEVM) das folhas da planta *Vitex montevidensis* na medida da área de lesão ( $\mu\text{m}$ ) dos cortes histológicos da raiz da aorta de camundongos C57 bl/6 KO LDLr corados com Oil Red. # diferença significativa entre o grupo controle tratado com dieta DC e o grupo controle tratado com dieta DH ( $p < 0,001$ ); \* diferença significativa entre o grupo controle tratado com dieta DH e o grupo tratado com HEVM 500mg/kg ( $p < 0,001$ )

### 7.2.3.2. Determinação do Índice Aterogênico

O índice aterogênico apresentou uma significativa elevação no grupo controle tratado com dieta DH ( $2,8 \pm 0,4$ ) após os 30 dias de tratamento. O tratamento com extrato hidroalcoólico da planta *Vitex montevidensis* nas doses de 500 mg/kg ( $0,9 \pm 0,2$ ) e 1000mg/kg ( $1,3 \pm 0,75$ ) induziu uma redução significativa do índice ( $p < 0.01$ ). De igual modo, os camundongos tratados com a fração FBUVM 125 mg/kg ( $1,2 \pm 0,1$ ) e 250 mg/kg ( $1,0 \pm 0,1$ ) mostraram valores significativamente menores do que o grupo DH sendo esses valores próximos aos encontrados nos animais tratados com sinvastatina ou aos encontrados no grupo controle (Figura 17).



**Figura 17.** Efeito do extrato hidroalcoólico (HEVM), fração residual (FRVM) e fração n-butanólica (FBUVM) das folhas da planta *Vitex montevidensis* sobre o índice aterogênico ( $IA = TC / HDL-C$ ) de camundongos C57BL/6 KO LDLr. #

diferença significativa entre o grupo controle tratado com dieta DC e o grupo controle tratado com dieta DH ( $p < 0,05$ ; ANOVA seguida pelo teste de Dunnett). \* diferença significativa entre o grupo controle tratado com dieta DH e os diferentes extratos da planta *Vitex montevidensis* ( $p < 0,05$ ; ANOVA seguida pelo teste de Dunnett).

## **8. ANÁLISE TOXICOLÓGICA**





## **8.1. Material e Métodos**

### **8.1.1. Teste hipocrático ou Teste de Irwin**

O teste hipocrático, ou também conhecido como teste de Irwin ou triagem farmacológica comportamental, é realizado por meio de observações comportamentais sistemáticas, fornecendo uma estimativa geral da toxicidade da substância sobre o estado consciente e disposição geral, atividade e coordenação do sistema motor, reflexos e atividades sobre o sistema nervoso central e sistema nervoso autônomo (CUNHA *et. al.*, 2006; MALONE; ROBICHAUD, 1983).

*Procedimento experimental:* Para a realização do teste hipocrático, camundongos macho da linhagem C57/bl6 KO LDLr foram divididos em seis grupos experimentais, sendo cada grupo composto por três animais, conforme demonstrado na Tabela 7.

Os animais foram tratados e observados 30 min, 1 h, 2 h, 4h, 8h e 24 h após a administração e, a partir de então, diariamente, até o décimo quarto dia, uma vez ao dia sempre no mesmo horário, para avaliar os efeitos relacionados às atividades do Sistema Nervoso Central (estimulante, depressora, entre outros), do Sistema Nervoso Autônomo (salivação, diarreia, entre outros) e a mortalidade dos animais.

Os efeitos observados nos animais tratados foram registrados respeitando uma escala de intensidade dos efeitos, sendo (0) sem efeito, (-) efeito diminuído, (+) efeito presente e (++) efeito intenso, para posteriormente serem analisados.

Os animais sobreviventes foram anestesiados com uma solução de xilazina - quetamina e sacrificados por deslocamento cervical. Foram realizadas análises macroscópicas dos órgãos e pesagem do fígado e do baço para determinação de possíveis efeitos toxicológico dos extratos.

**Tabela 7.** Representação dos grupos, tratamentos, doses e vias de administração dos animais avaliados no teste de triagem hipocrática.

<b>Grupo</b>	<b>Tratamento / Dose</b>	<b>Via de administração</b>
Controle	Salina 0,9%	Via oral
Tratado 1000 mg/kg	EHA <i>V. montevicensis</i> ó 1000 mg/kg	Via oral
Tratado 2000 mg/kg	EHA <i>V. montevicensis</i> ó 2000 mg/kg	Via oral
Tratado 4000 mg/kg	EHA <i>V. montevicensis</i> ó 4000 mg/kg	Via oral
Tratado 250 mg/kg	FBU <i>V. montevicensis</i> ó 250 mg/kg	Via oral
Tratado 500 mg/kg	FBU <i>V. montevicensis</i> ó 500 mg/kg	Via oral
Tratado 1000 mg/kg	FBU <i>V. montevicensis</i> ó 1000 mg/kg	Via oral
Controle	Salina 0,9%	Via intraperitoneal
Tratado 1000 mg/kg	EHA <i>V. montevicensis</i> ó 1000 mg/kg	Via intraperitoneal
Tratado 2000 mg/kg	EHA <i>V. montevicensis</i> ó 2000 mg/kg	Via intraperitoneal
Tratado 4000 mg/kg	EHA <i>V. montevicensis</i> ó 4000 mg/kg	Via intraperitoneal
Tratado 250 mg/kg	FBU <i>V. montevicensis</i> ó 250 mg/kg	Via intraperitoneal
Tratado 500 mg/kg	FBU <i>V. montevicensis</i> ó 500 mg/kg	Via intraperitoneal
Tratado 1000 mg/kg	FBU <i>V. montevicensis</i> ó 1000 mg/kg	Via intraperitoneal

## 8.2. Resultados

### 8.2.1. Teste Hipocrático ou Teste de Irwin

Durante o teste hipocrático observou-se efeitos importantes, tanto fisiológicos como comportamentais, que foram úteis no momento da seleção de possíveis doses terapêuticas e para avaliação da toxicidade aguda da planta. O teste proporcionou um direcionamento do estudo quanto aos possíveis efeitos que o extrato apresenta. Os principais efeitos foram observados nos tempos de 30 min, 1 h e 2 h. A partir deste tempo não foram observados efeitos significativos, quando comparados com o grupo controle.

Dentre os efeitos observados, destacaram-se a analgesia (30 min a 2 h), a sedação (30 min a 2 h) e a piloereção (30 min a 1 h), em grupos tratados com FBU *V. montevidensis* ó 1000 mg/kg por via i.p. Além disso, foi possível verificar que não houve alteração no peso ou nas características morfológicas dos órgão (fígado e baço) analisados (Tabela 8) e também não houve mortalidade dos animais avaliados, o que indica uma baixa toxicidade aguda desta planta.



**Tabela 8.** Análise do peso dos órgãos dos animais após realização do teste Hipocrático ou Teste de Irwin.



## **9. CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA**





## 9.1. Material e Métodos

### 9.1.1. Reagentes

Orientina, Isoorientina, Vitexina, Isovitexina e Vitexina-2-O-Rhamnosida foram obtidos a partir da Farmacopeia USP e da Farmacopéia Brasileira, com pureza de 99,9% para todas as substâncias. Acetonitrila, metanol, ácido fórmico e formato de amônio grau HPLC, acetato de etilo, butanol, diclorometano e n-hexano grau HPLC, foram adquiridos a partir da Sharlau (Barcelona, Espanha). Água ultra pura foi obtida a partir de um sistema de purificação Gehaka Master System (Gehaka, São Paulo, Brasil).

### 9.1.2. Preparo das Soluções Padrão e Amostras para Análise Instrumental

Para o preparo das soluções estoque, padrões dos flavonoides orientina, isoorientina, vitexina, isovitexina e vitexina-2-o-rhamnosida foram solubilizados em metanol e diluídos para se obter uma concentração de 5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ .

As amostras obtidas a partir dos extratos foram diluídas em uma proporção de 1:4 (v/v) com a fase móvel (água:acetonitrila 95:5 v/v). O mesmo procedimento foi utilizado para a diluição das soluções estoque dos padrões de flavonóides.

### 9.1.3. Equipamento e Colunas

Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência Acoplado à Espectrometria de Massas, *Ultra-Performance Liquid Chromatography Electrospray Tandem Mass Spectrometry* (UPLC-ESI-MS) foi realizada em um equipamento ACQUITY UPLC H-Class equipado com amostrador automático refrigerado e forno para coluna com aquecimento, acoplado a espectrômetro de massa Waters Xevo-TQ com interface de ionização por electrospray (ESI) (Waters Corporation, Milford, MA, EUA). Para a aquisição de dados e controle do sistema foi

utilizadoo software Mass Lynx versão 4.1 (Waters Corporation). Gás nitrogênio foi produzido a partir de nitrogênio líquido (White Martins, SC, Brasil). A separação cromatográfica foi realizada através de uma coluna ACQUITY UPLC BEH C18 (150 mm x 2,1 mm, 1,7  $\mu\text{m}$ ) com pré-coluna ACQUITY BEH C18 VanGuard, (5 mm x 2,1 mm, 1,7  $\mu\text{m}$ ) (Waters Corporation).

#### 9.1.4. Procedimento

Todas as separações cromatográficas foram realizadas com um sistema de eluição por gradiente. A fase móvel para as corridas cromatográficas foi preparada a partir de uma solução de formato de amônio a 10  $\text{mmolL}^{-1}$  e ácido fórmico 0,1 % (v/v) (fase móvel A) e acetonitrila (fase móvel B). O gradiente iniciou com 5 % de fase móvel B, aumentando linearmente para 12 % em 114 min, em seguida, retornou a indicação inicial de 5 % de fase B em 115 minutos, mantendo-se até 120 min. O fluxo foi de 0,4  $\text{ml min}^{-1}$ . A temperatura da coluna foi mantida a 40 ° C e o amostrador automático ficou condicionado em 6 ° C. O volume de injeção foi de 7,5 ml.

