



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO

Campus Macaé

Curso de Farmácia



ESTUDO FITOQUÍMICO DE EXTRATOS BIOATIVOS DA ESPÉCIE
Psidium cattleianum SABINE (MYRTACEAE) COM ATIVIDADE
VASODILATADORA

FLÁVIA MEDEIROS BONITO

Macaé

2016

FLÁVIA MEDEIROS BONITO

ESTUDO QUÍMICO E POTENCIAL VASODILATADOR DA ESPÉCIE
PSIDIUM CATTLEIANUM SABINE (MYRTACEAE)

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao Curso de Farmácia, da Universidade Federal do Rio de Janeiro – *Campus* Macaé, como requisito para obtenção do título de farmacêutico.

Orientador: Shaft Corrêa Pinto

Coorientadora: Michelle Frazão Muzitano

Macaé

2016

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por ter me concedido saúde, sabedoria e por ter renovado minhas forças diariamente para chegar até aqui.

Aos meus pais, Helizabete e José Manoel, por todo o apoio, paciência, compreensão, amor e incentivo de sempre.

Ao meu Orientador Shaft Corrêa e a minha co-orientadora Michelle Frazão, pela confiança, paciência e disponibilidade para me auxiliar no que fosse preciso. Obrigada pelos ensinamentos concedidos e colaboração de vocês!

Aos meus amigos, pelo apoio, incentivo e companheirismo.

A todos os professores do curso de farmácia, pelos ensinamentos ao longo da graduação.

Ao Marcos, farmacêutico do laboratório, que sempre esteve disponível me ajudando e dando suporte nos experimentos realizados.

A banca examinadora, que aceitou o convite de participar da defesa deste trabalho de conclusão de curso.

Ao Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica (PIBIC/CNPQ) pela concessão da bolsa e pelo apoio financeiro para a realização deste projeto

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Principais biomas do Brasil (Dinerstein, 1995; BRANDON, et al., 2005).....	21
Figura 2: Espécies de arazás nativos da região Centro- oeste do Brasil (FRANZON, et al., 2006).....	25
Figura 3: Espécie <i>Psidium cattleianum</i> Sabine (westafricanplants.senckenberg).....	27
Figura 4: Partes aéreas de <i>Psidium cattleianum</i> (ufrgs.br/fitoecologia/florars)	31
Figura 5: Percolador.	32
Figura 6: Extração líquido-líquido.	33
Figura 7: Cromatografia em coluna.....	34
Figura 8: Método para escolha do sistema de solvente para CCC (1mg da fração AcOEt dissolvida em 5mL da mistura de solventes. FO= fase orgânica (fase superior); FA= fase aquosa (fase inferior)).....	36
Figura 9: Perfil cromatográfico do extrato AcOEt por CCD, sob observação em câmara de UV em 365 nm após revelação com NP/PEG.....	44
Figura 10: Cromatograma representativo do extrato AcOEt de <i>P. cattleianum</i> e espectros de UV dos picos majoritários do extrato. (A= pico 9; B= pico 10; C= pico 11; D= pico 13).	45
Figura 11: Estrutura química geral de um flavonoide e seu espectro de UV.	45
Figura 12: Perfil cromatográfico e espectro de UV da sub-fração PCAcE(4) nos comprimentos de onda de 225 nm e 340 nm (A= pico 7; B= pico 8)	49
Figura 13: Perfil cromatográfico e espectro de UV da sub-fração PCAcE(4)-2 nos comprimentos de onda de 225 nm e 340 nm.....	50
Figura 14: Perfil cromatográfico e espectro de UV da sub-fração PCAcE(4)-3.1 nos comprimentos de onda de 225 nm e 340 nm (A= pico majoritário; B=pico minoritário).....	51
Figura 15: Perfil cromatográfico e espectro de UV da sub-fração PCAcE(4)-4.1 nos comprimentos de onda de 225 nm e 340 nm respectivamente.....	51

Figura 16: Perfil cromatográfico do extrato BuOH por CCD, sob observação em câmara de UV 365nm, após revelação com NP/PEG.....	52
Figura 17: Cromatograma representativo da fração BuOH de <i>P. cattleianum</i> em 365nm. Espectros de UV dos picos majoritários do extrato.(A= pico 6; B=pico 8; C=pico 9).	53
Figura 18: Perfil cromatográfico e espectro de UV da sub-fração PCBut(A4) de <i>P. cattleianum</i> em 340 nm.	55
Figura 19: Espectro de RMN ^1H da fração PCAcE(4)-4.1 em MeOD.....	57
Figura 20: Expansão do espectro de RMN ^1H , enfatizando a região de 5 a 8 ppm.....	58
Figura 21: Expansão do espectro de RMN ^1H , enfatizando a região de 3 a 4ppm.....	58
Figura 22: Flavonol glicosilado isolado da espécie <i>P. cattleianum</i> sabine (Isoquercitrina)	59
Figura 23: Espectro de RMN ^1H da fração PCAcE(4)-3.1 em MeOD.....	60
Figura 24: Expansão do espectro de RMN ^1H , enfatizando a região de 5 a 8 ppm.....	60
Figura 25: Expansão do espectro de RMN ^1H , enfatizando a região de 3 a 4 ppm.....	61
Figura 26: Flavonol glicosilado isolado da espécie <i>P. cattleianum</i> sabine (Guajaverina).....	61

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Condições cromatográficas definidas para a análise das frações em AcOEt e BuOH, e suas sub-frações.	38
Tabela 2: Gradiente de eluição para análise da fração em AcOEt e suas sub-frações.	39
Tabela 3: Gradiente de eluição para análise da fração em BuOH e suas sub-frações.	39
Tabela 4: Condições cromatográficas definidas para o isolamento de substâncias por CLAE semi-preparativa.	40
Tabela 5: Rendimento das frações orgânicas obtidas da extração líquido-líquido.	42
Tabela 6: Reunião das sub-frações obtidas do fracionamento da fração AcOEt por CCC e analisadas por CLAE-DAD.	47
Tabela 7: Grupos obtidos a partir do fracionamento de PCAcE(4) por CLAE semi-preparativa.	49
Tabela 8: Reunião das sub-frações obtidas do fracionamento da fração BuOH por CC e analisadas por CCD.	54
Tabela 9: Fracionamento obtido por CC da sub-fração PCBut(A).	55
Tabela 10: Dados espectroscópicos de RMN ¹ H obtidos da literatura e experimentais da Quercetina-3-O-β-D-glicopiranosídeo (Isoquercitrina).	57
Tabela 11: Dados espectroscópicos de RMN ¹ H obtidos da literatura e experimentais da Quercetina-3-O-α-L-arabinopiranosídeo (Guaijaverina).	59

LISTA DE ABREVIACÕES

AcO	Acetona
AcOEt	Acetato de etila
BuOH	Butanol
CC	Cromatografia em Coluna
CCC	Cromatografia Contracorrente
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
Hex	Hexano
H₂O	Água
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
mAU	MiliAmpér
MeOH	Metanol
NP	Difenilboriloxietilamina
OMS	Organização Mundial da Saúde
PEG	Polietilenoglicol
RMN ¹H	Ressonância Magnética Nuclear de 1H
UV	Ultravioleta

RESUMO

A espécie *Psidium cattleianum* Sabine pertencente a família Myrtaceae, e coletadas no Parque Nacional da Restinga de Jurubatiba (PARNA Jurubatiba), é conhecida popularmente por Araçá e utilizada medicinalmente para tratar doenças urinárias, diarreia e hipertensão. Este trabalho tem como objetivo isolar substâncias dos extratos das folhas da espécie vegetal *Psidium cattleianum* com atividade vasodilatadora. O extrato etanólico foi preparado a partir das folhas por percolação e fracionado por extração líquido-líquido obtendo-se assim as frações orgânicas. O extrato etanólico e as frações em acetato de etila e butanol foram avaliados quanto a sua atividade vasodilatadora e apresentaram uma porcentagem de relaxamento da aorta de ratos de 58,13%, 36,5% e 31,24% respectivamente. A fração bioativa em acetato de etila foi fracionada por cromatografia contracorrente e cromatografia líquida de alta eficiência semi-preparativa, e a fração em butanol foi fracionada por cromatografia em coluna utilizando Sephadex LH-20 e Sílica ligada a C₁₈, e os resultados para ambas as frações foram analisados por CCD e CLAE. Foram obtidas 196 sub-frações da cromatografia contracorrente com a fração em acetato de etila e 37 sub-frações da cromatografia em coluna com a fração butanólica, que foram reunidas de acordo com o perfil cromatográfico em CCD e CLAE. A sub-fração PCBut(A) foi submetida à uma nova cromatografia em coluna com Sílica C₁₈ para purificação, que após análise cromatográfica gerou 10 sub-frações. Foi isolado um flavonóide na sub-fração PCBut(A4) com o tempo de retenção de 13,8 minutos e bandas de absorção no espectro de UV de 256 nm e 356 nm. No fracionamento da fração em acetato de etila por CCC, a sub-fração PCAcE(4), após análise por CLAE-DAD, apresentou em seu cromatograma dois flavonóides majoritários nos tempos entre 12,5 minutos e 13,5 minutos. Esta sub-fração foi submetida a purificação por CLAE semi-preparativa isolando os dois flavonóides majoritários. As sub-frações que apresentaram constituintes isolados foram submetidas a análise por RMN ¹H para determinação estrutural. As análises de RMN ¹H mostraram-se inconclusivas para a sub-fração PCBut(A4). A sub-fração PCAcE(4)-4.1 trata-se de um flavonol esterificado com uma unidade de glicose, enquanto o açúcar do flavonol na sub-fração PCAcE(4)-3.1, possivelmente é a arabinose. Após determinação estrutural completa, estas substâncias isoladas serão avaliadas quanto a atividade vasodilatadora.

Palavras-chave: Atividade vasodilatadora, cromatografia contracorrente, isoquercitrina, *Psidium cattleianum* Sabine.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO.....	20
1.1 Biodiversidade.....	20
1.2 Plantas Medicinais.....	22
1.3 Família Myrtaceae.....	23
1.4 Gênero <i>Psidium</i>	24
1.5 Espécie <i>Psidium cattleianum</i> Sabine.....	25
1.6 Atividade anti-hipertensiva.....	27
2 JUSTIFICATIVA.....	29
3 OBJETIVOS.....	30
3.1 Objetivo geral.....	30
3.2 Objetivos específicos.....	30
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	31
4.1 Coleta da Espécie vegetal.....	31
4.2 Preparação dos extratos orgânicos.....	31
4.2.1 Percolação.....	31
4.2.2 Evaporação do solvente em aparelho de evaporação rotatório de pressão reduzida.....	32
4.3 Fracionamento do extrato etanólico.....	32
4.3.1 Extração líquido-líquido em funil de separação.....	32
4.4 Perfil cromatográfico e fracionamento das frações orgânicas.....	33
4.4.1 Perfil cromatográfico.....	33
4.4.1.1 Cromatografia em camada delgada.....	33
4.4.2 Fracionamento por cromatografia em coluna.....	33
4.4.2.1 Sephadex LH-20.....	33
4.4.2.2 Cromatografia de fase reversa (Sílica ligada a C ₁₈).....	34
4.4.3 Fracionamento por cromatografia contracorrente.....	35
4.4.3.1 Escolha do sistema de solvente.....	35

4.4.3.2 Condições para a CCC.....	36
4.4.4 Cromatografia líquida de alta eficiência.....	37
4.4.4.1 CLAE analítica	37
4.4.4.1.1 Preparo da amostra	37
4.4.4.1.2 Condições para a CLAE	38
4.4.4.2 CLAE semi-preparativa.....	39
4.4.4.2.1 Condições para a CLAE	39
4.5 Atividade vasodilatadora	40
4.6 Ressonância magnética nuclear	41
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	42
5.1 Obtenção e rendimento dos extratos orgânicos	42
5.2 Avaliação da atividade vasodilatadora dos extratos	42
5.3 Perfil cromatográfico e fracionamento da fração acetato de etila	43
5.3.1 Perfil cromatográfico	43
5.3.1.1 Cromatografia em camada delgada	43
5.3.1.2 Cromatografia líquida de alta eficiência.....	44
5.3.2 Isolamento de constituintes fenólicos da fração acetato de etila	45
5.3.2.1 Fracionamento por cromatografia contracorrente	45
5.4 Perfil cromatográfico e fracionamento da fração butanólica.....	52
5.4.1 Perfil cromatográfico	52
5.4.1.1 Cromatografia em camada delgada	52
5.4.1.2 Cromatografia líquida de alta eficiência.....	52
5.4.2 Isolamento de constituintes fenólicos do extrato butanólico.....	53
5.4.2.1 Fracionamento por cromatografia em coluna.....	53
5.5. Caracterização das substâncias isoladas	56
6 CONCLUSÃO.....	63
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	64

INTRODUÇÃO

1.1 Biodiversidade

O termo biodiversidade ou diversidade biológica refere-se à diversidade de espécies, tanto animais quanto vegetais, micro-organismos e aos ambientes que lhe dão suporte. (FRANCO, 2013). É a variedade e variabilidade das espécies vivas, compreendendo a diversidade entre e dentro de espécies, abrangendo os ecossistemas marinhos e terrestres, e ainda, a diversidade entre ecossistemas e espécies (WILSON, 1997). O conceito de biodiversidade entre a comunidade científica tornou-se mais recorrente na década de 80, onde os ativistas da época preocupavam-se com a proporção dos impactos gerados pelas ações humanas sobre a natureza, podendo levar a extinção de algumas espécies da fauna e flora (DASMANN, 1968; SOULÉ; WILCOX, 1980; FRANCO, 2013).

De acordo com o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), o Brasil apresenta uma superfície de 8.514.876,6 km², com extrema diversidade climática e geológica, incluindo desde regiões equatoriais ao norte até regiões extratropicais ao sul (IBAMA, 2010; RODRIGUES,2011). Não se sabe ao certo o tamanho da biodiversidade Brasileira, contudo, de acordo com os especialistas, uma significativa parcela da biodiversidade mundial está localizada em território brasileiro (MITTERMEIER et al., 2005; MEDEIROS, 2006). O número total de espécies existentes no país segundo Lewinsohn & Prado (2005) é estimado em cerca de dois milhões, no entanto, essa extraordinária biodiversidade ainda é pobremente conhecida e apenas 10% das espécies foram identificadas.

No Brasil, encontram-se sete biomas principais, sendo eles: a Amazônia, Mata Atlântica, Pantanal, Cerrado, Caatinga, Campos Sulinos e Costeiros (IBAMA, 2010; RODRIGUES,2011).

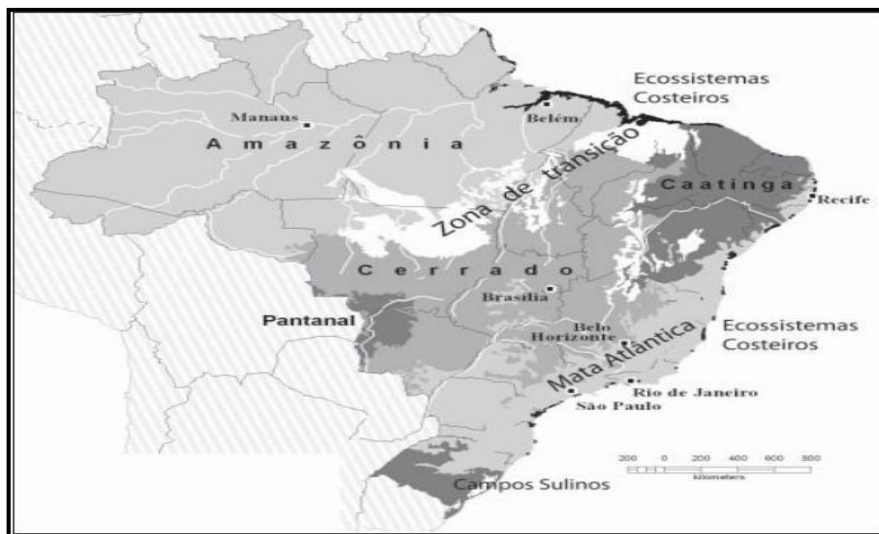


Figura 1: Principais biomas do Brasil (Dinerstein, 1995; BRANDON, et al., 2005).

A Mata Atlântica é considerada Patrimônio Nacional pela Constituição Federal (art. 225), sendo predominante na região Sudeste abrangendo os estados de São Paulo, Rio de Janeiro e Espírito Santo. Está isolada das Florestas Andinas pelo Chaco e da Floresta Amazônica pela Caatinga (SILVA, CASTELETI 2005; MOREIRA, D. O.; COUTINHO, B. R.; MENDES, S.L., 2008). Trata-se de um bioma Brasileiro, que está entre os mais importantes e ameaçados de extinção do mundo. Originalmente, a Mata Atlântica ocupava cerca de 12% do território brasileiro, atualmente ocupa 7% da sua cobertura vegetal original, mas ainda sim apresenta extrema importância ambiental e social. É considerada um dos maiores repositórios de biodiversidade do mundo, apresentando em torno de vinte mil espécies vegetais, sendo oito mil delas endêmicas (VARJABEDIAN, 2010).

Para cerca de 70% da população brasileira que vive em seu domínio, ela regula o fluxo dos mananciais hídricos, assegura a fertilidade do solo, controla o clima e protege escarpas e encostas das serras, além de preservar um patrimônio natural e cultural imenso. Na Mata Atlântica, nascem diversos rios que abastecem as cidades e metrópoles brasileiras (VARJABEDIAN, 2010, p.1).

Devido à sua extensa diversidade e por ser a mais alta prioridade de conservação do país, é considerada um importante alvo para a conservação, manejo e pesquisas científicas (MYRES et al. 2000).

A região costeira do Brasil é uma das mais exploradas do país, sofrendo um intenso impacto humano, resultando em um processo crescente de degradação. (ROCHA, BERGALLO, 1997 ;ARAÚJO, LACERDA, 1987; ARAÚJO, 2000; ROCHA et al., 2005). As Restingas ou “Planícies costeiras” como também podem ser denominadas, constituem um dos habitats que compõem a Mata Atlântica. São ecossistemas que apresentam um conjunto de

dunas e areias costeiras, cobertos de vegetação baixa, solo arenoso e as espécies da flora e fauna que habitam esses ambientes são dotados de mecanismos para suportarem fatores como os extremos de temperatura, solo instável, a presença de ventos, escassez de água, salinidade entre outros fatores (ANDRADE, 2000; MARTINI et al., 2008).

