



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO

Campus Macaé



Estudo fitoquímico e farmacológico da espécie vegetal
***Mandevilla moricandiana* (Apocynaceae) coletada na restinga**
de Jurubatiba

Autor: Márcio Vinícius da Silva Gomes

Macaé

Agosto de 2013

Márcio Vinícius da Silva Gomes

Título: Estudo fitoquímico e farmacológico da espécie vegetal *Mandevilla moricandiana* (Apocynaceae) coletada na restinga de Jurubatiba

Monografia apresentada ao curso de Farmácia da Universidade Federal do Rio de Janeiro como requisito para obtenção do título de farmacêutico.

Orientadora: Prof.^a. Dra. Michelle Frazão Muzitano.

Co-Orientadora: Prof.^a. Dra. Ivana Ramos Correa Leal.

Macaé

Agosto de 2013

“Ser grande não é empenhar-se em grandes causas: grande é quem luta até por uma palha, quando a honra está em jogo”.

Hamlet

Agradecimentos:

À Deus, por me permitir finalizar a tão sonhada graduação, por ter me dado forças para superar todas as dificuldades e condições adversas. Por ter guardado minha vida todos os dias, e conhecer todos os colegas e amigos que fiz durante a graduação.

Aos meus pais, que sem dúvida foram o grande suporte para tornar possível essa conquista, dando apoio emocional, financeiro e dividindo comigo suas vastas experiências. Sempre presentes nas dificuldades, nas alegrias, em todo momento.

Às minhas orientadoras, que me acolheram tão bem no laboratório, especialmente à minha querida orientadora Michelle, que esteve sempre ao meu lado e foi de imensa importância em todo esse trabalho. Também esteve ao meu lado nos momentos de dúvidas, quando estava desanimado, e esteve comigo em todas as situações, sempre disponível para me ouvir. Também agradeço, professora, pelos muitos puxões de orelha que me fizeram dedicar-me cada vez mais ao projeto e pelos conselhos que me nortearam desde o momento que entrei até o momento em que finalizei a graduação.

À minha namorada Millena, por me mostrar que tudo é possível, até mesmo me amar. Ter me ajudado quando perdi meu querido avô, ter me dado suporte em outras situações difíceis, e sempre ter estado do meu lado.

Aos meus amigos e colegas, que passaram esses longos cinco anos, tornando todas as dificuldades as melhores experiências possíveis. Por estarmos juntos estudando, brincando e, raramente, brigando, visando sempre o melhor para todos.

Aos meus parentes, que apoiaram nossa família durante todos os momentos de dificuldades, e sempre compartilharam de nossa felicidade. Especialmente minha avó Rita, que sempre orou por mim todos os dias, e minha avó Nélia, que sempre me acolheu em sua casa nos poucos momentos de férias...

Ao meu falecido avô Isamir, que sempre me apoiou a cumprir meus objetivos, e que deixou muita saudade, mas também muita admiração principalmente pela sua determinação e caráter.

Aos meus professores, que dividiram seus extensos conhecimentos conosco, nos ensinaram os conceitos, práticas e a ética de nossa profissão. Nos ajudaram nos momentos extra classe, e sempre visaram o nosso crescimento profissional e pessoal. Agradeço especialmente à professora Magdalena Rennó pela sua enorme insistência durante suas aulas, que acabaram por nos mostrar o quão grande pode ser um farmacêutico, basta apenas lutarmos e nunca desistir. À professora Samantha Martins, que sempre lutou a favor da nossa turma enquanto estava na coordenação da faculdade, assim como deixou o cargo e se tornou nossa professora e conselheira.

Aos técnicos dos laboratórios Vitor e Léo, que sempre me auxiliaram quando possível nas análises e métodos, além de se tornarem grandes amigos, que tornaram os dias de trabalho muito mais agradáveis.

Aos meus companheiros e amigos de laboratório, que me 'aturaram' por três anos que passaram tão depressa, e sempre estiveram dispostos a ajudar tudo quanto fosse possível.

Às agências de fomento FAPERJ e CNPq, por apoiarem financeiramente todos os projetos desenvolvidos durante grande parte desses cinco anos.

Ao IMMT, por compartilhar seu espaço com nossa Universidade, de forma a crescermos juntos nessa caminhada, além de contribuir com equipamentos e apoio financeiro com nosso laboratório.

A UFRJ, que contribuiu com todos os seus esforços para melhorar ao máximo seu já conceituado curso de Farmácia.

LISTA DE ABREVIÇÕES

Ach – Acetilcolina
BAW – Butanol: Ácido Acético (acetic acid): Água (water)
CCD – Cromatografia em Camada Delgada
CDB - Convenção da Diversidade Biológica
CFT – Compostos Fenólicos Totais
CG – Cromatografia Gasosa
CLAE – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
DCV - Doenças cardiovasculares
D2&W – Deutério e Tungstênio
EB – Extrato Bruto
EDRF - Fator de Relaxamento Derivado do Endotélio
EM – Espectrômetro de massas
FT – Flavonoides Totais
GAE - mg equivalentes de ácido gálico
GMPc – Guanosina monofosfato cíclico
IV – Infravermelho
NO – óxido nítrico
OMS/WHO – Organização Mundial de Saúde
PGE-2 – Prostaglandina E - 2
PGI-1 – Prostaglandina I - 1
Phe – Fenilefrina
PNRJ – Parque Nacional da Restinga de Jurubatiba
Ppt BuOH – precipitado butanólico
Rf – Fator de retenção
RMN – Ressonância Magnética Nuclear
UV – Ultravioleta

RESUMO

Mandevilla Lindl. corresponde ao maior gênero neotropical da família Apocynaceae, com cerca de 150 espécies relatadas nas Américas. Dentre elas, a espécie *Mandevilla moricandiana* (A.DC.) R. E. Woodson apresenta ocorrência restrita a áreas de Restinga, como a do Parque Nacional da Restinga de Jurubatiba. A espécie não possui muitos dados na literatura, principalmente quanto à atividade biológica, tornando-se importante estudar o perfil fitoquímico e farmacológico da *Mandevilla moricandiana*, além de identificar as substâncias responsáveis pelas atividades farmacológicas encontradas para o extrato. Para tal, as folhas da *M. moricandiana* foram levadas à maceração em etanol: água (7:3), e em seguida fracionados em *n*-hexano, diclorometano, acetato de etila e *n*-butanol. Foi obtido um rendimento para o extrato bruto de 15,33% (p/p). A partir da análise por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência foi possível traçar o perfil químico do extrato e frações acetato de etila e butanólica e verificar que estas são ricas em flavonoides. O extrato bruto foi avaliado quanto aos compostos fenólicos totais, utilizando o método de Folin-Ciocalteu e como padrão o ácido gálico, e indicou um teor de 7,5%. O ensaio de flavonoides totais, utilizando a rotina com padrão, indicou um teor de 3,45% de flavonoides no extrato bruto, enquanto as frações acetato de etila representou 85% desses flavonoides. O extrato bruto e frações foram avaliados quanto ao potencial vasodilatador. Tal ensaio apresentou CI_{50} de $0,82 \pm 0,10$ $\mu\text{g/mL}$ para o extrato bruto, enquanto a fração acetato de etila, a mais ativa, apresentou CI_{50} de $10,64 \pm 1,69$ $\mu\text{g/ml}$. Essa fração foi purificada em coluna de gel Sephadex e as subfrações analisadas para elucidação estrutural e atividade das mesmas.

Palavras-chave: *Mandevilla moricandiana*, Apocynaceae, Flavonoides, Vasodilatação, Restinga de Jurubatiba.

Sumário

1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Produtos Naturais	1
1.2 Restinga.....	2
1.3 Unidades de Conservação.....	2
1.4 Parque Nacional da Restinga de Jurubatiba	3
1.5 Compostos fenólicos.....	4
1.6 Flavonoides	5
1.7 Gênero <i>Mandevilla</i>	10
1.8 Espécie <i>Mandevilla moricandiana</i>	11
1.9 Doenças cardiovasculares.....	13
2. JUSTIFICATIVA	14
3. OBJETIVOS	14
3.1 Objetivos Gerais.....	14
3.2 Objetivos Específicos	15
4. MATERIAIS E MÉTODOS	15
4.1 Material Vegetal	15
4.2 Obtenção dos extratos.....	15
4.3 Avaliação do perfil Químico por Cromatografia em Camada Delgada e Cromatografia Líquida de Alta Eficiência.....	18
4.4 Fracionamento cromatográfico	19
4.5 Dosagem de conteúdo de Flavonoides Totais.....	20
4.6 Compostos fenólicos totais.....	21
4.7 Análise por Infravermelho	21
4.8 Atividade Biológica: Efeito Vasodilatador.....	22

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	23
5.1 Rendimentos das frações obtidas dos processos de fracionamento líquido-líquido	23
5.2 Dosagem de Compostos fenólicos totais no extrato bruto	24
5.3 Análise do Perfil Químico do Extrato bruto das Folhas, Flor, Caule e Rizoma da <i>M. moricandiana</i> por CCD e CLAE-UV	26
5.4 Dosagem do conteúdo de flavonoides totais no extrato e nas frações em acetato de etila e butanólica	33
5.5 Ensaios biológicos: efeito vasodilatador.....	35
5.6 Análise por Infravermelho da fração obtida da purificação da Fração em Acetato de etila.....	38
6. CONCLUSÃO	42
7. REFERÊNCIAS.....	43

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Imagem da flora do Parque Nacional da Restinga de Jurubatiba	3
Figura 2: Precursores das duas principais rotas biogénicas dos compostos fenólicos. 5	
Figura 3: Núcleo fundamental dos flavonoides e sua numeração	9
Figura 4: Representação da conjugação do sistema benzoil e cinamoil, presente nos flavonoides.	9
Figura 5: Algumas das estruturas identificadas em espécies do género <i>Mandevilla</i>	10
Figura 6: Flor da <i>Mandevilla moricandiana</i> (Fonte: LaProN)	12
Figura 7: Estrutura de algumas das moléculas identificadas na cera da <i>Mandevilla moricandiana</i>	12
Figura 8: Curva de calibração da rotina utilizando as concentrações de 0,01; 0,1; 1; 2 e 4 µg/µl, com as análises feitas em triplicata	21
Figura 9: Massa total obtida do fracionamento com Hexano, Diclorometano, Acetato de Etila, e Butanol.....	24
Figura 10: Representação gráfica das absorvâncias encontradas para o padrão do ácido gálico e do extrato hidroalcoólico de folhas de <i>Mandevilla moricandiana</i>	25
Figura 11: Imagem do ensaio de Folin-Ciocalteu	26
Figura 12: Cromatoplasmas do extrato bruto das folhas e frações da <i>Mandevilla moricandiana</i>	26
Figura 13: Cromatoplasmas do extrato bruto das Folhas, Flores, Caule e Rizoma e frações da <i>Mandevilla moricandiana</i>	27
Figura 14: Cromatograma do extrato bruto hidroalcoólico das folhas a 254 nm.....	27
Figura 15: Cromatograma do extrato bruto hidroalcoólico do caule a 254 nm.	28
Figura 16: Cromatograma do extrato bruto hidroalcoólico das flores a 254 nm.	28
Figura 17: Cromatograma do extrato bruto hidroalcoólico do rizoma a 254 nm.....	28
Figura 18: Cromatograma da fração acetato de etila proveniente do EB hidroalcoólico de folhas de <i>M. moricandiana</i> , a 254 nm.....	29
Figura 19: Cromatograma da fração butanólica proveniente do EB hidroalcoólico de folhas de <i>M. moricandiana</i> , a 254 nm.....	30
Figura 20: Cromatograma da fração aquosa residual proveniente do EB hidroalcoólico de folhas de <i>M. moricandiana</i> , a 254 nm.....	30

Figura 21: Espectros de ultravioleta com padrão flavonoídico semelhantes à rutina, obtidos nas frações de acetato de etila e butanólica.....	31
Figura 22: Espectros de ultravioleta com padrão flavonoídico semelhantes à rutina, obtidos no extrato bruto hidroalcoólico de folhas de <i>M. moricandiana</i>	32
Figura 23: Cromatograma vs Espectro em três dimensões das frações acetato de etila e butanol.....	32
Figura 24: Estrutura química e espectro de UV da rutina.	33
Figura 25: Curvas concentração-resposta do extrato de <i>M. moricandiana</i> em aortas com e sem endotélio.	35
Figura 26: Efeito das frações do extrato etanólico de <i>M. moricandiana</i> no músculo liso vascular. Curvas concentração-resposta da fração hexânica, fração diclorometânica, precipitado da fração butanólica e fração acetato de etila em aortas com endotélio..	36
Figura 27: Estrutura de alguns flavonoides com atividade vasodilatadora	37
Figura 28: Infravermelho das cinco primeiras subfrações reunidas coletadas na coluna Sephadex, com seus respectivos parâmetros analíticos.	39
Figura 29: Cromatografia da subfração 1-5 coletada na Sephadex, revelada com ninhidrina. O sistema de eluentes foi BAW (3: 1: 1).	41
Figura 30: CCD revelada com vapor de iodo	41
Figura 31: Subfração 1-5 revelada com Dragendorff e com Dragendorff + Ácido sulfúrico 10%	42

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Classificação dos compostos fenólicos de acordo com o esqueleto básico.....	4
Tabela 2: Classes de flavonoides e algumas características conhecidas.....	6
Tabela 3: Reagentes empregados na detecção de flavonoides	8
Tabela 4: Rendimento em mg das frações oriundas da coluna em gel de Sephadex da fração acetato de etila das folhas de <i>M. moricandiana</i>	20
Tabela 5: Equipe do projeto, com suas ocupações e respectivas contribuições.	23
Tabela 6: Massa total obtida do fracionamento com Hexano, Diclorometano, Acetato de Etila, e Butanol oriundos do EB de folhas de <i>M. moricandiana</i>	24
Tabela 7: Concentrações encontradas para o extrato da <i>Mandevilla moricandiana</i> , expresso em miligramas de equivalente de ácido gálico (mGAE) por grama de extrato bruto.	25
Tabela 8: Picos de flavonoides comuns nos EB das folhas e EB das flores	29
Tabela 9: Massa em miliequivalente de rutina (em mEqR) de picos similares ao espectro de rutina para o extrato bruto, a fim de calcular o conteúdo de flavonoides totais.....	33
Tabela 10: Massa em miliequivalente de rutina (em mEqR) de picos similares ao espectro de rutina para as frações acetato de etila e butanol, a fim de calcular o conteúdo de flavonoides totais.....	34
Tabela 11: Resumo das principais bandas de infravermelho encontradas para o conjunto de subfrações de 1-5.....	40

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1: Fluxograma do fracionamento líquido-líquido do extrato hidroalcoólico bruto das folhas de <i>M. moricandiana</i>	17
Esquema 2: Representação esquemática resumida do procedimento de maceração e fracionamento	18
Esquema 3: Fluxograma de fracionamento em coluna de gel de Sephadex da fração acetato de etila das folhas de <i>M. moricandiana</i>	19

1. INTRODUÇÃO

1.1 Produtos Naturais

O uso de produtos naturais, como plantas medicinais e alimentos funcionais, é difundido por todo o mundo. Segundo a OMS, cerca de três quartos da população mundial utilizam recursos vegetais de forma frequente para o tratamento de diversas patologias (DUBEY, KUMAR E TRIPATHI, 2004). Além do reconhecido uso popular, muito dos produtos naturais têm importante aplicação no desenvolvimento de novos fármacos e terapias medicamentosas. Para que se tenha ideia da importância dessa fonte no mercado mundial, Newman e Cragg (2012) avaliaram a contribuição dos produtos naturais no desenvolvimento de fármacos no período entre 1981 e 2010, demonstrando que dentro desse período foram descobertos 1130 novos fármacos oriundos dessa fonte, considerando desde o uso da molécula isolada até vacinas e farmacóforos (região do fármaco responsável pelo efeito farmacológico) de moléculas sintéticas que foram originadas de produtos naturais.

Considerando esses aspectos, o Brasil torna-se um atrativo para pesquisadores de todas as partes do mundo, visto que, segundo estimativas da Convenção da Diversidade Biológica (CDB) (BARREIRO, 2009), o Brasil hospeda entre 15 e 20% de toda a biodiversidade mundial, sendo considerado o maior do planeta em número de espécies endêmicas. Desta forma, a biodiversidade do Brasil é considerada uma fonte de substâncias biologicamente ativas e sua preservação é fundamental tanto pelo valor intrínseco dessa imensa riqueza biológica quanto pelo seu enorme potencial como fonte de novos fármacos. Um dos aspectos que pode justificar essa enorme biodiversidade, além do enorme território nacional, é a grande variedade de biomas, como caatinga, cerrado, a mata atlântica e restingas, por exemplo. Dentre esses, vale destacar a restinga, visto que é um bioma que em sua grande parte é preservada por órgãos federais, estaduais ou municipais, de modo que o acesso a esses locais é bem controlado. Com isso, muitas das espécies lá presentes tornam-se restritas ao público em geral, sendo então uma importante fonte de pesquisa (MACAÉ, 2013).

1.2 Restinga

O bioma Restinga pode ser definido como planícies arenosas costeiras de origem marinha, abrangendo praias, cordões arenosos, dunas, depressões entre cordões e depressões entre dunas com respectivos brejos, charcos, alagados e lagoas, cuja vegetação e fauna estão adaptadas às condições ambientais locais (RIO DE JANEIRO, 2008). De uma forma geral, o termo restinga pode ser usado no sentido geomorfológico, significando diversos tipos de depósitos arenosos litorâneos de origem marinha, ou no sentido botânico, designando o conjunto de comunidades vegetais fisionomicamente distintas sob influência marinha (ARAÚJO, 1992). A vegetação sobre a restinga é formada por mosaicos vegetacionais que refletem as condições de umidade e fertilidade do solo (ARAÚJO E LACERDA 1987). As famílias botânicas mais comuns dessa vegetação são: Convolvulaceae, Gramineae, Amaranthaceae, Cyperaceae e Leguminosae (MANTOVANI 2003). Das plantas presentes com característica endêmica, os estudos referente à grande parte dessa flora são escassos em relação à atividade biológica e perfil fitoquímico.

1.3 Unidades de Conservação

Existe um grande número de Unidades de Conservação que protegem as restingas no Estado do Rio de Janeiro, como a Área de Proteção Ambiental da Massambaba, a Área de Proteção Ambiental de Maricá, o Parque Nacional da Restinga de Jurubatiba, o Parque Estadual da Ilha Grande, a Reserva Biológica da Praia do Sul e a Reserva Ecológica da Juatinga. O Parque Nacional da Restinga de Jurubatiba (PNRJ – Figura 1) tem a maior área de restinga incluída em uma Unidade de Conservação no Estado e abriga uma das 12 áreas do Programa Brasileiro de Pesquisas Ecológicas de Longa Duração (PELD/MCT-CNPq) (IMBASSAHY, COSTA E ARAÚJO, 2009). A flora do PNRJ compõe-se de 588 táxons de angiospermas, 31 de pteridófitas 147 de algas continentais (COSTA E DIAS 2001), e 55 espécies de briófitas (COSTA, YANO 1998; COSTA *et al.* 2006). O Parque Nacional da Restinga de Jurubatiba localiza-se no litoral da região Norte Fluminense do Estado do Rio de Janeiro, na planície costeira do rio Paraíba do Sul (MUEHE E VALENTINI 1998), entre as coordenadas 22°00'-22°23'S e

41°15'-41°45'W, abrangendo parte dos municípios de Macaé, Quissamã e Carapebús, com área total de 148,6 km² (IMBASSAHY, COSTA E ARAÚJO, 2009).