A análise por espectrometria de massa foi realizada utilizando uma fonte ESI no modo de íons negativos. As condições utilizadas para a análise foram: ( $\text{N}_2$ ) com fluxo de 800  $\text{L h}^{-1}$ , fluxo de gás de cone foi de 150  $\text{L h}^{-1}$ , a temperatura da fonte e do gás de dessolvatação foram de 150 ° C e 500 ° C, respectivamente, a voltagem da fonte ESI foi de 2.5 kV e voltagem do cone de 30 V. Os espectros de massa de íons negativos foram obtido sem uma faixa de massa/carga ( $m/z$ ) de 50 a 800  $m/z$  por varredura a cada 2 s. Através de comparação entre os tempos de retenção dos picos gerados nos espectros de massas das amostras com os gerados nas soluções padrão, foi possível identificar as substâncias desconhecidas contidas nas amostras.

## 9.2. Resultados

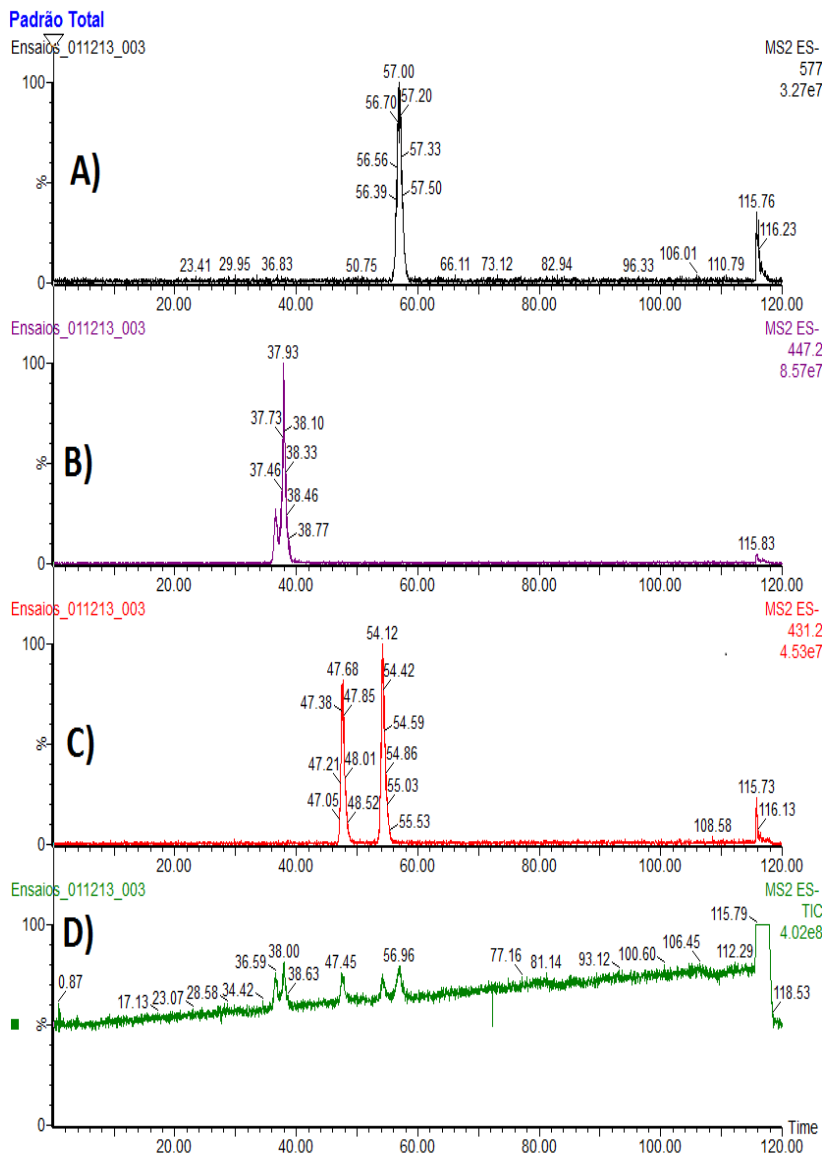
### 9.2.1. Identificação e caracterização de possíveis marcadores dos extratos e frações da planta *Vitex montevicensis*

As soluções padrão dos cinco flavonóides foram estudadas através de MS operando em modo de íons negativos por meio de varredura de íon precursor (MS SCAN). O tempo de retenção das flavonas e suas respectivas massas detectadas por espectrometria de massa são apresentadas na Tabela 8. O cromatograma de uma mistura dos padrões de flavonas é apresentado na Figura 18. Como mostrado na Figura 18D, foram identificados cinco picos principais (1, 2, 3, 4 e 5) em diferentes tempos de retenção (TR), 36,6, 37,9, 47,6, 54,1 e 57,0 min. Através da comparação entre os cromatogramas em razões de m/z fixas, (Figura 18 A, B e C), esses picos foram atribuídos para orientina, isoorientina, vitexina, isovitexina e vitexina-2-o-rhamnoside, respectivamente. Os espectros de MS dos cinco picos dos padrões também foram medidos usando UPLC-ESI-MS e são apresentados na Figura 19. Como mostrado, no TR 57 min, foi observado íons com 577 m/z, atribuídos ao vitexina-2-o-rhamnoside, no TR 36,5 e 37,9 min, íons com 447,2 m/z, atribuídos a orientina e isoorientina, TR 47,6 e 54,1 min, íons com 431,2 m/z atribuídos à vitexina e isovitexina. As massas encontradas estão condizentes com o esperado, sendo encontradas massas com diferença de uma unidade entre a teórica, tendo em vista a perda de um próton no processo de ionização  $[MóH]^{-}$ .

Como pode ser visto na Figura 20, alguns dos compostos foram identificados no extrato hidroalcoólico e nas frações n - butanol e residuais. Os tempos de retenção não são exatamente idênticos aos compostos padrão, possivelmente devido a efeitos de matriz e outras substâncias presentes no extrato que podem estar co-eluidando com os compostos de interesse. No entanto, as espectrometrias de massa apresentadas nas Figuras 21 e 22, confirmaram a presença de orientina, isoorientina, vitexina e isovitexina. O flavonoide vitexina-2-o-rhamnoside não foi observado em nenhuma das amostras avaliadas.

Extratos orgânicos a partir de n-hexano e diclorometano também foram estudados, porém em nenhum dos casos foram observados a extração dos flavonóides. Esse fato se deve provavelmente a baixa polaridade dos solventes extratores. Os flavonóides estudados

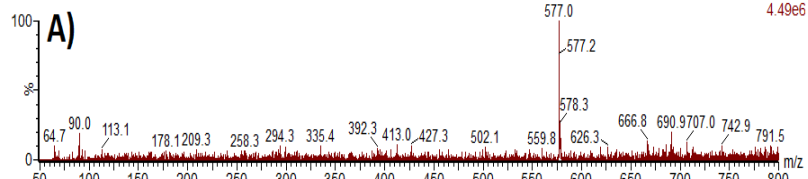
apresentam alta afinidade por solventes próticos polares, devido ao grande número de hidroxilas e sítios polares em suas estruturas.



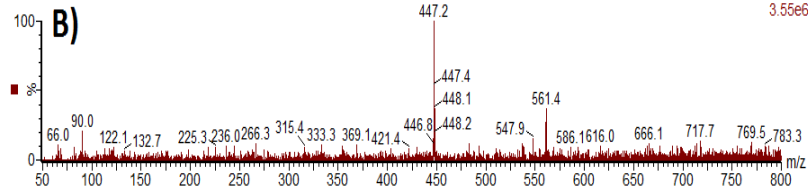
**Figura 18.** Cromatogramas dos padrões de flavonoides: A) íon extraído 577,0 m/z vitexina-2-o-rhamnoside em TR: 57 min, B) íons extraídos 447,2 m/z de orientina em TR: 36,6 min e isoorientina TR: 37,9 min, C) íons extraídos 431,2 m/z de vitexina em TR: 47,6 min e isovitexina TR: 54,1 min, D) cromatograma de íons totais.

## Padrão Total

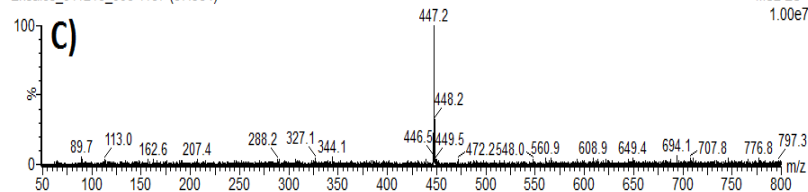
Ensaio\_011213\_003 1711 (57.130)

MS2 ES-  
4.49e6

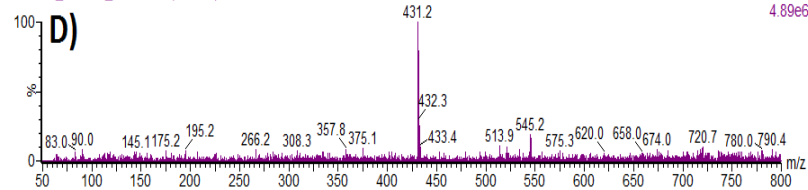
Ensaio\_011213\_003 1098 (36.662)

MS2 ES-  
3.55e6

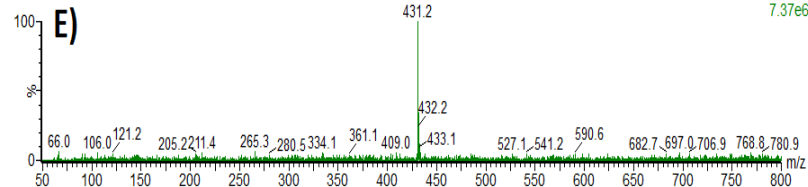
Ensaio\_011213\_003 1137 (37.964)

MS2 ES-  
1.00e7

Ensaio\_011213\_003 1429 (47.714)