As áreas mais conhecidas da Restinga em termos de fauna e flora estão concentradas na região Sudeste, sendo elas a de Maricá, Jurubatiba, no Rio de Janeiro, e ainda a de Setiba no Espírito Santo (ROCHA et al., 2005). No Rio de Janeiro as restingas ocupam uma área de 1.200 Km², destacando-se as regiões de São João da Barra e Macaé, no litoral norte (ARAÚJO & MACIEL 1998; PEREIRA, 2004), onde foi criado em 1998 o Parque Nacional da Restinga de Jurubatiba, com o objetivo de proteger uma região que apresenta grande riqueza de espécies (PEREIRA, 2004).

O conhecimento a respeito da biodiversidade brasileira vem crescendo a passos largos e dentre as espécies de regiões tropicais já identificadas, apenas cerca de 15% foram estudadas com relação ao seu potencial farmacêutico. (CSEKE et al., 2006; RODRIGUES, 2011). Diante disso, considera-se de extrema importância o conhecimento a respeito de plantas para fins medicinais.

1.2 Plantas Medicinais

A utilização de plantas para fins medicinais, tratamento, cura e prevenção de doenças é de uso milenar, e estas são fontes importantíssimas de agentes terapêuticos, por isso o conhecimento sobre o uso de plantas é de suma importância no sentido de orientar pesquisas para busca de novas substâncias ativas que darão origem a novos medicamentos (MOURA, 2010). O conhecimento a respeito das plantas medicinais representa muitas vezes o único recurso terapêutico de algumas comunidades, e ainda, a utilização destas representa grande importância econômica, uma vez que os medicamentos industrializados não estão disponíveis a uma parcela significativa da população (AGRA et al., 2008; MOURA, 2010).

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), mesmo com o surgimento de novos medicamentos sintéticos e com o crescimento da indústria farmacêutica, 65 a 80% da população do mundo utilizam as plantas medicinais para fins terapêuticos, percebendo-se a importância e a crescente proporção do uso das plantas para o tratamento de doenças (ILHA et al., 2008; MIGUEL, 2004; MOURA, 2010).

O conceito de planta medicinal definido pela OMS seria “todo e qualquer vegetal que possui, em um ou mais órgãos, substâncias que podem ser utilizadas com fins terapêuticos ou

que sejam precursores de fármacos semissintéticos”. Já o medicamento fitoterápico, de acordo com a Vigilância Sanitária, em sua RDC nº 26 de 13 de maio de 2014, seria (JUNIOR, 2005):

Produto obtido de matéria-prima ativa vegetal, exceto substâncias isoladas, com finalidade profilática, curativa ou paliativa, incluindo medicamento fitoterápico e produto tradicional fitoterápico, podendo ser simples, quando o ativo é proveniente de uma única espécie vegetal medicinal, ou composto, quando o ativo é proveniente de mais de uma espécie vegetal (ANVISA, 2015)

O avanço científico abrangendo estudos farmacológicos e químicos das plantas medicinais, visando a obtenção de novos compostos com propriedades terapêuticas, é notavelmente crescente nos últimos anos, com o desenvolvimento de novas técnicas vem se tornando possível a elucidação de estruturas moleculares complexas de constituintes naturais. As plantas têm contribuído para a obtenção de diversos fármacos, que são utilizados até hoje, como por exemplo, a morfina, emetina, vincristina, rutina, entre outros (FILHO, 1997).

1.3 Família Myrtaceae

A família Myrtaceae abrange cerca de 100 gêneros e 3500 espécies, encontradas principalmente em regiões tropicais e subtropicais de todo o mundo, apresentando centros de diversidade na América tropical e na Austrália, sendo também encontradas em regiões temperadas, porém com menor frequência (BARROSO, 1984; ARANTES, 2002). De acordo com Cronquist (1981) esta família se divide em duas subfamílias, sendo elas a Myrtoideae e Leptospermoideae (ARAÚJO, 2010).

A Myrtoideae abrange cerca de 70 gêneros com 2400 espécies ocorrendo principalmente nas Américas Central e do Sul (BRIGGS & JOHSON, 1979). As espécies de Myrtaceae estão localizadas com maior frequência nas formações vegetacionais do Brasil e são fontes de grande interesse para diversos estudos pelos mais variados interesses. Estas espécies são fontes de compostos como os sesquiterpenos e monoterpenos que exibem uma gama de efeitos biológicos incluindo antineoplásico, microbicida, antimalárico, antioxidante, antimicrobiano e antiviral. Algumas de suas espécies são produtoras de óleos essenciais, como exemplo pode-se citar o gênero *Eucalyptus*, o qual são descritas atividades anti-inflamatória, antifúngica e antibacteriana. Algumas plantas do gênero *Myrcia* são empregadas como hipoglicemiante, anticancerígena e antidiabética (ARAÚJO, 2010; SOUZA et al., 1998).

A família Myrtaceae está representada por árvores ou arbustos, com folhas simples, geralmente opostas, de coloração sempre verde e contendo glândulas produtoras de óleos

essenciais. Apresentam atividade anti-inflamatória relevante, sendo atribuída à presença de sesquiterpenos nos óleos essenciais dessas plantas (MENEZES et al., 1997). Estes, além de apresentarem aplicações na indústria farmacêutica, também estão relacionados ao preparo de alimentos, cosméticos e perfumes (MALINOWSKI; NAKASHIMA; ALQUINI, 2009).

Entre a grande diversidade de frutíferas nativas, as da família Myrtaceae estão em destaque e ocorrem com ampla variabilidade. Nessa família está o gênero *Psidium*, ao qual pertencem os araçazeiros, como são popularmente conhecidos e ocorrem com ampla distribuição no território brasileiro, assim como em outras partes do mundo (FRANZON et al., 2009).

1.4 Gênero *Psidium*

O gênero *Psidium*, em sua distribuição nativa, é um gênero neotropical, encontrado desde o Sul do México até a capital da Argentina, Buenos Aires, abrangendo ainda o Oeste das Índias e dois arquipélagos no pacífico (LANDRUM; KAWASAK, 1997; SOARES-SILVA, PROENÇA, 2008). Neste gênero encontra-se cerca de 100 espécies, e destas, a de maior importância é a *Psidium guajava*. Existem ainda, várias outras espécies de importância comercial e farmacológica, produtoras de frutos comestíveis e dentre estas destaca-se a espécie *Psidium cattleianum*, pelas características de seus frutos com sabor exótico e contendo elevado nível de vitamina C (RASEIRA, 1960). Das espécies de araçazeiros, as que promovem maior interesse comercial são *P. cattleianum* sabine e *P. guineense* (BEZERRA et al., 2006). No Brasil, as espécies deste gênero são encontradas ao Sul do país e também nos estados de São Paulo e Minas Gerais, tendo como exemplos a *P. grandifolium*, *P. arboreum* Vell, *P. lucidum* var, *P. cattleianum* Sabine, *P. guajava*, entre outras (PIO CORREA, 1926; FRANZON et al., 2009).

As plantas exibem vários compostos antioxidantes em sua constituição, sendo que a quantidade e o perfil desses compostos se diferenciam de acordo com o tipo, variedade e grau de maturação do vegetal, assim como, com as condições climáticas e de cultivo. Para a avaliação dessa ação antioxidante é necessário a extração desses compostos, que podem apresentar polaridades diferentes (SILVA, et al., 2013).

O estudo químico de plantas medicinais é feito através de diversos métodos de isolamento, purificação e identificação das substâncias, que são dispendiosos e que requerem bastante tempo, tais como cromatografias em coluna (sílica gel, sephadex, entre outros), cromatografias líquidas e gasosas, ressonância magnética nuclear (RMN), ultravioleta (UV),

entre outros (ROBARDS, 2003). No entanto, estas técnicas não são capazes de realizar a identificação e a concentração da substância ao mesmo tempo (RODRIGUES, 2011).

A *Psidium guajava*, conhecida popularmente como goiabeira, é uma planta originária da América central e da América do Sul que apresenta cultivo em países de clima tropical, e é a espécie de maior importância da família Myrtaceae. Na medicina popular seu uso é indicado para cólicas, diarreia, colite, dor de barriga, desintéria e como cicatrizante, sendo o extrato de suas folhas capaz de apresentar atividades antioxidante, anti-diarréica e antimicrobiana e os extratos de sua fruta apresentam atividade hipoalergênica (VENDRUSCOLO et al., 2005; TORRES et al., 2005; CAMPOS, 2010). Ainda apresenta atividade antimicótica contra *Aspergillus fumigatus* (SATO et al., 2000; PESSINI et al., 2003) e também no tratamento contra as leveduras *Candida albicans*, *C. krusei*, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis*. Com relação a composição química de suas folhas, encontram-se taninos (9-10%), óleo essencial (90,3%), rico em cariofileno, nerolidiol, β -bisaboleno, aromadendreno, p-selinemo, α -pinemo e 1,8-cineol; triterpenóides e β -sitosterol (ALVES, 2006; ARAÚJO et al., 2015). A quercetina glicosídica é o principal componente do extrato metanólico das folhas e por apresentar atividade antioxidante vem atraindo a atenção de pesquisadores para aplicação deste produto na área da farmacologia (ESCRIG et al., 2001; IHA et al., 2008).

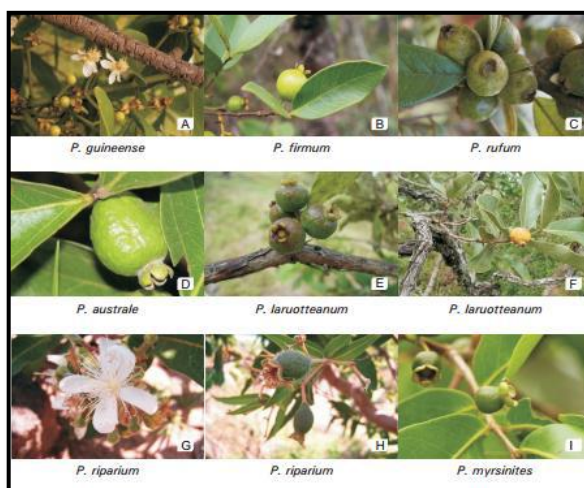


Figura 2: Espécies de araçás nativos da região Centro- oeste do Brasil (FRANZON, et al., 2006).

1.5 Espécie *Psidium cattleianum* Sabine

Psidium cattleianum Sabine é uma planta tropical oriunda da família Myrtaceae, e no Brasil é nativa da Costa Atlântica especialmente em florestas densas e restingas, porém tem a capacidade de se adaptar a uma diversidade de climas e por isso também pode ser

encontrada em diversos outros países. No Brasil é conhecida pelo seu nome popular araçá-rosa, araçá-vermelho ou araçá do campo e seus frutos e folhas apresentam alto potencial para comercialização e importantes atividades biológicas (BIEGELMEYER et al., 2011; PATEL, 2012; RIBEIRO et al., 2014).

Na medicina tradicional brasileira é utilizada para tratar diversas doenças como diarreia, diabetes, cárie dentária, usada como adstringente e como agente hepatoprotetor, além de apresentar atividade antimicrobiana e em estudos recentes foi verificado também seu potencial em reduzir a metástase no câncer de pulmão, e esse potencial é devido a presença de um composto fenólico identificado como quercetina-3-glucuronido (MENEZES et al., 2010; JUNHO et al., 2011; IM et al., 2012; ALVARENGA et al., 2013;). Suas folhas são utilizadas como chá, diretamente pela mastigação, usadas também para uso tópico ou como bebida para alívio de dores como dor de dente, dor de barriga, de garganta e dor abdominal (PÉTARD, 1986; VENDRUSCOLO et al., 2005; MENTZ, 2006; ALVARENGA et al., 2013).

Assim, *P. cattleianum* pode ser considerada uma planta de grande interesse tanto na indústria de alimentos quanto na indústria farmacêutica, com aplicação potencial para alimentos funcionais e fitoterápicos (PATEL, 2012), e essas utilidades são devido a presença de compostos bioativos como os carotenóides e os compostos fenólicos. Estes compostos presentes nos extratos dessa planta são conhecidos por apresentarem capacidade de eliminação de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (ALMEIDA et al., 2008; CHISTE et al., 2011; CHISTE et al., 2012), porém essa capacidade varia significativamente de acordo com o potencial antioxidante, interações químicas entre si e interações com componentes endógenos (RIBEIRO et al., 2014).

Os compostos fenólicos estão incluídos entre as diversas classes de substâncias antioxidantes de ocorrência natural e têm recebido muita atenção principalmente por inibirem a peroxidação lipídica, estes compostos enquadram-se em várias categorias, tais como fenóis simples, flavonoides, cumarinas, ácidos fenólicos, taninos, etc. Sua atividade antioxidante está relacionada principalmente à sua estrutura química e às suas propriedades redutoras, estas características apresentam importante papel na neutralização ou sequestro de radicais livres e quelando metais de transição, atuando na etapa de iniciação e propagação do processo oxidativo (SOUZA, et.al, 2007).

De acordo com Medina et al. (2011) a atividade antimicrobiana, antiproliferativa e antioxidante do extrato aquoso e de acetona de *P. cattleianum* foram correlacionadas aos altos níveis de compostos fenólicos presentes nesses extratos.



Figura 3: Espécie *Psidium cattleianum* Sabine (westafricanplants.senckenberg).

1.6 Atividade anti-hipertensiva

A hipertensão é uma doença que acomete cerca de 970 milhões de pessoas em todo o mundo e é uma das principais causas de mortalidade e morbidade. Um indivíduo é diagnosticado com hipertensão quando sua pressão arterial é consistentemente maior que 140/90 mmHg (FISCHER et al., 2010). É descrita como uma fisiopatologia de origem multifatorial levando-se em consideração os vários mecanismos de controle da pressão como mecanismos estruturais, hormonais e neurais (PAGE, 1999; RIBEIRO, 2007).

É uma doença que afeta homens e mulheres embora seja prevalente em homens e cerca de 30% da população adulta é afetada, porém um terço das pessoas que são acometidas não sabem que têm a doença. A pressão arterial elevada é um dos fatores de risco para o desenvolvimento do infarto do miocárdio, acidente vascular cerebral, insuficiência renal e ainda pode provocar cegueira e insuficiência cardíaca (WHELTON, 1994; AHMAD et al., 2015).

Os produtos naturais são fontes ricas de agentes terapêuticos desde a antiguidade, por meio de estudos clínicos, químicos e farmacológicos das plantas medicinais foram descobertos diversos fármacos como por exemplo a salicilina (substância química que originou a aspirina) da *Salix Alba*, a efedrina da *Ephedra sínica*, a digitoxina da *Digitalis purpúrea*, entre outros (MASHOUR et al., 1998; BUTLER, 2004). A reserpina, originária da espécie *Rauwolfia serpentina*, foi um dos primeiros fármacos utilizados para o tratamento da hipertensão. (ENGEL, STRAUS, 2002).

Diversos estudos já realizados têm demonstrado o potencial de substâncias isoladas de plantas no tratamento de doenças cardiovasculares, dentre essas substâncias, os compostos

fenólicos como os flavonóides e os taninos exibem atividade vasodilatadora, antioxidante e moduladoras do metabolismo lipídico (ACHIKE & KWAN, 2003), e estas estão diretamente relacionadas à redução do risco cardiovascular.

De acordo com a OMS, 80% da população de todo o mundo faz uso das medicinas tradicionais para suprimento das necessidades de assistência médica primária (ELISABETSKY, 1987). Por isso, a utilização de plantas medicinais, sem respaldo científico têm atraído o interesse de pesquisadores na validação de novos fármacos (MATOS, 1994; RIBEIRO, 2007).

Diversas plantas medicinais são usadas para inúmeros fins incluindo para o tratamento da hipertensão, dentre essas plantas está a *Psidium guajava*, que é uma planta pertencente ao mesmo gênero e família da espécie estudada em questão (*Psidium cattleianum* Sabine), e esta é utilizada na medicina popular da África do Sul para tratar uma diversidade de doenças incluindo a hipertensão arterial (OJEWOLE, 2005; OH et al., 2005). Em estudos já realizados, o extrato aquoso de suas folhas exibiu efeitos cardioprotetores contra lesão isquêmica e ainda causou hipotensão através de mecanismos colinérgicos. Portanto, essa planta pode trazer benefícios na prevenção de doenças cardiovasculares, uma vez que seu uso tradicional para a hipertensão está bem estabelecido (OJEWOLE, 2005; GUTIÉRREZ, MITCHELL, SOLIS, 2008). Sendo assim, o presente estudo tem como propósito o isolamento de substâncias bioativas que apresentem atividade anti-hipertensiva.

2 JUSTIFICATIVA

A hipertensão é uma doença que acomete milhares de pessoas em todo o mundo e ainda é um fator de risco para o desenvolvimento de uma série de outras doenças. As plantas medicinais são fontes ricas em diversas substâncias e é conhecido o potencial que essas substâncias isoladas apresentam no tratamento de doenças cardiovasculares, como por exemplo os compostos fenólicos, dentre elas o gênero *Psidium*. Diante disso, é importante que se desenvolva novos medicamentos para o tratamento da hipertensão gerando um custo menor à população. O extrato bruto, as frações em acetato de etila e butanol foram testadas pelo Laboratório Integrado de Pesquisa (LIP) pela Prof^a. Dr^a. Juliana Montani e apresentaram uma porcentagem de relaxamento da aorta de 58,13%, 36,5% e 31,24% respectivamente. Com base nessas informações torna-se interessante o isolamento de substâncias provenientes dos extratos de *Psidium cattleianum* Sabine, para desenvolvimento posterior de um novo medicamento fitoterápico.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Isolar substâncias dos extratos bioativos das folhas da espécie vegetal *Psidium cattleianum* Sabine com atividade vasodilatadora.