Figura 1: Imagem da flora do Parque Nacional da Restinga de Jurubatiba (Fonte: PREFEITURA DE QUISSAMÃ, 2012)

1.4 Parque Nacional da Restinga de Jurubatiba

Segundo Araújo *et al.* (2001), foram registradas 588 espécies de angiospermas para o Parque Nacional da Restinga de Jurubatiba, sendo a família Apocynaceae uma das que apresentam maior representatividade. A família Apocynaceae (incluindo Asclepiadaceae) apresenta cerca de 410 gêneros e aproximadamente 4.650 espécies entre lianas, árvores, arbustos e herbáceas, distribuídas, principalmente, nas regiões tropicais e subtropicais do mundo (SIMPSON, 2006). No Brasil ocorrem aproximadamente 90 gêneros e 850 espécies, habitando diversas formações vegetais (SOUZA E LORENZI 2005). *Mandevilla* Lindl. é o maior gênero neotropical da subfamília Apocynoideae com cerca de 140-150 espécies, distribuídas do México até a Argentina (WOODSON, 1933; SALES, KINOSHITA E SIMÕES, 2006; SIMÕES *et al.* 2004). É um gênero considerado extremamente variado com arbustos, ervas, lianas e até mesmo epífitas (SIMÕES *et al.* 2004). Seus representantes destacam-se pelo potencial paisagístico e medicinal, onde no extrato das raízes tuberosas foram encontrados princípios ativos que podem ser utilizados no tratamento contra venenos de cobras, além de metabólitos secundários no látex como, borracha e alcaloides (METCALFE E CHALK 1950; CALIXTO *et al.* 1986a). Os compostos fenólicos, ou simplesmente fenóis, possuem uma grande diversidade de moléculas, e muitas das classes presentes nesse

grupo são responsáveis por uma gama de efeitos biológicos, mas foram identificados somente no néctar e estrutura floral na *Mandevilla laxa* (GALETTO, 1997).

1.5 Compostos fenólicos

Os compostos fenólicos englobam todos os metabólitos primários e especiais presentes no vegetal, e podem variar desde ácidos fenólicos até flavonoides. Desta forma, existe uma variedade de estruturas básicas de acordo com sua classe química, como mostrado na Tabela 1. Tal estrutura, ou seja, o esqueleto básico, é a classificação mais usual no campo de farmacognosia, segundo Simões *et al.* (2010).

Tabela 1: Classificação dos compostos fenólicos de acordo com o esqueleto básico
Fonte: SIMÕES *et al.*, 2010.

Esqueleto básico	Classe de fenólicos de acordo com o esqueleto básico
C6	Fenóis simples, benzoquinonas
C6-C1	Ácidos fenólicos
C6-C2	Acetofenonas e ácidos fenilacéticos
C6-C3	Fenilpropanoides: ácido cinâmico e compostos análogos, fenilpropenos, cumarinas, isocumarinas e cromonas
C6-C4	Naftoquinonas
C6-C1-C6	Xantonas
C6-C2-C6	Estilbenos, antraquinonas
C6-C3-C6	Flavonoides e isoflavonoides
(C6-C3) ₂	Lignanas
(C6-C3-C6) ₂	Diflavonoides
(C6) _n	Melaninas vegetais
(C6-C3) _n	Ligninas
(C6-C1) _n	Taninos hidrolisáveis
(C6-C3-C6) _n	Taninos condensados

Os compostos fenólicos podem ser formados basicamente em duas rotas biogénicas: pela via do ácido chiquímico (a partir de carboidratos) ou pela via do acetato-malato, que inicia com a enzima acetil-coenzima A e malonil-coenzima A (BIRT,

HENDRICH E WANG, 2001). Tais precursores são mostrados na Figura 2. A maior parte dos compostos fenólicos não é encontrada no estado livre na natureza, mas sob a forma de ésteres ou de heterosídeos sendo, portanto, solúveis em água e em solventes orgânicos polares. Por serem aromáticos, apresentam intensa absorção na região do ultravioleta.

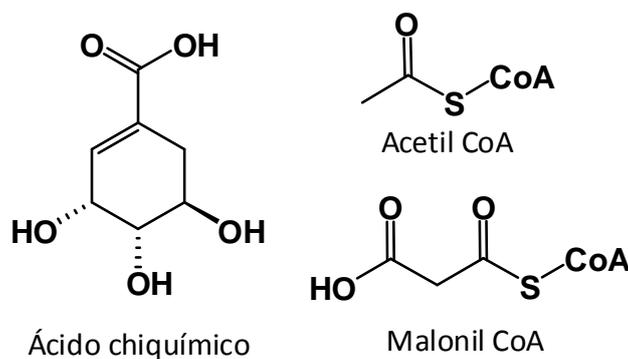


Figura 2: Precursores das duas principais rotas biogénicas dos compostos fenólicos.

A identificação desses compostos pode ser realizada através de características de fluorescência, coloração com reagentes químicos e fator de retenção (Rf) com padrões. Também podem ser utilizadas a Cromatografia Gasosa (CG), após derivatização (modificação estrutural que facilita a passagem para o estado gasoso) dos mesmos, e CLAE em fase reversa, cujos eluentes são, geralmente, mistura de água, acetonitrila ou álcoois, e pequenas quantidades de soluções ácidas, para evitar a ionização.

1.6 Flavonoides

Os flavonoides são substâncias fenólicas ou polifenólicas, ou seja, possuem um ou mais núcleos aromáticos contendo substituintes hidroxilados e /ou seus derivados funcionais, como ésteres, éteres, glicosídeos, entre outros. Contudo, compostos que contêm hidroxilas fenólicas não são exclusivas da classe dos flavonoides, por isso é conveniente empregar uma definição também que leve em consideração a origem biogénica, ou seja, suas características biossintéticas (SIMÕES *et al.*, 2010). Tais substâncias representam um dos grupos mais importantes e diversificados entre os produtos de origem natural, sendo amplamente distribuído no reino vegetal. Já foram encontrados em algas, briófitas, pteridófitas e com apenas um relato em fungos. A ampla maioria dos representantes dessa classe são presentes nas angiospermas, com

enorme variedade estrutural. No geral, foram identificados mais de 4200 flavonoides diferentes, sejam eles na forma conjugada (ou heterosídeo) ou na forma aglicona (Tabela 2) sendo que aproximadamente 40% deles são representadas pelos flavonóis e flavonas (COOK E SAMMAN, 1996). Estar na forma conjugada significa que o flavonoide está ligado a um açúcar, podendo ser por ligação através de um átomo de oxigênio (*O*-glicosídeo) ou de carbono (*C*-glicosídeo). Quando eles não possuem ligação com açúcar, são denominados aglicona ou genina, também podendo ser denominados de forma livre (DEGÁSPARI E WASZCZYNSKYJ, 2004).

Tabela 2: Classes de flavonoides e algumas características conhecidas. Fonte: SIMÕES *et al.*, 2010

Classes dos flavonoides	Número aproximado de estruturas conhecidas	Características
Flavonas, flavonóis e seus <i>O</i> -heterosídeos	1660	co-pigmentação em flores; protetores contra raios UV nas folhas
<i>C</i> -heterosídeos	303	-
Antocianos	256	pigmentação do vermelho até o azul
Chalconas	197	pigmentação amarela
Auronas	29	pigmentação amarela
Di-hidro-flavonóis	110	estão frequentemente presentes em tecidos de madeiras
Flavanonas	319	podem apresentar sabor amargo
Di-hidro-chalconas	71	podem apresentar sabor amargo
Flavanas, leucoantocianidinas e proantocianidinas	309	substâncias adstringentes com propriedades tanantes
Isoflavonoides	630	propriedades estrogênicas e/ou antifúngicas
Neoflavonoides	70	-
Biflavonoides	134	propriedades antifúngicas
Outras estruturas	100	-

Quanto às propriedades físico-químicas, os flavonoides se comportam de diferentes formas. As aglicona aparecem sob a forma de cristais amarelos, enquanto os heterosídeos são geralmente solúveis em água e álcoois diluídos, mas insolúveis nos solventes orgânicos habituais, enquanto que as respectivas aglicona são normalmente solúveis em solventes orgânicos apolares e em soluções aquosas alcalinas (devido ao caráter fenólico). A posição ocupada pela porção açúcar, o grau de instauração e natureza dos substituintes influem grandemente na solubilidade da molécula e na sua capacidade de precipitação em presença de metais. O aquecimento, mesmo com o material diluído, pode levar a hidrólise dos *O*-heterosídeos e muitas vezes interferir na análise estrutural de flavonoides (SIMÕES *et al.*, 2010).

Para a extração, utilizam-se geralmente solventes com polaridade crescente: a primeira extração, com solvente apolar (normalmente *n*-hexano), retira óleos, gorduras, esteróis e pigmentos, facilitando a extração posterior dos flavonoides. A segunda extração com solvente um pouco mais polar (p. e. clorofórmio e acetato de etila) permite recuperar aglicona livres pouco polares, tais como flavonas, flavonóis e flavanonas. Aumentando a polaridade do solvente (água, butanol, metanol) se extraem as agliconas poli-hidroxiladas, flavonas e flavonóis mais polares (ANDERSEN E MARKHAM, 2006).

A caracterização pode ser feita por diversas maneiras, sendo os ensaios cromatográficos os mais simples e usuais. Dentre esses, destaca-se a cromatografia em camada delgada (CCD), onde as aglicona normalmente são eluídas em sistema *n*-butanol-ácido acético-água (BAW) em diferentes proporções. Após secagem, a placa é analisada sob luz ultravioleta utilizando comprimentos de onda curto (254 nm) e longo (365 nm) (SIMÕES *et al.*, 2010). Após a análise em UV, a cromatoplaça pode ser exposta a um ou mais dos reagentes cromogênicos listados na Tabela 3.

Tabela 3: Reagentes empregados na detecção de flavonoides. Adaptada. Fonte: SIMÕES *et al.*, 2010; ANDERSEN e MARKHAM, 2006) .

Reagente	Coloração obtida	Especificidade
AlCl ₃ 1% alcoólico	Fluorescência no UV	Todos os flavonoides
NaOH 2%, NH ₃ , Na ₂ CO ₃ 0,2%	Várias cores	Muitos compostos fenólicos
<i>p</i> -nitroanilina 0,2% diazotada com 20% Na ₂ CO ₃	Várias cores	Todos os compostos fenólicos
Reagente de Gibbs (2,6-dicloroquinona 2% alcoólico; clorimida com AcOH ou Na ₂ CO ₃)	Várias cores	Muitos compostos fenólicos
Difenilborato 1% em metanol (Reagente Natural A)	Laranja, amarelo ou verde	Todos os flavonoides
FeCl ₃ 1% alcoólico	Azul, verde, marrom ou vermelho	Muitos compostos fenólicos
FeCl ₃ ou K ₃ Fe(CN) ₆ 1% aq.	Azul	Todos os compostos fenólicos
Reagente de Folin-Ciocalteu (fosfomolibdato-fosfotungstato)	Azul	Todos os compostos fenólicos
AgNO ₃ amoniacal 5% em acetona	Preto	Todos os compostos fenólicos
Sulfato cérico	Várias cores	Compostos de natureza flavonoídica e terpenoídica
Vanilina clorídrica 0,1%	Cor-de-rosa	Muitos compostos fenólicos
NP-PEG (difenilboriloxietilamina seguido de polietilenoglicol)	Várias cores	Todos os flavonoides

Os flavonoides podem ser encontrados em diversas formas estruturais. A unidade básica da maioria dos representantes dessa classe possui 15 átomos de carbono em seu núcleo fundamental, constituído de duas fenilas ligadas por uma cadeia de três carbonos entre elas. Quando estão na forma tricíclica, as unidades são

chamadas de A, B e C, enquanto os átomos de carbono recebem a numeração com os números ordinários para os núcleos A e C e os mesmos números seguidos de uma linha (') para o núcleo B, conforme mostrado na Figura 3 (ANDERSEN e MARKHAM, 2006; SIMÕES *et al.*, 2010).

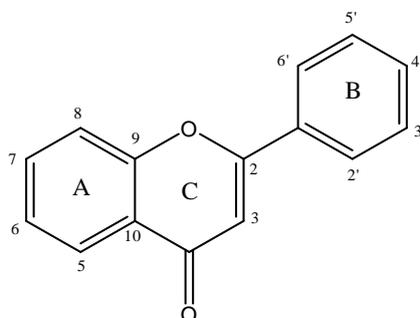


Figura 3: Núcleo fundamental dos flavonoides e sua numeração

Os flavonoides possuem absorção na faixa do UV-visível, devido a presença de grupamentos cromóforos na molécula. Esses grupamentos são classificados com Banda I e Banda II, sendo que o primeiro compreende a faixa espectral máxima entre 240- 290nm e o segundo 300- 390nm. A Banda I é originada da conjugação do Anel A (sistema benzoil) e a Banda II é relativa à conjugação do anel B ao C (sistema cinamoil), conforme mostrado na Figura 4 (MERKEN, 2000).

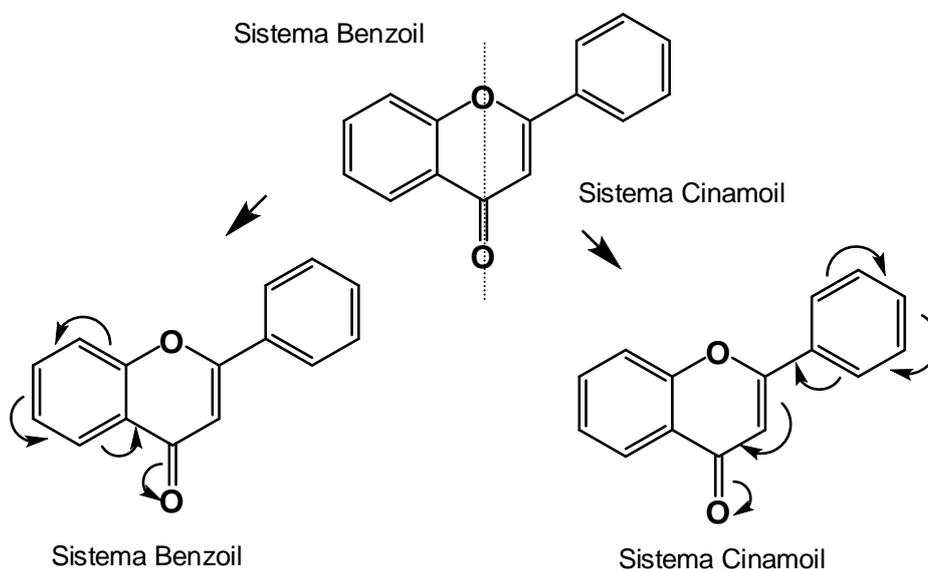


Figura 4: Representação da conjugação do sistema benzoil e cinamoil, presente nos flavonoides.

1.7 Gênero *Mandevilla*

Existem poucos estudos em termos de constituição química e atividade biológica da grande maioria das espécies do gênero *Mandevilla* Lindl. Dentre os estudos já realizados quanto à caracterização química, destacam-se a *Mandevilla pentlandiana* (A. DC.) Woodson, da qual já foram isolados da semente glicosídeos cardiotônicos (LUFRAÑO, STARITA E BALDINI, 1982), e da raiz, hidrocarbonetos, lipídios, esteroides e triterpenos (MICHELOTTI e GROS, 1983), peróxidos esteroidais e lignanas (CABRERA *et al.*, 1991a), derivados esteroidais (D-20-esteróides e 6-ceto-5-a-estanóis) (CABRERA *et al.*, 1991b), glicosídeos com núcleo pregnano (CABRERA *et al.*, 1993a), sesquiterpenóides do tipo aromadendrano (CABRERA *et al.*, 1993b) e glicosídeos cardenólideos (CABRERA *et al.*, 1993a). Rodriguez e Guzman (1995) estudaram a composição química do óleo das sementes de *M. pentlandiana* e de *Mandevilla laxa* (Ruiz & Pav.) Woodson, evidenciando ácido oleico e linoleico como principais componentes. Em *Mandevilla illustris* (Vell.) Woodson, foram isolados de rizomas acetililustrol (NIERO *et al.*, 1999), um derivado *nor*-pregnano (NIERO *et al.*, 2002) e um derivado 14:15-*seco*-15-*nor*-pregnano, chamado ilustról (YUNES *et al.*, 1993a; VENCATO *et al.*, 1999) (Figura 5). Em *Mandevilla velutina* K. Schum., foram isolados de rizomas glicosídeos com núcleo pregnano (CALIXTO, YUNES, 1991), velutínol A (YUNES *et al.*, 1993b; BENTO *et al.*, 1996) e velutinosídeo A, um derivado pentassacarídico (BENTO *et al.*, 2003).

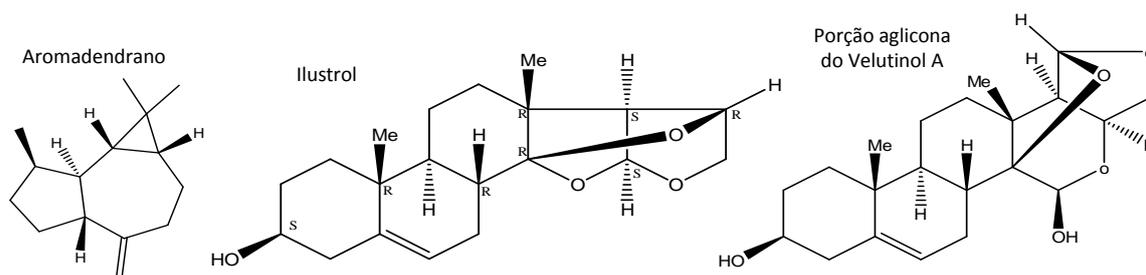


Figura 5: Algumas das estruturas identificadas em espécies do gênero *Mandevilla* Lindl.

Vários estudos farmacológicos foram feitos para o gênero *Mandevilla*. Na medicina popular, a infusão ou o extrato alcoólico dos rizomas de *Mandevilla velutina* e *M. illustris* (Apocynaceae) são utilizados como anti-inflamatório e para tratamento

de mordida de cobra. Já foi isolado anteriormente da *M. velutina* um composto com estrutura pregnano, denominado velutinol A e com atividade antagonista de bradicinina (YUNES *et al.*, 1993b); onde a estrutura do foi elucidada por Bento *et al.* (1996). Apesar do extrato alcoólico da *M. illustris* antagonizar a bradicinina, o illustrol mostrou ser inativo se utilizado isoladamente no útero isolado de ratas e nos ensaios de contração muscular bradicinina-induzida no íleo isolado de cobaias (YUNES *et al.*, 1993a). A *M. velutina* também apresentou atividade antirreumática (HIRSCHMANN, 1990; CALIXTO *et al.*, 1985; CALIXTO e YUNES, 1986b; CALIXTO *et al.*, 1987; CALIXTO e YUNES, 1990), anti-edematogênica (MATTOS *et al.*, 2006), antinociceptiva (JUNIOR *et al.*, 2010) e anti-inflamatória, tanto oralmente quanto tópica (CALIXTO, 1991). Atualmente, já foram isolados cinco compostos não peptídicos do rizoma de *M. velutina*. Quatro deles foram caracterizados como glicosídeos esteroidais (estrutura não elucidada), enquanto o quinto (velutinol A) possui um esteroide como porção aglicona (CALIXTO *et al.*, 1988; YUNES *et al.*, 1993b). Outros dois compostos foram identificados sendo um esteroide glicosilado e um esteroide aglicona.

Para *M. pentlandiana* já foram descritos o isolamento de cardenólídeos mono e tri glicosilados (CABRERA *et al.*, 1993a), além do aromadendrano (CABRERA *et al.*, 1993b), todos obtidos do extrato etanólico das raízes. A medicina popular atribui para a *M. coccinea* o uso como analgésico, anti-inflamatório e inibição dos efeitos de veneno de cobra (DUARTE E LARROSA, 2011).

1.8 Espécie *Mandevilla moricandiana*

Existem muitas outras espécies do gênero *Mandevilla* Lindl que ainda não foram descritas na literatura quanto à atividade biológica, destacando-se a *Mandevilla moricandiana* (A. DC.) R.E. Woodson (Figura 6), que apresenta distribuição restrita ao litoral do nordeste e do Rio de Janeiro. Ela habita preferencialmente as dunas de areias das restingas. *Mandevilla moricandiana* pode ser facilmente reconhecida pelos ramos delgados, volúveis, geralmente afilos pela queda das folhas pelos apêndices nodais muito desenvolvidos, coriáceos e pontiagudos nos ramos mais velhos e pelos ramos laterais, eretos, curtos, com os nós engrossados e densamente folhosos pelo encurtamento dos entrenós; ocasionalmente, na porção apical dos ramos volúveis em

crescimento, as folhas estão presentes. Outras características, também relevantes, são encontradas nas folhas obovadas, largo a oblongo-obovadas com base atenuada à aguda, ápice curtíssimo-cuspidado e principalmente pela corola com a garganta-turbinada com 1,2-2 cm de comprimento e 5-8 mm de diâmetro na fauce. Como foi demonstrada, essa espécie apresenta parâmetros botânicos bem estabelecidos, mas até a presente data não foram descritas nenhuma atividade biológica para a tal (WOODSON, 1933; SALES, 1993).



Figura 6: Flor da *Mandevilla moricandiana* (Fonte: LaProN).

