



REDE NORDESTE DE BIOTECNOLOGIA (RENORBIO)  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO

**EFEITO CARDIOVASCULAR DAS SAPONINAS EXTRAÍDAS DAS FOLHAS  
DE *Syzygium cumini* (L.) Skeels**

MATHEUS BRANDÃO CAMPOS

São Luís  
2019

MATHEUS BRANDÃO CAMPOS

**EFEITO CARDIOVASCULAR DAS SAPONINAS EXTRAÍDAS DAS FOLHAS  
DE *Syzygium cumini* (L.) Skeels**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Rede Nordeste de Biotecnologia (Renorbio) como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Biotecnologia.

**Orientadora:** Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Marilene Oliveira da Rocha Borges

**Co-orientadora:** Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Rachel Melo Ribeiro

**Área de concentração:** Biotecnologia em Recursos Naturais

São Luís  
2019

Ficha gerada por meio do SIGAA/Biblioteca com dados fornecidos pelo(a) autor(a).  
Núcleo Integrado de Bibliotecas/UFMA

Campos, Matheus Brandão.

Efeito cardiovascular das saponinas extraídas das  
folhas de *Syzygium cumini* L. Skeels / Matheus Brandão  
Campos. - 2019.

100 f.

Coorientador(a): Rachel Melo Ribeiro.

Orientador(a): Marilene Oliveira da Rocha Borges.

Tese (Doutorado) - Programa de Pós-graduação em  
Biotecnologia - Renorbio/ccbs, Universidade Federal do  
Maranhão, São Luis, 2019.

1. Anti-hipertensivo. 2. Cardiovascular. 3.  
Saponinas. 4. SHR. 5. *Syzygium cumini*. I. Borges,  
Marilene Oliveira da Rocha. II. Ribeiro, Rachel Melo.  
III. Título.

EFEITO CARDIOVASCULAR DAS SAPONINAS EXTRAÍDAS DAS FOLHAS  
DE *Syzygium cumini* (L.) Skeels

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Rede Nordeste de Biotecnologia (Renorbio) como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Biotecnologia.

BANCA EXAMINADORA

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Marilene Oliveira da Rocha Borges  
Orientadora  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO

---

Prof. Dr. José Ribamar da Silva Júnior  
UNIVERSIDADE ESTADUAL DO MARANHÃO

---

Prof. Dr. Antônio Carlos Romão Borges  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO

---

Prof. Dr. Rui Miguel Gil da Costa Oliveira  
UNIVERSIDADE DO PORTO

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria do Socorro de Sousa Cartágenes  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO

Dedicado aos meus avós  
Zeca Pinto (*in memoriam*) e  
Corina Brandão

## AGRADECIMENTOS

À minha Orientadora Professora Dr<sup>a</sup> Marilene Borges por todos esses anos de ensinamento, paciência, orientações e oportunidades concebidas, por sua disponibilidade e dedicação desde os primeiros passos no ingresso a pesquisa até a conclusão deste trabalho e a diante;

À minha querida amiga e segunda mãe Professora Dr<sup>a</sup> Rachel Melo Ribeiro, co-orientadora, por sua infinita dedicação, cumplicidade e companheirismo, por todo empenho para realização deste trabalho e além;

Ao estimado Professor Dr. Antonio Carlos Romão Borges pelos anos de apoio, pela orientação segura e suporte necessário para realização deste trabalho

Aos colegas farmacêuticos Rafael Cavalhal e Carol Marreiros pelo suporte técnico e dedicação quando ainda alunos de graduação;

À Amanda Passos por toda ajuda, disponibilidade e apoio nas horas mais complicadas;

Ao Laboratório de Pesquisa e Pós Graduação em Farmacologia da Universidade Federal do Maranhão – LPPF, aos técnicos Denilson Amorim e Elaine Mendes pelo suporte técnico;

Ao Professor Dr. José Ribamar da Silva Júnior pelas pela contribuição, ponderações e disponibilidade;

À Professora Dr<sup>a</sup> Claudia Quintino da Rocha pelas análises e contribuições nos dados obtidos colaborando para o enriquecimento deste trabalho;

À Professora Dr<sup>a</sup> Denise Fernandes Coutinho pelas orientações, contribuições, ponderações e disponibilidade desde os primórdios desta jornada

Ao Professor Francisco das Chagas e ao aluno Rudielson Santos do Laboratório de Química Quântica computacional e Planejamento de Fármacos da Universidade Estadual do Piauí - UESPI pelas indispensáveis contribuições para conclusão deste trabalho

Ao Professor Rui M. Gil da Costa pela disponibilidade e ajuda nesta etapa final de realização deste trabalho

À secretaria do programa RENORBIO, Camila Rocha e Adriana Jardim pela paciência, disponibilidade e eficiência;

A Fundação de Amparo à Pesquisa e ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Maranhão - FAPEMA e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES pelo financiamento ao longo destes anos de doutoramento e a Universidade Federal do Maranhão – UFMA pela infraestrutura e suporte para a realização deste trabalho.