3.2 Objetivos específicos

3.2.1 Realizar o fracionamento das frações bioativas de *P.cattleianum* por extração líquido-líquido, cromatografia em coluna e cromatografia contracorrente;

3.2.2 Analisar por CLAE-DAD as frações e sub-frações provenientes da cromatografia em coluna e CCC;

3.2.3 Identificar as substâncias isoladas pela técnica de Ressonância magnética nuclear.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Coleta da Espécie vegetal

As partes aéreas da espécie vegetal *P.cattleianum* (Myrtaceae), foram coletadas no Parque Nacional de Jurubatiba no município de Carapebus e Quissamã, no litoral nordeste do Estado do Rio de Janeiro.



Figura 4: Partes aéreas de *Psidium cattleianum* (ufrgs.br/fitoecologia/florars)

4.2 Preparação dos extratos orgânicos

4.2.1 Percolação

O peso das partes aéreas de *P. cattleianum* sabine coletada foi de 886,91g. O material vegetal foi pulverizado em moinho de facas e dividido em dois percoladores (Figura 5):

- (1) Contendo 500 g da espécie;
- (2) Contendo 386,91 g da espécie;

O solvente utilizado foi o etanol P.A. (3,0 L), e deu-se início ao procedimento. Foram realizadas quatro percolações até que o extrato etanólico obtido adquirisse uma coloração quase que transparente, finalizando o processo. O material obtido foi filtrado para posterior secagem.



Figura 5: Percolador.

4.2.2 Evaporação do solvente em aparelho de evaporação rotatório de pressão reduzida

Após o término das percolações, o extrato foi submetido ao evaporador rotatório de pressão reduzida da marca Heidolph, mantendo o banho Maria do aparelho à 45 - 50°C e pressão à 200 mbar, visando uma remoção rápida do solvente do extrato.

4.3 Fracionamento do extrato etanólico

4.3.1 Extração líquido-líquido em funil de separação

Cerca de 5 g do extrato etanólico seco de *P. cattleianum* foi dissolvido em 500 mL da solução MeOH/H₂O (9:1, v/v) e a esta solução deu-se o nome de fase hidroalcólica. A extração líquido-líquido foi feita com solventes orgânicos seguindo uma ordem crescente de polaridade.

Iniciou-se a extração com o hexano, em seguida, diclorometano, acetato de etila e butanol, utilizando 30 mL de cada solvente orgânico para cada partição e a mesma fase aquosa para todas as etapas. Com o término da partição, adicionou-se aos Erlenmeyers, contendo as fases orgânicas dos solventes utilizados, o sulfato de sódio anidro para eliminação da água presente nas frações. Em seguida filtraram-se todas as frações para retirada do sulfato de sódio anidro adicionado e posterior secagem.

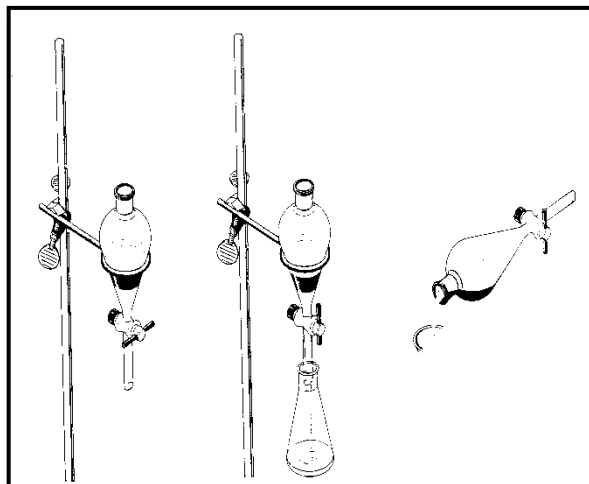


Figura 6: Extração líquido-líquido.

4.4 Perfil cromatográfico e fracionamento das frações orgânicas

4.4.1 Perfil cromatográfico

4.4.1.1 Cromatografia em camada delgada

Para a caracterização qualitativa dos extratos foi utilizada a técnica de CCD, onde em uma cromatoplaça de sílica-gel SilliaPlate da Silicycle de dimensão 5,0 x 1,5 mm, sobre suporte de alumínio aplicou-se uma porção das frações AcOEt e BuOH utilizando um capilar e tendo como sistema de eluente a mistura AcOEt/AcO/H₂O/Ác. Acético glacial/Ác. fórmico (5:3:1:0,2:0,2, v/v/v/v/v). Em seguida, colocou-se cuidadosamente a placa na cuba, evitando que o ponto de aplicação da amostra mergulhasse no solvente. Quando o solvente atingiu 0,5 cm do topo da placa, esta foi removida e aguardou-se a secagem para realizar a observação do número de bandas coloridas, bem como a distância percorrida por cada substância utilizando radiação UV no comprimento de onda longa (365 nm) após revelação com NP/PEG.

4.4.2 Fracionamento por cromatografia em coluna

4.4.2.1 Sephadex LH-20

Para cromatografia em coluna foi utilizada uma coluna de dimensões 37 x 2 cm, utilizando cerca de 30 g de sephadex LH-20 da marca GE Healthcare Life Science como adsorvente da fase estacionária e MeOH/H₂O como fase móvel.

Cerca de 300 mg da fração BuOH da *P. cattleianum* foram diluídas em 5 mL de metanol, e posteriormente inserida na coluna para iniciar a cromatografia. A eluição iniciou-se utilizando apenas Metanol (100%), em seguida MeOH:H₂O (9:1, v/v) e para finalizar, usou-se novamente o Metanol (100%) para realizar a lavagem da coluna. As frações obtidas foram devidamente secas e pesadas.

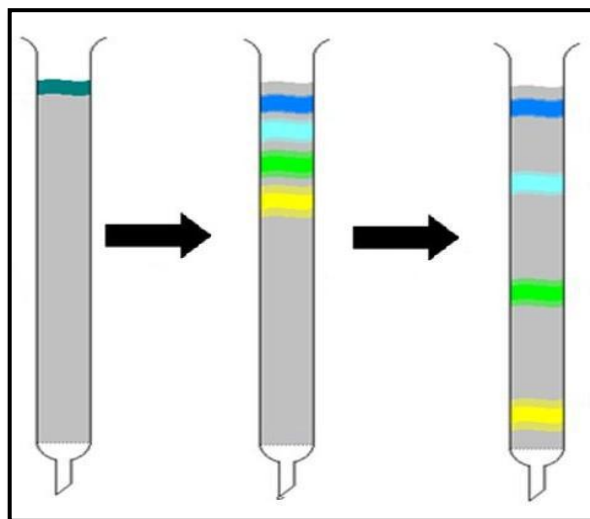


Figura 7: Cromatografia em coluna.

4.4.2.2 Cromatografia de fase reversa (Sílica ligada a C₁₈)

Após o fracionamento da fração BuOH em coluna de Sephadex LH-20 e análise por CLAE (item 4.4.4.1), foi selecionada a sub-fração PCBut(A), pois exibia substâncias parcialmente isoladas, e foi feita uma nova cromatografia em coluna para melhor separação destas.

Para esta cromatografia foi utilizada uma coluna de dimensões 54 x 1,2 cm a qual foi empacotada com cerca de 10 g de sílica ligada a C₁₈. (Carbon 17%) da marca Silicycle (fase estacionária), com tamanho de partícula de 40-63 µm e como fase móvel foi utilizada H₂O/MeOH. Iniciou-se apenas com 50mL de água pura e em seguida o volume de água foi sendo diminuído e adicionando-se metanol nas seguintes proporções: H₂O/MeOH (9:1, v/v), H₂O/MeOH (8:2, v/v), H₂O/MeOH (7:3, v/v) e assim por diante até o gradiente chegar em MeOH 100% , finalizando a análise.

Cerca de 28,6 mg da PCBut(A) foi diluída em 10 mL de metanol e inserida na coluna cromatográfica para iniciar o procedimento. Suas sub-frações foram devidamente coletadas, secas e pesadas, e em seguida analisadas por CLAE (item 4.4.4.1)

4.4.3 Fracionamento por cromatografia contracorrente

4.4.3.1 Escolha do sistema de solvente

A fração AcOEt foi submetida ao fracionamento através da técnica de cromatografia contracorrente (CCC).

A CCC é uma forma de cromatografia de partição líquido-líquido sem o uso de adsorventes e utiliza duas fases líquidas imiscíveis, onde uma é a fase estacionária, retida no aparelho sem o uso de suportes sólidos, e a outra a fase móvel, que é passada através da fase estacionária. O princípio da separação envolve a partição de um soluto entre duas fases líquidas imiscíveis (CONWAY, 1990; LEITÃO, 2005). Essa técnica é amplamente utilizada na separação de produtos naturais devido à ausência de suporte sólido, evitando problemas como a adsorção irreversível das amostras e a degradação de seus constituintes, assim como permite a injeção de uma grande quantidade de amostra sem necessidade de purificação prévia, e utiliza um baixo consumo de solventes (MARSTON et al., 1994; OKA et al., 1998; LEITE et al., 2005).

A técnica mais utilizada atualmente é a cromatografia contracorrente de alta velocidade (HSCCC), que é composta por uma bobina de teflon enrolada de forma espiral, realizando um movimento planetário em torno de um eixo central. A fase estacionária é mantida no equipamento através da força centrífuga e a fase móvel pode ser bombeada em alta velocidade, o que permite um menor tempo de análise (MARSTON et al., 1994; OKA et al., 1998; LEITE et al., 2005).

A escolha do sistema de solventes adequado ao isolamento de substâncias é fundamental para o sucesso da técnica e separação dos constituintes, tem como objetivo minimizar a diferença de polaridade entre as fases e aumentar a solubilidade da amostra em ambas, de maneira proporcional, ou seja, obtendo-se um coeficiente de partição aproximado ou igual a um (PLAZA, 2007). Existem diversas maneiras de se realizar essa escolha, sendo que a utilizada neste trabalho está ilustrada na Figura 10. Uma das características básicas na escolha é que a amostra seja solúvel no sistema escolhido. Para isso, foram testados diversos sistemas de solventes em tubos de ensaio e observou-se a diluição da amostra e a separação desta entre as fases.

Os sistemas testados foram:

- (1) Hex/AcOEt/MeOH/H₂O (3:7:3:7, v/v/v/v)
- (2) Hex/AcOEt/MeOH/H₂O/BuOH (3:7:3:7:0,1, v/v/v/v/v)
- (3) Hex/AcOEt/MeOH/H₂O/BuOH (3:7:3:7:0,2, v/v/v/v/v)

- (4) Hex/AcOEt/MeOH/H₂O/BuOH (3:7:3:7:0,3, v/v/v/v/v)
- (5) Hex/AcOEt/MeOH/H₂O (2:0,05:2:0,1, v/v/v/v)
- (6) Hex/AcOEt/MeOH/EtOH/H₂O (1:4:1:0,4:4, v/v/v/v/v)

Uma pequena quantidade da fração em AcOEt (cerca de 1 mg) foi adicionada a cada tubo de ensaio contendo os sistemas de solventes citados acima, agitados cuidadosamente com auxílio de um vórtex da marca Edutec e observado a separação de fases. Em seguida, foi feita a CCD com as amostras, aplicando-se na parte inferior da cromatoplaca a fase superior e a fase inferior de cada sistema de solvente. As placas foram inseridas em uma cuba cromatográfica, utilizando como sistema de eluente AcOEt/AcO/H₂O (2,5:1,5:0,2 v/v/v), e foi dado início a análise cromatográfica, posteriormente foram observadas em câmara UV nos comprimentos de onda de 254 e 365 nm, para observação da separação das substâncias.

Este teste de sistema de solventes em tubo de ensaio tem como objetivo escolher o melhor sistema a ser utilizado na CCC, sendo que este sistema deve apresentar uma separação de fases com volumes próximos, deve diluir totalmente a amostra e apresentar uma separação uniforme desta entre ambas as fases para a substância alvo, não deve haver formação de emulsão. O sistema escolhido, neste caso, foi o número (6).

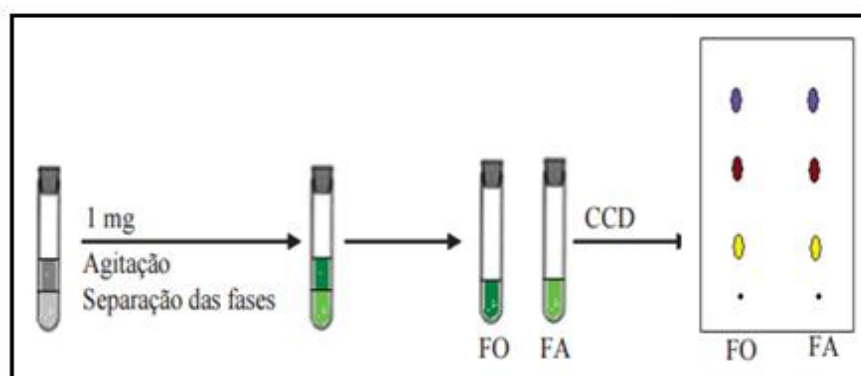


Figura 8: Método para escolha do sistema de solvente para CCC (1mg da fração AcOEt dissolvida em 5mL da mistura de solventes. FO= fase orgânica (fase superior); FA= fase aquosa (fase inferior)).

4.4.3.2 Condições para a CCC

O equipamento utilizado para a CCC foi o A ECS QuickPrep ECP 2000. O sistema bifásico de solvente utilizado foi Hex/AcOEt/MeOH/EtOH/H₂O nas proporções 120:480:120:48:480, v/v/v/v/v, sendo a fase superior utilizada como fase móvel (orgânica) e a fase inferior utilizada como fase estacionária (aquosa). Este sistema foi preparado e deixado em repouso por 24 h para uma total separação e saturação das fases.

A fase estacionária foi bombeada para a coluna e após o preenchimento desta, a fase móvel foi bombeada com uma vazão de $2,0 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ com o equipamento ligado à uma rotação de 850rpm.

Cerca de 500 mg da fração em AcOEt foi dissolvida em 10 mL do sistema de solvente utilizado. Essa mistura foi filtrada e injetada no loop do aparelho com auxílio de uma seringa. Foram coletadas frações de 4 mL cada (por tubo), sendo 56 tubos com rotação ligada, 56 tubos com rotação desligada e 84 tubos coletando volume de extrusão, utilizando duas vezes a fase móvel e uma vez a fase estacionária, respectivamente. A técnica foi realizada à uma temperatura de 35°C , volume morto de 28 mL e a lavagem foi feita utilizando MeOH/H₂O.

As frações coletadas foram analisadas por CCD e de acordo com o perfil apresentado por cada uma, realizou-se a junção das mesmas. Em seguida, foram transferidas para pequenos frascos de vidro e devidamente secas e pesadas. As frações obtidas desta etapa foram submetidas à CLAE (item 4.4.4), obtendo-se assim seus respectivos perfis cromatográficos.

4.4.4 Cromatografia líquida de alta eficiência

4.4.4.1 CLAE analítica

O equipamento utilizado para realizar as análises cromatográficas dos extratos foi o Shimadzu equipado com controlador de sistema CBM-20A operado pelo programa LC Solution Versão 1.25. Além da controladora, o equipamento é composto de sistema quaternário de bombas LC-20AT, detector de arranjo de fotodiodos (DAD) SPD-M20A, forno CTO-20A, autoinjeter SIL-20A e degaseificador DGU-20AS. As análises foram realizadas por fase reversa empregando uma coluna Luna $5\mu \text{ C}_{18}$ (2) 100\AA , com dimensões de $250 \times 4,6 \text{ mm}$ da Phenomenex.

4.4.4.1.1 Preparo da amostra

Cerca de 1 mg das frações em AcOEt e BuOH foram diluídas em 1 mL de metanol, transferidos para um vial para dar início à análise.

Através dos valores obtidos na pesagem das frações da CC, fizeram-se cálculos para obter um volume respectivo para determinada concentração para uso no CLAE, devendo-se todas as amostras estar a uma concentração de $1 \text{ mg}/1 \text{ mL}$.

A cada fração obtida da CC, foi adicionado 1 mL de metanol, sendo transferido para um eppendorf apenas o volume determinado pelos cálculos, para ajustar a concentração. Para as amostras da fração em AcOEt secou-se o solvente contido nos eppendorfs e adicionou-se 1 mL de solução de H₂O:ACN (0,8:0,2, v/v) em cada. E para as amostras da fração em BuOH, o solvente foi seco e adicionou-se 1 mL de metanol grau HPLC em cada. Estes foram transferidos para um vial para análise sob CLAE.

4.4.4.1.2 Condições para a CLAE

As condições utilizadas para análise das frações em AcOEt e BuOH estão demonstradas na Tabela 1.

Tabela 1: Condições cromatográficas definidas para a análise das frações em AcOEt e BuOH, e suas sub-frações.

Parâmetro	Descrição
Coluna	Luna C ₁₈ (2) 100Å analítica (250 x 4,6 mm)
Fase Móvel	Água+TFA (0,05%): Acetonitrila
Temperatura	30°C
Vazão	1,0 mL/min
Volume de Injeção	20µL
Pressão	87 Kg/cm ²
Detecção	UV em 225 nm e 340 nm

As condições cromatográficas para análise da fração em BuOH foram as mesmas descritas anteriormente, exceto pela fase móvel utilizada, que foi H₂O+TFA (0,05%):MeOH. As condições do gradiente de eluição para cada amostra são mostradas nas Tabelas 2 e 3.

Tabela 2: Gradiente de eluição para análise da fração em AcOEt e suas sub-frações.

Tempo (min)	Concentração de Acetonitrila (%)
0	15
12	32
13	32
15	35
20	100
23	100
24	15
30	15

Tabela 3: Gradiente de eluição para análise da fração em BuOH e suas sub-frações.

Tempo (min)	Concentração de Metanol (%)
0	30
10	60
15	80
20	100
25	30
30	30

4.4.4.2 CLAE semi-preparativa

Realizou-se o fracionamento de uma amostra proveniente da fração em AcOEt obtida pela técnica de CCC. A fração foi diluída em 1 mL de MeOH grau HPLC, transferida para um vial e inserida no aparelho para realização da análise.

4.4.4.2.1 Condições para a CLAE

As condições utilizadas para o fracionamento estão representadas na Tabela 4. Foram realizadas 15 análises de 30 minutos cada.