Quanto à composição química, já foram descritos para a espécie o nonacosano (C₂₉), hentriacontano (C₃₁), tritriacontano (C₃₃), α - e β -amirina, lupeol e acetato de lupeol, acetato de α - e β -amirina, extraídos da cera da planta utilizando os solventes hexano e diclorometano (CORDEIRO *et al.*, 2011), conforme mostrado na Figura 7.

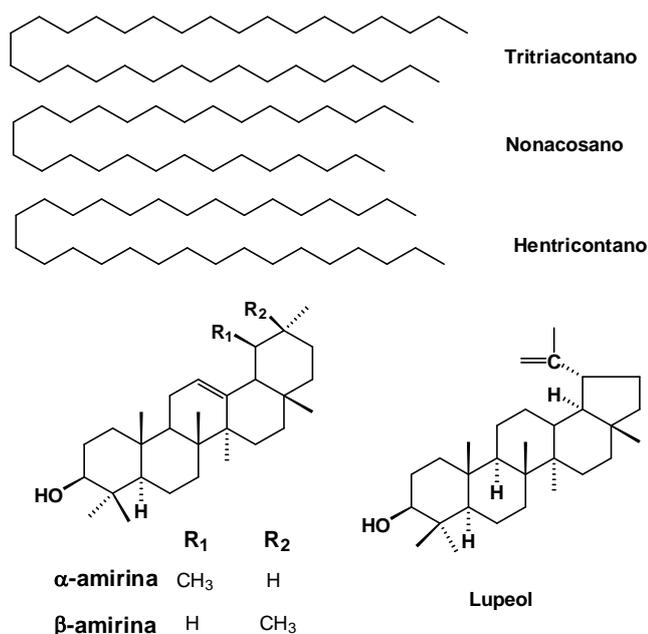


Figura 7: Estrutura de algumas das moléculas identificadas na cera da *Mandevilla moricandiana*.

Até o momento, não foi descrita nenhuma atividade biológica para a espécie *Mandevilla moricandiana*, da mesma forma que para o gênero os estudos são mais focados em elucidação estrutural e ensaios selecionados baseado em estudos etnobotânicos. Dessa forma, o presente trabalho visa estudar a atividade, no sistema cardiovascular, do extrato e frações de *M. moricandiana*. Nesse contexto, as doenças cardiovasculares surgem como alvo devido à alta taxa de incidência das mesmas no contexto mundial.

1.9 Doenças cardiovasculares

As doenças cardiovasculares (DCV) são um grupo de doenças do coração e dos vasos sanguíneos que podem ocorrer das mais variadas causas, como doença cardíaca coronária (doença dos vasos sanguíneos que irrigam o músculo cardíaco), doença vascular cerebral (doenças dos vasos sanguíneos que abastecem o cérebro), doença arterial periférica (doença de vasos sanguíneos que irrigam os braços e pernas), entre outras (WHO, 2013).

As doenças cardiovasculares são a principal causa de morte no mundo: mais pessoas morrem anualmente de doenças cardiovasculares do que por qualquer outra causa (WHO, 2011). Para que se tenha uma ideia, das 57 milhões de mortes ocorridas em 2008, 36 milhões foram causadas por doenças não-transmissíveis, aos quais incluem principalmente doenças cardiovasculares, diabetes, câncer e doenças respiratórias crônicas. Dentre eles, estima-se que 17,3 milhões de pessoas morreram devido somente a doenças cardiovasculares, representando 30% de mortes (WHO, 2011). A estimativa de pessoas que morrerão de doenças cardiovasculares podem atingir 23,3 milhões em 2030 (WHO, 2011; MATHERS E LONCAR, 2006), devendo permanecer como a principal causa de morte no mundo (MATHERS E LONCAR, 2006). Aproximadamente 9,4 milhões de mortes por ano, ou 16,5% de todas as mortes podem ser atribuídas à hipertensão arterial (LIM *et al.*, 2012).

Um dos principais fatores que afetam hipertensão é a regulação do tônus vascular, que está intrinsecamente relacionado ao endotélio vascular. Durante uma disfunção endotelial ocorre um desequilíbrio entre os fatores contrateis e relaxantes derivados do endotélio. Tais fatores podem apresentar ação ampla ou específica,

como o fator de relaxamento derivado do endotélio (EDRF – Endothelium Derived Relaxing Factor), prostaglandina (PGI-1 e PGE-2), endotelina, trombomodulina, óxido nítrico (NO), entre muitos outros. Destes, destacam-se o EDRF e o NO por terem ações semelhantes, inclusive muitos autores acreditam que se tratam da mesma substância (FELIZZOLA *et al.*, 1996). Muitos medicamentos já foram desenvolvidos com a finalidade de atuar em muitos desses fatores, mas atualmente nenhum deles é 100% eficaz no que diz respeito ao custo/benefício, evidenciando a necessidade de se obter moléculas novas com mecanismos inexplorados e com efeitos adversos mínimos.

Considerando tais aspectos, a necessidade de caracterizar fitoquímica e farmacologicamente a espécie *Mandevilla moricandiana* torna-se importante não apenas para identificar novos protótipos terapêuticos, mas também para explorar a riqueza que a restinga do PNRJ tem a oferecer.

2. JUSTIFICATIVA

O PNRJ possui uma vasta flora e fauna, até o momento muito pouco explorado. Dessa forma, essa pesquisa tem como principal objetivo a identificação de plantas promissoras no caráter medicinal, de forma a enriquecer o conhecimento e a importância da região como fonte de novos fármacos. A partir de uma extração biomonitorada, nossa equipe avaliou o potencial de uma espécie pertencente a uma das maiores famílias presentes na Restinga de Jurubatiba, a *Mandevilla moricandiana* (Apocynaceae), quanto ao efeito vasodilatador, de forma buscar novas moléculas candidatas a fármacos. Não existem estudos biológicos para a espécie destacando a importância desse estudo para a difusão do conhecimento das espécies lá presentes.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivos Gerais

O objetivo do grupo foi realizar o estudo fitoquímico e farmacológico da espécie *Mandevilla moricandiana*, cuja ocorrência é característica nas regiões de restinga, como a do PNRJ, a fim de expandir o conhecimento científico a cerca das espécies vegetais lá presentes.

3.2 Objetivos Específicos

- Conhecer o perfil químico do extrato bruto da espécie *Mandevilla moricandiana* por Cromatografia em Camada Delgada, Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada a detector de ultravioleta (CLAE-UV);
- Realizar purificação bioguiada pelo ensaio *in vivo* de ação vasodilatadora do extrato e promover o isolamento de substâncias que possam ser responsáveis pela atividade apresentada;
- Análise das subfrações obtidas através de técnicas cromatográficas em camada delgada, Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) e Infravermelho (IV);
- Avaliação da ação vasodilatadora do extrato e das frações da *M. moricandiana*.
- Análise dos Compostos Fenólicos Totais e do Conteúdo dos Flavonoides Totais, a fim de conhecer o perfil dos metabólitos especiais lá presentes.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

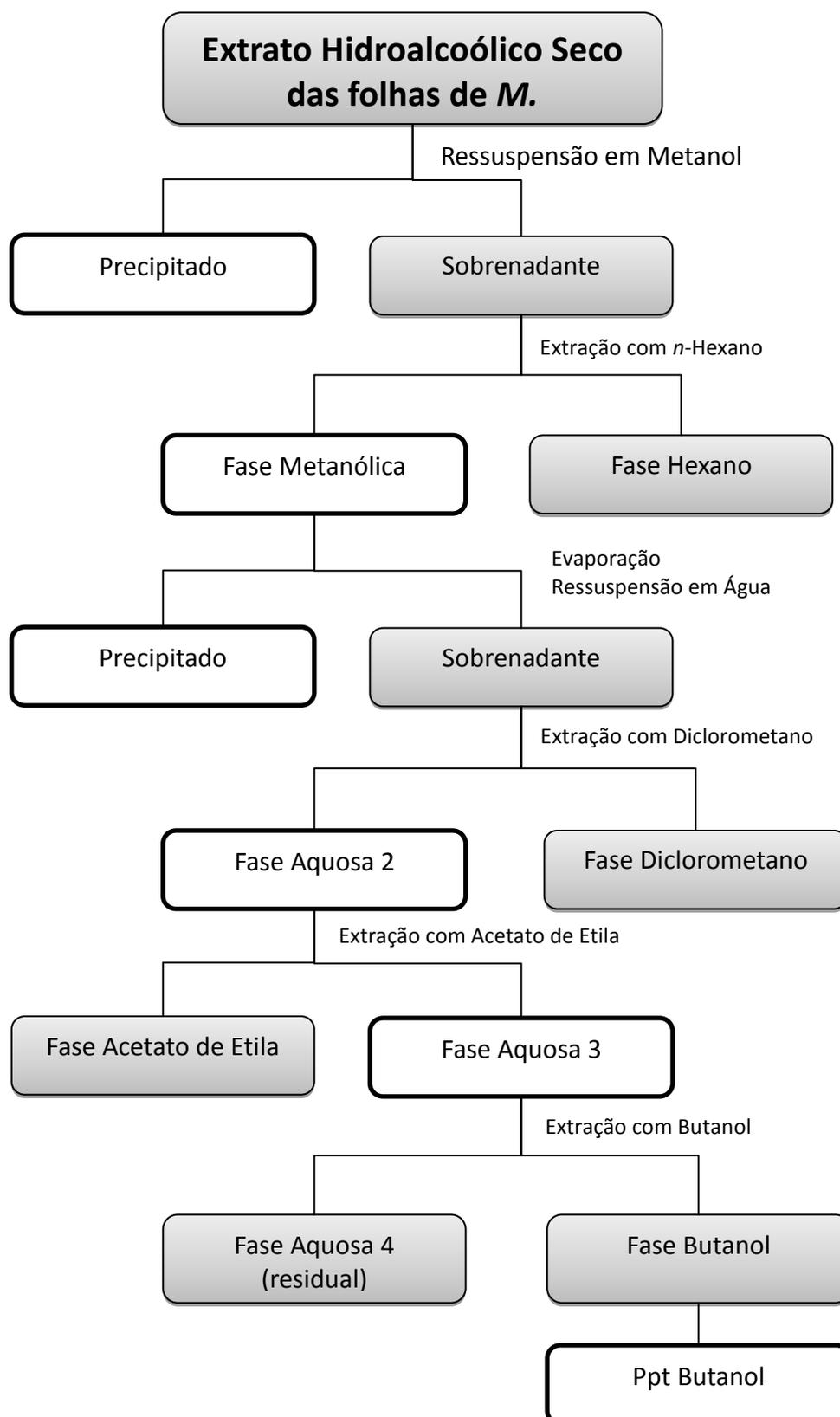
4.1 Material Vegetal

Após a seleção e identificação do material vegetal, o mesmo foi coletado pela manhã. A coleta foi feita em Carapebús-RJ, em dois locais distintos, o primeiro com coordenadas S22.27003°; O 41.64854° (15 m de altitude) e o segundo S22.26632°; O 41.65129° (18 m de altitude). A partir de uma amostra da planta foi preparada uma exsicata, cuja identificação botânica foi feita pela Prof.^a Tatiana Ungaretti Paleo Konno, e em seguida registrada no herbário do NUPEM/UFRJ, sob o número RFA38748. Após a seleção do material, este foi pesado e submetido à secagem em estufa a 40°C com circulação de ar. A secagem das folhas foi feita até que o peso estivesse constante. As folhas e o caule do vegetal foram submetidos à redução mecânica até a obtenção de fragmentos de pequenas dimensões.

4.2 Obtenção dos extratos

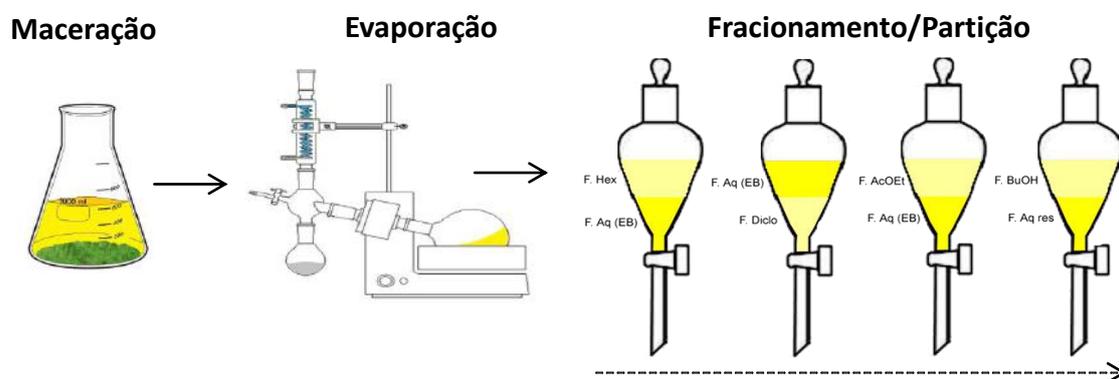
Os extratos brutos das folhas, flores, caule e rizoma foram preparados utilizando-se água e etanol, pelo método de maceração, sendo posteriormente secos e

quantificados (Esquema 1). Em seguida foi realizado um *screening* farmacológico para o extrato, bem como o estudo do perfil químico. O método de maceração a 10% (p/p) foi realizado utilizando o total de 248,88 gramas das folhas secas trituradas de *Mandevilla moricandiana*, utilizando o sistema de solvente etanol/água (7:3), totalizando 500 ml de solvente extrator por maceração estática, num frasco âmbar e o solvente periodicamente trocado mediante a ausência de manchas nas CCDs preparadas. Também foi feita maceração, à caráter comparativo, das flores, caule e rizoma da planta, utilizando 5 gramas, nas mesmas condições das folhas. Todos os extratos, antes da quantificação, foram filtrados em algodão hidrofílico. Foram separados exclusivamente para os ensaios biológicos uma massa de 7,4906g e o restante (30,6604g) foi levado ao método de fracionamento por partição líquido-líquido no funil de separação, onde o extrato bruto foi dividido em três partes para o fracionamento, utilizando solventes de polaridade crescente (hexano, diclorometano, acetato de etila e butanol), conforme descrito nos Esquemas 1 e 2. Os reveladores utilizados foram Vanilina Sulfúrica, Anisaldeído Sulfúrico, NP-PEG, Dragendorff, Ninhidrina, Vapores de Iodo, Sulfato Cérico, todos preparados conforme proposto por Alice *et al* (1995).



Esquema 1: Fluxograma do fracionamento líquido-líquido do extrato hidroalcoólico bruto das folhas de *M. moricandiana*.

O extrato bruto seco das folhas foi ressuspensionado em metanol, filtrado e particionado com hexano. Em seguida, o metanol foi retirado e o extrato restante foi ressuspensionado em água, continuando o fracionamento com diclorometano, acetato de etila e butanol. O material retido no filtro foi ressuspensionado em água e que não foi solúvel foi quantificado. Na última fração obtida (butanólica) do segundo fracionamento era visível a formação de um precipitado, que foi filtrado com algodão e lavado com metanol, tornando o precipitado branco, sendo chamado de ppt BuOH.



Esquema 2: Representação esquemática resumida do procedimento de maceração e fracionamento

4.3 Avaliação do perfil Químico por Cromatografia em Camada Delgada e Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

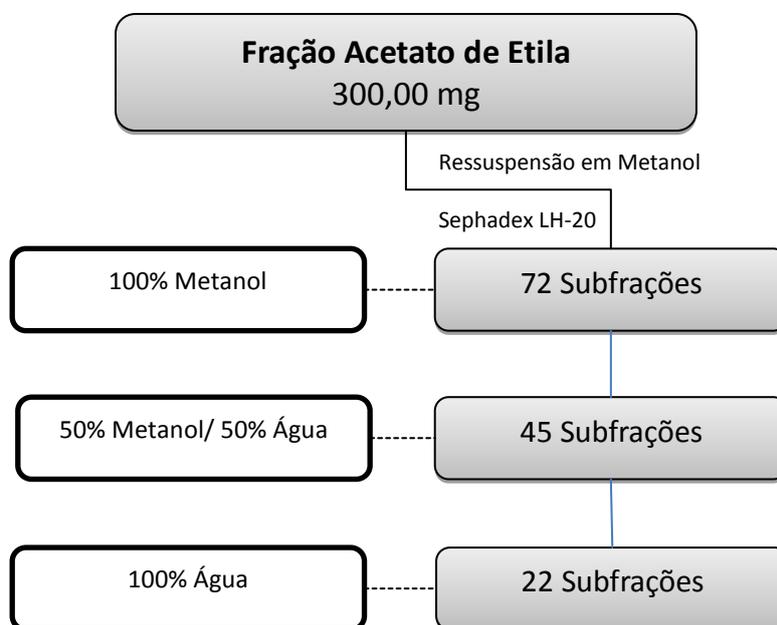
A Cromatografia de Camada Delgada foi feita utilizando cromatoplaças da marca Silicagel (Merck), utilizando as misturas de solvente BAW (8:1:1) e BAW (3:1:1). Os reveladores foram selecionados de acordo com a necessidade, utilizando-se o Anisaldeído Sulfúrico, Sulfato Cérico, NP-PEG, vapor de Iodo, Dragendorff e Ninhidrina.

Para as análises do presente trabalho foi utilizado o CLAE Shimadzu, modelo LC-10A, com detector DAD modelo L201549. As amostras contendo o extrato bruto foram feitas em duplicatas, utilizando a concentração de 10 mg/ml, diluídos em água/acetonitrila (1:1). O gradiente de solvente foi preparado utilizando uma mistura de acetonitrila e água ultrapura, com tampão de fosfato monobásico ajustado em pH 3.2. A corrida analítica foi iniciada com 100% de água e 0% de acetonitrila, e aumentando gradativamente até 15% de acetonitrila, no tempo de 10 min. Após isso, a

concentração aumentou para 25% de ACN no tempo de 20 min e para 50% de ACN no tempo de 40 min. Para finalizar, a concentração de ACN foi levada à 100% no tempo de 42 min e mantida até 47 min. Em seguida, o sistema foi retomado às condições iniciais (t= 49 min) de 0% de ACN, e mantida por mais 6 minutos, completando um total de 55 minutos de corrida. O fluxo total utilizado foi de 1,0 ml/min, com todas as amostras (exceto as curvas de calibração) uniformizadas na concentração de 10 mg/ml. A lâmpada utilizada foi de deutério e tungstênio (D2&W), com uma varredura realizada de 190 – 800 nm, com volume de injeção de 10 µl. Todas as análises foram feitas em coluna C18 (250x4,6 mm i.d.) Supelco, à temperatura ambiente.

4.4 Fracionamento cromatográfico

A fração em acetato de etila foi subfracionada empregando cromatografia em gel de Sephadex em gradiente com água e metanol foi utilizado (100% metanol, 50% metanol/50% água e 100% água – Esquema 3). As subfrações foram coletadas baseadas no volume do frasco de coleta, que eram preenchidos até aproximadamente a metade, volume máximo para a liofilização (quando necessária).



Esquema 3: Fluxograma de fracionamento em coluna de gel de Sephadex da fração acetato de etila das folhas de *M. moricandiana*.

O material coletado da coluna (Tabela 4) foi reunido baseado nas CCDs e nos cromatogramas obtidos pela CLAE. O sistema de solvente utilizado iniciou-se em

metanol 100%, e após a limpidez observada por CCD para as frações coletadas, o sistema foi trocado para 50% metanol e 50% água, e por último 100% água. As nove primeiras subfrações, após a reunião, formaram espontaneamente um cristal, que foi levado à análise de espectroscopia por infravermelho (IV). Os conjuntos foram reunidos baseados na similaridade entre as CCDs das frações e, quando necessário, por similaridade de cromatograma por CLAE.

Tabela 4: Rendimento em mg das frações oriundas da coluna em gel de Sephadex da fração acetato de etila das folhas de *M. moricandiana*.

Subfração	Massa (mg)	Subfração	Massa (mg)
M1-9	33,80	M68-69	2,90
M10	19,8	M70-75	5,60
M11	6,3	M76-80	4,90
M12	4,4	M81-84	1,8
M13-16	24	M85-87	2,80
M17-21	37,90	M88	10,2
M22	3,4	M89-92	8,70
M23-31	27,1	M93-96	3,70
M32	3,1	M97	1,2
M33-35	7	M98-100	3,50
M36-37	7,7	M101	1,3
M38	6,7	M102-104	4,10
M39	4,4	M105-106	3,6
M40-60	16,5	M107-123	7,75
M61-64	3,20	M124-128	3,3
M65-67	2,75	M129-139	8,90
Total: 282,3			

4.5 Dosagem de conteúdo de Flavonoides Totais

A dosagem do conteúdo de Flavonoides Totais (FT) foi realizada utilizando o flavonoide rutina como padrão. Para tal, foi feita a curva de calibração em cinco concentrações de rutina, de 0,01 a 4,0 µg/µl (Figura 8), utilizando o método de CLAE, com volume injetado de 1 µl e o mesmo gradiente descrito no tópico 4.3. As análises foram feitas em triplicatas.