## RESUMO

As doenças cardiovasculares (DCV) são as principais causas de morte no mundo e, a busca por novos medicamentos que possam assegurar o tratamento de doenças como a hipertensão arterial, por exemplo, são cada vez mais frequentes. Dentre os compostos investigados destacam-se os produtos de origem vegetal que apresentam metabólitos secundários com potencial farmacológico sobre o sistema cardiovascular. As saponinas, classe de metabólitos de origem vegetal, são moléculas anfifílicas que tem sido vistas como uma proeminente fonte de compostos com atividade benéfica ao sistema cardiovascular. O presente estudo avaliou o potencial farmacológico da fração rica em saponinas (FRS) extraída das folhas de *Syzygium cumini* (L.) Skeels, no sistema cardiovascular de ratos espontaneamente hipertensos (SHR). A FRS foi obtida por processo físico (patente (INPI BR 102014003275-4), e sua composição foi comprovada por análise fitoquímica. A FRS apresentou atividade antioxidante pelo método do DPPH. Para a avaliação farmacológica, SHR machos com 90 dias de idade foram tratados diariamente, pelo período de 15 dias, com a fração rica em saponinas isoladas de *S. cumini* (FRS), nas doses de 10 e 50 mg/kg/v.o. Os resultados demonstraram que a FRS reduziu a pressão arterial (PA) dos SHR, promoveu uma redução de eventos arrítmicos, tais como bloqueio atrioventricular e diminuiu resistência vascular periférica, causando a diminuição da contração induzida por noradrenalina nos animais SHR tratados com a dose mais alta. Os mecanismos do vasorrelaxamento foram investigados em anéis de artéria mesentérica. A FRS foi capaz de promover o efeito vasorrelaxante e bloquear a contração induzida pelo cálcio extracelular. Com os resultados apresentados conclui-se que a FRS diminui a PA por mecanismo que envolve o bloqueio do influxo de cálcio e, promove cardioproteção em SHR, sendo, portanto, um proeminente agente com potencial efeito anti-hipertensivo e em desordens cardiovasculares.

Palavras-chave: Saponinas; Cardiovascular; *Syzygium cumini*; Vasorrelaxante; Anti-hipertensivo

## ABSTRACT

Cardiovascular diseases (CVD) are the leading causes of death in the world and the search for new medicines that can ensure the treatment of diseases such as hypertension, for example, are becoming more frequent. Among the compounds investigated are products of plant origin that present classes of metabolites with pharmacological potential on the cardiovascular system. Saponins, class of plant origin, are amphiphilic molecules that have been seen as a prominent source of compounds with beneficial activity to the cardiovascular system. The present study evaluated the pharmacological potential of saponins extracted from leaves of *Syzygium cumini* (L.) Skeels in the cardiovascular system of spontaneously hypertensive rats (SHR). SHR male were treated for a period of 15 days with a rich fraction of *S. cumini* (FRS) 10 mg / kg / day / week saponins. and FRS 50 mg / kg / day / v.o. The results demonstrated that FRS was able to reduce blood pressure of SHRs, promote a reduction of arrhythmic events such as atrioventricular block and act on peripheral vascular resistance in resistance arteries, causing the decrease of noradrenaline-induced contraction in treated SHR animals with the highest dose. The vasorelaxation mechanisms were also evaluated in mesenteric artery rings. FRS was able to promote the vasorelaxing effect and block the contraction induced by extracellular calcium. With the results presented, it is concluded that FRS appears to act by blocking the influx of calcium and promoting cardioprotection, being therefore a prominent agent with potential antihypertensive effect and in cardiovascular disorders.