Tabela 4: Condições cromatográficas definidas para o isolamento de substâncias por CLAE semi-preparativa.

Parâmetro	Descrição
Coluna	Luna C ₁₈ Semi-preparativa (250 x 10 mm)
Fase Móvel	Água+TFA (0,05%):Acetonitrila
Temperatura	30 °C
Vazão	4 mL/min
Volume de Injeção	100 µL
Pressão	126 Kgf/cm ²
Detecção	UV em 225nm e 340nm

As amostras obtidas desta etapa foram congeladas, liofilizadas e pesadas obtendo-se suas respectivas massas. Após isso, estas foram diluídas em 1 mL de metanol e analisadas através de CLAE-DAD seguindo as condições demonstradas na Tabela 1, com o objetivo de realizar o perfil cromatográfico das substâncias isoladas.

4.5 Atividade vasodilatadora

O ensaio para atividade vasodilatadora foi realizado no Laboratório Integrado de Pesquisa (LIP), pela Prof^a. Dra. Juliana Montani. Registro de tensão isométrica da aorta: Ratos Winstar machos (200-250 g) foram sacrificados por deslocamento cervical sob anestesia geral, para que a porção torácica da artéria aorta fosse dissecada e limpa através da retirada do tecido conjuntivo externo, sendo dividida em cilindros de aproximadamente 3 mm de comprimento. Os anéis de aorta foram posicionados em hastes experimentais em cubas verticais preenchidas com solução Krebs- Henseilet continuamente oxigenada com mistura carbogênica (95% O₂/ 5% CO₂), à 37 °C. Uma das extremidades do tecido foi conectada a um transdutor de tensão isométrica (MLT0201; ADInstruments) e os sinais gerados foram digitalizados (Power Lab 4/30; ADInstruments) e armazenados em computador para posterior análise através do programa LabChart Pro (ADInstruments) (Raimunto et. al., 2006).

Protocolos Experimentais:

Efeito vasodilatador dos extratos brutos, frações e substâncias isoladas: Após o período de equilíbrio da preparação, a contratatura do músculo liso vascular foi induzida com 10 µM de fenilefrina ou 40 mM de KCl e foram adicionadas concentrações crescentes das

amostras a serem testadas. Foram utilizados anéis de aorta com e sem endotélio com o objetivo de verificar a importância do endotélio vascular para o efeito vasodilatador. Os experimentos foram realizados de acordo com o protocolo Macaé 01 de 14 de Março de 2012 (RAIMUNDO et al., 2008).

4.6 Ressonância magnética nuclear

Todas as frações que exibiram substâncias isoladas via análise por CLAE-DAD foram submetidas à RMN ^1H com o objetivo de realizar a elucidação desses compostos.

Os experimentos de RMN de ^1H foram realizados em espectrômetros Varian 400 e 500 MHz do Instituto de Pesquisas de Produtos Naturais (IPPN/UFRJ). Tetrametilsilano (TMS) foi utilizado como referência interna. As substâncias foram dissolvidas em 0,6 mL de clorofórmio, benzeno e/ou metanol deuterados para as análises. Os deslocamentos químicos foram medidos em partes por milhão (ppm) da frequência aplicada e as constantes de acoplamento (J) medidas em Hertz (Hz).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Obtenção e rendimento dos extratos orgânicos

O material vegetal (886,91 g) extraído por percolação, após secagem (item 4.2.2), gerou 450,30 g de extrato etanólico, apresentando um rendimento de 50,77%.

A extração líquido-líquido segue uma ordem crescente de polaridade a fim de extrair inicialmente as substâncias ativas menos polares e em seguida, as mais polares.

Foram feitas três partições com o hexano, duas com diclorometano, nove com acetato de etila e cinco com butanol. As frações, incluindo o extrato aquoso, foram devidamente secas (item 4.2.2) e a fase aquosa foi submetida a liofilização.

A massa, obtida após secagem, e o rendimento das frações, estão representados na Tabela 5, onde se verifica que os extratos que apresentaram maior rendimento foram os extratos butanol e acetato de etila, respectivamente.

Tabela 5: Rendimento das frações orgânicas obtidas da extração líquido-líquido.

Frações	Massa (mg)	Rendimento (%)
Hexano	169,7	3,4
Diclorometano	1,9	0,04
Acetato de Etila	843,3	17,0
Butanol	1620,6	32,4
Aquosa	1842,3	36,0

5.2 Avaliação da atividade vasodilatadora dos extratos

O extrato bruto, na concentração de 10 µg/mL, e as frações AcOEt e BuOH, na concentração de 30 µg/mL, foram testadas pelo Laboratório Integrado de Pesquisa (LIP) pela Prof^a. Dr^a. Juliana Montani e apresentaram uma porcentagem de relaxamento da aorta de 58,13%; 36,5% e 31,24% respectivamente.

Sugere-se que essa atividade hipotensora é proveniente da presença de flavonoides como a quercetina, miricetina, luteolina e Canferol existentes nos extratos das folhas de *P. cattleianum*, visto que, em estudos já realizados foi verificado a abundância desses compostos nas espécies de *Psidium* (ARIMA e DANO, 2002; VARGAS, et al. 2006; FERREIRA, 2009).

Em vista disso, torna-se importante o isolamento dessas substâncias que apresentam atividade vasodilatadora.

5.3 Perfil cromatográfico e fracionamento da fração acetato de etila

5.3.1 Perfil cromatográfico

5.3.1.1 Cromatografia em camada delgada

A CCD é um tipo de cromatografia que consiste na separação dos componentes de uma mistura através da migração diferencial destes sobre uma camada delgada de adsorvente retido sobre uma superfície plana. É uma técnica simples e econômica, além de prática e de rápida realização.

O sistema de eluente utilizado, AcOEt/AcO/H₂O/Ác. Acético glacial/Ác. fórmico (5:3:1:0,2:0,2, v/v/v), é um sistema polar, e de acordo com o perfil cromatográfico apresentado, pode-se dizer que a fração AcOEt é constituída por substâncias de média e alta polaridade, que possivelmente tratam-se de substâncias glicosiladas.

Na caracterização qualitativa da fração, observou-se a possível presença de flavonoides, caracterizado pela cor fluorescente amarelada/alaranjada (Figura 9) após revelação com NP/PEG. O revelador NP por ser muito sensível e específico foi escolhido para a observação de substâncias fenólicas, uma vez que ele reage com essas substâncias formando complexos fluorescentes. Enquanto que o PEG foi utilizado como intensificador de fluorescência. Após revelação química, a coloração laranja-amarelado indica a presença de flavonóis como a quercetina, miricetina e seus glicosídeos. A coloração laranja indica a presença da flavona luteolina e seus glicosídeos; a coloração amarela-esverdeada para os flavonóis canferol, isoramnetina e seus glicosídeos e flavonas como a apigenina e seus glicosídeos. E a coloração azul indica a presença de ácidos fenólicos (WAGNER, BLADT, 1996; CORRÊA et.al, 2016).



Figura 9: Perfil cromatográfico do extrato AcOEt por CCD, sob observação em câmara de UV em 365 nm após revelação com NP/PEG.

5.3.1.2 Cromatografia líquida de alta eficiência

O perfil cromatográfico da fração AcOEt, obtido por CLAE (item 4.4.4.1), apresenta seis picos majoritários, sendo eles os picos 8, 9, 10, 11, 12 e 13, apresentando tempos de retenção entre 12,71 e 15,59 minutos e purezas de pico de 0,83; 0,92; 0,95; 0,94; 0,95 e 0,96 respectivamente. Através de uma análise feita por UV, foram constatados dois máximos de absorção em cada substância: 8 (255 e 255 nm), 9 (263 e 365 nm), 10 (255 e 354 nm), 11 (256 e 354 nm), 12 (264 e 351 nm) e 13 (268 e 346 nm) (Figura 10). A julgar pelos tempos de retenção e pelas duas bandas de absorção máxima, os espectros de UV identificam estruturas com dois cromóforos aromáticos conjugados, que são característicos de flavonoides já que, pela literatura, estes apresentam duas bandas de absorção definidas no espectro de UV, sendo a banda I entre 300 e 400 nm, representando a absorção do anel B, e a banda II, entre 240 e 285 nm, correspondente à absorção do anel A (Figura 10) (MARKHAM, 1982; YAO et al., 2004; VILA, 2006).

Os flavonoides são substâncias aromáticas, derivados das flavonas, e apresentam uma diversidade de formas estruturais, porém, em seu núcleo básico, todas as formas exibem 15 átomos de carbono em uma configuração $C_6-C_3-C_6$, ou seja, são dois anéis aromáticos ligados por três carbonos que podem ou não formar um outro anel, ligado à inúmeros substituintes (Figura 11). Na biossíntese de flavonoides podem ocorrer diversas modificações como adição ou redução, hidroxilação, dimerização produzindo bisflavonoides, metilação dos grupos hidroxila ou do núcleo dos flavonóides, glicosilação dos grupos hidroxila (produzindo O-glicosídeos) ou do núcleo (produzindo C-glicosídeos) (HARBORNE, 1994; YAO et al., 2004; VILA, 2006).

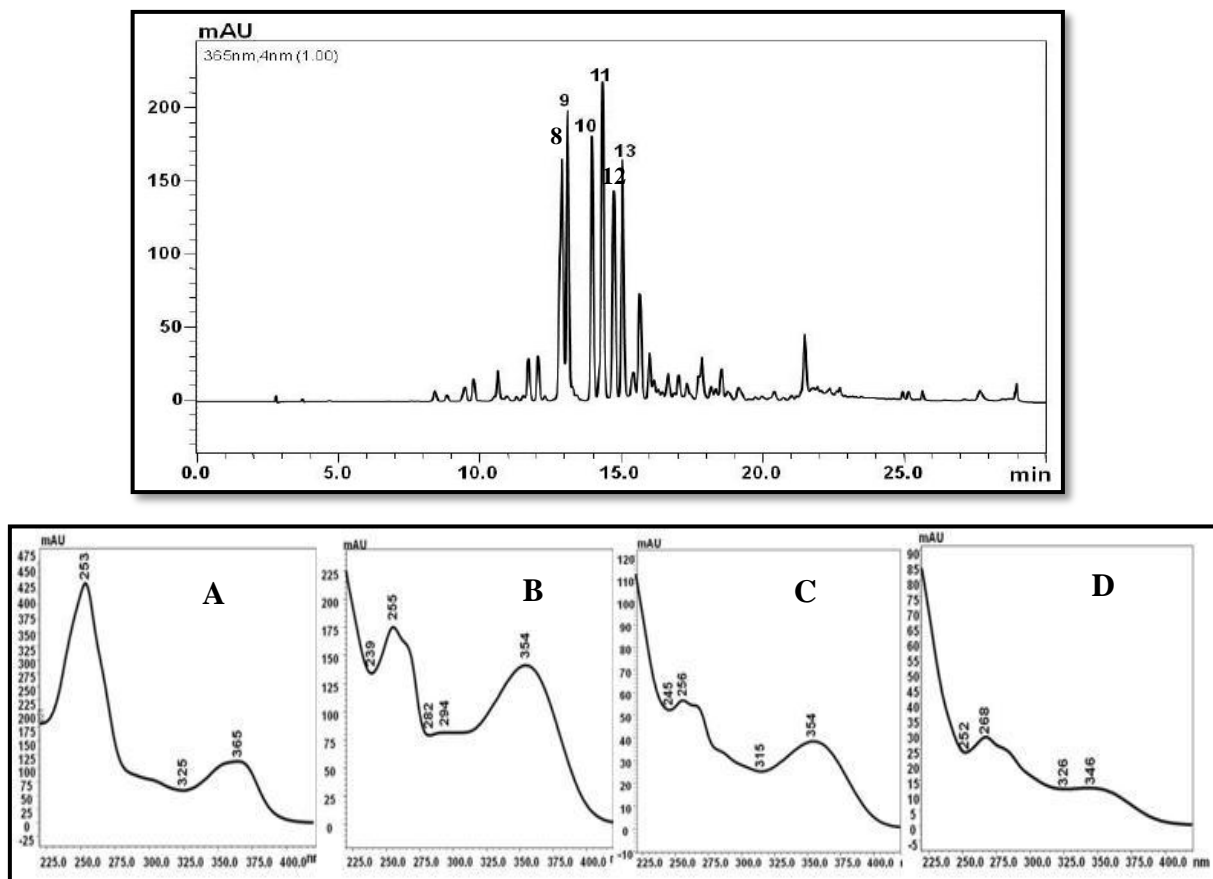


Figura 10: Cromatograma representativo do extrato AcOEt de *P. cattleianum* e espectros de UV dos picos majoritários do extrato. (A= pico 9; B= pico 10; C= pico 11; D= pico 13).

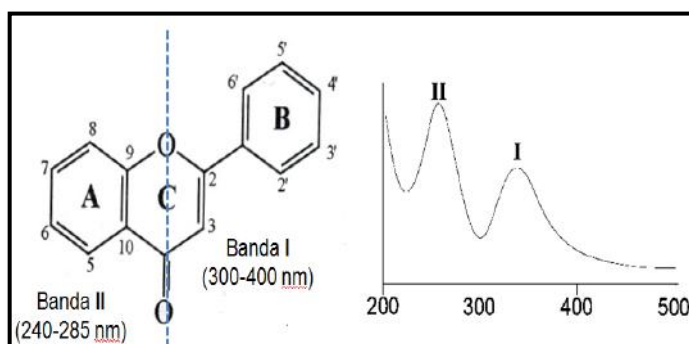


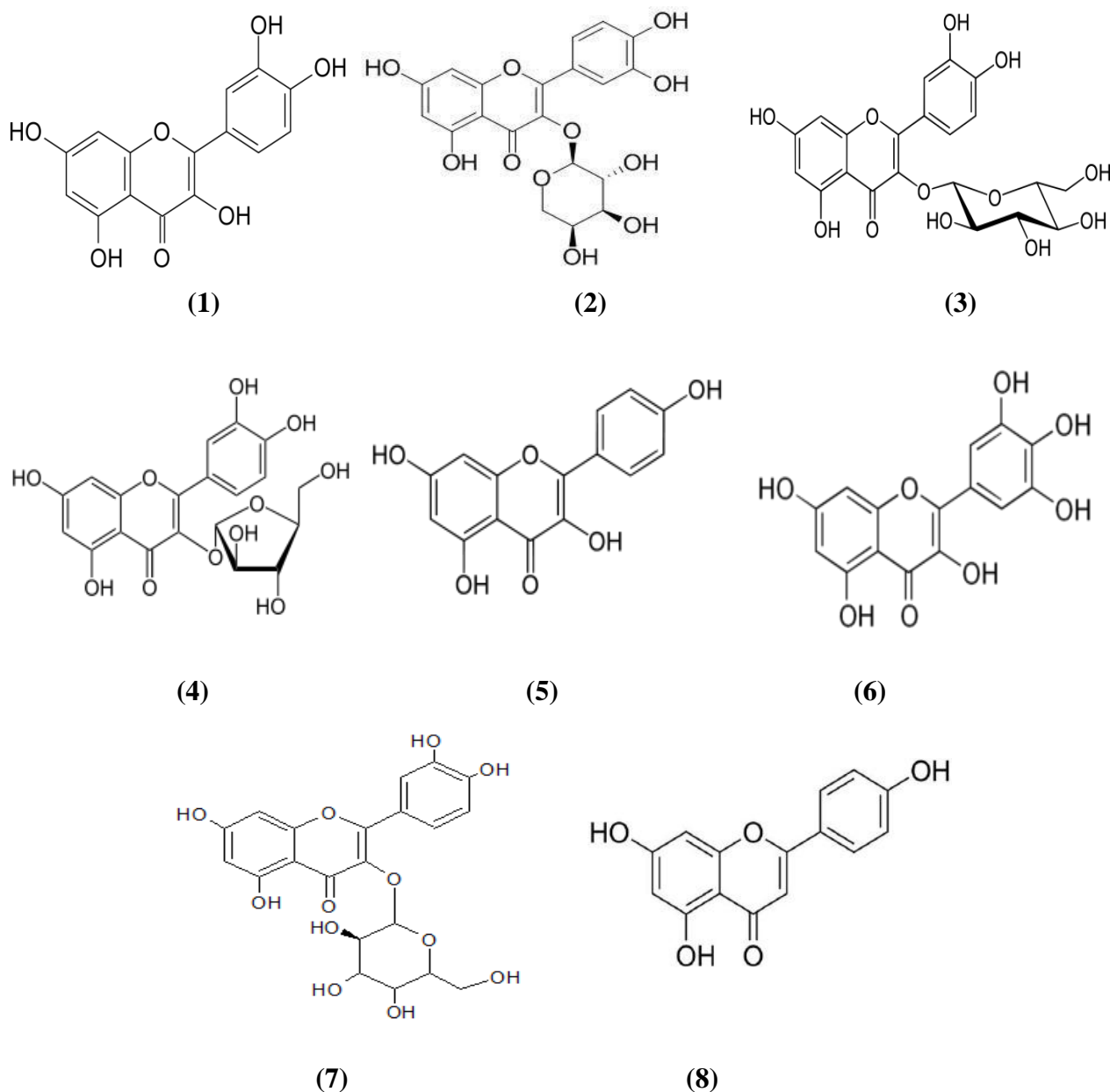
Figura 11: Estrutura química geral de um flavonoide e seu espectro de UV.