MS2 ES-  
4.89e6

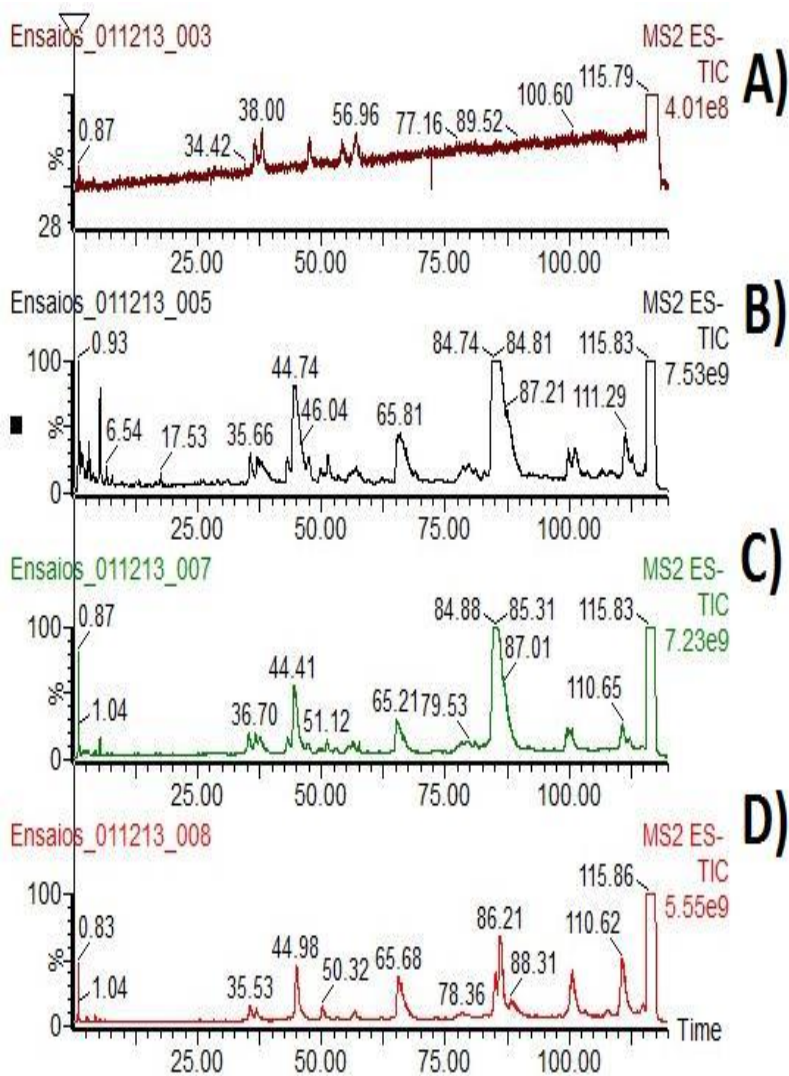
Ensaio\_011213\_003 1625 (54.258)

MS2 ES-  
7.37e6

**Figura 19.** Espectros de massa dos cromatogramas dos padrões de flavonoides: A) íon extraído 577 m/z de vitexina-2-o-rhamnoside em TR: 57 min, B) e C) íons extraídos 447,2 m/z de orientina TR: 36,5 min e isoorientina TR: 37,9 min, C) e E) íons extraídos 431,2 m/z de vitexina TR: 47,6 min e isovitexina TR: 54,1 min.

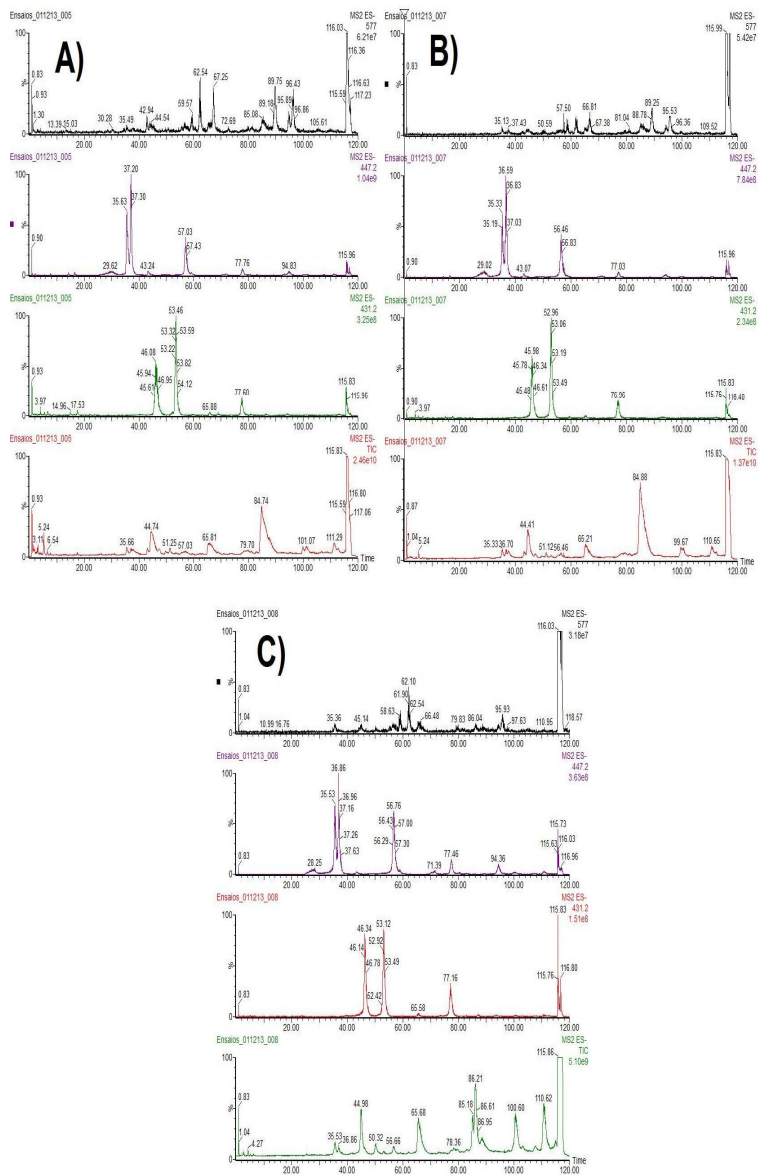
**Tabela 9.** Os compostos identificados por UPLC-MS/MS no modo negativo em comparação com padrão.

Flavonóides	Extrato identificado	Estrutura	MS [M6H] <sup>6</sup> (m/z)	t <sub>r</sub> (min)
Orientina	Extrato hidroalcoólico, butanólicos residual <sup>e</sup>		447.2	36.5
Isoorientina	Extrato hidroalcoólico, butanólicos residual <sup>e</sup>		447.2	37.9
Vitexina	Extrato hidroalcoólico, butanólicos residual <sup>e</sup>		431.2	47.6
Isovitexina	Extrato hidroalcoólico, butanólicos residual <sup>e</sup>		431.2	54.1
Vitexina-2- <i>o</i> -rhamnoside	-		577.0	57.0

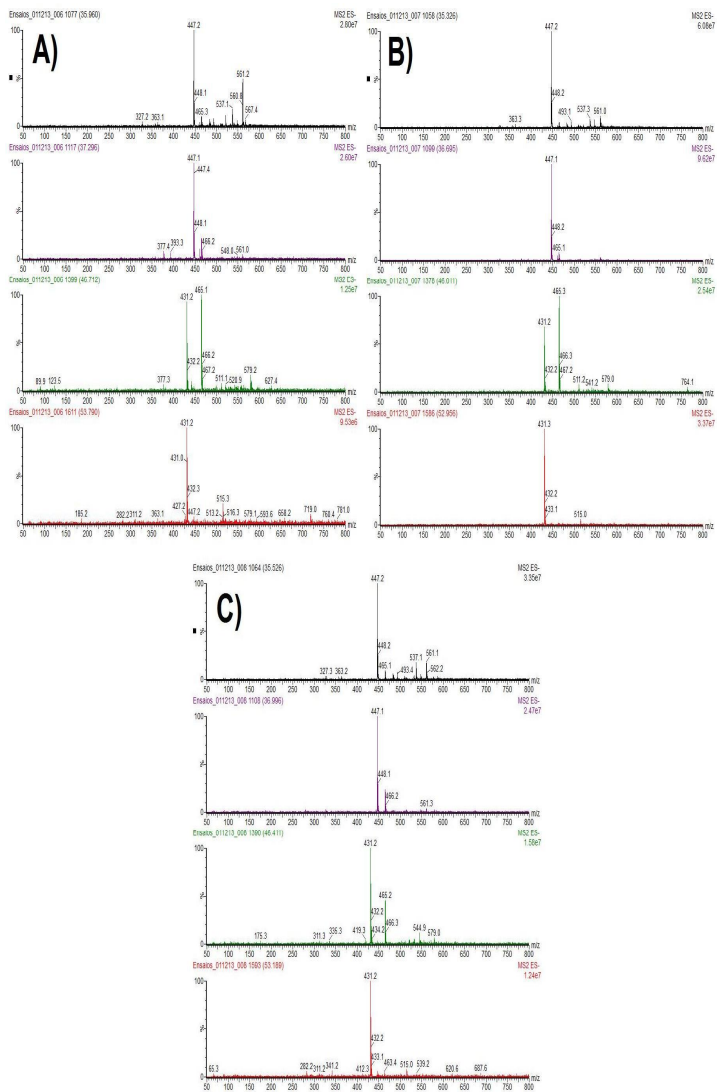


**Figura 20.** Cromatogramas de íons totais de: A) padrões de flavonoides B) extrato hidroalcoólico C) fração n-butanol e D) fração residual.





**Figura 21.** Cromatogramas de íons totais e cromatogramas de íons extraídos em 577,0 m/z de vitexina-2-o-rhamnoside, 447,2 m/z de orientina e isorientina, 431,2 m/z vitexina e isovitexina de A) extrato hidroalcoólico B) fração n-butanol e C) fração residual.



**Figura 22.** Espectro de massa das amostras A) extrato hidroalcoólico B) fração n-butanol e C) fração residual, picos atribuídos a vitexina-2-o-rhamnoside TR: 57 min, orientina TR: 36,5 min, isoorientina TR: 37,9 min, vitexina TR: 47,6 min e isovitexina TR: 54,1 min.