Keywords: Saponins; Cardiovascular; *Syzygium cumini*; Vasorelaxant; Antihypertensive

## SUMÁRIO

1.INTRODUÇÃO	11
2. REVISÃO DE LITERATURA	
2.1 A espécie vegetal <i>Syzygium cumini</i>	13
2.1.1 Características botânicas de <i>S.cumini</i>	13
2.1.2 Propriedades farmacológicas de <i>S. cumini</i>	14
2.2 Saponinas	18
2.2.1 Características químicas	19
2.2.2 Utilizações de saponinas de origem vegetal	21
2.2.3 Propriedades farmacológicas das saponinas	24
2.2.4 Saponinas e o sistema cardiovascular	26
2.3 Sistema cardiovascular e suas desordens	31
2.3.1 Fisiologia vascular	32
2.3.2 Hipertensão e terapêutica atual	34
3 OBJETIVOS	36
3.1 Objetivo geral	36
3.2 Objetivos específicos	36
4 METÉRIAS E MÉTODOS	36
4.1 Material Botânico	36
4.2 Animais	36
4.3 Reagentes, solventes, sais e drogas	37
4.4 Extração, fracionamento e caracterização fitoquímica	37
4.5 Perfil cromatográfico por HPLC–UV / Vis e FIA-ESI-IT-MSn	38
4.6 Testes de atividade farmacológica	39
4.6.1 Determinação da Pressão Arterial de SHR tratados com a FRS - Método Indireto	39
4.6.2 Determinação de parâmetros eletrocardiográficos de SHR tratados com a FRS	40
4.6.3 Avaliação das alterações histológicas do coração	40
4.6.3 Avaliação da reatividade de artérias	41

mesentéricas e estimativa de hipertrofia cardíaca de SHR tratados com FRS	
4.6.5 Avaliação do efeito vasorrelaxante da FRS em artéria mesentérica	41
4.6.5.4 Avaliação do efeito da FRS na reatividade vascular ao cálcio	42
4.6.5.1 Avaliação atividade vasorrelaxante da FRS na contração induzida pela Noradrenalina em artéria mesentérica de SHR	42
4.6.5.3 Avaliação do efeito vasorrelaxante da FRS em artéria mesentérica de SHR em solução despolarizante de KCl (20mM)	42
4.6.5.2 Avaliação do efeito vasorrelaxante da FRS em artéria mesentérica de SHR em solução despolarizante de KCl (80mM)	42
4.7 Atividade antioxidante	43
4.8 Docagem molecular	43
4.9 Análise Estatística	44
5. RESULTADOS	45
5.1 Obtenção da Fração rica em saponinas de <i>Syzygium cumini</i>	45
5.2 Caracterização química	45
5.3 Teste de atividade antioxidante da FRS frente ao DPPH	46
5.3 Avaliação do efeito <i>in vivo</i> da FRS no sistema cardiovascular	47
5.3.1 Efeito da FRS sobre a pressão arterial de SHR	47
5.3.2 Efeito da FRS sobre os parâmetros eletrocardiográficos de ratos SRH	50
5.3.3 Efeito da FRS no tônus vascular	51
5.3.4 Estimativa de hipertrofia cardíaca dos ratos SHR tratados	52

5.4 Efeito da FRS sobre o tecido cardíaco	<b>53</b>
5.4 Avaliação do efeito vasorrelaxante <i>ex vivo</i> da FRS em anéis de artéria mesentérica de SHR	<b>53</b>
5.4.1 Efeito vasorrelaxante da FRS em anéis de artéria mesentérica com e sem endotélio funcional	<b>53</b>
5.4.2 Efeito vasorrelaxante da FRS em artérias mesentéricas de SRH despolarizadas com KCl 80mM	<b>55</b>
5.4.3 Efeito vasorrelaxante da FRS em anéis de artéria mesentérica de SRH despolarizadas com KCl 20mM	<b>56</b>
5.5 Efeito da FRS na reatividade vascular de SHR ao cálcio	<b>57</b>
6. Docagem molecular	<b>58</b>
DISCUSSÃO	<b>61</b>
CONCLUSÃO	<b>69</b>
REFERÊNCIAS	<b>70</b>
ANEXOS	

## 1. INTRODUÇÃO

Segundo a Organização mundial da Saúde (OMS) as doenças cardiovasculares (DCV) são atualmente a principal causa de morte no mundo. Mais pessoas morrem anualmente por essas enfermidades do que por qualquer outra causa. Estima-se que 17,9 milhões de pessoas morrem a cada ano de doenças cardiovasculares, representando 31% de todas as mortes em nível global. (WHO, 2017). Daí um interesse na pesquisa de novos medicamentos, com destaque ao uso de produtos de origem vegetal como terapia alternativa e complementar na prevenção e tratamento de doenças cardiometabólicas, destacando-se o importante crescimento no número de estudos científicos na área de pesquisa nesta área (WALTENBERGER *et al.*, 2016).