5.3.2 Isolamento de constituintes fenólicos da fração acetato de etila

5.3.2.1 Fracionamento por cromatografia contracorrente

Os compostos fenólicos originam-se do metabolismo secundário das plantas derivados de aminoácidos como fenilalanina e tirosina. Existe uma ampla variedade de compostos fenólicos que incluem, por exemplo, os fenóis simples, ligninas, derivados do ácido benzóico,

flavonoides, entre outros (VILA, 2006). Os flavonoides, por sua vez, são substâncias abundantes em espécies do gênero *Psidium*, e em estudos já realizados com a espécie *P. guajava*, conhecida popularmente como goiabeira, verificou-se o isolamento de flavonoides do seu extrato etanólico como a quercetina (1) e quercetina-3-arabinosídeo (2), e outros como os flavonoides glicosilados Quercetina-3-glicopiranosídeo (3) e avicularina (4). Das suas frações AcOEt e BuOH já foram isolados o Canferol (5), miricetina (6), hiperina (7), e apigenina (8). Muitos desses flavonoides já foram estudados com relação à sua atividade biológica e apresentaram atividades antimicrobiana, hipoglicemiante, hipotensora, entre outras. (WANG et al., 2010; ARIMA, DANNO, 2014)



A cromatografia contracorrente é uma técnica eficiente, rápida e econômica, muito utilizada para separação de componentes de origem vegetal, particularmente útil para substâncias polares e lábeis. Em vista disso, esta foi a técnica escolhida para o isolamento de substâncias da fração AcOEt. O sistema escolhido foi a mistura Hex/AcOEt/MeOH/EtOH/H₂O (1:4:1:0,4:4, v/v/v/v/v), pois distribuiu as substâncias presentes na fração de maneira proporcional em ambas as fases.

O processo resultou na obtenção de 196 sub-frações (item 4.4.3). As 50 primeiras sub-frações foram reunidas e secas, porém não evidenciaram nenhuma substância na cromatoplaça sob observação no UV e não mostraram material quantificável. As sub-frações restantes foram analisadas por CCD (item 4.4.1.1) e reunidas obtendo-se um total de 35 sub-frações, que foram submetidas à análise por CLAE-DAD (item 4.4.4.1), onde foi possível a observação dos perfis cromatográficos e feita uma nova junção das sub-frações que mostraram-se semelhantes, gerando um total de 19 sub-frações (Tabela 6).

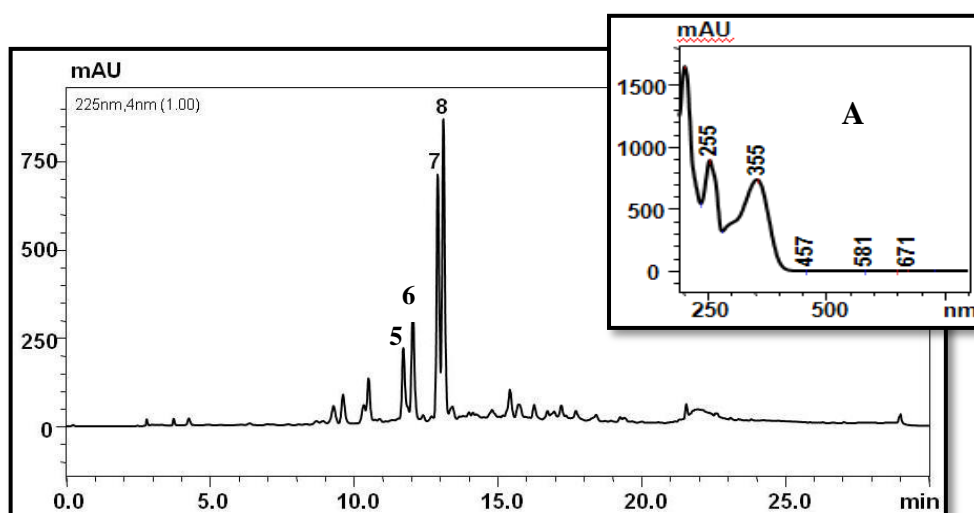
Tabela 6: Reunião das sub-frações obtidas do fracionamento da fração AcOEt por CCC e analisadas por CLAE-DAD.

Fração	Junção	Massa(mg)	Fração	Junção	Massa(mg)
PCAcE(1)	51-60	98,7	PCAcE(11)	91-100	38,1
PCAcE(2)	61-67	126,0	PCAcE(12)	101-104	1,2
PCAcE(3)	68-69	7,2	PCAcE(13)	105-108	1,5
PCAcE(4)	70-73	95,9	PCAcE(14)	109-124	33,4
PCAcE(5)	74	4,3	PCAcE(15)	125-144	4,4
PCAcE(6)	75-76	41,4	PCAcE(16)	145-156	18,8
PCAcE(7)	77-84	10,7	PCAcE(17)	157-168	1,3
PCAcE(8)	85-88	24,6	PCAcE(18)	169-176	35,3
PCAcE(9)	89	18,2	PCAcE(19)	177-196	25,9

A sub-fração selecionada para dar continuidade ao estudo foi a PAcE(4), pois em seu perfil cromatográfico foi verificado a concentração de dois flavonóides majoritários nos tempos de retenção entre 12 e 14 minutos, com purezas de pico de 0,99 e 0,75 e com percentuais de área de 26,51% e 32,61% respectivamente, nos comprimentos de onda de 225. Através de uma análise por UV constatou-se que as substâncias exibiram duas bandas de absorção em 255 nm e 354 nm (Figura 12), podendo ser um flavonol com o grupo 3-hidroxil substituído (metilado ou glicosilado), já que estes apresentam a banda I de absorção na região

entre 328-357 nm (ÁSSIMOS, 2014). Devido à presença dessas duas substâncias majoritárias, a sub-fração foi submetida a análise por CLAE semi-preparativa (item 4.4.4.2), visando o isolamento das mesmas. Foram obtidas 9 sub-frações, que foram liofilizadas e pesadas (Tabela 7), onde 3 delas demonstraram ser substâncias isoladas.

O perfil cromatográfico da sub-fração PCAcE(4)-2 mostrou o isolamento de uma substância majoritária com tempo de retenção de 12,2 minutos, pureza de pico de 1 e percentual de área de 3,32%. A análise feita por UV apresentou um espectro com dois máximos de absorção em 263 nm e 355 nm (Figura 13). O cromatograma representativo da sub-fração PCAcE(4)-3.1 (Figura 14) mostrou o isolamento de uma substância com tempo de retenção de 13,1 minutos, pureza de pico de 1 e percentual de área de 1,03%. Seu espectro de UV exibiu dois máximos de absorção, em 255 nm e 355 nm. Com isso, pode-se dizer que houve o isolamento do primeiro flavonoide majoritário (pico 7) presente na sub-fração PCAcE(4) (Figura 12). Para a sub-fração PCAcE(4)-4.1 foi verificado a presença de uma substância majoritária isolada, com tempo de retenção de 13,3 minutos, pureza de pico de 0,99 e percentual de área de 1,47%. O espectro de UV exibiu duas bandas máximas de absorção, uma em 255 nm e outra em 354 nm (Figura 15). Diante disso, pode-se dizer que houve o isolamento do outro flavonoide majoritário presente na sub-fração PCAcE(4) (Figura 12). Todos os espectros de UV obtidos são característicos de flavonóis, podendo ser glicosilados ou não. Aqueles que não apresentam um açúcar ligado ao seu grupo 3-Hidroxil costumam revelar a banda I de absorção em torno de 352-385nm, e os flavonóis glicosilados apresentando a banda I em 328-357 nm (MABRY et al., 1970; ÁSSIMOS, 2014).



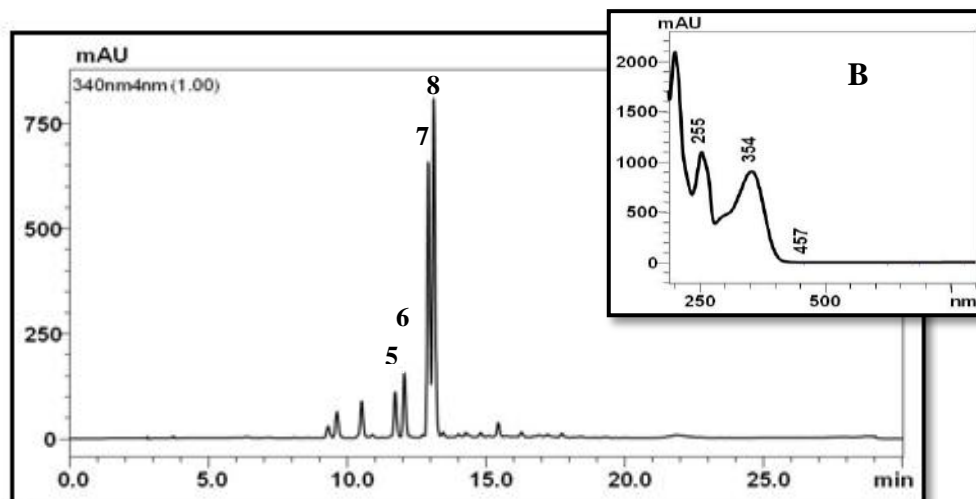


Figura 12: Perfil cromatográfico e espectro de UV da sub-fração PCAcE(4) nos comprimentos de onda de 225 nm e 340 nm (A= pico 7; B= pico 8)

Tabela 7: Grupos obtidos a partir do fracionamento de PCAcE(4) por CLAE semi-preparativa.

Fração	Massa (mg)
PCAcE(4)-1	1,0
PCAcE(4)-2	0,9
PCAcE(4)-3.1	5,2
PCAcE(4)-3.2	1,7
PCAcE(4)-3.3	0,5
PCAcE(4)-I	0,8
PCAcE(4)-4.1	0,6
PCAcE(4)-4.2	2,7
PCAcE(4)-4.3	0,5

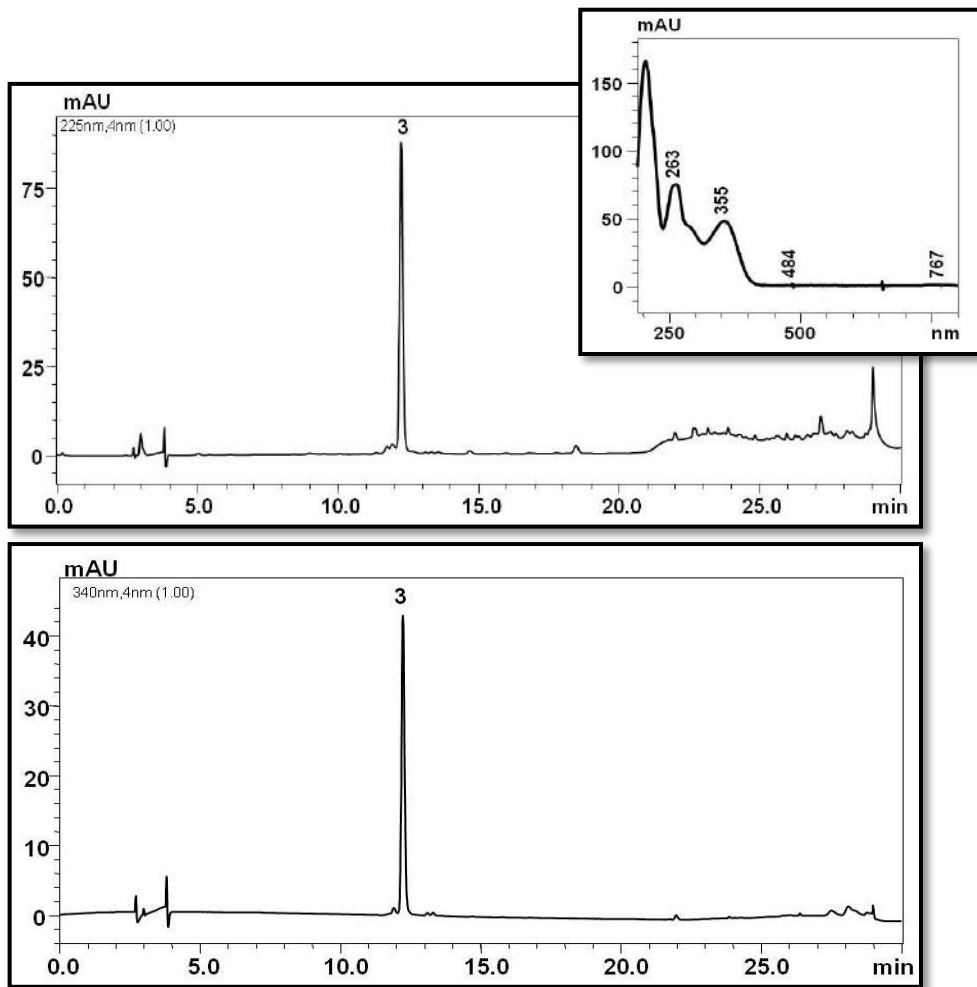
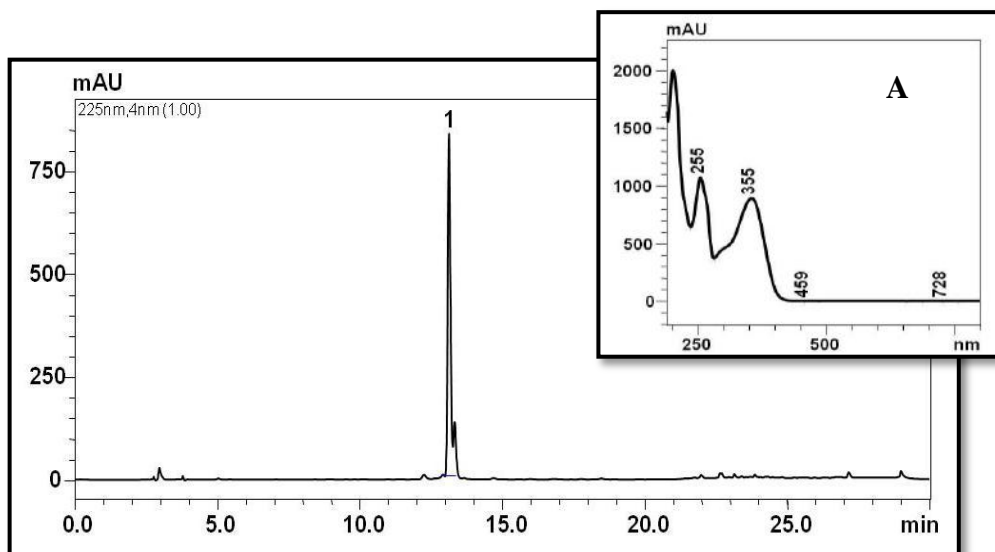


Figura 13: Perfil cromatográfico e espectro de UV da sub-fração PCAcE(4)-2 nos comprimentos de onda de 225 nm e 340 nm.



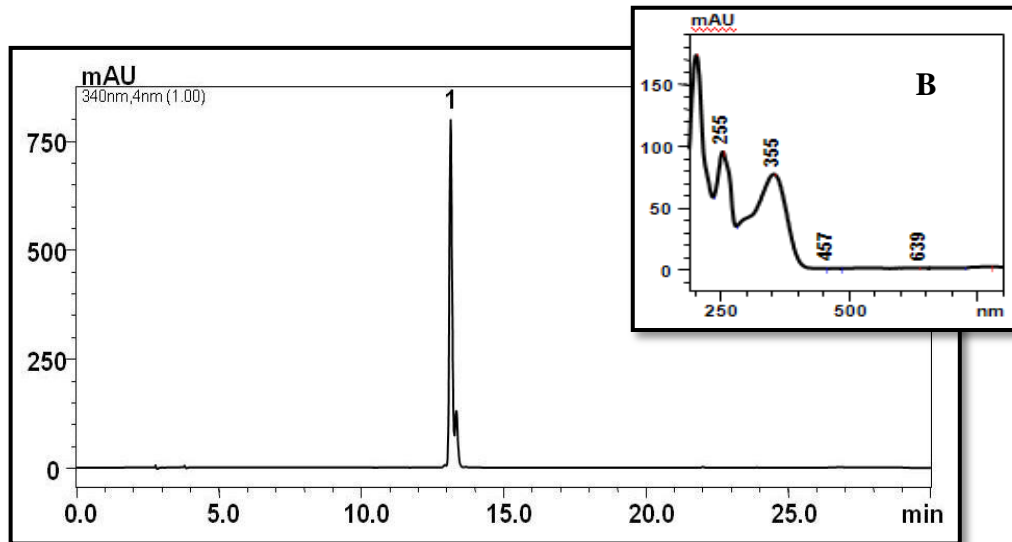


Figura 14: Perfil cromatográfico e espectro de UV da sub-fração PCAcE(4)-3.1 nos comprimentos de onda de 225 nm e 340 nm (A= pico majoritário; B=pico minoritário).

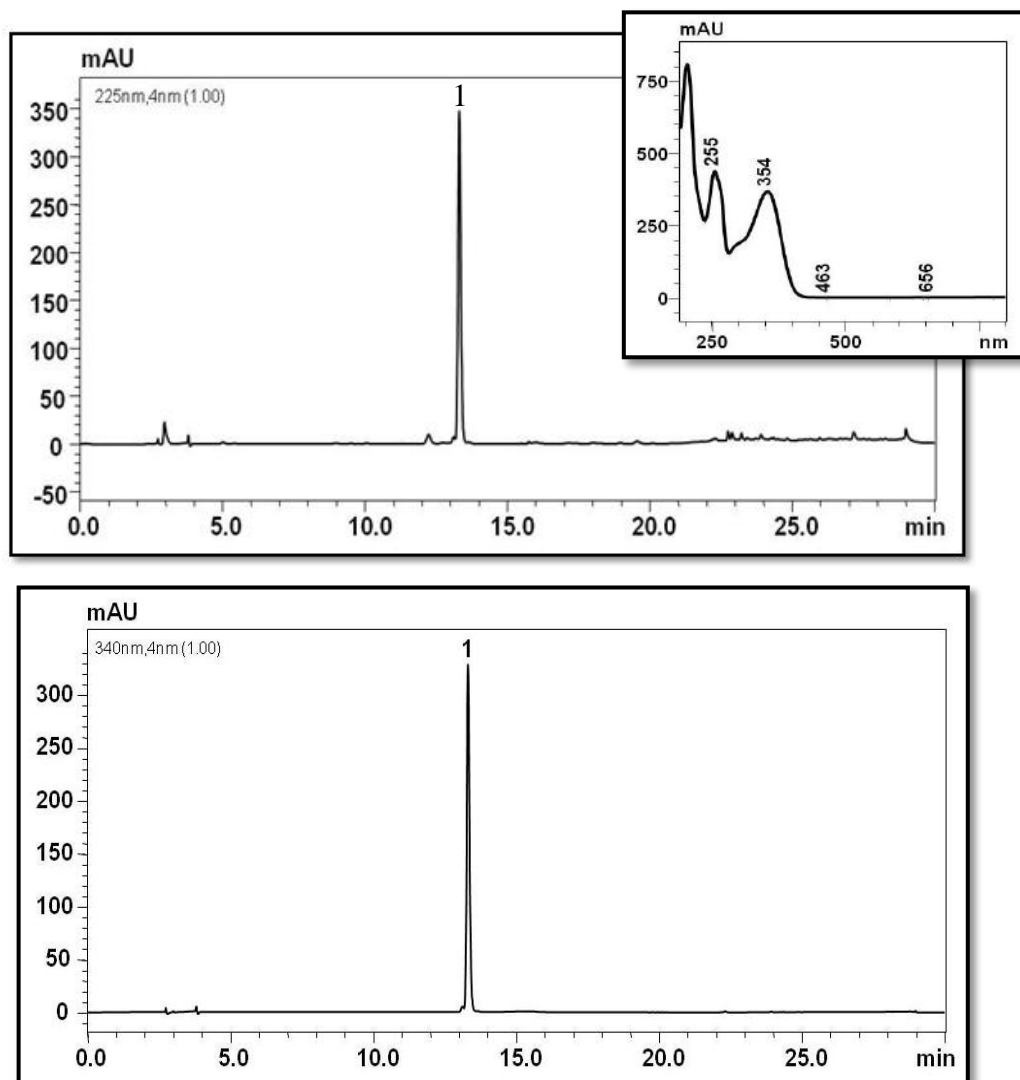


Figura 15: Perfil cromatográfico e espectro de UV da sub-fração PCAcE(4)-4.1 nos comprimentos de onda de 225 nm e 340 nm respectivamente.