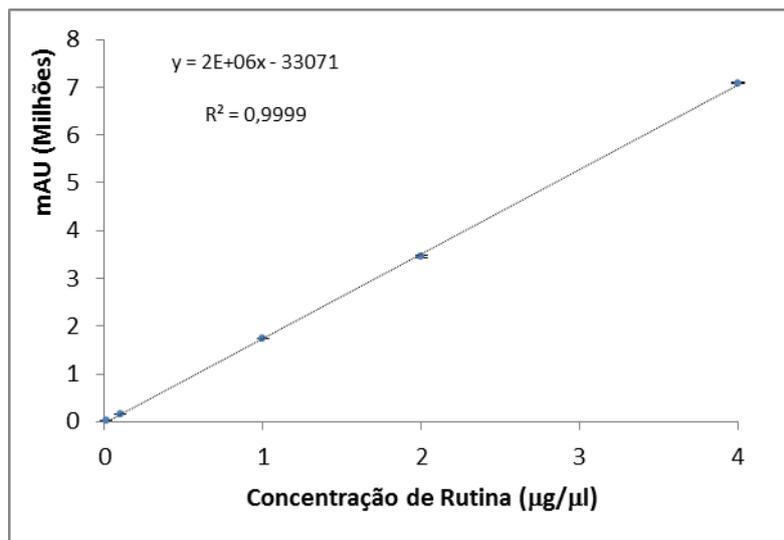


Figura 8: Curva de calibração da rutina utilizando as concentrações de 0,01; 0,1; 1; 2 e 4 µg/µl, com as análises feitas em triplicata

4.6 Compostos fenólicos totais

O Compostos Fenólicos Totais (CFT) no extrato de plantas foi determinado utilizando o método colorimétrico Folin-Ciocalteu de adaptado por Victório *et al.* (2010), com algumas modificações. Uma alíquota de 50 µl da solução da amostra (500 µg/ml) ou branco foi pipetado em diferentes locais de uma placa de 96 poços, junto com 100 µl de uma solução de 7.5% p/v de carbonato de sódio (Vetec®) e mais 100 µl de 10% do reagente Folin-Ciocalteu (Merck) foram adicionados e misturados. A amostra foi incubada por 2 horas a temperatura ambiente. A absorbância foi medida no comprimento de onda de 740 nm num leito de microplacas (Biot-Tek Instruments Inc., modelo µQuant) utilizando o ácido gálico (Sigma-Aldrich®) como padrão (5, 10, 25, 50, 125 e 250 µg/ml). A quantificação dos CFT foi determinado pela curva de calibração $y = 0.0063x + 0,958$ ($R^2 = 0.932$) e expressa em mg equivalentes de ácido gálico (mGAE) por grama de extrato seco. As análises do extrato bruto das folhas foram feitas em duas concentrações, 250mg/ml e 500mg/ml. Todas as medidas foram feitas em triplicata.

4.7 Análise por Infravermelho

A análise por infravermelho foi feita realizada utilizando um leitor de infravermelho, modelo IRPrestige-21. Para tal, foi preparada uma amostra da

subfração em 1% em brometo de potássio, que em seguida foi lida por 20 vezes, resolução de 2 cm^{-1} e apodização Happ-Genzel. O background foi feito utilizando o aparato de análise de sólidos com o anel sem a pastilha. A análise foi feita em colaboração com o Laboratório de Controle de Qualidade de Fármacos e Medicamentos – Faculdade de Farmácia – UFRJ *Campus* Fundão.

4.8 Atividade Biológica: Efeito Vasodilatador

Os experimentos foram realizados com ratos Wistar machos (200-280 g), eutanasiados por deslocamento cervical sob anestesia geral, para a retirada da artéria aorta. A artéria aorta foi dissecada e limpa, sendo posteriormente dividida em anéis, que foram posicionados em hastes experimentais em cubas verticais preenchidas com solução Krebs-Henseilet continuamente oxigenada com mistura carbogênica (95% O_2 / 5% CO_2), à 37°C. Uma das extremidades do tecido foi conectada a um transdutor de tensão isométrica (MLT0201; ADInstruments) para o registro de tensão isométrica. Em seguida, esperou-se estabilizar o aparelho por 1 hora e 30 minutos (período de equilíbrio) e nos tempos de 20, 40 e 60 minutos a solução da cuba foi trocada.

Após o período de equilíbrio da preparação a contratatura do músculo liso foi induzida com a adição de $10 \mu\text{M}$ de fenilefrina (Phe) à cuba contendo a solução de Krebs. Uma vez estabelecido o platô da contratatura, foram adicionados $10 \mu\text{M}$ de acetilcolina (Ach). Este foi considerado íntegro quando o relaxamento induzido por acetilcolina ($10 \mu\text{M}$) foi superior a 80%. A remoção mecânica do endotélio foi confirmada pela ausência de relaxamento (ou inferior 10%) frente à acetilcolina.

Após novo período de equilíbrio da preparação, a contratatura do músculo liso vascular foi induzida novamente com $10 \mu\text{M}$ de fenilefrina, sendo adicionadas concentrações crescentes do extrato bruto e frações (0,1 $\mu\text{g/ml}$; 0,3 $\mu\text{g/ml}$; 1,0 $\mu\text{g/ml}$; 3,0 $\mu\text{g/ml}$; 10,0 $\mu\text{g/ml}$; 30,0 $\mu\text{g/ml}$) da *Mandevilla moricandiana*. Foram utilizados anéis de aorta com e sem endotélio com o objetivo de verificar a importância do endotélio vascular para o efeito vasodilatador (RAIMUNDO *et al.*, 2006). Todos os sinais gerados foram digitalizados pelo sistema Power Lab Chart.

Tabela 5: Equipe do projeto, com suas ocupações e respectivas contribuições.

Equipe do Projeto		
	Ocupação	Função
Márcio Vinícius	Graduando	Extração e Isolamento
Letícia Ferreira	Mestre	Efeito vasodilatador
Juliana Montani	Professora colaboradora	Efeito vasodilatador
Raimundo		
Ivana Leal	Co-orientadora (Dr ^a)	Acompanhamento e orientação
Michelle Muzitano	Orientadora (Dr ^a)	Acompanhamento e orientação

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Rendimentos das frações obtidas dos processos de fracionamento líquido-líquido

Após o fracionamento, as massas foram secas e quantificadas (Tabela 6). A Figura 9 representa graficamente o percentual encontrado para cada massa obtida nas frações obtidas. As frações hexânica, diclorometânica e acetato de etila mostraram um baixo percentual de rendimento obtido em relação ao extrato bruto, provavelmente devido ao método de maceração hidroalcoólico, ou seja, o extrato possui caráter hidrofílico e lipofílico. As frações seguintes representaram uma alta quantidade de compostos hidrofílicos.

Todas as frações foram colocadas em banho-maria. Entretanto parte da fração butanólica obtida foi perdida por excesso de aquecimento. A quantidade elevada de material insolúvel após a ressuspensão em água também aparenta ser pelo mesmo motivo, apesar de em todas as três partições serem encontrados valores relativos semelhantes. Outro ponto a ser considerado é que a filtração feita após a maceração foi realizada em algodão hidrofílico, podendo ter passado substâncias insolúveis para a quantificação do extrato bruto. A massa total obtida da maceração das folhas (Extrato bruto -EB) totalizaram 38,151 gramas. O rendimento total observado foi de 15,33 % (p/p) ou 15,33g/100g.

Tabela 6: Massa total obtida do fracionamento com Hexano, Diclorometano, Acetato de Etila, e Butanol oriundos do EB de folhas de *M. moricandiana*. O rendimento foi calculado através da divisão entre a massa total obtida das frações dividida pela massa inicial do fracionamento x 100, com resultados expressos em %.

Frações	Massa (g)
F. Hexano	0,5721
F. Diclorometano	0,1048
F. Acetato de Etila	0,3938
F. Butanol	2,4126
F. ppt butanol	0,5525
F. Aquosa Residual	6,0446
Filtrado Insolúvel	16,3667
Total (g)	26,4471
EB total	30,6604
Rendimento ($F_{total}/E_{b_{total}} * 100$)	86,26%

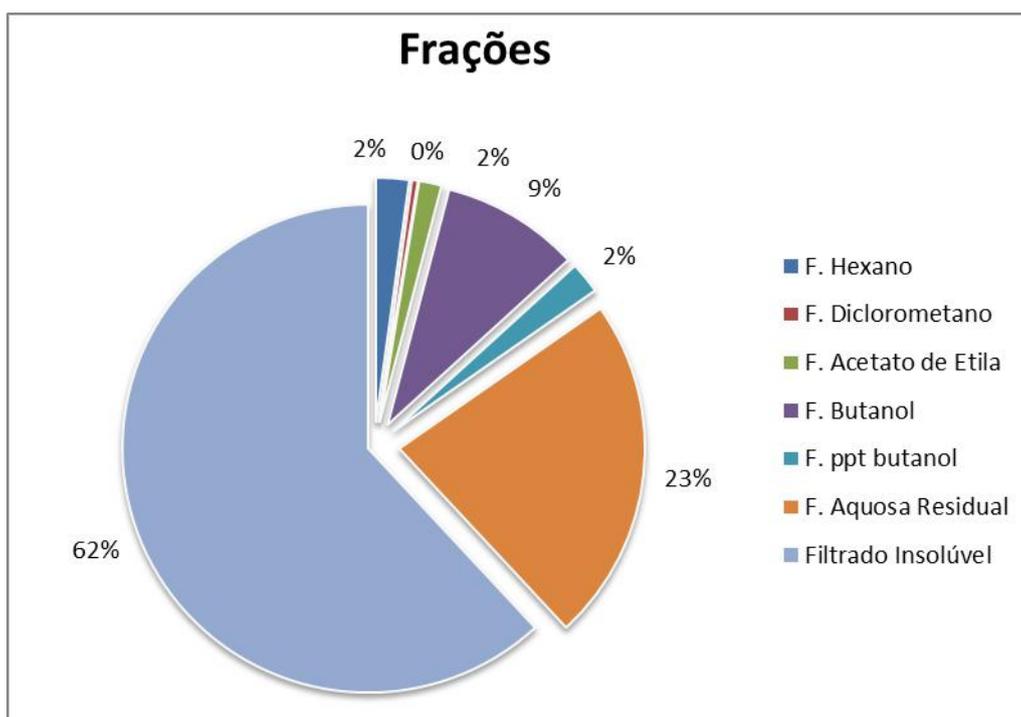


Figura 9: Massa total obtida do fracionamento com Hexano, Diclorometano, Acetato de Etila, e Butanol.

5.2 Dosagem de Compostos fenólicos totais no extrato bruto

A dosagem de compostos fenólicos totais mostrou uma quantidade aparentemente constante quando comparados entre as duas concentrações testadas (Figura 10), conforme expresso na Tabela 7. Este ensaio (Figura 11) foi realizado

utilizando duas concentrações distintas do extrato para confirmação da eficácia do método. Foi observado que o teor do EB em concentrações iniciais diferentes não foi significativo.

Apesar dessa quantificação ser relativamente comum, poucos ensaios foram descritos na literatura para a família Apocynaceae. Gacche e Dhole (2011) demonstraram que o extrato etanólico das folhas de *Catharanthus roseus* apresentou 80 mg/g de fenólico totais, enquanto Kumar *et al.* (2010) encontraram para *Alstonia scholaris* a mesma quantidade, mas por extração com metanol 80%. Ambos os resultados estão bem próximos do resultado encontrado para a *Mandevilla moricandiana*, conforme mostrado na Tabela 8.

Tabela 7: Concentrações encontradas para o extrato da *Mandevilla moricandiana*, expresso em miligramas de equivalente de ácido gálico (mGAE) por grama de extrato bruto.

	Concentração do extrato bruto ($\mu\text{g/ml}$)	mGAE%(p/p)	mg/g GAE
<i>M. moricandiana</i>	500	7,303943	73,03943 \pm 1,628
	250	7,726165	77,26165 \pm 4,796

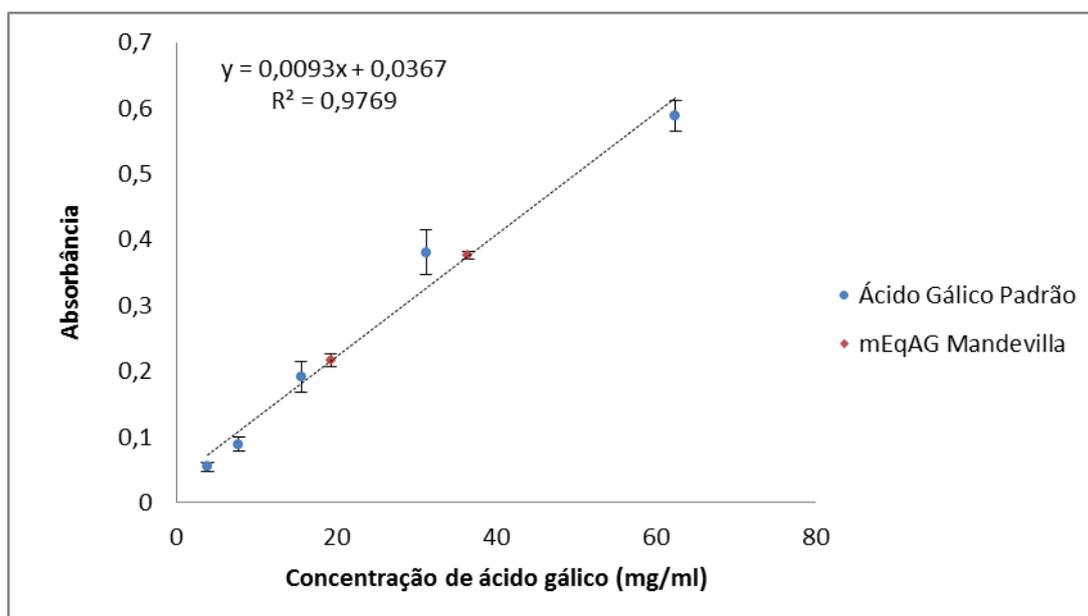


Figura 10: Representação gráfica das absorbâncias encontradas para o padrão do ácido gálico e do extrato hidroalcoólico de folhas de *Mandevilla moricandiana*.

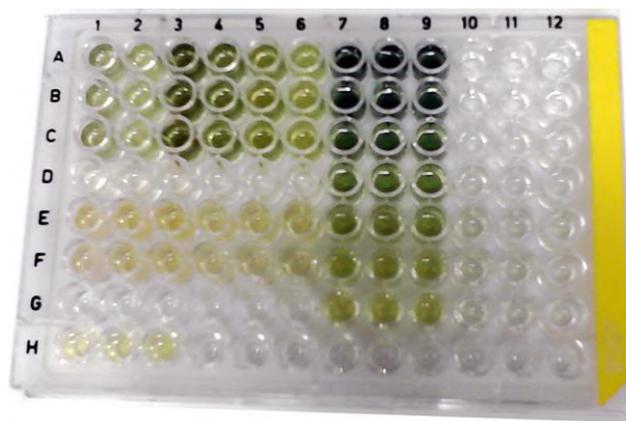


Figura 11: Imagem do ensaio de Folin-Ciocalteu

5.3 Análise do Perfil Químico do Extrato bruto das Folhas, Flor, Caule e Rizoma da *M. moricandiana* por CCD e CLAE-UV

As cromatoplasmas indicadas na Figura 12 foram feitas utilizando o extrato bruto das folhas e suas respectivas frações, e indicaram a presença de flavonoides na fração butanólica (A e B), com poucas substâncias com absorção no visível em outras frações. A fração acetato de etila foi novamente preparada, de forma mais concentrada, e apresentada na figura C, indicado também a alta quantidade de flavonoides, após os reveladores utilizados.

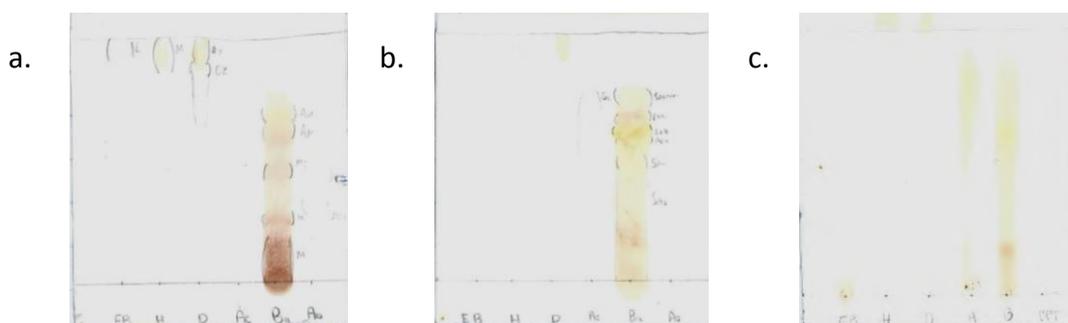


Figura 12: Cromatoplasmas do extrato bruto das folhas e frações da *Mandevilla moricandiana*. Revelação de Sulfato Cérico e NP-PEG. EB = Extrato Bruto, H = Fração Hexano, D = Fração Diclorometano, Ac = Fração Acetato de Etila, Bu = Fração Butanol e Aq = Fração aquosa residual.

As cromatoplasmas feitas com os extratos brutos das partes da planta, indicada na Figura 13, foram realizadas a caráter comparativo, e indicam a presença de manchas similares entre o extrato bruto da folha e das flores.

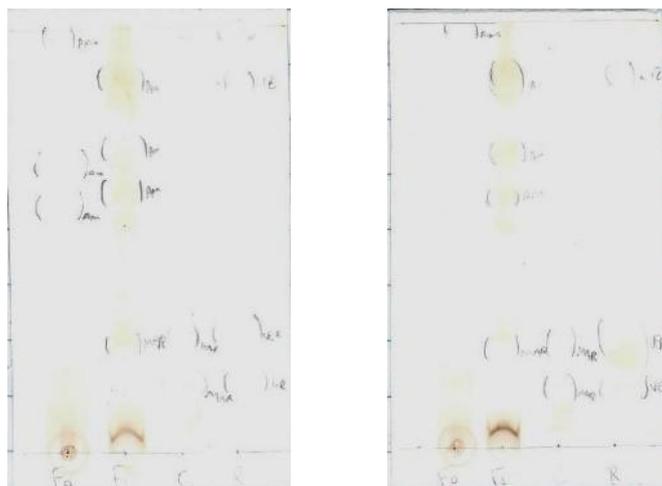


Figura 13: Cromatoplas das Folhas (Fo), Flores (Fl), Caule (C) e Rizoma (R) e frações da *Mandevilla moricandiana*. Revelação com Anisaldeído Sulfúrico e Sulfato Cérico, respectivamente.

As Figuras 14 a 17 mostram o cromatograma do extrato bruto das folhas, flores, caule e rizoma, respectivamente, da *Mandevilla moricandiana*, a 254 nm. Para que os dados obtidos com a curva de calibração da rotina pudessem ser comparados com dados dos cromatogramas, foi necessário que as áreas da primeira fossem divididas por 10, pois os volumes injetados foram diferentes. As tabelas anexadas aos cromatogramas das Figuras 12 a 15 mostram os tempos de retenção e a área relativa dos picos integrados pelo software LCSolution.