## 10. DISCUSSÃO

Apesar da quase inexistente disponibilidade no mercado de alternativas terapêuticas para o tratamento de doenças do sistema cardiovascular de origem natural, nos últimos anos são crescentes os estudos que avaliam o efeito das plantas para estas patologias. Entre estes estudos destacam-se aqueles que avaliam o efeito de plantas ricas em flavonóides, que apresentam efeitos importantes na diminuição da oxidação das lipoproteínas plasmáticas, diminuindo assim os níveis lipídicos e consequentemente, a formação de placas de aterosclerose.

Diferentes trabalhos descrevem o efeito antioxidante e hipolipemiantes de extratos, frações e compostos isolados obtidos a partir de plantas que possuem os flavonóides como constituintes majoritários, bem como os possíveis mecanismos de ação envolvidos nesses efeitos. Entre os principais efeitos cardioprotetores dos flavonóides, destacam-se: a redução nos níveis de lipídios sanguíneos através do aumento da sua metabolização ou ainda pelo aumento das taxas de degradação e redução na reabsorção intestinal, atividade anti-inflamatória e efeito vasodilatador (Sato *et. al.*, 2011; Mainini *et. al.*, 2013; Wang *et. al.*, 2013; Vázquez-Castilla *et. al.*, 2013; Farhat *et. al.*, 2014; Pirie *et. al.*, 2014).

Até o momento apenas um medicamento fitoterápico para o tratamento de doenças cardiovasculares, derivado da planta *Allium sativum*, teve o seu registro aprovado pela ANVISA, esse número pode estar relacionado a complexidade da investigação de eficácia e segurança para o tratamento destas patologias. Sendo assim, este trabalho teve como principal objetivo a avaliação do potencial terapêutico de plantas nativas com relatos da população de eficácia para o tratamento destas patologias. Para sua realização foram utilizados camundongos homozigotos com deficiência para receptores de lipoproteína de baixa densidade ó LDL (C57BL/6 LDLr KO). Os animais foram divididos em grupos e receberam dieta hipercolesterolêmica, ou dieta comercial, durante 30 dias, concomitantemente com o tratamento com diferentes doses dos extratos testados, veículo ou sinvastatina.

As plantas *Vitex montevidensis*, *Campomanesia xantocarpa* e *Allophylus edulis*, utilizadas no presente trabalho foram selecionadas por se originar a partir de biomas característicos da flora brasileira e ter reconhecida utilização a partir do conhecimento tradicional e popular.

Das três plantas avaliadas a *Vitex montevidensis* foi a que

apresentou efeitos mais significativos, já que o seu extrato hidroalcoólico foi capaz de reduzir significativamente os níveis de CT, TG e LDL-C. Assim sendo, foi então a planta selecionada para dar continuidade às investigações. Os extratos aquoso e etanólico foram desprovidos de efeitos.

A partir do fracionamento do extrato, tentou-se conhecer melhor a constituição química e os principais constituintes dessa planta, que foi tão pouco estudada. Esta etapa foi de extrema importância já que ela é determinante para garantir a padronização, controle de qualidade e a constância nos resultados da planta estudada.

O extrato hidroalcoólico da planta *Vitex montevidensis* foi particionando com solventes de diferentes polaridades dando origem as frações hexano, diclorometano, acetato de etila, n-butanol e residual. Todas as frações foram testadas, sendo que as frações n-butanol e residual demonstraram ser as frações ativas com efeitos consistentes aos encontrados com extrato HEVM. Esse resultado é indicativo de que os compostos ativos presentes na planta provavelmente são mais polares e estão concentrados na fração n-butanol. Neste experimento observamos ainda que os animais que receberam tratamento com a fração n-BFVM tiveram uma redução significativamente maior nos níveis lipídicos do que os animais que receberam o extrato HEVM, confirmando assim a verificação da potencialização do efeito após o fracionamento do extrato.

Assim como o nosso estudo, Brandt *et. al.*, (2009), demonstraram o potencial hipocolesterolêmico da *Vitex montevidensis*. Para tanto, foi realizada indução hiperlipidêmica usando um modelo que preconiza o emprego de propiltiuracil 1,25 mg/300g de peso e colesterol 200 mg/kg de peso, aplicados via oral em ratos machos. A administração do extrato bruto hidroalcoólico das folhas (300 mg/Kg) e aquoso (decoção a 1%) das cascas, também foi via oral (gavagem) enquanto a água de beber foi trocada pelo decocto. Outro estudo importante realizado com essa planta foi o de Zanatta *et. al.*, (2007), que avaliou o efeito do extrato bruto e das frações acetato de etila e n-butanol de *V. montevidensis* sobre a hiperglicemia em ratos diabéticos. Os extratos foram administrados nas doses de 400 e 800 mg/Kg via oral. O extrato bruto reduziu os níveis de glicose tanto nos ratos normais como nos diabéticos, já as frações acetato de etila e n-butanol reduziram a glicemia apenas nos ratos diabéticos, sendo que a fração acetato de etila apresentou efeito mais potente.

Pela primeira vez, no nosso conhecimento, análises químicas mostraram que os compostos presentes em maiores quantidades no

extrato ativo e fração foram flavonóides do tipo C-glicosídeo. Através da técnica de espectrometria de massa confirmamos que os principais picos cromatográficos encontrados são os flavonóides orientina, isorientina, vitexina e isovitexina.

Campos *et al.*, (2014), demonstraram o efeito antioxidante dos flavonóides presentes na planta *Cymbopogon citratus* e, através de análises por HPLC, foi encontrado que a isorientina é um dos principais flavonóides presentes na planta, além de sugerirem que as propriedades antioxidantes do capim-limão podem prevenir a disfunção endotelial associada a um desequilíbrio oxidativo promovido por diferentes estímulos. Já no estudo de Kesavan *et al.*, (2013) foi possível observar a ação da planta *Gentiana lutea* na prevenção do desenvolvimento da aterosclerose, já que a planta rica em flavonóides, entre eles a isovitexina, foi capaz de prevenir a proliferação de células musculares lisas da aorta.

Mahendran *et al.*, (2014), também investigaram o efeito da planta *Swertia corymbosa*, rica em isovitexina, no tratamento do diabetes. Concluiu-se que o extrato metanólico da planta possui atividade antidiabéticos, antioxidantes e ainda foi capaz de diminuir os níveis de CT, TG e LDL-C e aumentar os níveis de HDL-C.

Orrego *et al.*, (2009), avaliaram o efeito inibitório de três C-glicoflavonóides da planta *Cymbopogon citratus* sobre a oxidação do LDL-C humano. Este estudo demonstrou que a isorientina é um inibidor eficaz de oxidação de LDL-C *in vitro*, e como a oxidação de LDL-C é um evento chave na formação de lesões ateroscleróticas, o uso deste antioxidante natural pode ser benéfico para evitar ou atenuar a aterosclerose.

Mali *et al.*, (2012), avaliaram os efeitos anti-hipertensivos e cardioprotetores do fruto da planta *Lagenaria siceraria* e demonstraram redução na hipertensão induzida por L-NAME. Observaram também uma redução significativa nos níveis de CT e ausência de apoptose no coração dos animais tratados com o fruto da planta. Os autores sugeriram ainda que a atividade antioxidante dos flavonóides orientina, isorientina e vitexina presentes na planta parece ser a responsável por reduzir o dano induzido pelo tratamento com L-NAME e apresentar atividade anti-hipertensiva e cardioprotetora.

Relatos na literatura já haviam mostrado que altas quantidades de flavonóides e taninos condensados foram detectados na fração acetato de etila obtida a partir do extrato da folha da planta *Vitex megapotamica*, e que esses compostos podem estar correlacionados com a inibição da peroxidação lipídica. Existem relatos também de que

principais compostos quantificados por HPLC/DAD no extrato bruto e frações foram ácidos clorogênicos e rosmarínico (Brum *et al.*, 2013), ambos com efeitos antioxidantes comprovados quando avaliados em outras plantas (Sato *et al.*, 2011; Farhat *et al.*, 2014).

De acordo com Alice *et al.*, 1991, as folhas da *Vitex montevidensis* apresentam flavonóides em grande quantidade, além de esteróis/triterpenos e saponinas mas não apresentam alcalóides, cumarinas, antraquinonas ou taninos. Em outros estudos, Rimpler, (1969, 1972), isolou pterosterona, polipodin B, fitoecdisonas e iridóides. Estes compostos, com exceção dos iridóides, pertencem a classe dos triterpenóides, tal como as saponinas triterpênicas e fitosteróis e são sintetizados pelas plantas como uma defesa contra fitopatógenos. Estes compostos são réplicas exatas de hormônios usados por insetos e crustáceos no processo de ecdise (processo de mudança do exoesqueleto). Santos *et al.*, 2001, mostraram que espécies do gênero *Vitex* apresentam ecdisteroides, sendo a 20-hidroecdisona o mais comum.

Com o aumento do número de mortes causadas por doenças cardiovasculares, uma variedade de modelos animais foram desenvolvidos para imitar essa enfermidade humana e assim serem utilizadas em estudos de novos tratamentos para essas doenças. Dentre os modelos animais existentes os camundongos *knockout* tem recebido bastante destaque. Esses animais possuem um gene ou função eliminados (Carvalho e Lopes, 2006). Os camundongos *knockout* mais utilizados para o estudo de doenças cardiovasculares são os deficientes em ApoE (ApoE *-/-*), que apresenta elevada hipercolesterolemia e desenvolvimento espontâneo da aterosclerose e os camundongos deficientes em receptores de LDL (LDLr *-/-*) que apresentam aumento nos níveis lipídicos e formação de aterosclerose quando alimentados com dieta rica em gordura (Zadelaar *et al.*, 2007). Os camundongos *knockout* deficientes em receptores de LDL são atualmente os animais mais utilizados em estudos para investigação de novas opções terapêutica para o tratamento das dislipidemias e da aterosclerose, pois o desenvolvimento dos sintomas nestes animais são mais próximos aos observados nos humanos e eles respondem melhor as opções terapêuticas disponíveis hoje no mercado (Zadelaar *et al.*, 2007).