5.4 Perfil cromatográfico e fracionamento da fração butanólica

5.4.1 Perfil cromatográfico

5.4.1.1 Cromatografia em camada delgada

Para a CCD com a fração BuOH (item 4.4.1.1) foi utilizado como eluente a mistura AcOEt/AcO/H₂O/ Ác. Acético glacial/Ác. fórmico (5:3:1:1:0,2:0,2, v/v/v/v/v), e assim como na fração AcOEt, as substâncias presentes na fração BuOH são de média e alta polaridade, podendo ser possivelmente flavonoides, devido a sua coloração fluorescente amarela/laranja após revelação com NP/PEG e observação em câmara de UV no comprimento de onda de 365 nm. (Figura 16).

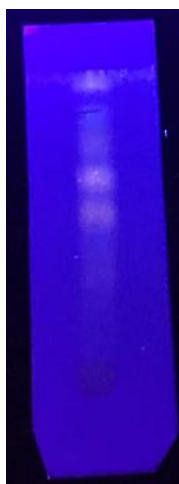


Figura 16: Perfil cromatográfico do extrato BuOH por CCD, sob observação em câmara de UV 365nm, após revelação com NP/PEG.

5.4.1.2 Cromatografia líquida de alta eficiência

O perfil cromatográfico da fração BuOH, obtido por CLAE (item 4.4.4.1), apresenta três picos majoritários, com tempo de retenção entre 13 e 15,5 minutos e purezas de picos de 0,92; 0,86 e 0,82 respectivamente. Através de uma análise feita por UV, foram constatados dois máximos de absorção em cada substância: 6 (320 nm e 355 nm), 8 e 9 (242 nm e 366 nm). Através disso sugere-se a presença de possíveis flavonoides já que, pela literatura, estes apresentam duas bandas de absorção características no espectro de UV, sendo a banda 1 entre 300 e 400nm e a banda 2 entre 240 e 285nm (Figura 17) (ÁSSIMOS, 2014).

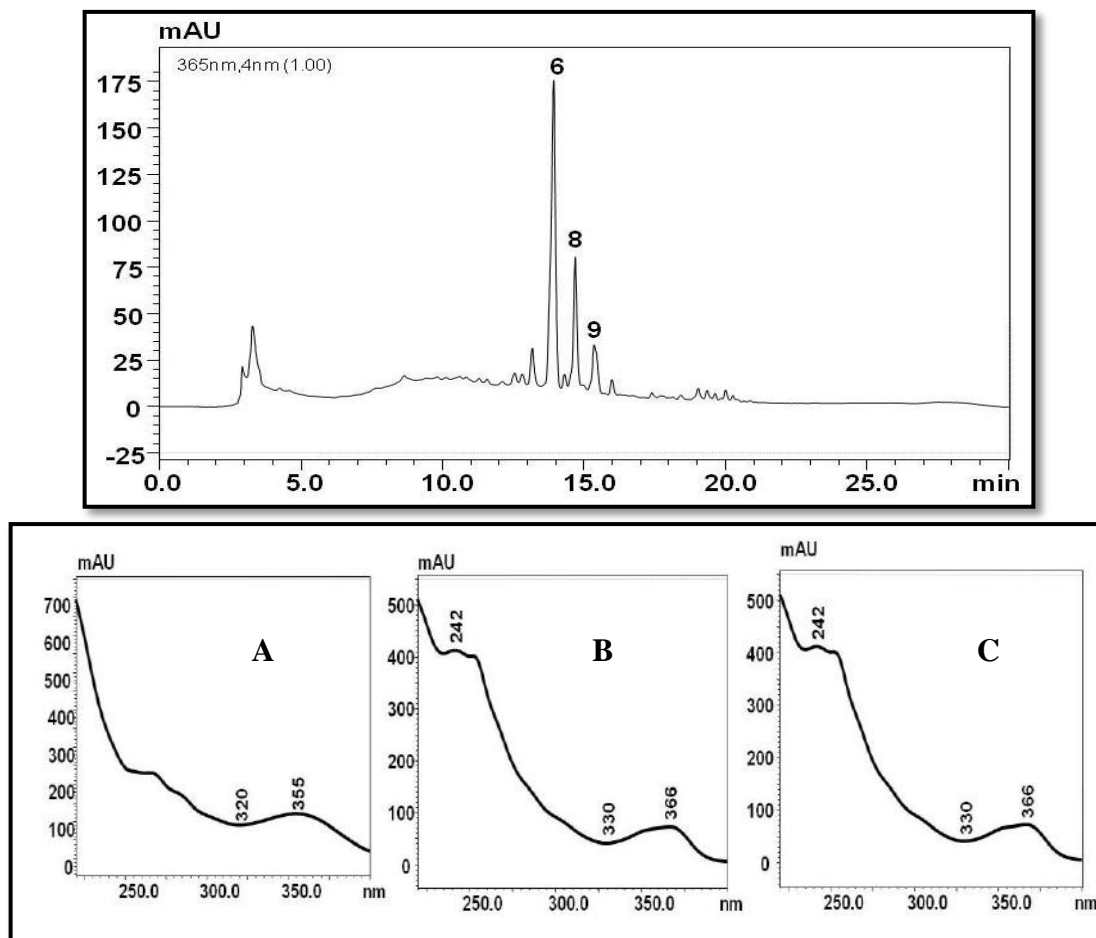


Figura 17: Cromatograma representativo da fração BuOH de *P. cattleianum* em 365nm. Espectros de UV dos picos majoritários do extrato.(A= pico 6; B=pico 8; C=pico 9).

5.4.2 Isolamento de constituintes fenólicos do extrato butanólico

5.4.2.1 Fracionamento por cromatografia em coluna

A partir do fracionamento da fração BuOH (300mg) por coluna de Sephadex LH-20 (item 4.4.2.1), obteve-se 37 frações que foram secas, pesadas e analisadas por CCD (item 4.4.1.1). Essa cromatografia utilizando como fase estacionária o Sephadex LH-20, é uma cromatografia de exclusão molecular, onde as substâncias são separadas pelo seu tamanho e por isso, esta técnica foi escolhida para realizar uma separação inicial das substâncias presentes nas frações orgânicas. Os compostos maiores que não penetram nos poros da fase estacionária são excluídos, e eluem primeiro junto à fase móvel, enquanto que aqueles de menor tamanho penetram na coluna e eluem bem depois (COLLINS, 2011).

As sub-frações que mostraram perfis cromatográficos semelhantes foram reunidas, renomeadas e pesadas novamente, gerando um total de 10 frações (Tabela 8).

Tabela 8: Reunião das sub-frações obtidas do fracionamento da fração BuOH por CC e analisadas por CCD.

Fração	Junção	Massa (mg)	Eluente (%)
PCBut(A)	1-2	28,6	MeOH (100%)
PCBut(B)	3	4,7	MeOH (100%)
PCBut(C)	4-5	6,4	MeOH (100%)
PCBut(D)	6	1,1	MeOH (100%)
PCBut(E)	7-8	40,8	MeOH (100%)
PCBut(F)	9-10	18,1	MeOH (100%)
PCBut(G)	11-12	6,0	MeOH (100%)
PCBut(H)	13-23	98,5	MeOH/H ₂ O (9:1)
PCBut(I)	24-28	86,3	MeOH/H ₂ O (9:1)
PCBut(J)	29-30	9,5	MeOH/H ₂ O (9:1)

A sub-fração PCBut(A) foi escolhida para dar continuidade as análises pois, foi observado com a CCD, que se tratava de substâncias parcialmente misturadas. Sendo assim, esta foi submetida à um novo fracionamento por cromatografia em coluna de Sílica ligada a C₁₈ (item 4.4.2.2) visando o isolamento dessas substâncias. Essa cromatografia se dá por afinidade e se baseia na polaridade dos compostos que se pretende isolar, na polaridade da fase estacionária e da fase móvel e da interação entre eles. Se a substância tem maior afinidade pela fase móvel, ela migrará mais rápido na coluna, e o contrário acontece para aquelas que apresentam maior afinidade pela fase estacionária (COLLINS, 2011).

Foram coletadas 10 sub-frações (Tabela 9), que foram secas, pesadas e analisadas por CLAE-DAD (item 4.4.4.1). O perfil cromatográfico da sub-fração PCBut(A4) mostrou-se significativo com o isolamento de uma substância apresentando tempo de retenção de 13,7 minutos, com percentual de área de 94,4% e pureza total do pico igual a 1. Através da análise por UV pode-se perceber dois máximos de absorção, sendo um em 256 nm e o outro em 356 nm, o que possivelmente indica a presença de um flavonol oxigenado no anel A, visto que apresentam a banda II de absorção mais pronunciada que a banda I (Figura 18). Através da posição da banda I, que nos flavonóis aparece em 352-385nm, é possível obter a informação sobre o tipo de flavonoide e também sobre o grau de oxidação da molécula (MABRY et al., 1970; ÁSSIMOS, 2014).

As frações AcOEt e BuOH e suas respectivas sub-frações foram analisadas por CLAE-DAD porque é a técnica analítica mais usada para separação de compostos em uma mistura, devido à alta seletividade, eficiência e sensibilidade do método, gerando resultados com alta resolução e em curto período de tempo, além da sua ampla aplicabilidade à substâncias de grande interesse para a indústria farmacêutica e para muitos ramos da ciência (SKOOG et al., 2002). A cromatografia foi do tipo fase reversa pois foi verificado através de CCD (Figuras 9 e 16) que ambas as frações apresentam substâncias altamente polares (flavonoides), e nesse tipo de cromatografia utiliza-se uma fase estacionária apolar (Sílica ligada a C₁₈) e uma fase móvel polar, onde os compostos polares eluem primeiro e em seguida os apolares (SILVA, 2012).

Tabela 9: Fracionamento obtido por CC da sub-fração PCBut(A).

Fração	Peso (mg)	Eluente (%)
PCBut(A1)	2,7	H ₂ O/MeOH (9:1)
PCBut(A2)	1,9	H ₂ O/MeOH (9:1)
PCBut(A3)	1,2	H ₂ O/MeOH (8:2)
PCBut(A4)	1,6	H₂O/MeOH (8:2)
PCBut(A5)	2,3	H ₂ O/MeOH (8:2)
PCBut(A6)	2,9	H ₂ O/MeOH (7:3)
PCBut(A7)	5,2	H ₂ O/MeOH (7:3)
PCBut(A8)	1,5	H ₂ O/MeOH (6:4)
PCBut(A9)	1,7	MeOH (100%)
PCBut(A10)	7,6	MeOH (100%)

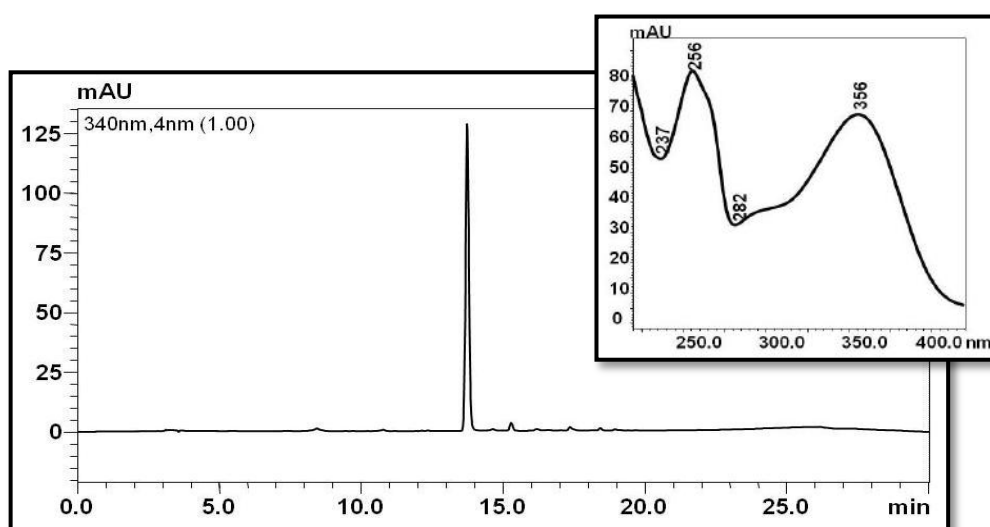


Figura 18: Perfil cromatográfico e espectro de UV da sub-fração PCBut(A4) de *P. cattleianum* em 340 nm.

5.5. Caracterização das substâncias isoladas

As sub-frações PCAcE(4)-2, PCAcE(4)-3.1, PCAcE(4)-4.1, PCAcE(4)-4.2 e PCBut(A4) foram analisadas através de RMN ^1H (item 4.6) com o intuito de realizar a identificação química estrutural do flavonóide isolado. Destas, apenas as sub-frações PCAcE(4)-4.1 (Figura 15) e PCAcE(4)-3.1 (Figura 14) puderam ser caracterizadas através dos dados espectrais de RMN medidos em metanol-D4.

A análise realizada por RMN ^1H (400 MHz, CD_3OD) da sub-fração PCAcE(4)-4.1 (Figuras 19, 20 e 21) exibiu deslocamentos químicos (δ) (em ppm), multiplicidade de sinais e acoplamento escalares (J) compatíveis com a aglicona da quercetina: 7,68 (d, J = 2,2 Hz, 1H), 7,57 (dd, J = 8,3, 2,2 Hz, 2H), 6,86 (d, J = 8,3 Hz, 2H), 6,24 (sl, 2H), 6,09 (sl, 1H). O próton anomérico com descolamento químico de 5,12 ppm e acoplamento escalar de 7,8 Hz condizentes com o H1'' da glicose 5,23 ppm (d, J=7,8 Hz), e os demais dados obtidos podem ser vistos na Tabela 10. Com base nos dados adquiridos pela literatura e comparando-os com os experimentais (Tabela 10), a substância presente na fração foi identificada como sendo o flavonol glicolisado Quercetina-3-O- β -D-glicopiranosídeo (Isoquercitrina) (Figura 22) (KAZUMA et al., 2000). Enquanto que a análise feita da fração PCAcE(4)-3.1 (Figuras 23, 24 e 25) mostrou deslocamentos químicos, multiplicidades e acoplamentos escalares também semelhantes ao da aglicona da quercetina, no entanto, com relação ao açúcar, alguns dados mostraram-se divergentes como por exemplo, o próton anomérico com deslocamento químico de 5,08 ppm e acoplamento escalar de 7,7 Hz e o H1'' da arabinose (5,15 ppm (d, J=7,0 Hz), e os demais valores podem ser visualizados na Tabela 11. Comparando-se os dados obtidos com os dados da literatura (Tabela 11), sugere-se que a substância presente nessa fração seja possivelmente a Quercetina-3-O- α -L-arabinopiranosídeo (Guaijaverina) (Figura 26), porém ainda serão realizados experimentos para que essa informação seja confirmada (ARIMA, DANNO, 2002; OLSZEWSKA, WOLBIS, 2002; PRABU et al., 2006).

Tabela 10: Dados espectroscópicos de RMN ^1H obtidos da literatura e experimentais da Quercetina-3-O- β -D-glicopiranosídeo (Isoquercitrina).