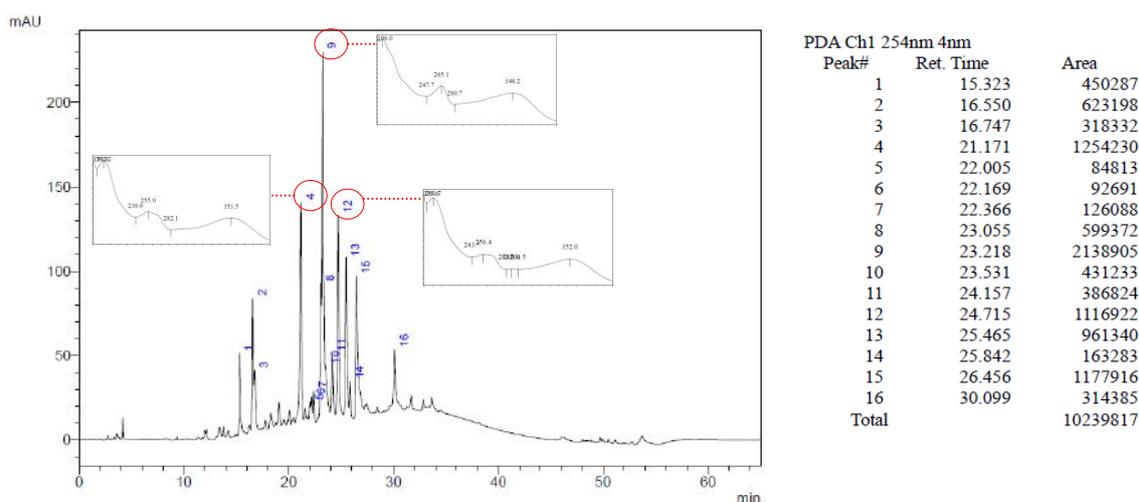


Figura 14: Cromatograma do extrato bruto hidroalcoólico das folhas a 254 nm.

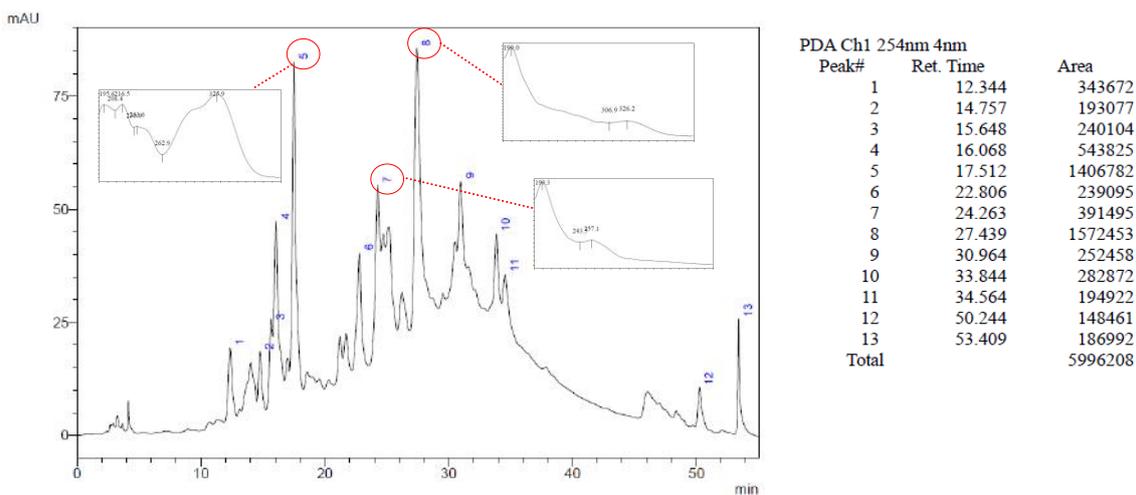


Figura 15: Cromatograma do extrato bruto hidroalcoólico do caule a 254 nm.

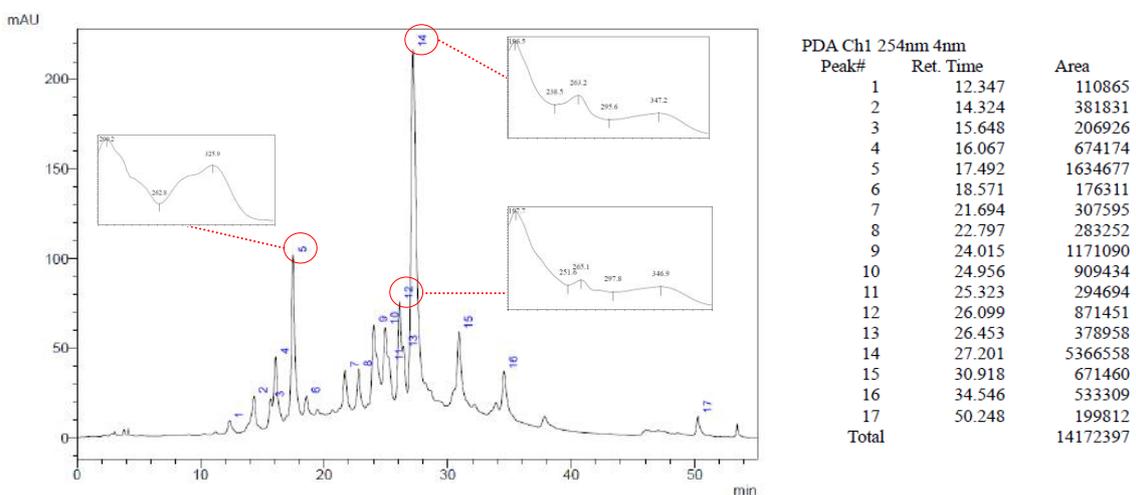


Figura 16: Cromatograma do extrato bruto hidroalcoólico das flores a 254 nm.

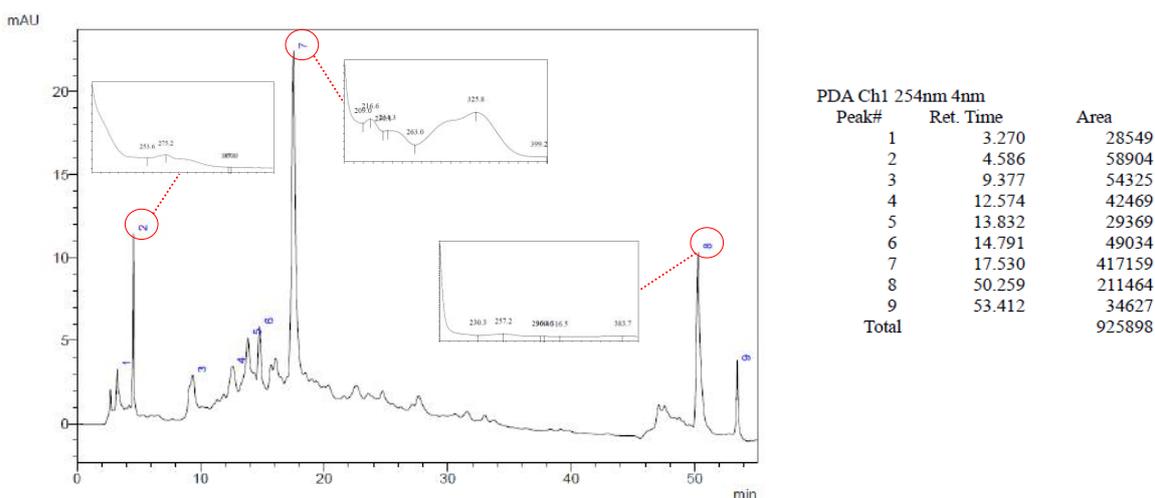


Figura 17: Cromatograma do extrato bruto hidroalcoólico do rizoma a 254 nm.

Os extratos brutos analisados apresentaram poucos picos similares e com tempo de retenção em comum. Foi observado a presença de um espectro característico de fenilpropanoides no Tr de 16,55 min para o EB das folhas (Figura 14a), enquanto no EB da caule, flor e rizoma (Figuras 15, 16 e 17, respectivamente) apresentaram fenilpropanoides com Tr bem próximos, em cerca de 17,5 min. Os extratos das folhas e flores apresentaram picos em comum, com espectro semelhante a flavonoide, com tempo de retenção semelhante e diferenças apenas de intensidade, conforme mostrado na Tabela 8. Outros picos semelhantes a flavonoides foram encontrados para as flores, mas nenhum deles era majoritário também nas folhas. Vale ressaltar que o flavonoide majoritário nos extratos das folhas e flores (Tr ~24,8 min) aparentam ser o mesmo. Os extratos brutos do caule e rizoma não apresentaram substâncias com espectro de ultravioleta semelhante a flavonoides (Figura 16c e 16d).

As frações acetato de etila, butanol e fração aquosa residual (Figuras 18- 20) foram levadas à análise por CLAE-UV, após solubilização em acetonitrila: água. Como as frações hexânica e diclorometânica não são solúveis em solventes polares, tais frações não foram analisadas por CLAE-UV.

Tabela 8: Picos de flavonoides comuns nos EB das folhas e EB das flores. T. Ret.: Tempo de Retenção

EB Folha			EB Flores		
T. Ret. (min)	λ máx (nm)	Área	T. Ret. (min)	λ máx (nm)	Área
24,715	200,6/ 256,4/ 352,0	1116922	24,956	200,1/ 264,8/ 349,3	909434
25,465	201,0/ 256,4/ 346,9	961340	25,323	199,8/ 265,3/ 343,6	294694

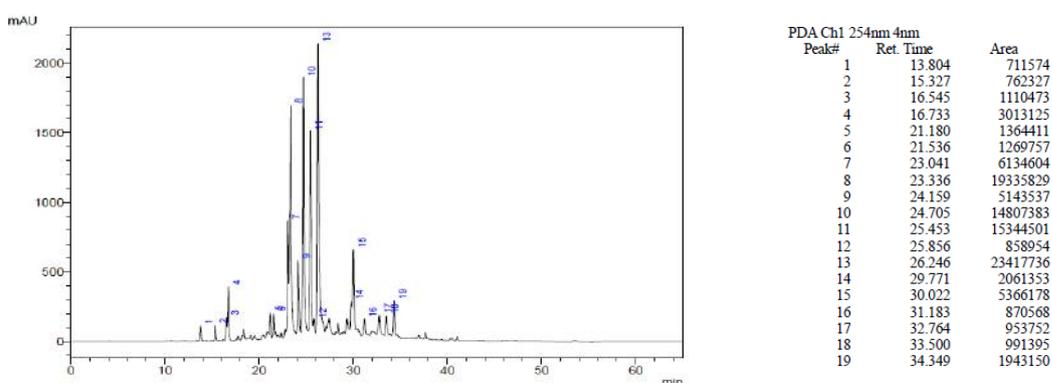


Figura 18: Cromatograma da fração acetato de etila proveniente do EB hidroalcoólico de folhas de *M. moricandiana*, a 254 nm.

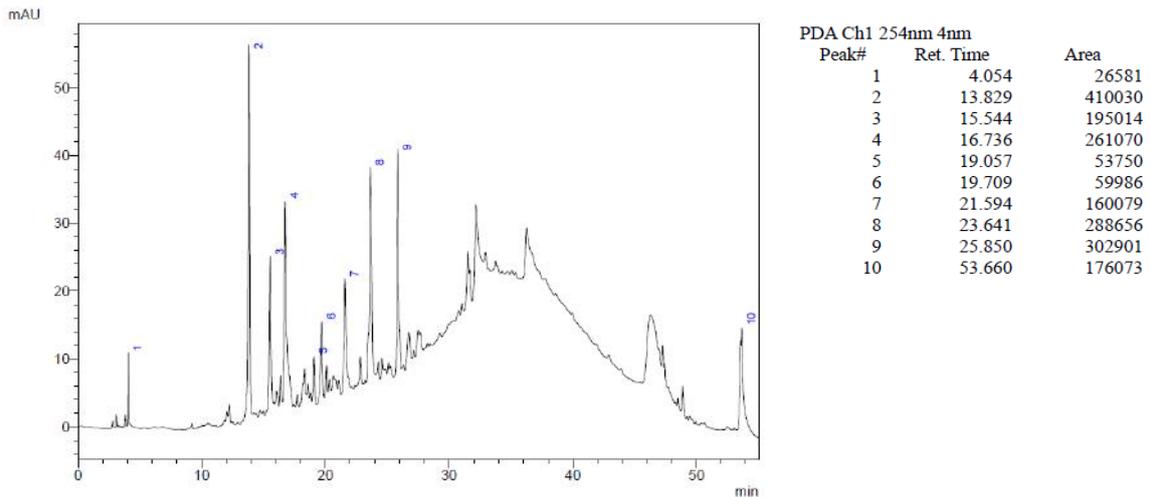


Figura 19: Cromatograma da fração butanólica proveniente do EB hidroalcoólico de folhas de *M. moricandiana*, a 254 nm.

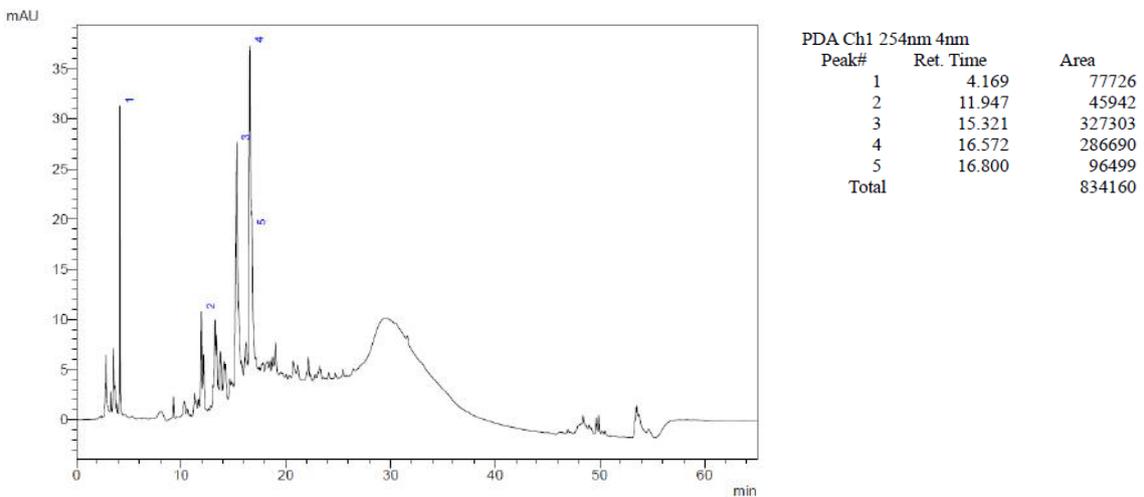
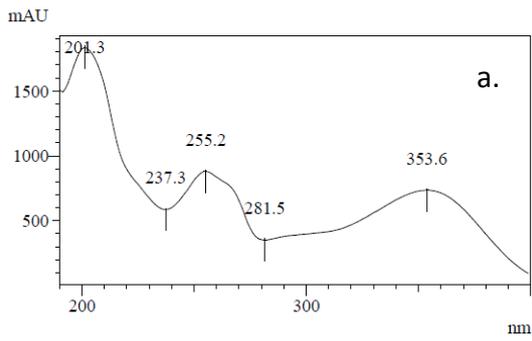


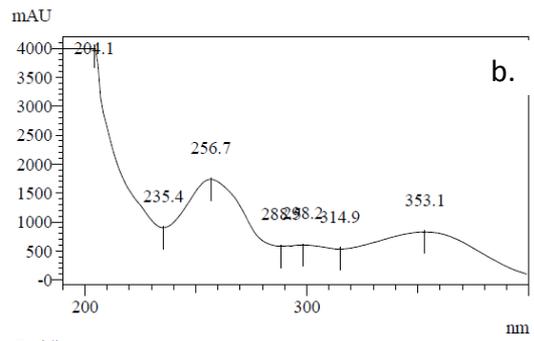
Figura 20: Cromatograma da fração aquosa residual proveniente do EB hidroalcoólico de folhas de *M. moricandiana*, a 254 nm.

Os espectros de ultravioleta obtidos nas frações acetato de etila, butanol e extrato bruto estão dispostos na Figura 21 e 22 (apenas para os picos majoritários). Estes mesmos picos podem ser também observados no cromatograma do extrato bruto. Para melhor visualização, foram plotados os gráficos em três dimensões, conforme mostrado na Figura 23. Importante destacar a diferença de intensidade ao compará-los, pois a fração butanólica possui muito menos moléculas que absorvem que a fração acetato de etila.

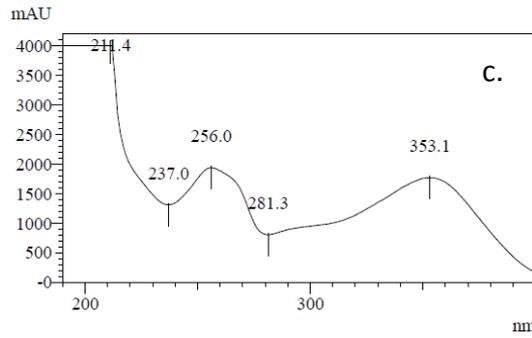
Peak# : 7
Retention Time : 23.041



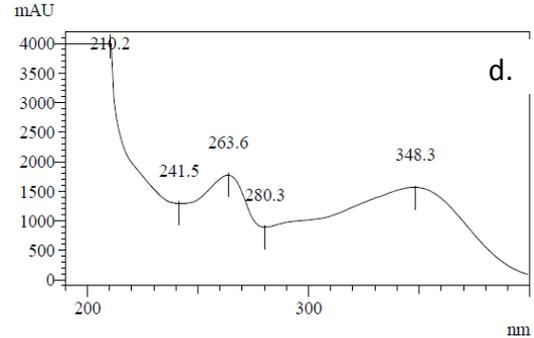
Peak# : 8
Retention Time : 23.336



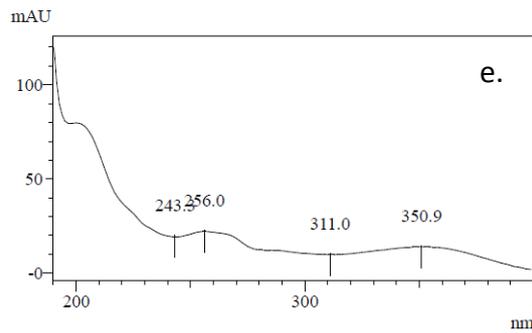
Peak# : 10
Retention Time : 24.705



Peak# : 11
Retention Time : 25.453



Peak# : 7
Retention Time : 21.594



Peak# : 8
Retention Time : 23.641

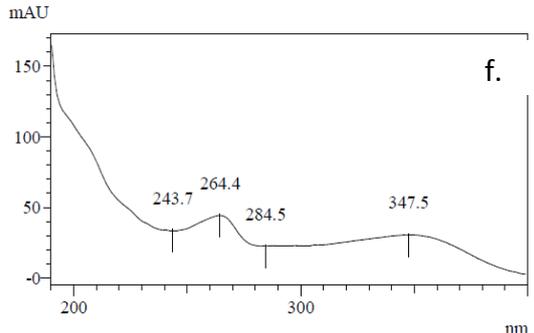
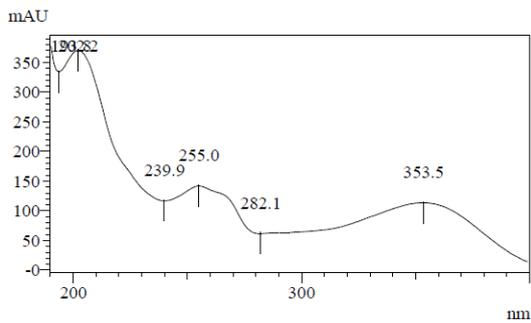
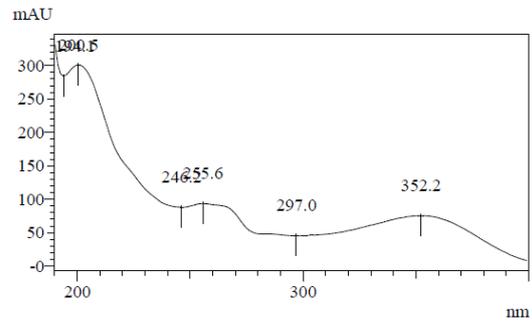


Figura 21: Espectros de ultravioleta com padrão flavonoídico semelhantes à rutina, obtidos nas frações de acetato de etila (a-d) e butanólica (e, f).