Assim como descrito na literatura, no nosso estudo, os camundongos C57/bl6 KO LDLr alimentados com uma dieta rica em gordura tiveram elevação dos níveis lipídicos e induzir a formação da placa de aterosclerose próximo as válvulas semi-lunares. Os níveis de CT e de LDL-C aumentaram substancialmente, mas, diferente de alguns

tipos de dislipidemias humana, os níveis de HDL-C e TG permaneceram relativamente inalterados. Curiosamente a redução dos níveis de CT e LDL-C causadas pelo tratamento com extrato hidroalcoólico e fração e n-butanol não foi associada a variações nos níveis de HDL-C. Isso nos indica que o mecanismo de ação dos compostos da planta responsável por esse efeito parece ser diferente de estatinas, que mesmo em diferentes graus não impactam diretamente nos níveis de HDL-C (Saini, 2005; Lewis, 2009). As lesões histológicas induzidas pela dislipidemia também foram significativamente reduzidas, uma consequência provável da redução no índice aterosclerótico. Este índice está associado à deposição de células espumosas, placas, lipídios ou ácidos graxos no coração, artérias coronárias, aorta, rins e fígado (Balogun e Adebayo, 2007). Assim, a prevenção de lesões ateroscleróticas parece estar diretamente relacionada com a redução de lipídios plasmáticos induzidos pelo extrato e frações.

Os resultados descritos aqui evidenciaram outro achado interessante. Conforme descrito, os níveis de triglicerídeos não foram alterados pela dieta rica em gordura. No entanto, o extrato hidroalcoólico e as frações n-butanol e residual causaram consistente redução dos níveis dos TG plasmáticos trazendo seus índices a valores abaixo dos níveis dos animais que não receberam a dieta rica em gordura. Esse resultado é importante, pois de todos os compostos farmacológicos disponíveis para o tratamento de dislipidemias, a classe menos eficaz e mais propensa a induzir efeitos secundários é aquela usada para reduzir os níveis de triglicerídeos, a classe dos fibratos. Estes compostos apresentam efeitos colaterais importantes, entre eles a lesão muscular que pode ser potencializada pela associação dos fibratos com estatinas. Levando-se em conta que as estatinas são hoje o principal tratamento para redução do LDL-colesterol, e que apresenta efeito discreto na redução dos níveis de triglicerídeos e ainda possui o risco de causar importantes efeitos adversos quando administrados em associação com fibratos, uma nova alternativa de tratamento capaz de reduzir os níveis de CT, LDL-C e ainda de TG se torna bastante interessante (Lewis, 2009; Michael *et. al.*, 2014).

Infelizmente não foi possível investigar o mecanismo de ação do extrato ativo e frações envolvidas nos efeitos farmacológicos encontrados. No entanto, sabe-se que os flavonóides são potentes inibidores da oxidação de LDL-C *in vitro*, *ex vivo*, reduzem a susceptibilidade do LDL-C à oxidação, impedem a destruição de antioxidantes endógenos e inibem a oxidação de LDL-C (Vaya *et. al.*, 2003; Quiñones, Miguel e Aleixandre, 2013). Além disso, os

flavonóides aumentam os níveis da paraoxonase 1 (PON1) no soro, uma lipolactonase associada a HDL-C. A PON1 tem a capacidade de proteger o LDL-C e o HDL-C de oxidação, diminuir o estado oxidativo de macrófagos, estimular o efluxo de colesterol a partir de macrófagos, diminuir o estado oxidativo nas lesões ateroscleróticas e atenuar o desenvolvimento da aterosclerose (Vaya *et al.*, 2003; Khateeb *et al.*, 2010; Mehdi e Rizvi, 2012; Aharoni, Aviram e Fuhrman, 2013).

Apesar de não ter sido investigado o mecanismo de ação da planta, a identificação química realizada no presente trabalho mostrou a presença de flavonóides do tipo C-glicosídeo que têm sido fortemente associados com a diminuição do risco de doenças cardiovasculares, principalmente através dos efeitos vasodilatador, antitrombótico, anti-inflamatório, anti-apoptótico, efeitos hipolipemiantes e antiaterogênico (Quiñones *et al.*, 2013), tornando-os efetores prováveis os efeitos benéficos do extrato e frações da planta *Vitex montevidensis*.

Embora preliminares e restritos, os resultados obtidos durante a realização do estudo hipocrático nos levam a concluir que os extratos e frações da planta *Vitex montevidensis* nas doses avaliadas não apresentaram indícios de efeitos tóxicos agudos, uma vez que os resultados mostraram que não houve morte de nenhum animal, não ocorreram diferenças significativas nas análises de aspectos morfológicos e peso dos órgãos avaliados, além da ausência de sinais clínicos relevantes. Brandt *et al.*, 2008 também avaliaram o efeito toxicológico do extrato hidroalcoólico das folhas e da decocção da casca da planta *Vitex megapotamica*, verificando que não houve lesão cardíaca, hepática ou renal pelo extrato e decocção utilizados nas avaliações toxicológicas preliminares.

Como descrito anteriormente, as três plantas selecionadas para este estudo foram escolhidas devido a sua tradicional utilização pela população brasileira para o tratamento de doenças cardiovasculares. No entanto, apenas a planta *Vitex montevidensis* apresentou resultados suficientes para subsidiar a continuidade das investigações. A ineficácia das plantas *Campomanesia xantocarpa* e *Alophylus edulis* no modelo experimental utilizado pode ter ocorrido devido a metodologia escolhida ou ainda pelo fato de que muitas vezes plantas são utilizadas sem evidências suficientes para garantir que o efeito descrito seja efetivamente alcançado.

Os resultados verificados nos testes farmacológicos e toxicológicos demonstraram a eficácia e segurança da planta *Vitex montevidensis* no tratamento da hipercolesterolemia e da aterosclerose no modelo animal utilizado. Estes resultados, compilados com os



resultados dos estudos fitoquímicos que evidenciaram a presença de quatro glicoflavonóides na planta, sugerem que provavelmente os flavonóides são os responsáveis pelo efeito encontrado. Uma vasta quantidade de artigos científicos corrobora com esses resultados, ao mostrarem os efeitos dos flavonóides para o tratamento dessas patologias, evidenciando o potencial farmacológico da planta avaliada e nos direciona para vários outros tipos de análises e experimentos que serão necessários para continuidade da investigação do potencial terapêutico da planta tais como estudos clínicos, identificação de marcadores e do mecanismo de ação.

Por tratar-se de uma tentativa de desenvolvimento de produtos obtidos de espécies nativas, este projeto tem impactos positivos sobre a preservação da biodiversidade, aumentando a importância da preservação de remanescentes florestais onde estas espécies nativas são encontradas. A valorização econômica dos biomas naturais repercute na sociedade que passa a se preocupar com sua preservação. O desenvolvimento de medicamentos a partir de espécies nativas e adaptadas poderá incrementar a cadeia produtiva de diversas plantas medicinais criando alternativa de renda para agricultores, estimulando a preservação de recursos genéticos até então inexplorados e desenvolvendo tecnologia própria na produção de medicamentos (Brasil, 2006).

O estudo de um novo medicamento trará a vantagem de uma nova opção terapêutica, com ausência ou diminuição dos principais efeitos colaterais das estatinas (cefaléia, flatulência, dispepsia, dores musculares, prurido e exantema cutâneo), que formam a principal família de fármacos hipocolesterolêmicos. Um novo produto fitoterápico com eficácia e segurança comprovadas, padronização do teor de ativos e mecanismo de ação definidos trará a confiança necessária na sua utilização pelos profissionais prescritores. Este fato não ocorre na atualidade com os produtos existentes no mercado que transitam entre suplementos alimentares e fitoterápicos com comprovação baseada apenas em informações de uso tradicional. A falta de produtos validados e com teor de ativos definido é uma das principais causas da falta de adesão dos profissionais de saúde na prescrição de fitoterápicos e tem dificultado o apoio dos órgãos reguladores na expansão deste mercado.

A descoberta de um novo medicamento seria de extrema importância para saúde pública, já que o aumento dos níveis de colesterol está diretamente relacionado nas causas de diversas doenças responsáveis por uma grande quantidade das mortes no Brasil.



## 11. CONCLUSÕES

- A eficácia da planta *Vitex montevidensis*, que é utilizada popularmente para o tratamento de doenças cardiovasculares, foi confirmada nos modelos experimentais utilizados;
- Os extratos brutos das plantas *Campomanesia xantocarpa* e *Alophylus edulis* não apresentaram efeito nos testes de eficácia para o tratamento do colesterol e da aterosclerose;
- O extrato hidroalcoólico e as frações n-butanol e residual da planta *Vitex montevidensis* foram eficazes na redução os níveis de CT, TG e LDL-C no plasma de animais tratados com dieta hipercolesterolêmica;
- A formação de placa de aterosclerose na aorta de camundongos dislipidêmicos foi substancialmente reduzida nos animais tratados com extrato hidroalcoólico da planta *Vitex montevidensis*;
- A planta *Vitex montevidensis*, nas doses avaliadas, não apresentou indícios de toxicologia aguda, já que não houve sinais clínicos relevantes ou morte de animais durante a realização do estudo hipocrático;
- Análises fitoquímicas indicaram que os maiores constituintes dos extratos ativos são os flavonóides orientina, isoorientina, vitexina e isovitexina.



## 12. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHARONI, S.; AVIRAM, M.; FUHRMAN, B. Paraoxonase 1 (PON1) reduces macrophage inflammatory responses. **Atherosclerosis**, v. 228, n. 2, p. 353ó61, jun. 2013.

ALICE, C. B.; VARGAS, V. M. F.; SILVA, G. A. A. B.; DE SIQUEIRA, N. C. S.; SCHAPOVAL, E. E. S.; GLEYE, J.; HENRIQUES, J. A. P.; HENRIQUES, A. T. Screening of plants used in south Brazilian folk medicine. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 35, n. 2, p. 165ó171, dez. 1991.