Hidrogênio	Literatura	Experimentais
	(MeOD)	(MeOD)
	δ (ppm), <i>m</i> , <i>J</i> (Hz)	δ (ppm), <i>m</i> , <i>J</i> (Hz)
Aglicona		
H-6	6,20 (d; 2,2)	6,09 (sl)
H-8	6,39 (d; 2,2)	6,24 (sl)
H-2'	7,70 (d; 2,2)	7,68 (d; 2,2)
H-3'		
H-5'	6,86 (d; 8,3)	6,86 (d; 8,3)
H-6'	7,58 (dd; 2,2; 8,3)	7,57 (dd; 2,2; 8,3)
3-Glicosil		
H1''	5,23 (d; 7,8)	5,12 (d; 7,8)
H2''	3,47 (dd; 7,7; 9,0)	3,48 (sl)
H3''	3,42 (t; 9,0)	3,42 (t; 8,8)
H4''	3,34 (t; 9,0)	3,34 (dd; 8,8; 2,3)
H5''	3,21 (ddd; 2,4; 5,4; 9,0)	3,25 (m)
H6a''	3,70 (dd; 2,2; 12,0)	3,70 (dd; 2,2; 12,0)
H6''b	3,56 (dd; 5,4; 11,8)	3,58 (dd; 5,0; 11,8)

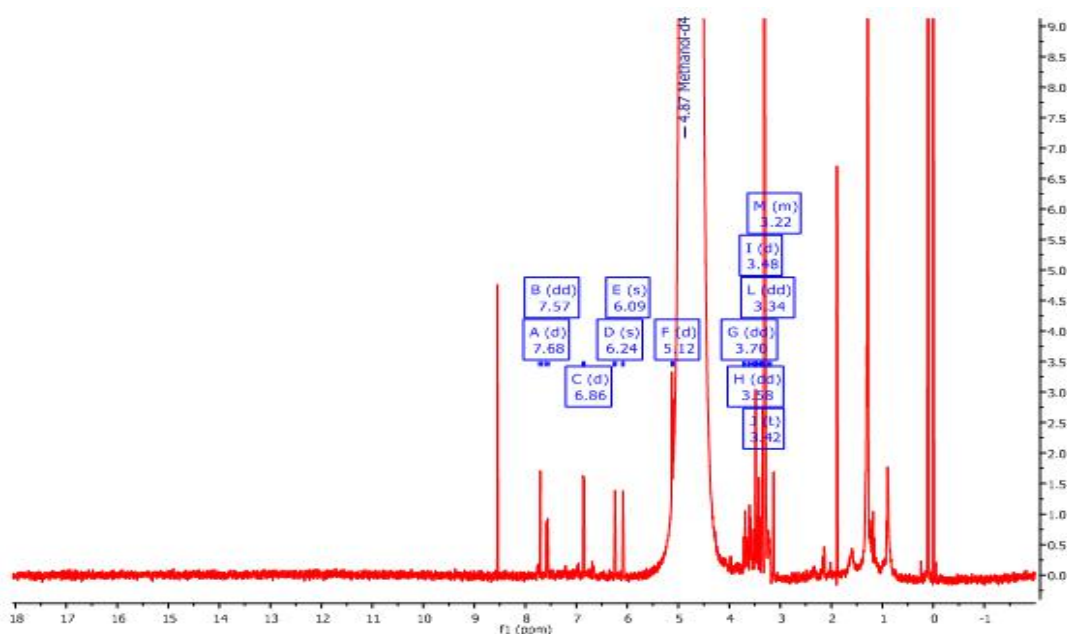


Figura 19: Espectro de RMN ^1H da fração PCAcE(4)-4.1 em MeOD.

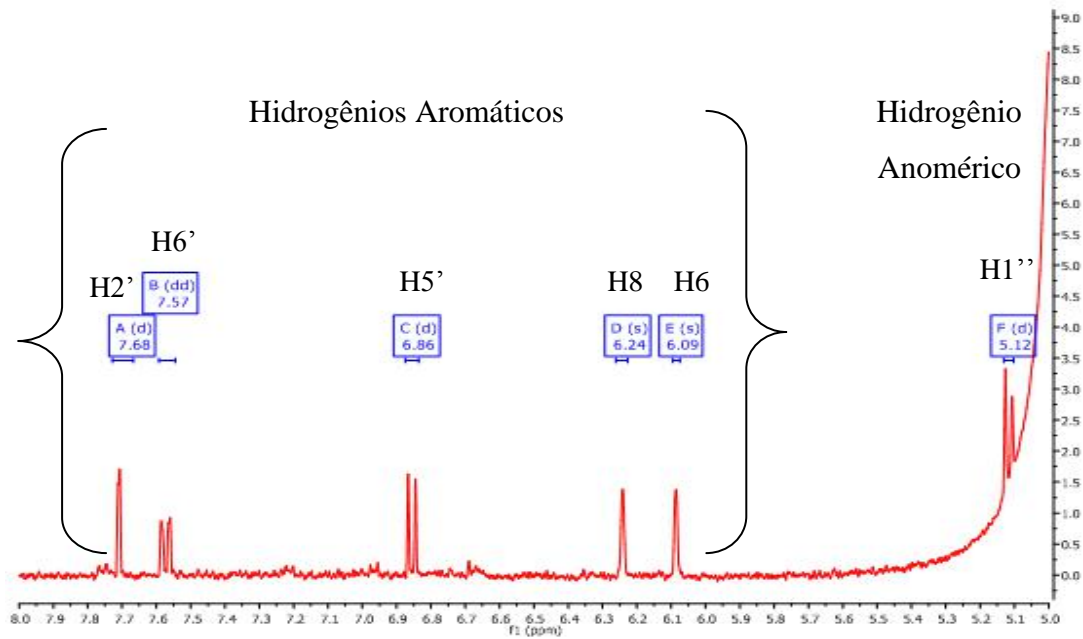


Figura 20: Expansão do espectro de RMN ^1H , enfatizando a região de 5 a 8 ppm.

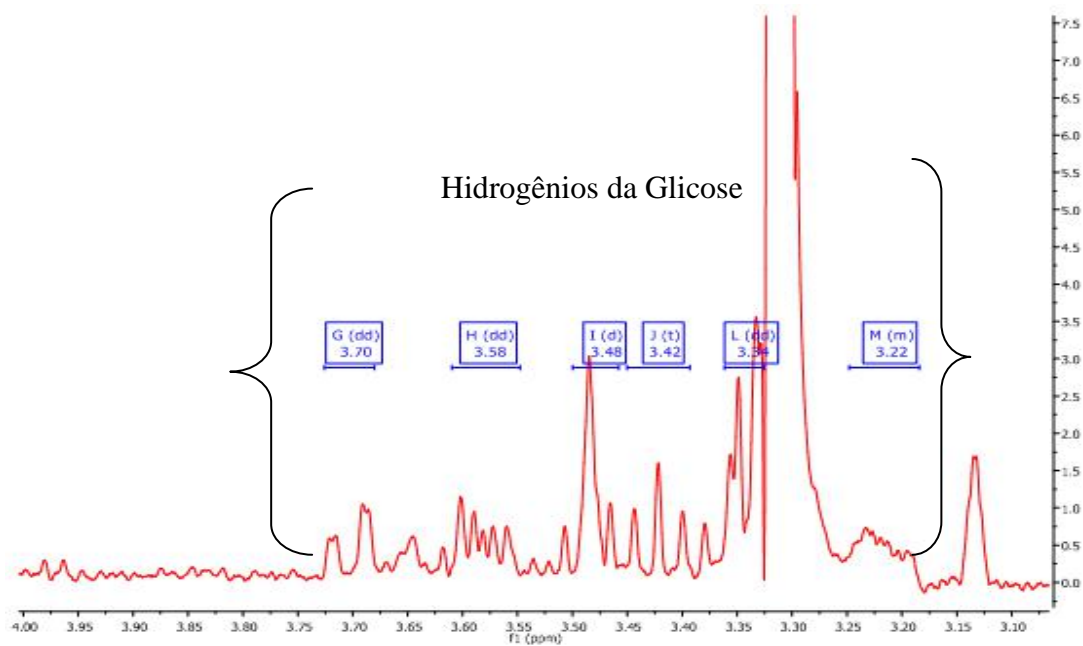


Figura 21: Expansão do espectro de RMN ^1H , enfatizando a região de 3 a 4 ppm.

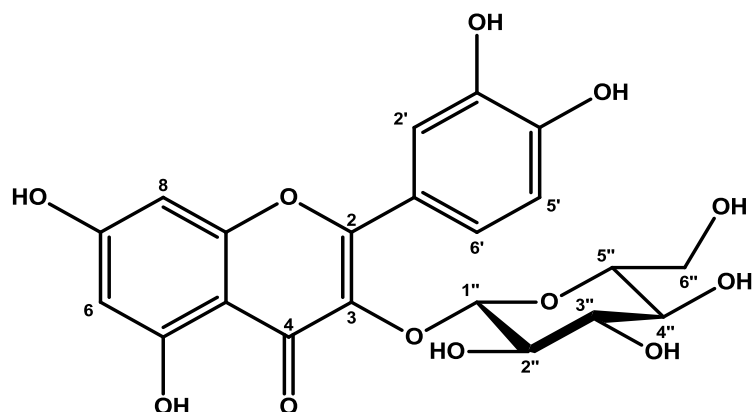


Figura 22: Flavonol glicosilado isolado da espécie *P. cattleianum* sabine (Isoquercitrina)

Tabela 11: Dados espectroscópicos de RMN ^1H obtidos da literatura e experimentais da Quercetina-3-O- α -L-arabinopiranosídeo (Guaijaverina).

Hidrogênio	Literatura	Experimentais
	(MeOD)	(MeOD)
	δ (ppm), <i>m</i> , <i>J</i> (Hz)	δ (ppm), <i>m</i> , <i>J</i> (Hz)
Aglicona		
H-2'	7,49 (d; 2,3)	7,85 (d; 2,3)
H-6'	7,5 (dd; 2,2; 8,5)	7,59 (dd; 2,2; 8,5)
H-5'	6,83 (d; 8,5)	6,86 (d; 8,5)
H-6	6,19 (d; 1,6)	6,29 (d; 1,6)
H-8	6,39 (d; 1,9)	6,12 (d; 1,9)
L- arabinose		
H-1''	5,15 (d; 7,0)	5,08 (d; 7,7)
H-2''	3,74 (t; 6,0)	3,84 (dd; 1,9; 9,8)
H-3''	3,64 (s)	3,81 (s)
H-4''	3,50 (dd; 3,0; 6,8)	3,59-3,53 (m)
H-5a''	3,59 (dd; 5,4; 11,4)	3,65 (dd; 6,2; 11,1)
H-5b''	3,20 (dd; 2,1; 11,4)	3,47 (s)

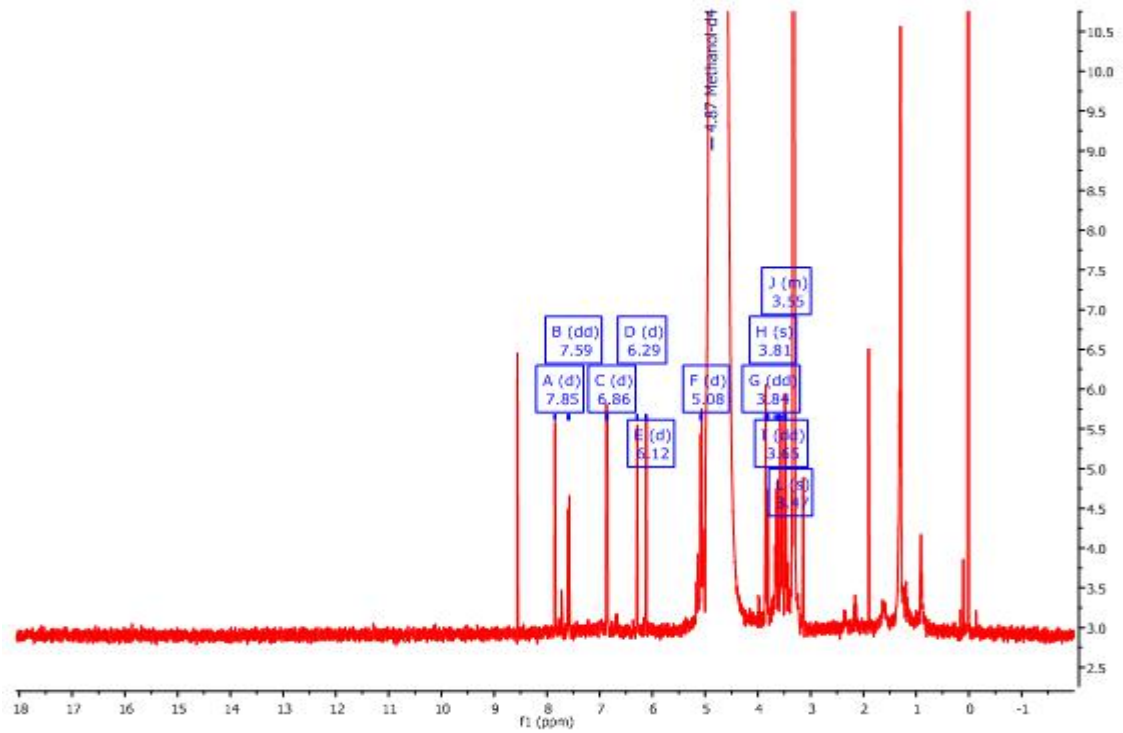


Figura 23: Espectro de RMN ^1H da fração PCAcE(4)-3.1em MeOD.

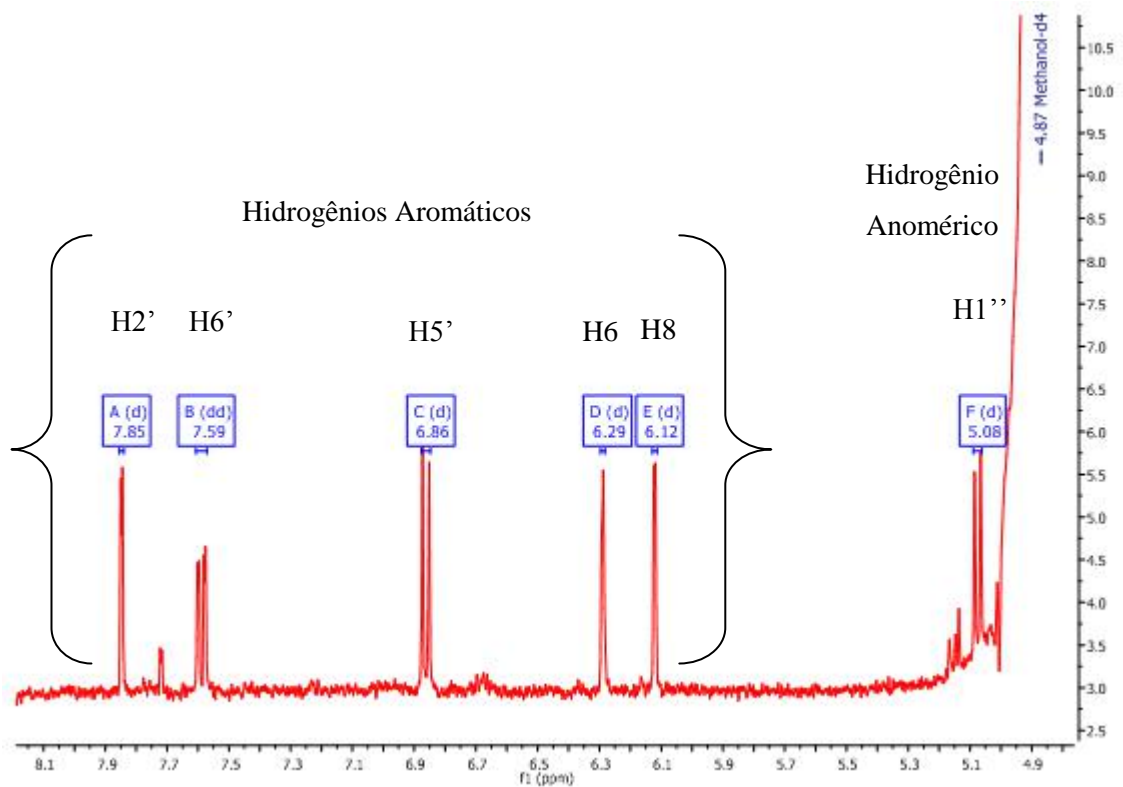


Figura 24: Expansão do espectro de RMN ^1H , enfatizando a região de 5 a 8 ppm.

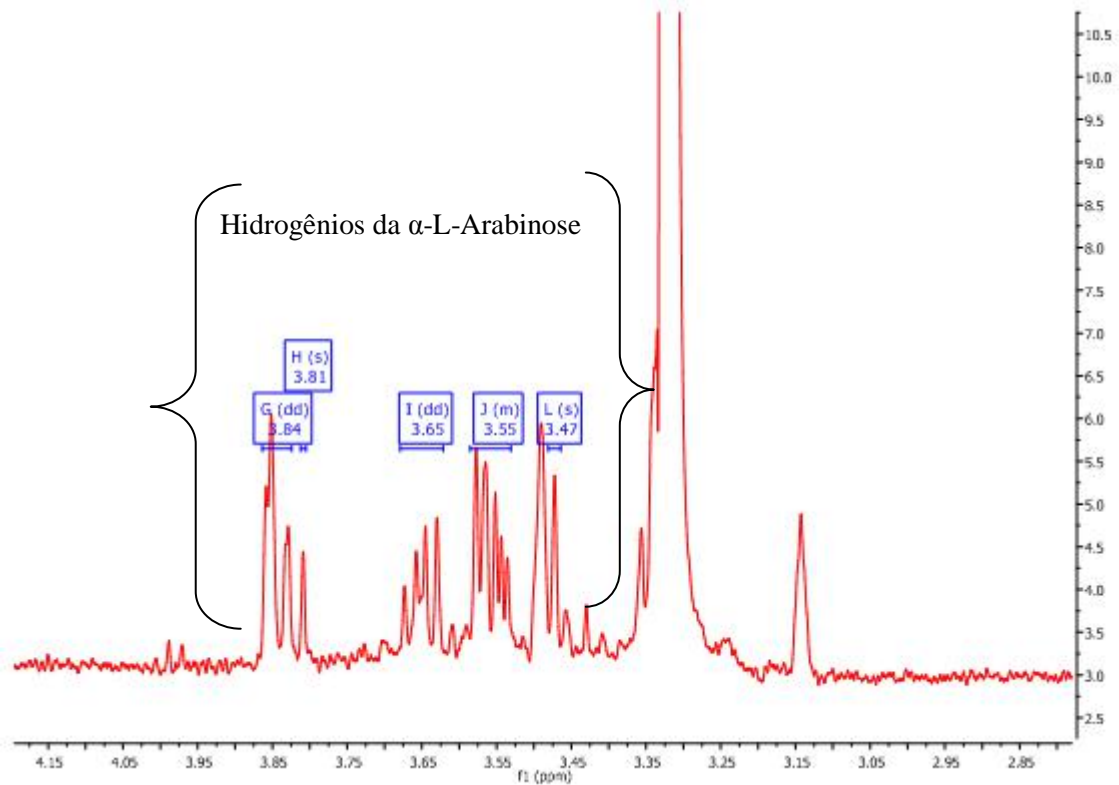


Figura 25: Expansão do espectro de RMN ^1H , enfatizando a região de 3 a 4 ppm.