Peak# : 4
Retention Time : 21.171



Peak# : 8
Retention Time : 23.055



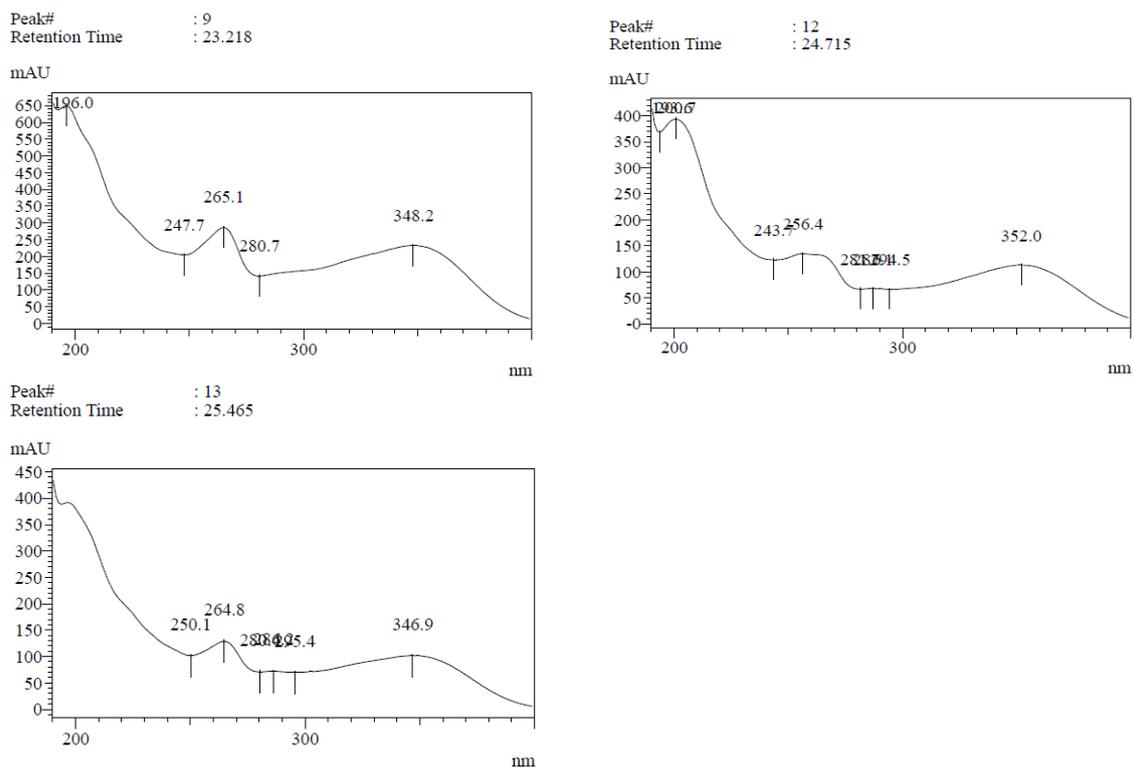


Figura 22: Espectros de ultravioleta com padrão flavonoídico semelhantes à rutina, obtidos no extrato bruto hidroalcoólico de folhas de *M. moricandiana*.

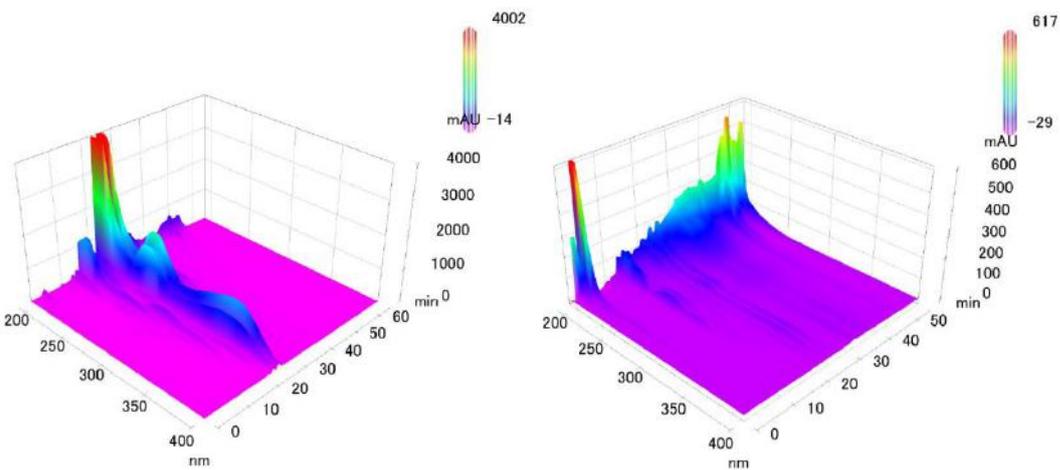


Figura 23: Cromatograma vs Espectro em três dimensões das frações acetato de etila (a) e butanol (b).

5.4 Dosagem do conteúdo de flavonoides totais no extrato e nas frações em acetato de etila e butanólica

Foram quantificados os flavonoides presentes nos extratos. Para tal, foram selecionados os picos cujo espectro de ultravioleta são semelhante ao da rutina ($\lambda_{\text{máx}}$ 202, 255, 354nm) (Figura 24) e calculado a massa correspondente em miliequivalente de rutina (mEqR), conforme mostrado nas Tabelas 9 e 10.

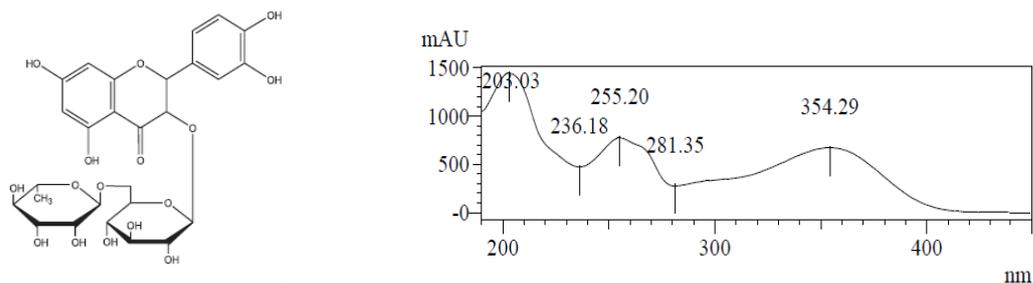


Figura 24: Estrutura química e espectro de UV da rutina.

Tabela 9: Massa em miliequivalente de rutina (em mEqR) de picos similares ao espectro de rutina para o extrato bruto, a fim de calcular o conteúdo de flavonoides totais. As análises foram feitas em duplicata.

FLAVONOIDES TOTAIS NO EXTRATO BRUTO		
Picos	Área (254 nm)	mEqR
4	1254230	0,6436505
5	84813	0,058942
6	92691	0,062881
8	599372	0,3162215
9	2138905	1,085988
11	386824	0,2099475
12	1116922	0,5749965
13	961340	0,4972055
Total		3,4498325

Tabela 10: Massa em miliequivalente de rutina (em mEqR) de picos similares ao espectro de rutina para as frações acetato de etila e butanol, a fim de calcular o conteúdo de flavonoides totais. As análises foram feitas em duplicata.

Flavonoides Totais na fração Butanólica		
Picos	Área (254 nm)	mEq Rutina
7	160079	0,02453945
8	288656	0,0309683
Total		0,05550775

Flavonoides Totais na fração Acetato de Etila		
Picos	Área (254 nm)	mEq Rutina
5	1364411	0,08475605
7	6134604	0,3232657
8	19335829	0,98332695
10	14807383	0,75690465
11	15344501	0,78376055
Total		2,9320139

Os resultados mostraram que as frações acetato de etila e butanol concentraram 86,6% dos flavonoides quantificados para o extrato bruto, o que já era esperado, se considerarmos suas características físico-químicas. Em relação ao rendimento, os flavonoides representam 3,45% da massa total do EB.

Até o momento não foram descritos na literatura a presença de flavonoides para o gênero *Mandevilla*, mas alguns flavonoides já foram encontrados na família Apocynaceae. Brun *et al.* (1999) descreveu a presença de sirigentina, um flavonol obtido da haste de *Catharanthus roseus*, isolado após extração por Soxhlet com *n*-hexano. Para essa mesma espécie também foram descritos dois outros flavonoides, a quercetina e o kaempferol, ambos tri-glicosilados (Nishibe, 1996). As antocianidinas rosinidina e metilcianidina também já foram encontradas nas flores de *Catharanthus roseus* (TOKI *et al.*, 2008).

Para a *Alstonia macrophylla* já foi relatado a presença dos flavonoides vitexina, mincetina e tricina, todos extraídos das folhas (PARVEEN *et al.*, 2010). O extrato bruto das folhas de *Carissa opaca*, obtido por extração com metanol, indicou a presença dos flavonoides isoquercetina, hiperosídeo, vitexina, miricetina e kaempferol (SAHREEN,

KHAN E KHAN, 2011). A quercetina e o kaempferol também foram encontrados nas folhas da espécie *Nerium oleander* (SIDDIQUI *et al.*, 2012).

5.5 Ensaios biológicos: efeito vasodilatador

O efeito vasodilatador foi investigado de acordo com a tensão isométrica de aorta isolada de ratos machos Wistar, sendo que todos os protocolos foram aprovados pelo CEUA-CC (Protocolo Macaé01). O extrato etanólico de folhas de *M. moricandiana* não apresentou efeito vasodilatador em anéis de aorta sem endotélio (Figura 25), mas produziu relaxamento de anéis de aorta com endotélio de forma dependente da concentração, com efeito máximo superior a 80% e concentração inibitória média (CI₅₀) de $0,82 \pm 0,10$ µg/mL, indicando que o extrato é dependente da liberação dos fatores vasorelaxantes produzidos pelo endotélio vascular.

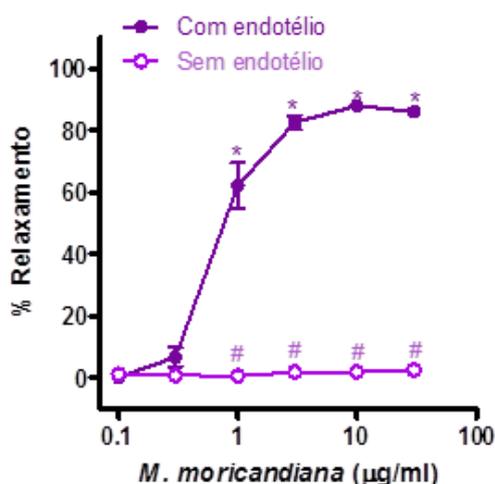


Figura 25: Curvas concentração-resposta do extrato de *M. moricandiana* em aortas com e sem endotélio. Os dados representam a média \pm E.P.M. de 5-7 experimentos. *P<0,05 vs controle, #P<0,05 vs com endotélio.

A Figura 26 apresenta os dados obtidos após a avaliação do efeito das frações do extrato bruto etanólico em aortas com endotélio. Não foram obtidos resultados significativos na fração hexânica (A), diclorometânica (B) e no precipitado da fração butanólica (C), visto que não alteraram significativamente a contração induzida pela fenilefrina. Já a fração em acetato de etila (D), fração onde observou-se uma alta concentração de flavonoides, produziu intenso relaxamento do músculo liso vascular, sendo este de $88,76 \pm 3,95$ % (n=6, P<0,05) na concentração de 30 µg/mL. A CI₅₀ obtida

para fração em acetato de etila ($10,64 \pm 1,69 \mu\text{g/ml}$) foi superior à encontrada para o extrato bruto ($P > 0,05$). A fração butanólica e a fração aquosa residual apresentaram difícil solubilização em água ou DMSO, sendo impossibilitado de fazer as análises com tais frações. Ferreira (2013) sugere o efeito vasodilatador encontrado para a fração acetato de etila esteja relacionado com a ativação da via NO/GMPc, mediada em parte pelos receptores de histamina H1.

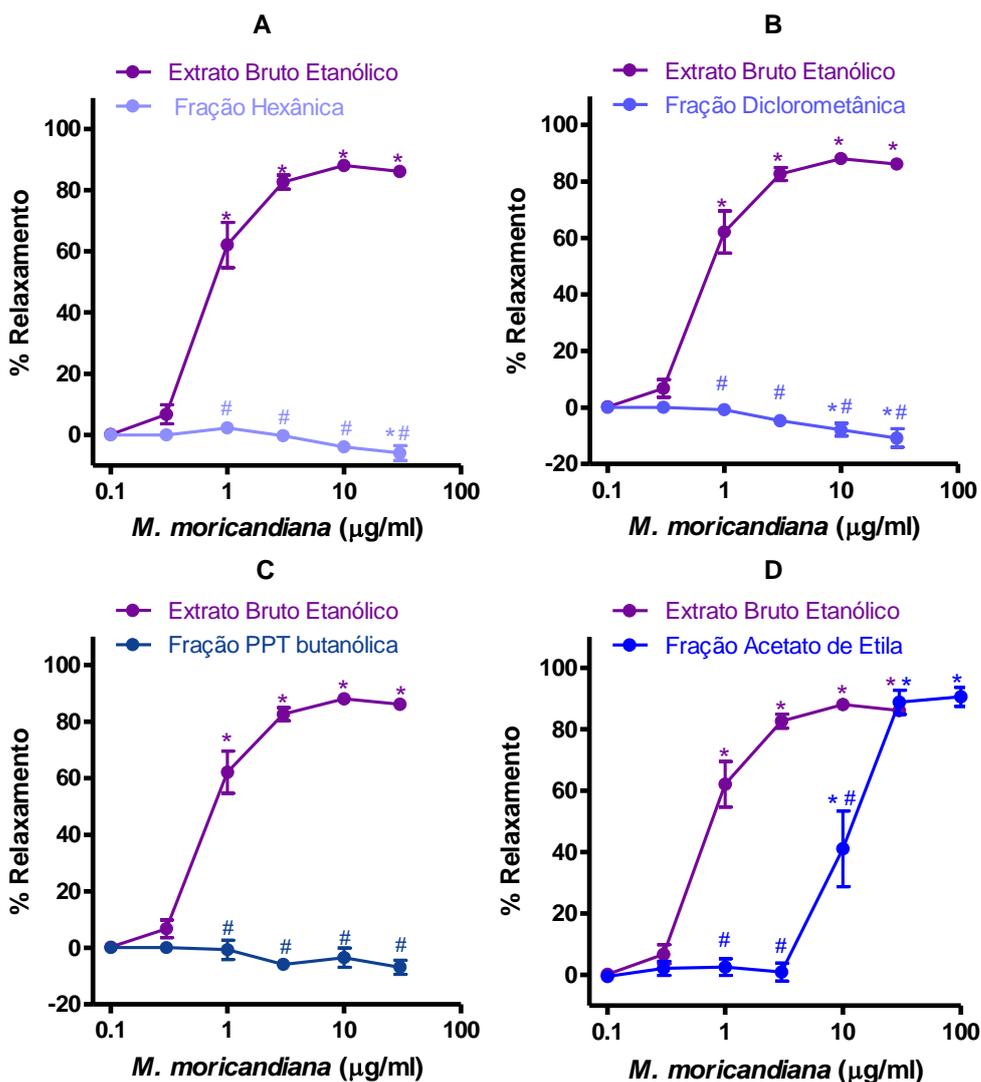


Figura 26: Efeito das frações do extrato etanólico de *M. moricandiana* no músculo liso vascular. Curvas concentração-resposta da fração hexânica (A), fração diclorometânica (B), precipitado da fração butanólica (C) e fração acetato de etila (D) em aortas com endotélio. Os dados representam a média \pm E.P.M. de 5-7 experimentos. * $P < 0,05$ vs controle, # $P < 0,05$ vs extrato bruto etanólico.

O resultado observado para a fração acetato de etila, a mais ativa no ensaio da atividade vasodilatadora, coincide com o alto conteúdo flavonoídico encontrado no ensaio de flavonoides totais, visto que tal fração possui grande parte dos flavonoides encontrados. A fração butanólica provavelmente também teria atividade no ensaio, visto que alguns flavonoides são comuns com a fração acetato de etila, se compararmos os espectros de ultravioleta. Dessa forma, parece plausível atribuir tal efeito aos flavonoides, visto que muitas moléculas dessa classe possuem atividade vasodilatadora já descritas na literatura, como a catequina (GHAYUR *et al.*, 2007), o dihidroxiflavonol (WANG *et al.*, 2004), diocleina (LEMOS *et al.*, 1999), quercetina (DUARTE *et al.*, 1993; VIZCAÍNO *et al.*, 2002) e kaempferol (VIZCAÍNO *et al.*, 2002) (Figura 27). Outros autores atribuem que a atividade vasodilatadoras no endotélio possa ser oriunda dos compostos fenólicos no contexto geral, como sugere PORTERI *et al.* (2010), atribuindo a tal efeito aos polifenóis presentes no vinho, através do efeito sinérgico. Vale ressaltar que os flavonoides quercetina e kaempferol e seus glicosídeos já foram relatados para a família Apocynaceae e podem estar presentes na espécie em estudo. Podendo então estar relacionados com a atividade vasodilatadora encontrada.

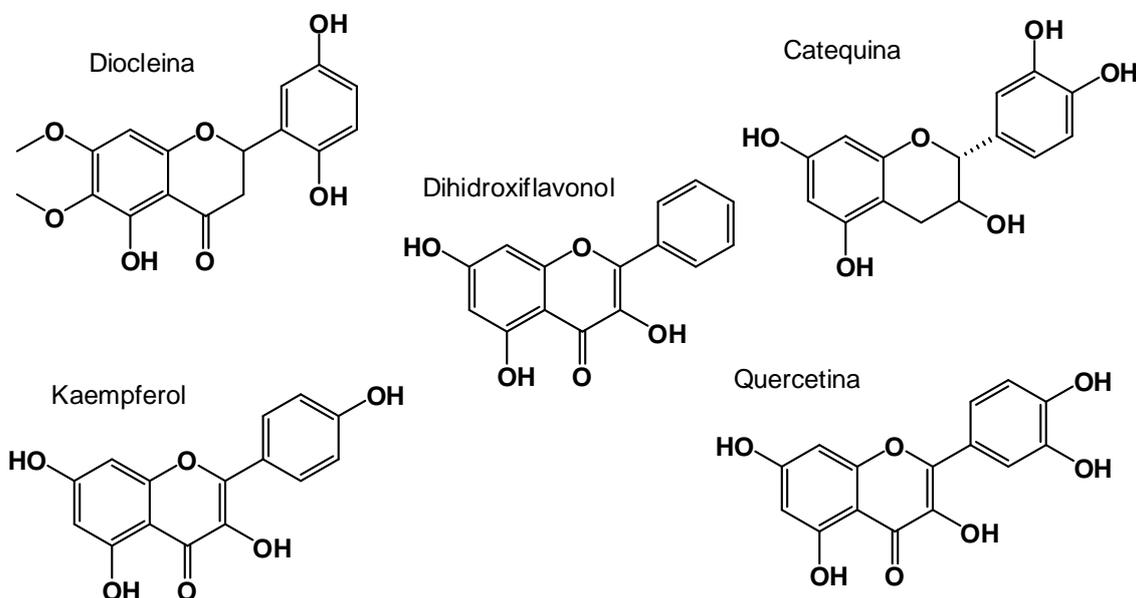


Figura 27: Estrutura de alguns flavonoides com atividade vasodilatadora

A ação vasodilatadora dependente do endotélio normalmente está associada a duas vias principais, a via da óxido nítrico sintase e via das prostaciclinas. Dentre os

flavonoides citados, foi visto que a diocleina e a catequina exercem atividade dependente do endotélio, sendo que a primeira atua diretamente na oxido nítrico sintase (LEMOS *et al.*, 1999), enquanto a última atua via ativação muscarínica (GHAYUR *et al.*, 2007). A ação independente de endotélio também foi vista para a diocleina, através da inibição das contrações dependentes da ativação da proteína quinase C, a inibição do influxo de cálcio através de canais de cálcio voltagem-dependente e, em pequena parte, pela inibição da liberação de cálcio armazenado sensível à noradrenalina. O dihidroxiflavonol, por sua vez, apresenta vasodilatação parcialmente dependente do endotélio, mediado pela óxido nítrico sintase (CHAN, 2000). Tal efeito pode ser confirmado pela ausência de vasodilatação após a adição de N-nitro-L-arginina (WANG *et al.*, 2004).

Quercetina e o kaempferol possuem atividade independente do endotélio, mas não possui mecanismo elucidado. Entretanto, foi visto que em ambos os casos o efeito vasodilatador não são causados ou modulados por fatores endoteliais ou nucleotídeos cíclicos e não estão relacionadas com alterações na concentração de cálcio intracelular (VIZCAINO *et al.*, 2002). Apesar disso, tais resultados não excluem um efeito da quercetina sobre a função endotelial, porque, após a administração durante cinco semanas em ratos espontaneamente hipertensos, a quercetina restaurou o relaxamento de forma dependente do endotélio (DUARTE *et al.*, 2001).