ALVES, N. D. C.; SANTOS, T. C.; RODRIGUES, C. R.; CASTRO, H. C.; LIRA, L. M.; DOMELAS, C. B. Avaliação da equação técnica de indústrias de medicamentos fitoterápicos e oficinais do Estado do Rio de Janeiro. **Revista Ciências & Saúde Coletiva**, v. 13, p. 745ó53, 2008.

AZAMBUJA, M. I. R.; FOPPA, M.; MARANHÃO, M. F. DE C.; ACHUTTI, A. C. Economic burden of severe cardiovascular diseases in Brazil: an estimate based on secondary data. **Arquivos brasileiros de cardiologia**, v. 91, n. 3, p. 148ó55, 163ó71, set. 2008.

BALOGUN. Effect of ethanolic extract of Daniella Oliveri leaves on some cardiovascular indices in rats. **Pharmacognosy Magazine**, v. 3, n. 9, p. 16, 1 jan. 2007.

BALUNAS, M. J.; KINGHORN, A. D. Drug discovery from medicinal plants. **Life sciences**, v. 78, n. 5, p. 431ó41, 22 dez. 2005.

BARBOSA-FILHO, J. M.; MARTINS, V. K. M.; RABELO, L. A.; MOURA, M. D.; SILVA, M. S.; CUNHA, E. V. L.; SOUZA, M. F. V.; ALMEIDA, R. N.; MEDEIROS, I. A. Natural products inhibitors of the angiotensin converting enzyme (ACE): a review between 1980 - 2000. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, n. 3, p. 421ó446, set. 2006.

BARREIRO, E. J.; FRAGA, C. A. M. **Química Medicinal: as bases moleculares da ação dos fármacos**. Porto Alegre: ArtMed Editora

Ltda, 2001.

BEECHER, G. R. Flavonoids in foods. In: PACKER, L.; HIRAMATSU, M.; YOSHIKAWA, T. (Eds.). **Antioxidant food supplements in human health**. San Diego: Academic Press, 1999. p. 2696281.

BIAVATTI, M. W.; FARIAS, C.; CURTIUS, F.; BRASIL, L. M.; HORT, S.; SCHUSTER, L.; LEITE, S. N.; PRADO, S. R. T. Preliminary studies on *Campomanesia xanthocarpa* (Berg.) and *Cuphea carthagenensis* (Jacq.) J.F. Macbr. aqueous extract: weight control and biochemical parameters. **Journal of ethnopharmacology**, v. 93, n. 2-3, p. 38569, ago. 2004.

BIONDI, D.; LEAL, L.; COBALCHINI, J. L. Tratamentos Silviculturais em Mudas de *Allophylus edulis* (A. St.-Hil., Cambess. & A. Juss.) Radlk. Para arborização de ruas. **Floresta**, v. 37, n. 3, 2007.

BORGHI-SILVA, A.; MENDES, R. G.; TRIMER, R.; CIPRIANO, G. Current Trends in Reducing Cardiovascular Disease Risk Factors From Around the World: Focus on Cardiac Rehabilitation in Brazil. **Progress in Cardiovascular Diseases**, out. 2013.

BRANDÃO, M. G. L.; COSENZA, G. P.; MOREIRA, R. A.; MONTE-MOR, R. L. M. Medicinal plants and other botanical products from the Brazilian Official Pharmacopoeia. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, n. 3, p. 4086420, set. 2006.

BRANDÃO, M. P.; PIMENTEL, F. L.; SILVA, C. C.; CARDOSO, M. F. Risk factors for cardiovascular disease in a Portuguese university population. **Portuguese journal of cardiology : an official journal of the Portuguese Society of Cardiology**, v. 27, n. 1, p. 7625, jan. 2008.

BRANDT, A. P.; OLIVEIRA, L. F. S. DE; FERNANDES, F. B.; ALBA, J. Avaliação in vivo do efeito hipocolesterolêmico e toxicológico preliminar do extrato bruto hidroalcoólico e decocção da *Vitex megapotamica* (Spreng) Moldenke (*V. montevidensis* Cham.). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, n. 2a, p. 3886393, jun. 2009.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Formulário de Fitoterápicos da Farmacopéia Brasileira/Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília: Anvisa, 2011.126p.

BRASIL. Congresso Nacional. Portaria 22 de 30 de outubro de 1967. Estabelece normas para o emprego de preparações fitoterápicas, 1967.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de vigilância Sanitária. RDC 17 de 24 de fevereiro de 2000. Aprova o regulamento técnico de medicamentos fitoterápicos junto ao sistema único de Saúde, 2000.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de vigilância Sanitária. RDC 23 de 6 de dezembro de 1999. Dispões sobre a isenção de registro de produtos, 1999.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de vigilância Sanitária. RE 89 de 16 de março de 2004. Dispões sobre a lista de registros simplificado de fitoterápicos, 2004.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de vigilância Sanitária. RDC 210 de 04 de agosto de 2003. Determina a todos os estabelecimentos fabricantes de medicamentos, o cumprimento das diretrizes estabelecidas no Regulamento técnico das boas práticas para fabricação de medicamentos, 2003.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de vigilância Sanitária. CP31 de 26 de maio de 2009. Proposta de Resolução que dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos junto a ANVISA, 2009.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria da vigilância Sanitária. Portaria 06 de 31 de janeiro de 1995. Institui e normatiza o regulamento de produtos fitoterápicos junto à secretaria de Vigilância Sanitária, 1995.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria da vigilância Sanitária. Portaria 1029 de 21 de dezembro de 1998. Institui a proposta de regulamento técnico sanitário para produtos fitoterápicos, 1998.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. Práticas integrativas e complementares: plantas medicinais e fitoterapia na Atenção Básica/Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. Brasília: Ministério da Saúde, 2012.156 p.: il. ó (Série A. Normas e Manuais Técnicos) (Cadernos de Atenção Básica ; n. 31).

BRASIL. Ministério da Saúde RENISUS. Relação nacional de plantas medicinais de interesse ao SUS. Espécies vegetais. Disponível em: <<http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/RENISUS.pdf>>. Acesso em:15mai.2011.

BRASIL. Presidência da Republica. Decreto 5813 de 22 de junho de 2006. Aprova a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos e dá outras providências, 2006.

CALIXTO, J. B. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents). **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 33, n. 2, p. 1796189, fev. 2000.

CALIXTO, J. B. Medicamentos Fitoterápicos. In: YUNES, R. A.; CALIXTO, J. B. (Eds.). **Plantas medicinais sob a ótica da química medicinal moderna: métodos de estudo, fitoterápicos e fitofármacos, biotecnologia, patente**. Chapecó: Argos Editora Universitária, 2001. p. 2976315.

CALIXTO, J. B.; SIQUEIRA JUNIOR, J. M. **Desenvolvimento de Medicamentos no Brasil: Desafios***Gazeta Médica da Bahia*, 10 jul. 2008. Disponível em: <<http://www.gmbahia.ufba.br/index.php/gmbahia/article/view/269>>. Acesso em: 15 mar. 2014.

CAMPOS, J.; SCHMEDA-HIRSCHMANN, G; LEIVA, E.; GUZMÁN, L.; ORREGO, R.; FERNÁNDEZ, P.; GONZÁLEZ, M.; RADOJKOVIC, C.; ZUÑIGA, F. A.; LAMPERTI, L.; PASTENE, E.; AGUAYO, C. Lemon grass (*Cymbopogon citratus* (D.C) Stapf) polyphenols protect human umbilical vein endothelial cell (HUVECs) from oxidative damage induced by high glucose, hydrogen peroxide and



oxidised low-density lipoprotein. **Food chemistry**, v. 151, p. 175681, 15 maio 2014.

CARVALHO, A. C. B.; SANTOS, L. A.; SILVEIRA, D. La regulación de los medicamentos herbarios en Brasil. **Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromaticas**, v. 8, n. 1, p. 7611, 2008.

CARVALHO, T. H. F.; LOPES, O. U. O emprego de camundongo geneticamente modificado como modelo de estudo para doenças cardiovasculares. **Medicina (Ribeirao Preto. Online)**, v. 39, n. 1, p. 1106116, 30 mar. 2006.

CHACRA, A. P. M.; DIAMENT, J.; FORTI, N. A. Classificação das dislipidemias. **Revista da Sociedade de Cardiologia do Estado de São Paulo**, v. 15, n. 6, p. 4656469, 2005.

COOK, N. Flavonoids-Chemistry, metabolism, cardioprotective effects, and dietary sources. **Journal of the European Ceramic Society**, v. 7, n. 2, p. 66676, fev. 1996.

CUNNINGHAM, A. B. **African medicinal plants: setting priorities at the interface between conservation and primary healthcare. People and plants working paper**. Paris: UNESCO, v. 1p. 1649, 1993.

DE BRUM, T. F.; ZADRA, M.; PIANA, M.; BOLIGON, A. A.; FRÖHLICH, J. K.; DE FREITAS, R. B.; STEFANELLO, S. T.; FROEDER, A. L. F.; BELKE, B. V.; NUNES, L. T.; DA SILVA JESUS, R.; MACHADO, M. M.; DA ROCHA, J. B. T.; SOARES, F. A. A.; ATHAYDE, M. L. HPLC analysis of phenolics compounds and antioxidant capacity of leaves of *Vitex megapotamica* (Sprengel) Moldenke. **Molecules (Basel, Switzerland)**, v. 18, n. 7, p. 8342657, jan. 2013.

DÍAZ, M.; GONZÁLEZ, A.; CASTRO-GAMBOA, I.; GONZALEZ, D.; ROSSINI, C. First record of L-quebrachitol in *Allophylus edulis* (Sapindaceae). **Carbohydrate research**, v. 343, n. 15, p. 26996700, 13 out. 2008.