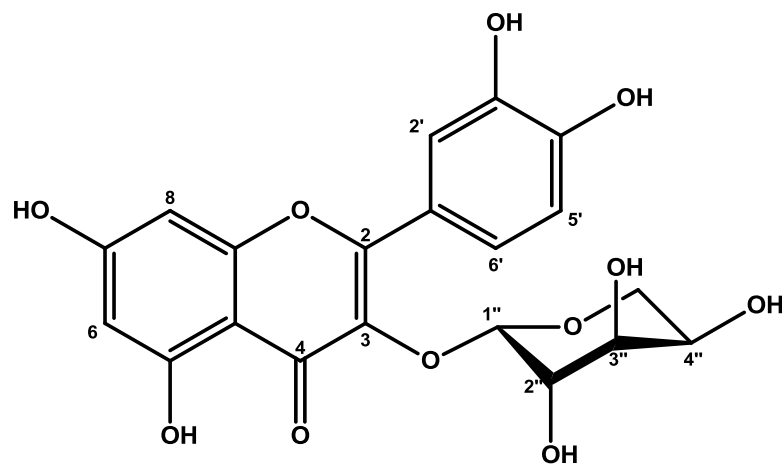


Figura 26: Flavonol glicosilado isolado da espécie *P. cattleianum* sabine (Guajaverina)

Os flavonoides estão distribuídos em uma diversidade de plantas e apresentam uso frequente na medicina popular de muitos países. São conhecidos pelos seus inúmeros benefícios incluindo ações antioxidante, antimicrobiana, cardioprotetora, hipotensora, entre outras. Estudos recentes demonstram que o consumo de alimentos ricos em flavonoides podem ser mediadores da redução da pressão sanguínea, gerando a possibilidade de que estes possam atuar como inibidores farmacológicos da enzima conversora de angiotensina (ECA)

(SCHRAMM & GERMAN, 1998; LACAILLE et al., 2001; EMURA et al., 2007; WU & MUIR, 2008), em vista disso, a presença dessa classe fitoquímica na espécie *P. cattleianum* explica o efeito vasodilatador observado no item 5.2.

A isoquercitrina, flavonol glicosilado isolado da fração PCAcE(4)-4.1, é uma substância relativamente solúvel e que apresenta alta taxa de absorção gastrointestinal, além de ser capaz de estabilizar placas ateroscleróticas, apresentar efeitos antioxidantes e inibir a atividade da ECA *in vitro* e *in vivo*. (LACAILLE et al., 2001; CHANG et al., 2005; ENKHMAA et al., 2005; MOTOYAMA et al., 2009). A ECA é uma protease que está amplamente distribuída no sistema cardiovascular e em outros tecidos. No rim, causa a produção de angiotensina II gerando uma diminuição na excreção urinária de água e sódio, o que leva a uma estabilização, a longo prazo, da hipertensão (KHOSLA et al., 2009; JUNIOR, 2010)

A guajaverina, outra substância possivelmente isolada da fração PCAcE(4)-3.1, é um polifenol que exibe atividades farmacológicas como antioxidante, antibacteriana e hipoglicemiante, inibe a enzima aldose-redutase que está relacionada às complicações do diabetes mellitus tipo II tais como catarata, retinopatia e neuropatia. Além disso, reduz os níveis do colesterol LDL, funciona como agente analgésico e hemostático (EIDENBERGER et al., 2013). Este flavonoide já foi isolado dos extratos acetato de etila e butanol das folhas de *P. guajava*, onde mostrou atividade inibitória contra a α -glicosidase intestinal de ratos, contribuindo também para o efeito hipoglicêmico demonstrado para essa espécie (WANG et al., 2010). Existem relatos sobre a atividade inibitória da guajaverina sobre *Staphylococcus aureus* (Khadem e Mohammed 1958), *Bacillus cereus* e *Salmonella enteritidis* (Arima e Danno, 2002), e sugere-se que esta esteja relacionada à presença do tipo catecol no anel B (3,4-dihidroxil). Segundo Prabu et al. (2006), esta substância foi isolada do extrato metanólico das folhas de *P. guajava* e demonstrou um potencial antiplaca contra *Streptococcus mutans*, exibindo uma concentração inibitória mínima (CIM) de 4 e 2 mg/mL.

Ambos os flavonoides já foram isolados dos extratos das folhas de espécies como *P. guajava*, e *P. cattleianum* e em ensaios biológicos demonstraram significativo potencial antioxidante que é possivelmente devido a presença da porção catecol no anel B e aos grupos hidroxila nos Carbonos 3 e 4 (HO et al., 2011), porém só existem relatos de atividade hipotensora para o flavonoide isoquercitrina e não para a guajaverina. Com base nisto, sugere-se que a atividade vasodilatadora causada pela espécie vegetal seja devido a presença do flavonol isoquercitrina.

6 CONCLUSÃO

Testes preliminares indicaram que o extrato etanólico e as frações acetato de etila e butanol de *P. cattleianum* exibiram atividade vasodilatadora, por este motivo deu-se continuidade ao estudo somente com essas frações.

Através da técnica de CCD foi possível identificar a presença de substâncias glicosiladas nas frações e através de CLAE identificou-se essas substâncias como flavonóides, visto que seus espectros de UV exibiram máximos de absorção característicos dessa classe química. Por meio da análise por RMN ^1H foi possível fazer a caracterização da substância isolada da fração PCAcE(4)-4.1, sendo ela a quercetina-3-O-glicopiranosídeo (Isoquercitrina), flavonol glicosilado que já apresentou efeitos cardiovasculares em estudos anteriores. Enquanto que o outro flavonol isolado da fração PCAcE(4)-3.1 ainda necessita de novos experimentos para sua caracterização completa.

Com base nos resultados obtidos, conclui-se que o presente trabalho foi satisfatório, uma vez que foi possível realizar o isolamento e caracterização de substâncias dos extratos ativos, como proposto inicialmente no objetivo do trabalho, justificando a atividade hipotensora da espécie. E como perspectiva tem-se em vista a caracterização completa das demais substâncias isoladas e a avaliação das mesmas para a atividade hipotensora.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AHMAD, Latif et al. **Ethnopharmacological documentation of medicinal plants used for hypertension among the local communities of DIR Lower, Pakistan.** Journal of Ethnopharmacology. Vol. 175, p. 138-146 (2015).
2. ALVARENGA, Felipe Queiroz et al. **In vivo analgesic activity, toxicity and phytochemical screening of the hydroalcoholic extract from the leaves of *Psidium cattleianum* Sabine.** Journal of Ethnopharmacology. Elsevier Ireland: 150 (2013) 280–284.
3. ALVES, P.M. et al. **Atividade antifúngica do extrato de *Psidium guajava* Linn. (goiabeira) sobre leveduras do gênero *Candida* da cavidade oral: uma avaliação in vitro.** Brasil, Revista brasileira de farmacognosia. 16(2): 192-196, Abr./Jun, 2006
4. ARANTES, A. Adriana. **A família Myrtaceae na Estação Ecológica do Panga, Uberlândia, Minas Gerais, Brasil.** Dissertação (Mestrado em Biologia)- Universidade Estadual Paulista/Rio Claro, São Paulo. 2002
5. ARAÚJO, Érika Roberta Silva de. **Avaliação da biocompatibilidade e determinação da atividade antimicrobiana de *Psidium guineense swartz.*** Dissertação (Mestrado em patologia geral)- Universidade Federal de Pernambuco/PE, Recife. 2010.
6. ARIMA, H.; DANNO, G. **Isolation of Antimicrobial Compounds from Guava (*Psidium guajava* L.) and their Structural Elucidation.** Biotechnology, and Biochemistry, 66(8), 1727-1730. Abril,2002.
7. ÁSSIMOS, Ariane Araújo. **Avaliação da concentração e dos tipos de flavonóides na Própolis utilizando Métodos Quimiométricos de Classificação e Calibração.** Dissertação (Mestrado em Química)- Universidade Federal de Minas Gerais/BH, Minas Gerais. 2014.
8. COLLINS, Carol H. **Pilares da cromatografia- Separação em colunas abertas: cromatografia por exclusão e por bioafinidade.** Scientia Chromatographica, 3(2): p. 107-114. Instituto internacional de cromatografia, 2011.
9. CONWAY, W.D. **Counter-Current Chromatography: Apparatus, Theory and Applications.** New York: VCH Publishers, Inc., 1990.
10. CORRÊA, J.B.; HECK, T.G.; GEHRKE, I.T.S. **Compostos fenólicos e atividade antioxidante de extratos da casca de *Schinus lentiscifolius* March. XXIV Simpósio de plantas medicinais do Brasil.** 2016
11. EIDENGERGER, T.; KRENNHUBER, K.; SELG, M. **Inhibition of dipeptidyl peptidase activity by flavonol glycosides of guava (*Psidium guajava* L.): A key to the beneficial effects of guava in type II diabetes mellitus.** Elsevier. Phytotherapy, 89 p.74–79, 2013.
12. EXCLI journal. ARAÚJO, H. M. et al. **Perfil químico e verificação capacidade antioxidante de *Psidium guajava* (Myrtaceae) frutos em diferentes estágios de maturação.** 14:1020-1030, Setembro, 2015.

13. FERREIRA, Marcel da Silva. **Otimização de solução extrativa e desenvolvimento tecnológico de produto seco por aspersão de *Psidium guajava* L.** Dissertação (Pós-graduação em ciências farmacêuticas)- Universidade Federal do Rio Grande do Norte/Natal, Rio Grande do Norte, 2009.
14. FRANCO, J.L.A. **O conceito de biodiversidade e a história da biologia da conservação: da preservação da wilderness à conservação da biodiversidade.** História (São Paulo) v.32, n.2, p. 21-48, jul./dez. 2013.
15. FRANZON, Rodrigo César et al. **Araças do gênero *Psidium*: principais espécies, ocorrência, descrição e usos.** Planaltina,DF: Embrapa Cerrados, 2009.
16. GUTIÉRREZ, Rosa Martha Pérez; MITCHELL, Sylvia; SOLIS, Rosário Vargas. ***Psidium guajava*: Uma revisão de seus usos tradicionais, fitoquímica e farmacologia.** Journal of Ethnopharmacology. Vol. 117, p. 1-27 (2008).
17. HARBORNE, J.B. **The Flavonoids.** New York. Chapman & Hall, p. 676, 1994
HO R. et al., **Antioxidant potential and radicalscavenging effects of flavonoids from the leaves of *Psidium cattleianum* grown in French Polynesia.** Natural Product Research: Formerly Natural Product Letters, v. 26, No. 3, February 2012, 274–277
18. IHA, S. M. et al. **Estudo fitoquímico de goiaba (*Psidium guajava* L.) com potencial antioxidante para o desenvolvimento de formulação fitocosmética.** São Paulo, Revista Brasileira de farmacognosia, 18(3): 387-393, Jul./Set. 2008.
19. JUNIOR, A.G.; MARQUES, M.C.A; KASSUYA, C.A.L. **Avaliação fitoquímica e farmacológica dos efeitos cardiovasculares e renais de *Tropaeolum majus* L. (TROPAEOLACEAE) em ratos.** Tese de pós-graduação. Universidade Federal do Paraná/Paraná. 2010.
20. KAZUMA, K., NODA, N., SUZUKI, M. **Malonylated flavonol glycosides from the petals of *Clitoria ternatea*.** Elsevier Science Ltd. Phytochemistry 62 p. 229–237, 2003.
21. LEITÃO, G.G. **Uso da cromatografia contracorrente na obtenção de padrões de origem vegetal.** Revista Fitos, v.1 n° 02, Novembro, 2005.
22. LEITE, A.C. et al. **ISOLAMENTO DO ALCALÓIDE RICININA DAS FOLHAS DE *Ricinus communis* (EUPHORBIACEAE) ATRAVÉS DE CROMATOGRAFIAS EM CONTRACORRENTE.** Quim. Nova, Vol. 28, No. 6, 983-985, 2005.
23. MABRY, T. J.; MARKHAM, K. R.; THOMAS, M. B. **The Systematic identification of flavonoids.** Ed. Springer. Berlin, 1970, p.41-169.
24. MARKHAM, K.R. **Techniques of flavonoid identification.** New York. Academic Press, p. 113, 1982.
25. MALINOWSKI, Letícia; NAKASHIMA, Tomoe; ALQUINI, Yedo. **Caracterização Morfoanatômica das Folhas Jovens de *Eucalyptus globulus* Labill ssp. *bicostata***

(Maiden et al.) **J.B. Kirkpat. (Myrtaceae)**. Latin American Journal of Pharmacy, 28 (5) – 2009

26. MARSTON, A.; HOSTETTMANN, K.; J. Chromatogr., A 1994, 658, 315.

27. MARTINI, L. et al. **Estudo das Áreas de Restinga utilizando sensoriamento remoto e topografia na região litorânea de Matinhos-PR**. Paraná, 2008.

28. MEDEIROS, R. **Desafios à gestão sustentável da biodiversidade no Brasil**. Floresta e ambiente, Rio de Janeiro, V.13, n.2, p. 01 - 10, 2006.

29. MOREIRA, D.O.; COUTINHO, B.R.; MENDES, S.L. **O status do conhecimento sobre a fauna de mamíferos do Espírito Santo baseado em registros de museus e literatura científica**. Espírito Santo, Biota Neotrop., vol. 8, no. 2, Abr./Jun. 2008.

30. OKA, H.; HARADA, K.; ITO, Y.; ITO, Y.; J. Chromatogr., A 1998, 812, 35

31. OLIVEIR, Jaime Cesar de Moura et al. Consolidado de normas da COFID (versão V). Disponível em: <[http://portal.anvisa.gov.br/documents/33836/351410/Consolidado+de+normas+da+COFID+\(Vers%C3%A3o+V\)/3ec7b534-a90f-49da-9c53-ce32c5c6e60d](http://portal.anvisa.gov.br/documents/33836/351410/Consolidado+de+normas+da+COFID+(Vers%C3%A3o+V)/3ec7b534-a90f-49da-9c53-ce32c5c6e60d)> Acesso em: 24 agosto, 2016.

32. OLSZEWSKA, Monika; WOLBIS, Maria. **Further Flavonoids from the flowers of *Prunus spinosa* L.** Polish Pharmaceutical Society, v.59, n° 2, p. 133-137, 2002.

33. PEREIRA, M.C.A.; CORDEIRO, S.Z.; ARAÚJO, D.S.D. **Estrutura do estrato herbáceo na formação aberta de *Clusia* do Parque Nacional da Restinga de Jurubatiba, RJ, Brasil**. Rio de Janeiro, Acta bot. bras. 18(3): 677-687. 2004.

34. PRABU, G.R., GNANAMANI, A., SADULLA, S. **Guaijaverin – a plant flavonoid as potential antiplaque agent against *Streptococcus mutans***. The Society for Applied Microbiology, Journal of Applied Microbiology 101 p. 487–495, 2006.

35. PLAZA, Carenina Vidotte. **Investigação fitoquímica e avaliação da atividade antioxidante das folhas e frutos de *Eugenia jambolana* Lam. (Myrtaceae)**. Dissertação (Mestrado em Química)- Universidade Estadual Paulista/Araraquara, São Paulo. 2007.

36. QUÍMICA NOVA. Rio de Janeiro: JUNIOR E PINTO, Vol. 28, n.3, fev. 2005.

37. QUÍMICA NOVA. Santa Catarina: FILHO E YUNES, Vol. 21, fev. 1997.

38. QUÍMICA NOVA. Piauí: SOUZA, et.al, Vol. 30, n.2, jan. 2007

39. RIBEIRO, Rachel Melo. **Estudo da atividade Hipotensora das folhas de *Syzygium jambolanum* D.C. (jambolão)**. Dissertação (Mestrado em Saúde e ambiente)- Universidade Federal do Maranhão/São Luís, Maranhão. 2007.

40. ROCHA, C. F. D. et al. **Os remanescentes dos habitats de restinga na Floresta Atlântica do estado do Rio de Janeiro, Brasil: perda de habitat e risco de desaparecimento**. Rio de Janeiro, Braz. J. Biol., 67(2): 263-273, 2007.

41. ROCHA, C. F. D. et al. **Tetrápodos endêmicos e ameaçados nas restingas dos corredores de biodiversidade da Serra do Mar e Central da Mata Atlântica no leste do Brasil**. Rio de Janeiro, Braz. J. Biol., 65(1): 159-168, 2005.
42. RODRIGUES, Juliana. **Uso sustentável da biodiversidade brasileira: prospecção químico-farmacológica em plantas superiores: Metodologia para estabelecimento de perfis quali e quantitativos para extratos vegetais**. Dissertação (Doutorado em Química)- Universidade Estadual Paulista/Araraquara, São Paulo. 2011
43. SILVA, L.C.A. et al. **Análise fitoquímica e atividade antioxidante do extrato hidroetanólico das folhas de *Psidium guajava* L. (Goiabeira)**. Biochemistry and Biotechnology reports. Edição especial, v. 2, N. 2, Jun., P. 76-78, 2013.
44. SILVA, Patrícia Damasceno. **Determinação de compostos fenólicos por HPLC**. Dissertação (Mestrado em Química Industrial)- Universidade da Beira Interior/Covilhã, Portugal. 2012.
45. VARJABEDIAN, R. **Lei da Mata Atlântica: retrocesso ambiental**. Estudos avançados 24 (68), 2010.
46. VILA, Fabiana Cristina. **Identificação dos flavonóides com atividade antioxidante da cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.)**. Dissertação (Mestrado em ciências)- Universidade de São Paulo/São Carlos, São Paulo.2006.
47. YAO, L.H.; JIANG, Y.M.; SHI, J.; THOMÁS- BARBERÁN, F.A.; DATTA, N.; SINGANUSONG, R.; CHEN, S. S. Flavonoids in food and their Health Benefits. **Plant Foods for Human Nutrition**, v.59, p. 113-122, 2004.
48. WAGNER, H.; BLADT, S. Natural Products Reagents. **Plant Drug Analysis: A Thin Layer Chromatography Atlas**. Heidelberg: 2º ed., p. 197, 1996.
49. WANG,H.; JI DU,Y.; CAN SONG,H. **α -Glucosidase and α -amylase inhibitory activities of guava leaves**. Elsevier, v.123,N.1, p.6-13, nov.2010.