5.6 Análise por Infravermelho da fração obtida da purificação da Fração em Acetato de etila

Devido à atividade farmacológica apresentada no ensaio biológico, a fração acetato de etila foi selecionada para iniciar o processo de purificação, através de coluna Sephadex, conforme descrito na metodologia. O primeiro conjunto de subfrações (M1-5) obtidas na coluna Sephadex foram reunidas e submetidas à análise por infravermelho, conforme mostrado na Figura 28. As subfrações M6-9 apresentaram massa irrisória, possuindo aspecto semelhante ao primeiro conjunto, sendo reunidas ao final das análises por IV. Tais subfrações foram reunidas por apresentarem pureza, com tempo de retenção semelhante na placa de CCD e na análise por CLAE. A faixa inicial de 3444 cm^{-1} é característica de um grupamento

hidroxila, apesar de não apresentar o pico mais largo. Por isso, também existe a possibilidade de que tal grupamento possa ser um grupamento amida (superposto), que pode ser confirmado pelo pico em aproximadamente 1690 cm^{-1} (não integrado nas condições analíticas), que indica a presença de um grupamento NH livre de amidas, e como é um singlete, trata-se de uma amida secundária. A presença de um pico de baixa intensidade em 1570 cm^{-1} indica a presença de NH de amins ou amidas secundárias. Os dois picos de baixa intensidade em 2924 e 2854 cm^{-1} indicam a presença de carbonos primários ou secundários (CH_3 ou CH_2) alifáticos. A banda em 1458 cm^{-1} indica a presença de grupamentos $-(\text{CH}_2)_n-$, sugerindo-se a presença de no máximo $n=6$, visto que no espectro não são vistas as bandas características em 720 cm^{-1} de cadeias maiores de sete carbonos. A literatura indica que uma banda em 848 cm^{-1} possa representar a presença de ligações entre hidrogênio e carbonos com dupla ligação, sugerindo que possa haver uma banda em 1465 cm^{-1} , que estaria superposta. As olefinas simétricas não possuem bandas na região $1675\text{-}1645\text{ cm}^{-1}$, podendo ser esse o caso. A Tabela 11 resume os resultados prováveis para o espectro obtido para a subfração 1-5.

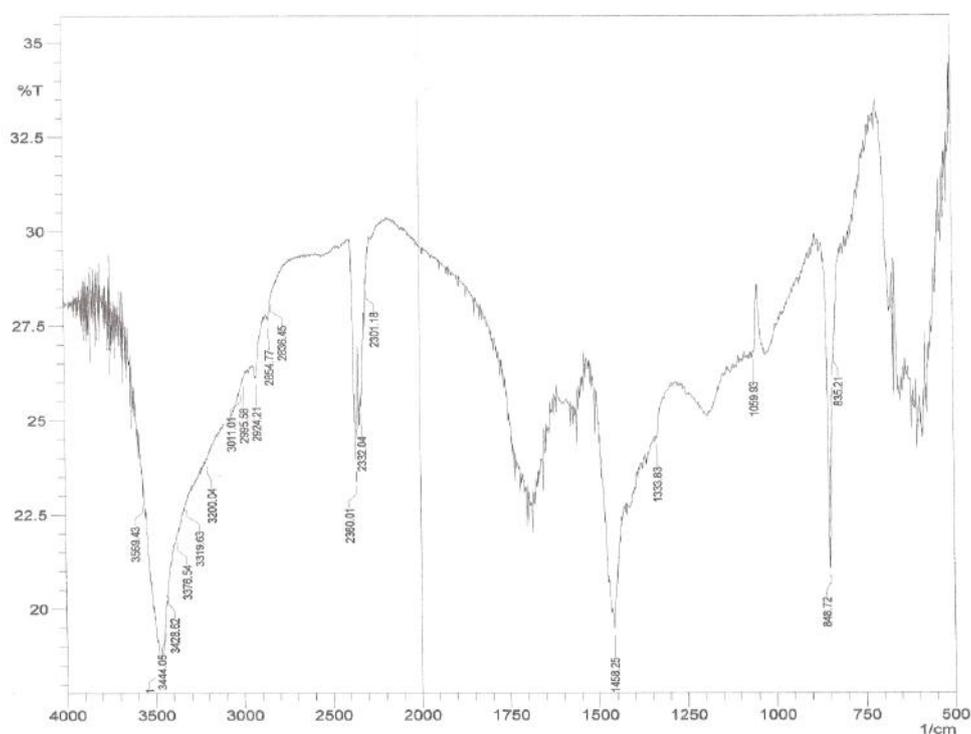


Figura 28: Infravermelho das cinco primeiras subfrações reunidas coletadas na coluna Sephadex, com seus respectivos parâmetros analíticos.

Tabela 11: Resumo das principais bandas de infravermelho encontradas para o conjunto de subfrações de 1-5.

Número de onda (cm ⁻¹)	Intensidade	Largura	Ligação	Descrição
3444	F	L	O-H (álcoois)	def. axial
			N-H (amida, NH ou NH ₂)	def. axial
			N-H (amina, NH ₂)	def. axial
			C-H (alquenos)	def. axial
2924	F	a	C-H (metila ou metileno)	def. axial
2854	F	a	C-H (metila ou metileno)	def. axial
2380	F	a	-	
2332	F	a	-	
1730	m	L	C-H (metila, superposta)	def. angular simétrica
1700	m	L	C=O (amida secundária)	def. axial
			C=C (lineares não-conjugados)	def. axial
1570	f	L	N-H (aminas e amidas 2 ^a)	def. angular
1458	F	L	C-H (metila)	def. angular assimétrica
			C-H (metileno)	def. angular simétrica, ausência da banda 720 indica quantidade de carbono menor que 7
1190	M	L	C-H (metileno)	def. angular simétrica e assimétrica, ausência de outras bandas confirmam a pouca quantidade de carbonos
848	F	A	C-H (alquenos)	def. angular fora do plano

A presença de possíveis grupamentos carboxílicos (devido à carbonila) e grupamentos amina primárias apontou para a possibilidade de que o conjunto de subfração analisado seja um aminoácido. Para descartar tal hipótese, foi feita uma cromatoplaça com a subfração e um padrão de aminoácido (glicina), posteriormente revelada com ninhidrina, revelador eficaz para a revelação de aminas primárias, especialmente de aminoácidos. Entretanto, a subfração apresentou um resultado negativo para o revelador, conforme mostrado na Figura 29.



Figura 29: Cromatografia da subfração 1-5 coletada na Sephadex, revelada com ninhidrina. O sistema de eluentes foi BAW (3: 1: 1).

A presença de ligações duplas também foi sugerida baseada no espectro de infravermelho. Dessa forma, a subfração foi revelada com vapor de iodo, revelador que reage com duplas ligações, conjugadas ou não, para avaliar se tal ligação está presente ou não. Como padrão foi utilizado o padrão de rutina, pois seu anel benzênico possui ligações duplas conjugadas que são reveladas com o vapor de iodo. Entretanto, a subfração também apresentou resultado negativo, conforme mostrado na Figura 30.



Figura 30: CCD revelada com vapor de iodo. O sistema de eluentes foi BAW (3: 1: 1).

A possibilidade da presença de aminas secundárias e terciárias também surgiu após a análise por infravermelho. Desta forma, utilizamos o revelador Dragendorff,

que indica a presença de alcaloides e compostos nitrogenados, como amins secundárias, terciárias e quaternárias. Entretanto, como mostrado na Figura 31, tal hipótese foi prontamente descartada, utilizando o Atroveran® (possui os alcaloides papaverina e atropina) como padrão. A adição de ácido sulfúrico 10% após a revelação com Dragendorff foi feita para intensificar as manchas do conteúdo revelado, evidenciando sua ausência na subfração M1-5.

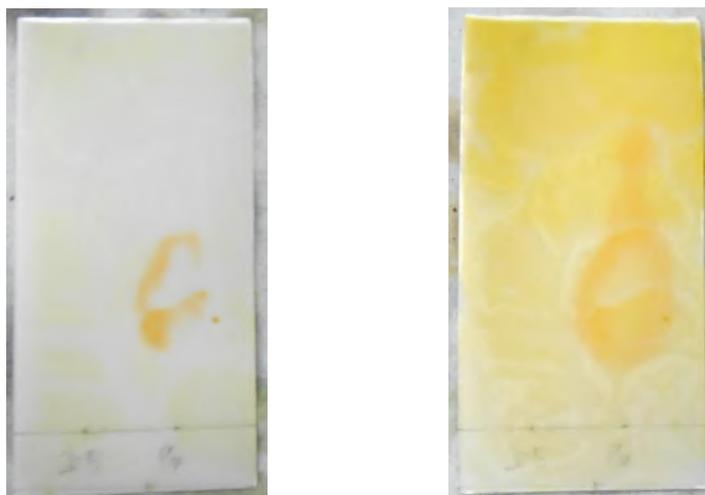


Figura 31: Subfração 1-5 revelada com Dragendorff (esquerda) e com Dragendorff + Ácido sulfúrico 10% (direita). O sistema de eluentes foi BAW (3: 1: 1). Padrão: Atroveran®

Tal molécula ainda será enviada à análise por RMN para sua elucidação estrutural e futuramente avaliada quanto a seu potencial farmacológico, pela equipe do projeto.

6. CONCLUSÃO

O extrato hidroalcoólico da espécie vegetal *Mandevilla moricandiana* apresentou resultados promissores no ensaio vasodilatador dependente do endotélio. A fração em acetato de etila mostrou CI_{50} equivalente a $10,64 \pm 1,69 \mu\text{g/ml}$, enquanto a CI_{50} obtida para o extrato bruto das folhas foi de $0,82 \pm 0,10 \mu\text{g/mL}$, indicando que os componentes presentes na fração supracitada sejam as responsáveis pela vasodilatação.

A análise por CLAE mostrou a presença de flavonoides na fração acetato de etila e butanólica, podendo justificar o efeito vasodilatador encontrado para a primeira. Espera-se que a fração butanólica, assim que testada, apresente alguma ação de vasodilatação, pois os flavonoides encontrados nessa fração são semelhantes aos encontrados na fração acetato de etila, comparando-se os espectros de UV.

As dosagens de flavonoides e de fenólicos totais mostraram que a fração acetato de etila concentra a maior parte dos flavonoides contidos no extrato bruto, e uma pequena parte encontrada na fração butanólica. Esse é mais um indício de que o efeito vasodilatador obtido esteja diretamente relacionado aos flavonoides.

Alguns flavonoides já foram descritos na literatura apresentando atividade vasodilatadora, seja ela dependente ou não de endotélio. Dessa forma parece plausível atribuir que o efeito vasodilatador obtido para o extrato hidroalcoólico da *M. moricandiana* seja derivada dos flavonoides. A espécie *M. moricandiana* torna-se mais uma das poucas espécies estudadas na Restinga de Jurubatiba, se considerar todo o seu potencial biológico. Esse estudo também fortalece as pesquisas de Produtos Naturais no Campus UFRJ-Macaé, estendendo o conhecimento das espécies vegetais presentes na Restinga de Jurubatiba.

Estudos paralelos também mostraram que o extrato etanólico da *M. moricandiana* também apresentou atividade apreciável em ensaios anti-inflamatório, analgésico, antioxidante e anti-tumoral, mostrando-se com um alto potencial farmacológico.

7. REFERÊNCIAS

ALICE, C.B.; SIQUEIRA, N.C.S.; MENTZ, L.A.; SILVA, G.A.A.B.; JOSÉ, K.F.D.. Plantas medicinais de uso popular: Atlas Farmacognóstico. Canoas: **Ed. Ulbra**. 1995.

ANDERSEN, O.M.; MARKHAM, K.R.. FLAVONOIDS: CHEMISTRY, BIOCHEMISTRY AND APPLICATIONS - 1ª EDIÇÃO. FLÓRIDA: **CRC PRESS – TAYLOR & FRANCIS GROUP**. 2006.

ARAÚJO, D.S.D.; LACERDA, L.D.. A NATUREZA DA RESTINGA. **CIÊNCIA HOJE**, v.6, n.33, p.42-48, 1987.

ARAÚJO, D.S.D.. VEGETATION TYPES OF SANDY COASTAL PLAINS OF TROPICAL BRAZIL: A FIRST APPROXIMATION. IN: ULRICH SEELIGER (ED). (ORG.). COASTAL PLANT COMMUNITIES OF LATIN AMERICA. NEW YORK: **ACADEMIC PRESS**, p. 477-493, 1992.

ARAÚJO, D.S.D.; COSTA, A.F.; OLIVEIRA, A.S.; MOURA, R.L.. FLORÍSTICA E PADRÕES FITOGEográficos. Pp. 155-165. IN: A.F. COSTA & I.C.A. DIAS. FLORA DO PARQUE NACIONAL DA RESTINGA DE JURUBATIBA E ARREDORES, RIO DE JANEIRO, BRASIL: LISTAGEM, FLORÍSTICA E FITOGEOGRAFIA: ANGIOSPERMAS, PTERIDÓFITAS, ALGAS CONTINENTAIS. RIO DE JANEIRO: **MUSEU NACIONAL** (SÉRIE LIVROS N. 8), 2001.

BARREIRO, E.. J. BIODIVERSIDADE: FONTE POTENCIAL PARA A DESCOBERTA DE FÁRMACOS. **QUIM. NOVA**, v.32, n.3, p.679-688, 2009.

BENTO, E.S.; CALIXTO, J.B.; HAWKES, G.E.; PIZZOLATTI, M.G.; SANT'ANA, A.E.G.; YUNES, R.A.. THE STRUCTURE OF VELUTINOL A IS (15R, 16R, 20S)-14, 16: 15, 20: 16, 21-TRIEPOXY-15, 16-SECO-14 BETA, 17 ALPHA-PREGN-5-ENE-3 BETA, 15-DIOL. A COMBINED QUANTITATIVE OVERHAUSER EFFECT AND MOLECULAR MODELLING STUDY. **JOURNAL OF THE CHEMICAL SOCIETY PERKIN TRANSACTIONS**, CAMBRIDGE, v. 2, n. 7, p. 1359-1366, 1996.

BENTO, E.S.; SANT'ANA, A.E.G.; HAWKES, G.E.; CALIXTO, J.B.; YUNES, R.A.. THE STRUCTURE OF VELUTINOSIDE A: A PREGNANE PENTASACCHARIDE FROM *MANDEVILLA VELUTINA*. **TETRAHEDRON LETTERS**, OXFORD, v. 44, n. 45, p. 8335-8337, 2003.

BIRT, D.F.; HENDRICH, S.; WANG, W.. DIETARY AGENTS IN CANCER PREVENTION: FLAVONOIDS AND ISOFLAVONOIDS. **PHARMACOLOGY THERAPEUTICS**, v. 90, p. 157-177, 2001.

BRUN, G.; DIJOUX, M.G.; DAVID, B.; MARIOTTE, A.M.. A NEW FLAVONOL GLYCOSIDE FROM *CATHARANTHUS ROSEUS*, **PHYTOCHEMISTRY**, v. 50, n. 1, p. 167-169, 1999.

CABRERA, G.; OBERTI, J.C.; SELDES, A.M.; GROS, E.G.. PHYTOCHEMICAL STUDY OF THE ROOTS OF *MANDEVILLA PENTLANDIANA* - STEROL PEROXIDES AND LIGNANES. **ANALES DE LA ASOCIACIÓN QUÍMICA**. ARGENTINA, BUENOS AIRES, v. 79, n. 2, p. 73-76, 1991A.

CABRERA, G.; PALERMO, J.A.; SELDES, A.M.; GROS, E.G.; OBERTI, J.C.. STEROIDAL DERIVATIVES FROM THE ROOTS OF *MANDEVILLA PENTLANDIANA*. **PHYTOCHEMISTRY**, OXFORD, V. 30, N. 4, P. 1239-1243, 1991B.

CABRERA, G.M.; DELUCA, M.E.; SELDES, A.M.; GROS, E.G.; OBERTI, J.C.; CROCKETT, J.; GROSS, M.L.. CARDENOLIDE GLYCOSIDES FROM THE ROOTS OF *MANDEVILLA PENTLANDIANA*. **PHYTOCHEMISTRY**, OXFORD, V. 32, N. 5, P. 1253-1259, 1993A.

CABRERA, G.M.; OBERTI, J.C.; GROS, E.G.; SELDES, A.M.. AROMADENDRANE SESQUITERPENE FROM *MANDEVILLA PENTLANDIANA*. **PHYTOCHEMISTRY**, OXFORD, V. 34, N. 6, P. 1642-1643, 1993B.

CALIXTO, J.B.; NICOLAU, M.; YUNES, R.A.. THE SELECTIVE ANTAGONISM OF BRADYKININ ACTION ON RAT ISOLATED UTERUS BY CRUDE *MANDEVILLA VELUTINA* EXTRACT. **BRITISH JOURNAL OF PHARMACOLOGY**, LONDON, V. 85, N. 4, P. 729-731, 1985.

CALIXTO, J.B.; NICOLAU, M.; TREBIEN, H.; HENRIQUE, M.G.O.; WEG, V.B.; CORDEIRO, R.S.B.; YUNES, R.A.. ANTIEDEMATOGENIC ACTIONS OF A HYDROALCOHOLIC CRUDE WATER-ALCOHOL EXTRACT OF *MANDEVILLA VELUTINA*. **BRAZILIAN JOURNAL OF MEDICAL AND BIOLOGICAL RESEARCH**, RIBEIRÃO PRETO, V. 19, N. 4-5, P. A575-A575, 1986A.

CALIXTO, J.B.; YUNES, R.A.. EFFECT OF A CRUDE EXTRACT OF *MANDEVILLA VELUTINA* ON CONTRACTIONS INDUCED BY BRADYKININ AND [DES-ARG⁹]-BRADYKININ IN ISOLATED VESSELS OF THE RABBIT. **BRITISH JOURNAL OF PHARMACOLOGY**, LONDON, V. 88, N. 4, P. 937-941, 1986B.

CALIXTO, J.B.; NICOLAU, M.; PIZZOLATTI, M.G.; YUNES, R.A.. KININ ANTAGONIST ACTIVITY OF COMPOUNDS FROM *MANDEVILLA VELUTINA* IN THE RAT ISOLATED UTERUS. **BRITISH JOURNAL OF PHARMACOLOGY**, LONDON, V. 91, N. 1, P. 199-204, 1987.

CALIXTO J.B., PIZZOLATTI M.G., YUNES R.A.. THE COMPETITIVE ANTAGONISTIC EFFECT OF COMPOUNDS FROM *MANDEVILLA VELUTINA* ON KININ-INDUCED CONTRACTIONS OF RAT UTERUS AND GUINEA-PIG ILEUM IN VITRO. **BR J PHARMACOL**, V.94, P.1133-42, 1988.

CALIXTO, J.B.; YUNES, R.A.. BLOCKADE OF KININ-INDUCED RESPONSES OF THE GUINEAPIG ISOLATED URINARY BLADDER BY THE EXTRACT OF *MANDEVILLA VELUTINA*. **GENERAL PHARMACOLOGY**, OXFORD, V. 21, N. 3, P. 285-290, 1990.

CALIXTO, J.B.; YUNES, R.A.. NATURAL BRADYKININ ANTAGONISTS. **MEMÓRIAS DO INSTITUTO OSWALDO CRUZ**, RIO DE JANEIRO, V. 86, SUPLEMENTO 2, P. 195-202, 1991.

CHAN, E.C., PANNANGPETCH, P., WOODMAN, O.L.. RELAXATION TO FLAVONES AND FLAVONOLS IN RAT ISOLATED THORACIC AORTA: MECHANISM OF ACTION AND STRUCTURE – ACTIVITY RELATIONSHIPS. **J. CARDIOVASC. PHARMACOL.** V.35, N.326-333, 2000.

COOK, N.C.; SAMMAN, S.. FLAVONOIDS – CHEMISTRY, METABOLISM, CARDIOPROTECTIVE EFFECTS, AND DIETARY SOURCES – REVIEW. **THE JOURNAL OF NUTRITION BIOCHEMISTRY.** V. 7, N. 1, P. 66-76, 1996.

CORDEIRO, S.Z.; SIMAS, N.K.; ARRUDA, R.C.O.; SATO, A.. COMPOSITION OF EPICUTICULAR WAX LAYER OF TWO SPECIES OF *MANDEVILLA* (APOCYNODEAE, APOCYNACEAE) FROM RIO DE JANEIRO, BRAZIL. **BIOCHEMICAL SYSTEMATICS AND ECOLOGY**, V.39, P.198–202, 2011.

COSTA, D.P.; YANO, O.. BRIÓFITAS DA RESTINGA DE MACAÉ, RIO DE JANEIRO, BRASIL. **HOEHNEA**, V.25, P.99-119, 1998.

COSTA, A.F.; DIAS, I.C.A. (orgs.). FLORA DO PARQUE NACIONAL DA RESTINGA DE JURUBATIBA E ARREDORES, RIO DE JANEIRO, BRASIL: LISTAGEM, FLORÍSTICA E FITOGEOGRAFIA. SÉRIE LIVROS 8. UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO - RJ, **MUSEU NACIONAL**, 2001.