DOS SANTOS, T. C.; DELLE MONACHE, F.; LEITÃO, S. G. Ecdysteroids from two Brazilian *Vitex* species. **Fitoterapia**, v. 72, n. 3,

p. 215620, mar. 2001.

DURKAR, A. M.; PATIL, R. R.; NAIK, S. R. Hypolipidemic and antioxidant activity of ethanolic extract of *Symplocos racemosa* Roxb. in hyperlipidemic rats: an evidence of participation of oxidative stress in hyperlipidemia. **Indian journal of experimental biology**, v. 52, n. 1, p. 36645, jan. 2014.

ESALQ-USP. **Tarumã**. Disponível em: <<http://www.esalq.usp.br/trilhas/fruti/fr01.htm>>. Acesso em: 14 dez. 2013.

ESTERBAUER, H.; GEBICKI, J.; PUHL, H.; JÜRGENS, G. The role of lipid peroxidation and antioxidants in oxidative modification of LDL. **Free radical biology & medicine**, v. 13, n. 4, p. 341690, out. 1992.

FABRICANT, D. S.; FARNSWORTH, N. R. The value of plants used in traditional medicine for drug discovery. **Environmental health perspectives**, v. 109 Suppl, p. 69675, mar. 2001.

FARHAT, M. BEN; CHAOUCH-HAMADA, R.; SOTOMAYOR, J. A.; LANDOULSI, A.; JORDÁN, M. J. Antioxidant potential of *Salvia officinalis* L. residues as affected by the harvesting time. **Industrial Crops and Products**, v. 54, p. 78685, mar. 2014.

FEBRAFARMA. **Fitoterápico atrai investimentos**. Disponível em: <<http://www.febrafarma.org.br/areas.php?area=pu&secao=38&modulo=materias>>. Acesso em: 10 jan. 2014.

FERRO, A. F. P.; BONACELLI, M. B. M.; ASSAD, A. L. D. Oportunidades tecnológicas e estratégias concorrenciais de gestão ambiental: o uso sustentável da biodiversidade brasileira. **Gestão & Produção**, v. 13, n. 3, p. 4896501, dez. 2006.

FONSECA, F. A. H. Farmacocinética das estatinas. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 85 suppl 5, p. 9614, 2005.

FUNARI, C. S.; FERRO, V. O. Uso ético da biodiversidade brasileira: necessidade e oportunidade. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 15, n. 2, p. 1786182, jun. 2005.

GASTPAR, M. Hypericum extract WS ® 5570 for depression--an overview. **International journal of psychiatry in clinical practice**, v. 17 Suppl 1, p. 167, 23 nov. 2013.

HARBORNE J.B; MABRY T.J; MABRY H. **The flavonoids**. London: Chapman and Hall, 1975. p. 5639

HAVSTEEN, B. Flavonoids, a class of natural products of high pharmacological potency. **Biochemical pharmacology**, v. 32, n. 7, p. 114168, 1 abr. 1983.

HOLLMAN, P. C.; KATAN, M. B. Dietary flavonoids: intake, health effects and bioavailability. **Food and chemical toxicology: an international journal published for the British Industrial Biological Research Association**, v. 37, n. 9-10, p. 937642, 1999.

IMS HEALTH. Retail drug monitor. Disponível em <[www.imshealth.com](http://www.imshealth.com)>. Acesso em 30 setembro de 2013.

INSULL, W. The pathology of atherosclerosis: plaque development and plaque responses to medical treatment. **The American journal of medicine**, v. 122, n. 1 Suppl, p. S36S14, jan. 2009.

JANG, D. S.; PARK, E. J.; KANG, Y.-H.; HAWTHORNE, M. E.; VIGO, J. S.; GRAHAM, J. G.; CABIESES, F.; FONG, H. H. S.; MEHTA, R. G.; PEZZUTO, J. M.; KINGHORN, A. D. Potential cancer chemopreventive flavonoids from the stems of *Tephrosia toxicaria*. **Journal of natural products**, v. 66, n. 9, p. 1166670, set. 2003.

JU WIAK, S.; WÓJCICKI, J.; MOKRZYCKI, K.; MARCHLEWICZ, M.; BIAŁECKA, M.; WENDA-RÓZEWICKA, L.; GAWRO SKA-SZKLARZ, B.; DRO DZIK, M. Effect of quercetin on experimental hyperlipidemia and atherosclerosis in rabbits. **Pharmacological reports : PR**, v. 57, n. 5, p. 60469, 2005.

KESAVAN, R.; POTUNURU, U. R.; NASTASIJEVIĆ, B.; T, A.; JOKSIĆ, G.; DIXIT, M. Inhibition of vascular smooth muscle cell proliferation by *Gentiana lutea* root extracts. **PloS one**, v. 8, n. 4, p. e61393, jan. 2013.

KHATEEB, J.; GANTMAN, A.; KREITENBERG, A. J.; AVIRAM, M.; FUHRMAN, B. Paraoxonase 1 (PON1) expression in hepatocytes is

upregulated by pomegranate polyphenols: a role for PPAR-gamma pathway. **Atherosclerosis**, v. 208, n. 1, p. 119625, jan. 2010.

KIRK, E. A.; SUTHERLAND, P.; WANG, S. A.; CHAIT, A.; LEBOEUF, R. C. Dietary isoflavones reduce plasma cholesterol and atherosclerosis in C57BL/6 mice but not LDL receptor-deficient mice. **The Journal of nutrition**, v. 128, n. 6, p. 95469, jun. 1998.

KLAFKE, J. Z.; DA SILVA, M. A.; PANIGAS, T. F.; BELLI, K. C.; DE OLIVEIRA, M. F.; BARICHELLO, M. M.; RIGO, F. K.; ROSSATO, M. F.; SOARES DOS SANTOS, A. R.; PIZZOLATTI, M. G.; FERREIRA, J.; VIECILI, P. R. N. Effects of *Campomanesia xanthocarpa* on biochemical, hematological and oxidative stress parameters in hypercholesterolemic patients. **Journal of ethnopharmacology**, v. 127, n. 2, p. 2996305, 3 fev. 2010.

KLAFKE, J. Z. **Efeito da *Campomanesia xanthocarpa* em parâmetros bioquímicos, hematológicos e de estresse oxidativo na tratamento de pacientes hipercolesterolêmicos**. 2009. 92 (Mestrado). Centro de Ciências Naturais e Exatas, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria. 2009.

KLAUBERG, C.; COSTA, N. C. F.; SILVA, A. C.; HIGUCHI, P. **Ecologia de espécie AE em um remanescente de floresta ombrófila mista montana, Campos Novos, SC, Brasil**. IX Congresso de Ecologia do Brasil. **Anais...**São Lourenço-MG: set. 2009.

KO, R. J. Causes, epidemiology, and clinical evaluation of suspected herbal poisoning. **Journal of toxicology. Clinical toxicology**, v. 37, n. 6, p. 6976708, jan. 1999.

KONATÉ, K.; YOMALAN, K.; SYTAR, O.; ZERBO, P.; BRESTIC, M.; PATRICK, V. D.; GAGNIUC, P.; BARRO, N. Free Radicals Scavenging Capacity, Antidiabetic and Antihypertensive Activities of Flavonoid-Rich Fractions from Leaves of *Trichilia emetica* and *Opilia amentacea* in an Animal Model of Type 2 Diabetes Mellitus. **Evidence-based complementary and alternative medicine : eCAM**, v. 2014, p. 867075, jan. 2014.

LASLETT, L. J.; ALAGONA, P.; CLARK, B. A.; DROZDA, J. P.; SALDIVAR, F.; WILSON, S. R.; POE, C.; HART, M. The worldwide

environment of cardiovascular disease: prevalence, diagnosis, therapy, and policy issues: a report from the American College of Cardiology. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 60, n. 25 Suppl, p. S1649, 25 dez. 2012.

LEWIS, S. J. Prevention and treatment of atherosclerosis: a practitioner's guide for 2008. **The American journal of medicine**, v. 122, n. 1 Suppl, p. S38650, jan. 2009.

LIBBY, P. Inflammation in atherosclerosis. **Nature**, v. 420, n. 6917, p. 868674, 19 jan. 2002.

LIBBY, P.; RIDKER, P. M.; HANSSON, G. K. Progress and challenges in translating the biology of atherosclerosis. **Nature**, v. 473, n. 7347, p. 317625, 19 maio 2011.

LIPP, F. J. The efficacy, history, and politics of medicinal plants. **Alternative therapies in health and medicine**, v. 2, n. 4, p. 36641, jul. 1996.

LUSIS, A. J. Atherosclerosis. **Nature**, v. 407, n. 6801, p. 233641, 14 set. 2000.

MACDONALD, I. A.; MADER, J. A.; BUSSARD. The role of rutin and quercetin in stimulating flavonol glycosidase activity by cultured cell-free microbial preparation of human fezes and saliva. **Mutation Research**, v. 122, p. 956102, 1983.

MAHENDRAN, G.; THAMOTHARAN, G.; SENGOTTUVELU, S.; BAI, V. N. Anti-diabetic activity of *Swertia corymbosa* (Griseb.) Wight ex C.B. Clarke aerial parts extract in streptozotocin induced diabetic rats. **Journal of ethnopharmacology**, v. 151, n. 3, p. 1175683, 12 fev. 2014.

MAININI, G.; TORELLA, M.; DI DONNA, M. C.; ESPOSITO, E.; ERCOLANO, S.; CORREA, R.; CUCINELLA, G.; STRADELLA, L.; LUISI, A.; BASSO, A.; CERRETO, F. V.; CICATIELLO, R.; MATTEO, M.; DE FRANCISCIS, P. Nonhormonal management of postmenopausal women: effects of a red clover based isoflavones supplementation on climacteric syndrome and cardiovascular risk serum profile. **Clinical and experimental obstetrics & gynecology**, v. 40, n.

3, p. 337641, jan. 2013.

MALI, V. R.; MOHAN, V.; BODHANKAR, S. L. Antihypertensive and cardioprotective effects of the *Lagenaria siceraria* fruit in NG-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME) induced hypertensive rats. **Pharmaceutical biology**, v. 50, n. 11, p. 1428635, nov. 2012.

MARKHAM, K. **Techniques of Flavonoid Identification**. New York: Academic Pr, p. 113. 1982.

MARKMAN, B. E. O.; BACCHI, E. M.; KATO, E. T. M. Antiulcerogenic effects of *Campomanesia xanthocarpa*. **Journal of ethnopharmacology**, v. 94, n. 1, p. 5567, set. 2004.

MEHDI, M. M.; RIZVI, S. I. Human plasma paraoxonase 1 (PON1) arylesterase activity during aging: correlation with susceptibility of LDL oxidation. **Archives of medical research**, v. 43, n. 6, p. 438643, 1 ago. 2012.

MELO, E. C. P.; TRAVASSOS, C.; CARVALHO, M. S. Qualidade dos dados sobre óbitos por infarto agudo do miocárdio, Rio de Janeiro. **Revista de Saúde Pública**, v. 38, n. 3, p. 3856391, jun. 2004.

MUSSI, F. C.; PASSOS, L. C. S.; MENEZES, A. A. DE; CARAMELLI, B. Entraves no acesso à atenção médica: vivências de pessoas com infarto agudo do miocárdio. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 53, n. 3, p. 2346239, jun. 2007.

NODARI, R. O.; GUERRA, M. P. Biodiversidade: aspectos biológicos, geográficos, legais e éticos. In: SIMÕES, C. M. O. *et. al.*, (Eds.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 2<sup>a</sup>. ed. Florianópolis: Editora da UFSC, p. 11624. 2000.

OMS. Estratégia da OMS sobre medicina tradicional 2002-2005. **Organização Mundial da Saúde**, 2002.

OMS. WHO Guidelines for Assessing Quality of Herbal Medicines with Reference to Contaminants and Residues. **Organização Mundial da Saúde**, 2007.

PAIGEN, B.; MORROW, A.; HOLMES, P. A.; MITCHELL, D.; WILLIAMS, R. A. Quantitative assessment of atherosclerotic lesions in

mice. **Atherosclerosis**, v. 68, n. 3, p. 2316240, dez. 1987.

PIRIE, A. D.; DAVIES, N. W.; AHUJA, K. D. K.; ADAMS, M. J.; SHING, C. M.; NARKOWICZ, C.; JACOBSON, G. A.; GERAGHTY, D. P. Hypolipidaemic effect of crude extract from *Carpobrotus rossii* (pigface) in healthy rats. **Food and chemical toxicology: an international journal published for the British Industrial Biological Research Association**, v. 66C, p. 1346139, 27 jan. 2014.

PLUTZKY, J. The vascular biology of atherosclerosis. **The American journal of medicine**, v. 115 Suppl , p. 55S661S, 8 dez. 2003.

QUIÑONES, M.; MIGUEL, M.; ALEIXANDRE, A. [The polyphenols, naturally occurring compounds with beneficial effects on cardiovascular disease]. **Nutrición hospitalaria**, v. 27, n. 1, p. 76689, 2012.

RIMPLER, H. Pterosteron, polypodin B und neues ecdysonriges steroid aus *Vitex megapotamica*. **Tetrahedron Letters** , v. 5, p. 3296333, 1969.

RIMPLER, H. Phytoecdysones and iridoids from *Vitex megapotamica*. **Archiv der Pharmazie**, v. 305, n. 10, p. 746651, out. 1972.

ROBBERS, J. E.; SPEEDIE, M. K.; TYLER, V. E. **Pharmacognosy and Pharmacobiotechnology**. [s.l.] Williams & Wilkins, p. 1614, 1996.

RODRIGUES, A. G. **Fitoterapia no Sistema Único de Saúde** , V Jornada Catarinense e I Jornada Internacional de Plantas Mediciniais. **Anais...**Joinville: 2006.

RUSSO, E.; SCICCHITANO, F.; WHALLEY, B. J.; MAZZITELLO, C.; CIRIACO, M.; ESPOSITO, S.; PATANÈ, M.; UPTON, R.; PUGLIESE, M.; CHIMIRRI, S.; MAMMÌ, M.; PALLERIA, C.; DE SARRO, G. *Hypericum perforatum*: Pharmacokinetic, Mechanism of Action, Tolerability, and Clinical Drug-Drug Interactions. **Phytotherapy research**, 30 jul. 2013.

SAINI, H. K.; XU, Y.-J.; ARNEJA, A. S.; TAPPIA, P. S.; DHALLA, N. S. Pharmacological basis of different targets for the treatment of atherosclerosis. **Journal of cellular and molecular medicine**, v. 9, n. 4, p. 818639, 2005.

SANGKITIKOMOL, W.; ROCEJANASAROJ, A.; TENCOMNAO, T. Effect of *Moringa oleifera* on advanced glycation end-product formation and lipid metabolism gene expression in HepG2 cells. **Genetics and molecular research : GMR**, v. 13, n. 1, p. 723635, jan. 2014.

SANTIAGO, L. M.; SÁ, O.; DE CARVALHO, I. M.; ROCHA, M. DA G.; PALMEIRO, L.; MESQUITA, E. P.; JORGE, S. Hypercholesterolemia and associated cardiovascular risk factors in young children and adolescents. **Portuguese journal of cardiology : an official journal of the Portuguese Society of Cardiology**, v. 21, n. 3, p. 301613, mar. 2002.

SATO, Y.; ITAGAKI, S.; KUROKAWA, T.; OGURA, J.; KOBAYASHI, M.; HIRANO, T.; SUGAWARA, M.; ISEKI, K. In vitro and in vivo antioxidant properties of chlorogenic acid and caffeic acid. **International journal of pharmaceutics**, v. 403, n. 1-2, p. 13668, 17 jan. 2011.

SNEADER, W. The discovery of aspirin: a reappraisal. **BMJ (Clinical research ed.)**, v. 321, n. 7276, p. 159164, [s.d.].

SIMÕES, C. M. O *et. al.*, **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6<sup>a</sup>. ed. Porto Alegre: Editora da UFRGS, 2007.

STEIN, J. H.; KEEVIL, J. G.; WIEBE, D. A.; AESCHLIMANN, S.; FOLTS, J. D. Purple grape juice improves endothelial function and reduces the susceptibility of LDL cholesterol to oxidation in patients with coronary artery disease. **Circulation**, v. 100, n. 10, p. 105065, 7 set. 1999.

TYLER, V. E. Natural products and medicine: an overview. In: BALICK, M. J.; ELISABETSKY, E.; LAIRD, S. A. (Eds.). **Medicinal resources of the tropical forest, biodiversity and its importance to human health**. New York: Columbia University Press, 1996. p. 3610.

VAYA, J.; MAHMOOD, S.; GOLDBLUM, A.; AVIRAM, M.; VOLKOVA, N.; SHAALAN, A.; MUSA, R.; TAMIR, S. Inhibition of LDL oxidation by flavonoids in relation to their structure and calculated enthalpy. **Phytochemistry**, v. 62, n. 1, p. 89699, jan. 2003.

VÁZQUEZ-CASTILLA S.; DE LA PUERTA R.; GARCIA GIMENEZ



M.D.; FERNÁNDEZ-ARCHE M.A.; GUILLÉN-BEJARANO R. Bioactive constituents from *östriguerö* asparagus improve the plasma lipid profile and liver antioxidant status in hypercholesterolemic rats. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 14, n. 11, p. 212276-21239, 2013.

VEIGA JUNIOR, V. F.; MELLO, J. C. P. As monografias sobre plantas medicinais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 3, p. 4646-471, set. 2008.

WANG, Q.; JIANG, C.; FANG, S.; WANG, J.; JI, Y.; SHANG, X.; NI, Y.; YIN, Z.; ZHANG, J. Antihyperglycemic, antihyperlipidemic and antioxidant effects of ethanol and aqueous extracts of *Cyclocarya paliurus* leaves in type 2 diabetic rats. **Journal of ethnopharmacology**, v. 150, n. 3, p. 1119627, 12 dez. 2013.

WEBER, C.; NOELS, H. Atherosclerosis: current pathogenesis and therapeutic options. **Nature medicine**, v. 17, n. 11, p. 1410622, jan. 2011.

WILKINSON, M. J.; LAFFIN, L. J.; DAVIDSON, M. H. Overcoming toxicity and side-effects of lipid-lowering therapies. **Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism**, jan. 2014.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. General guideline for methodologies on research and evaluation of tradicional medicine. (WHO / EDM / TRM), 2000.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. The world medicines situation: Traditional medicines global situation, issues and challenges, . OMS, 2011.

YAJÍA, M. E.; MARTÍ, D. A.; BIDAÜ, C. J.; AMAT, A. G.; RIGLOS, A. G.; SILVESTRONI, A. Genotoxicity evaluation of *Allophilus edulis*(Camb.) Radlk. (Sapindaceae) aqueous extract. **Acta Horticulturae (ISHS)**, v. 501, p. 31636, 1999.

YUNES, R. A.; PEDROSA, R. C.; CECHINEL FILHO, V. Fármacos e fitoterápicos: a necessidade do desenvolvimento da indústria de fitoterápicos e fitofármacos no Brasil. **Química Nova**, v. 24, n. 1, p. 1476152, fev. 2001.

ZADELAAR, S.; KLEEMANN, R.; VERSCHUREN, L.; DE VRIES-VAN DER WEIJ, J.; VAN DER HOORN, J.; PRINCEN, H. M.; KOOISTRA, T. Mouse models for atherosclerosis and pharmaceutical modifiers. **Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology**, v. 27, n. 8, p. 1706621, ago. 2007.

ZANATTA, L.; DE SOUSA, E.; CAZAROLLI, L. H.; JUNIOR, A. C.; PIZZOLATTI, M. G.; SZPOGANICZ, B.; SILVA, F. R. M. B. Effect of crude extract and fractions from *Vitex megapotamica* leaves on hyperglycemia in alloxan-diabetic rats. **Journal of ethnopharmacology**, v. 109, n. 1, p. 15165, 3 jan. 2007.