COSTA, D.P.; IMBASSAHY, C.A.A.; ALMEIDA, J.S.S.; SANTOS, N.D.; IMBASSAHY, T.F.V.. DIVERSIDADE DAS BRIÓFITAS NAS RESTINGAS DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO, BRASIL. **BOLETIM DO INSTITUTO DE BOTÂNICA**, V.18, P.131-139, 2006.

DEGÁSPARI, C.H.; WASZCZYNSKYJ, N.. PROPRIEDADES ANTIOXIDANTES DE COMPOSTOS FENÓLICOS. **VISÃO ACADÊMICA**. CURITIBA, V. 5, N. 1, P. 33-40, 2004.

DUARTE, J.; VIZCAÍNO, F.P.; ZARZUELO, A.; JIMENEZ, J.; TAMARGO, J.. VASODILATOR EFFECTS OF QUERCETIN IN ISOLATED RAT VASCULAR SMOOTH MUSCLE. **EUROPEAN JOURNAL OF PHARMACOLOGY**, V.239, P.1-7, 1993.

DUARTE J.; PEREZ-PALENCIA R.; VARGAS F.; PEREZ-VIZCAINO F.; ZARZUELO A.; TAMARGO J.. ANTIHYPERTENSIVE EFFECTS OF THE FLAVONOID QUERCETIN IN SPONTANEOUSLY HYPERTENSIVE RATS. **BR J PHARMACOL**, V.133, P.117–124, 2001.

DUARTE, M.R.; LARROSA, C.R.R.. MORPHO-ANATOMICAL CHARACTERS OF THE LEAF AND STEM OF *MANDEVILLA COCCINEA* (HOOK. ET ARN.) WOODSON, APOCYNACEAE. **BRAZILIAN JOURNAL OF PHARMACEUTICAL SCIENCES**, v.47, n.1, 2011.

DUBEY, N.K.; KUMAR, R.; TRIPATHI, P.. GLOBAL PROMOTION OF HERBAL MEDICINE: INDIA'S OPPORTUNITY. **CURRENT SCIENCE**, BANGALORE, v. 86, p. 37-41, 2004.

FELIZZOLA, L.R.; SOBRINHO, J.R.R.; ZERN, W.C.W.; BELLEN, B.V.. O PAPEL DO ENDOTÉLIO VASCULAR NA FISIOLÓGIA CIRCULATÓRIA. **Cir Vasc Angiol**, v.12, p.129-136, 1996.

FERREIRA, LETÍCIA LIMA DIAS MOREIRA. EFEITO VASODILATADOR DE ESPÉCIES DE PLANTAS PRESENTES NO PARQUE NACIONAL DA RESTINGA DE JURUBATIBA (RJ), COM ÊNFASE EM *MANDEVILLA MORICANDIANA* (APOCYNACEAE). DISSERTAÇÃO DE MESTRADO. UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO - CAMPUS MACAÉ, 2013.

GACCHE, R.N.; DHOLE, N.A.. PROFILE OF ALDOSE REDUCTASE INHIBITION, ANTI-CATARACT AND FREE RADICAL SCAVENGING ACTIVITY OF SELECTED MEDICINAL PLANTS: AN ATTEMPT TO STANDARDIZE THE BOTANICALS FOR AMELIORATION OF DIABETES COMPLICATIONS. **FOOD AND CHEMICAL TOXICOLOGY**, v.49, p.1806–1813, 2011.

GALETTO, L.. FLOWER STRUCTURE AND NECTAR CHEMICAL COMPOSITION IN THREE ARGENTINE APOCYNACEAE. **FLORA**, v. 192, p. 197-207, 1997.

GHAYUR, M.N.; KHAN, H.; GILANI, A.H.. ANTISPASMODIC, BRONCHODILATOR AND VASODILATOR ACTIVITIES OF (+)-CATECHIN, A NATURALLY OCCURRING FLAVONOID. **ARCH PHARM RES**, v.30, n.8, p.970-975, 2007.

HIRSCHMANN, G.S.; ARIAS, A.R.. A SURVEY OF MEDICINAL PLANTS OF MINAS GERAIS, **BRAZIL**. **JOURNAL OF ETHNOPHARMACOLOGY**, v.29, p.159- 172, 1990.

IMBASSAHY, C.A.A.; COSTA, D.P.; ARAUJO, D.S.D.. BRIÓFITAS DO PARQUE NACIONAL DA RESTINGA DE JURUBATIBA, RJ, BRASIL. **ACTA BOT. BRAS.** v.23, n.2, p.558-570. 2009.

JUNIOR, A.A.S.; LEAL, P.C.; EDELWEISS, M.I.A.; LOPES, T.G.; CALIXTO, J.B.; MORRONE, F.B.; CAMPOS, M.M.. EFFECTS OF THE COMPOUNDS MV8608 AND MV8612 OBTAINED FROM

MANDEVILLA VELUTINA IN THE MODEL OF HEMORRHAGIC CYSTITIS INDUCED BY CYCLOPHOSPHAMIDE IN RATS. **NAUNYN-SCHMIED ARCH PHARMACOL**, v. 382, p.399–407, 2010.

KUMAR, A.; KAUR, R.; ARORA, S.. FREE RADICAL SCAVENGING POTENTIAL OF SOME INDIAN MEDICINAL PLANTS. **JOURNAL OF MEDICINAL PLANTS RESEARCH**, VOL. 4, N.19, P. 2034-2042, 2010.

LEMOS, V.S.; FREITAS, M.R.; MULLER, B.; LINO, Y.D.; QUEIROGA, C.E.G.; CÔRTEZ, S.F.. DIOCLEIN, A NEW NITRIC OXIDE- AND ENDOTHELIUM-DEPENDENT VASODILATOR FLAVONOID. **EUROPEAN JOURNAL OF PHARMACOLOGY**, v.386, p.41–46, 1999.

LIM, S.S.; VOS, T.; FLAXMAN, A.D.; DANAEI, G.; SHIBUYA, K.; ADAIR-ROHANI, H.. A COMPARATIVE RISK ASSESSMENT OF BURDEN OF DISEASE AND INJURY ATTRIBUTABLE TO 67 RISK FACTORS AND RISK FACTOR CLUSTERS IN 21 REGIONS, 1990-2010: A SYSTEMATIC ANALYSIS FOR THE GLOBAL BURDEN OF DISEASE STUDY 2010. **LANCET**, 380 (9859), p.2224–2260, 2012.

LUFRAÑO, P.; STARITA, S.; BALDINI, O.A.N.. ACTIVE CARDIOTONICS IN THE SEEDS OF *MANDEVILLA PENTLANDIANA* (A. DC.) WOODSON. **ACTA PHARMACEUTICAL BONAERENSE**, LA PLATA, v. 1, n. 1, p. 3-11, 1982.

MACAÉ. PREFEITURA DE MACAÉ: ÁREAS DE PRESERVAÇÃO AMBIENTAL FEDERAIS. DISPONÍVEL EM <[HTTP://WWW.MACAE.RJ.GOV.BR/CONTEUDO/LEITURA/TITULO/AREAS-DE-PRESERVACAO-AMBIENTAL-FEDERAIS](http://www.macaerj.gov.br/conteudo/leitura/titulo/areas-de-preservacao-ambiental-federiais)>. ACESSADO EM 16/07/2013.

MANTOVANI, W.. A DEGRADAÇÃO DOS BIOMAS BRASILEIROS. IN: RIBEIRO, W.C. (ORG.). PATRIMÔNIO AMBIENTAL BRASILEIRO. USPIANA: BRASIL 500 ANOS. SÃO PAULO. IMPRENSA OFICIAL DO ESTADO DE SÃO PAULO. **EDITORA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**, 2003.

MATHERS, C.D.; LONCAR, D.. PROJECTIONS OF GLOBAL MORTALITY AND BURDEN OF DISEASE FROM 2002 TO 2030. **PLoS Med**, v.3, n.11, p.442, 2006.

MATTOS, W.M.; CAMPOS, M.M.; FERNANDES, E.S.; RICHETTI, G.P.; NIERO, R.; YUNES, R.A.; CALIXTO, J.B.. ANTI-EDEMATOGENIC EFFECTS OF VELUTINOL A ISOLATED FROM *MANDEVILLA VELUTINA*: EVIDENCE FOR A SELECTIVE INHIBITION OF KININ B1 RECEPTOR-MEDIATED RESPONSES. **REGULATORY PEPTIDES**, v. 136, n. 98–104, 2006.

MERKEN, H. M.; BEECHER, G. R. MEASUREMENT OF FOOD FLAVONOIDS BY HIGHPERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY: A REVIEW. **JOURNAL OF AGRICULTURAL AND FOOD CHEMISTRY**, v. 28, n. 3, p. 577-599, 2000.

METCALFE, C.; CHALK, L.. ANATOMY OF THE DICOTYLEDONS. v. II. OXFORD: **CLAREDON PRESS**, 1950. 1500p.

MICHELOTTI, E.L.; GROS, E.G.. PHYTOCHEMICAL STUDY OF *MANDEVILLA PENTLANDIANA*. HYDROCARBONS, LIPIDS, STEROLS AND TRITERPENOLS FROM THE PETROLEUM ETHER EXTRACT. **ANALES DE LA ASOCIACIÓN QUÍMICA ARGENTINA**, BUENOS AIRES, v. 71, n. 1, p. 179-183, 1983.

MUEHE, D.; VALENTINI, E.. O LITORAL DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO: UMA CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-AMBIENTAL. RIO DE JANEIRO, **FEMAR – SEMA/GTZ**, 1998.

NEWMAN, D.G.; CRAGG, G.M.. NATURAL PRODUCTS AS SOURCES OF NEW DRUGS OVER THE 30 YEARS FROM 1981 TO 2010. **JOURNAL OF NATURAL PRODUCTS**, v. 75, p. 311-335, 2012.

NIERO, R.; CALIXTO, J.B.; FILHO, J.D.D.S.; YUNES, R.A.; SANT'ANA, A.E.G.. ACETYLLILLUSTROL: A NEW COMPOUND FROM *MANDEVILLA ILLUSTRIS* (VELL.) WOODSON (APOCYNACEAE). **NATURAL PRODUCT LETTERS, BASINGSTOKE**, v. 13, n. 1, p. 63-70, 1999.

NIERO, R.; ALVES, R.V.; CECHINEL, V.; CALIXTO, J.B.; HAWKES, J.E.; SANT'ANA, A.E.G.; YUNES, R.A.. A NEW ANTI-OEDEMATOGENIC NOR-PREGNANE DERIVATIVE ISOLATED FROM *MANDEVILLA ILLUSTRIS*. **PLANTA MEDICA**, STUTTGART, v. 68, n. 9, p.850-853, 2002.

NISHIBE, S.; TAKENAKA, T.; FUJIKAWA, T.; YASUKAWA, K.; TAKIDO, M.; MORIMITSU, Y.; HIROTA, A.; KAWAMURA, T.; NORO, Y.. BIOACTIVE PHENOLIC COMPOUNDS FROM *CATHARANTHUS ROSEUS* AND *VINCA MENOR*. **J. NAT. MED. (TOKYO)**, v. 50, p. 378, 1996.

PARVEEN, M.; KHANAM, Z.; ALI, A.; AHMAD, S.M.. A NOVEL ANTIMICROBIAL FLAVONOIDIC GLYCOSIDE FROM THE LEAVES OF *ALSTONIA MACROPHYLLA* WALL EX A. DC (APOCYNACEAE). **CHINESE CHEMICAL LETTERS**, v. 21, n. 5, p. 593-595, 2010.

PORTERI, E.; RIZZONI, D.; DE CIUCEIS, C.; BOARI, G.E.M.; PLATTO, C.; PILU, A.; MICLINI, M.; ROSEI, C.A.; BULGARI, G.; ROSEI, E.A.. VASODILATOR EFFECTS OF RED WINES IN

SUBCUTANEOUS SMALL RESISTANCE ARTERY OF PATIENTS WITH ESSENTIAL HYPERTENSION. **Am J Hypertens**, 23, 373-378, 2010.

PREFEITURA DE QUISSAMÃ. TURISMO, ATRAÇÕES NATURAIS, PARQUE DE JURUBATIBA. 2012. DISPONÍVEL EM: <[HTTP://WWW.QUISSAMA.RJ.GOV.BR/INDEX.PHP/TURISMO/ATRACOES-NATURAIS/2012-03-14-18-03-28](http://www.QUISSAMA.RJ.GOV.BR/INDEX.PHP/TURISMO/ATRACOES-NATURAIS/2012-03-14-18-03-28)>. ACESSADO EM: 23 DE JULHO DE 2013.

RAIMUNDO, J.M.; SUDO, R.T.; PONTE, L.B.; ANTUNES, F.; TRACHEZ, M.M.; ZAPATA-SUDO, G.. IN VITRO AND IN VIVO VASODILATOR ACTIVITY OF RACEMIC TRAMADOL AND ITS ENANTIOMERS IN WISTAR RATS. **EUROPEAN JOURNAL OF PHARMACOLOGY**, 530, 117-123, 2006

RIO DE JANEIRO (Estado). **DECRETO Nº 41.612, DE 23 DE DEZEMBRO 2008**: DISPÕE SOBRE A DEFINIÇÃO DE RESTINGAS NO ESTADO DO RIO DE JANEIRO E ESTABELECE A TIPOLOGIA E A CARACTERIZAÇÃO AMBIENTAL DA VEGETAÇÃO DE RESTINGA. RIO DE JANEIRO, 2008.

RODRIGUEZ, G.L.; GUZMAN, C.A.. CHEMICAL COMPOSITION OF SEED OIL AND SEED OF *MANDEVILLA LAXA* AND *MANDEVILLA PENTLANDIANA* (APOCYNACEAE). **ANALES DE LA ASOCIACIÓN QUÍMICA ARGENTINA**, BUENOS AIRES, v. 83, n. 1-2, p. 23-30, 1995.

SAHREEN, S.; KHAN, M.R.; KHAN, R.A.. HEPATOPROTECTIVE EFFECTS OF METHANOL EXTRACT OF *CARISSA OPACA* LEAVES ON CCL4-INDUCED DAMAGE IN RAT. **BMC COMPLEMENTARY AND ALTERNATIVE MEDICINE**, v.11, n.48, 2011.

SALES, M. F.. ESTUDOS TAXONÔMICOS DE *MANDEVILLA* LINDLEY SUBGÊNERO *MANDEVILLA* (APOCYNACEAE) NO BRASIL. TESE APRESENTADA AO INSTITUTO DE BIOLOGIA DA UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS. CAMPINAS, SP, 1993.

SALES, M.F., KINOSHITA, L.S.; SIMÕES, A.O.. EIGHT NEW SPECIES OF *MANDEVILLA* LINDLEY (APOCYNACEAE, APOCYNACEAE) FROM BRAZIL. **NOVON**, v.16, p.112–128, 2006.

SIDDIQUI, B.S.; KHATOON, N.; BEGUM, S.; FAROOQ, A.D.; QAMAR, K.; BHATTI, H.A., ALI, S.K.. FLAVONOID AND CARDENOLIDE GLYCOSIDES AND A PENTACYCLIC TRITERPENE FROM THE LEAVES OF *NERIUM OLEANDER* AND EVALUATION OF CYTOTOXICITY. **PHYTOCHEMISTRY**, v.77, p.238-244, 2012.

SIMÕES, A.O.; ENDRESS, M.E.; NIET, V.D.T.; KINOSHITA, L.S.; CONTI, E.. TRIBAL AND INTERGENERIC RELATIONSHIPS OF MESECHITEAE (APOCYNACEAE, APOCYNACEAE): EVIDENCE FROM

THREE NONCODING PLASTID DNA REGIONS AND MORPHOLOGY. **AMERICAN JOURNAL OF BOTANY**, v.91, n.9, p.1409-1418, 2004.

SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. (ORGS). FARMACOGNOSIA DA PLANTA AO MEDICAMENTO, 6ª EDIÇÃO. RIO GRANDE DO SUL. EDITORA **UFRGS**, 2010.

SIMPSON, M.G.. PLANT SYSTEMATICS. CALIFORNIA: **ELSEVIER ACADEMIC PRESS**, 2006. 590p.

SOUZA, V.C.; LORENZI, H.. BOTÂNICA SISTEMÁTICA: GUIA ILUSTRADO PARA IDENTIFICAÇÃO DAS FAMÍLIAS DE ANGIOSPERMAS DA FLORA BRASILEIRA, BASEADO EM APG II. NOVA ODESSA: **INSTITUTO PLANTARUM**, 2005. 640p.

TOKI, K.; SAITO, N.; IRIE, Y.; TATSUZAWA, F.; SHIGIHARA, A.; HONDA, T.. 7-O-METHYLATED ANTHOCYANIDIN GLYCOSIDES FROM *CATHARANTHUS ROSEUS*. **PHYTOCHEMISTRY**, v.69, n.5, p.1215–1219, 2008.

VENCATO, I.; NIERO, R.; MONTANARI, J.L.; CALIXTO, J.B.; SANT'ANA, A.E.G.; YUNES, R.A.. A NEW 14: 15-SECO-15-NORPREGNANE DERIVATIVE FROM *MANDEVILLA ILLUSTRIS* WOODSON (APOCYNACEAE). **ACTA CRYSTALLOGRAPHICA. SECTION C, CRYSTAL STRUCTURE COMMUNICATIONS**, COPENHAGEN, v. 55, n. 5, p. 827-829, 1999.

VICTORIO, C.P.; ARRUDA, R.D.D.; LAGE, C.L.S.; KUSTER, R.M. Production of Flavonoids in Organogenic Cultures of *Alpinia zerumbet*. **Natural product communications**, v.5, p.1219-1223, 2010.

VIZCAÍNO, F.P.; IBARRA, M.; COGOLLUDO, A.L.; DUARTE, J.; ARNÁEZ, F.Z.; MORENO, L.; LÓPEZ, G.L.; TAMARGO, J.. ENDOTHELIUM-INDEPENDENT VASODILATOR EFFECTS OF THE FLAVONOID QUERCETIN AND ITS METHYLATED METABOLITES IN RAT CONDUCTANCE AND RESISTANCE ARTERIES. **THE JOURNAL OF PHARMACOLOGY AND EXPERIMENTAL THERAPEUTICS**, v. 302, n.1, p.66-72, 2002.

WANG, S.; DUSTING, G.J.; WOODMAN, O.L.; MAY, C.N.. SELECTIVE VASODILATOR AND CHRONOTROPIC ACTIONS OF 3V,4V-DIHYDROXYFLAVONOL IN CONSCIOUS SHEEP. **EUROPEAN JOURNAL OF PHARMACOLOGY**, v.491, p.43–51, 2004.

WHO. GLOBAL STATUS REPORT ON NONCOMMUNICABLE DISEASES 2010. GENEVA, 2011. DISPONÍVEL EM: < [HTTP://WWW.WHO.INT/NMH/PUBLICATIONS/NCD_REPORT_FULL_EN.PDF](http://www.who.int/nmh/publications/ncd_report_full_en.pdf)>. ACESSO EM: 23 DE JULHO DE 2013.

WHO. CARDIOVASCULAR DISEASES. 2013. DISPONÍVEL EM: <[HTTP://WWW.WHO.INT/MEDIACENTRE/FACTSHEETS/FS317/EN/](http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs317/en/)>. ACESSO EM: 23 DE JULHO DE 2013.

WOODSON JR, R.E.. Studies in the Apocynaceae. IV. THE AMERICAN GENERA OF ECHITOIDEAE. **ANN. MISSOURI BOT. GARD.**, v.20, p. 605–790, 1933.

YUNES, R.A.; BRUM, R.L.; CALIXTO, J.B.; RIMPLERT, H.. ILLUSTROL, A SECONORPREGNANE DERIVATIVE FROM *MANDEVILLA ILLUSTRIS*. **PHYTOCHEMISTRY**, OXFORD, v. 34, n. 3, p. 787-790, 1993A.

YUNES, R.A.; PIZZOLATTI, M.G.; SANT'ANA, A.E.G.; HAWKES, G.E.; CALIXTO, J.B.. THE STRUCTURE OF VELUTINOL-A, AN ANTIINFLAMMATORY COMPOUND WITH A NOVEL PREGNANE SKELETON. **PHYTOCHEMICAL ANALYSIS**, SUSSEX, v. 4, n. 2, p. 76-81, 1993B.