A espécie vegetal *Syzygium cumini* (L.) Skeels é uma árvore terrestre, frutífera de grande porte, originada da Índia e aclimatada no Brasil. É muito frequente no litoral o estado do Maranhão. É conhecido popularmente como azeitona doce, jambolão, jamelão entre outros nomes. Esta espécie é largamente empregada pela população como adstringente, anti-hemorragico, antimicrobiano e anti-diarréica (POZETTI, 1989; MURUGANANDAN *et al.*, 2001).

Extratos dessa planta apresentaram atividades sobre o sistema cardiovascular. Ribeiro *et al.* (2014) demonstraram o efeito anti-hipertensivo do extrato hidroalcoólico das folhas de *S. cumini* esta espécie em ratos espontaneamente hipertensos (SHR). Neste estudo os animais tratados por oito semanas com o extrato apresentaram redução na pressão arterial média, batimentos cardíacos, além de efeito sobre a reatividade vascular, com redução da responsividade arterial. O extrato mostrou capacidade de agir via bloqueio do influxo de cálcio na musculatura lisa vascular de artérias mesentéricas.

Chagas *et al.* (2016) fez um compilado de estudos mostrando que esta espécie vegetal tem se mostrado como uma proeminente fonte de moléculas bioativas, que apresenta potencial farmacológico para o tratamento de doenças cardiometabólicas, por promover além do efeito anti-hiperglicêmico e anti-hiperlipidêmico, atividade cardioprotetora, anti-inflamatória, entre outras.

Dentre as classes de metabólitos secundários que possuem efeito sobre o sistema cardiovascular, destaca-se a ação das saponinas. Singh *et al.* (2018) mostrou por diferentes mecanismos como estas moléculas possuem o efeito cardioprotetor, atuando no sistema cardiovascular. Em seu estudo foi comprovado ações antioxidante, anti-hipoxia, regulatória do íon  $\text{Ca}^{++}$ , anti-aterosclerose, vasorrelaxante, ionotrópica, angiogênica, entre outras, que podem resultar em novos fitofármacos para o tratamento dessas enfermidades.

*S. cumini* é uma espécie reportada na literatura como um vegetal rico em saponinas, sobretudo nos extratos das folhas, quando obtidos com solução hidroetanólica ou etanol (SHARMA e VISHNOI, 2017).

Uma metodologia simples e de baixo custo para obtenção de frações de saponinas, a partir de extratos vegetais, foi desenvolvida por nós, utilizando um método físico por agitação e produção de espuma, o que não compromete a estrutura química das saponinas, tendo como produto final uma fração rica em saponinas (depósito de patente INPI BR 102014003275-4).

Assim, o presente trabalho teve por objetivo avaliar o efeito farmacológico pré-clínico da fração rica em saponinas, extraídas das folhas de *Syzygium cumini* (FRS), no sistema cardiovascular de ratos espontaneamente hipertensos (SHR), utilizando de ensaios *in vivo* e *in vitro*. Para isto foram determinados os efeitos da FRS na reatividade de anéis de artérias de resistência e o efeito do tratamento com essa fração sobre a pressão arterial e parâmetros eletrocardiográficos dos ratos.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 A espécie vegetal *Syzygium cumini*

*Syzygium cumini* (L.) Skeels é uma planta nativa do sudeste asiático que possui várias sinonímias incluindo *Eugenia jambolana* Lam., *Myrtus cumini* Linn., *Syzygium jambolana* DC., *Syzygium jambolanum* (Lam.) DC., *Eugenia djouant* Perr., *Calyptranthes jambolana* Willd., *Eugenia cumini* (Linn.) Druce. e *Eugenia caryophyllifolia* Lam. Pertence à família *Myrtaceae* sendo característica desta uma ampla distribuição nas regiões tropicais sobretudo América e Austrália (AYYANAR; SUBASH-BABU, 2012). No Brasil, a espécie vegetal é bem adaptada devido ao clima tropical, localizando-se com frequência nos estados do Maranhão, Bahia, Minas Gerais, Rio de Janeiro, São Paulo, Rio Grande do Sul e frutifica fartamente no mês de fevereiro. Os nomes populares atribuídos a essa espécie são: Jambolão, Jamelão, Azeitona Roxa, Jambo da Índia, Jambol, variando de acordo com a região. (PIO CORRÊA, 1984).



A



B

**FIGURA 1:** Partes aéreas de *Syzygium cumini*. A: detalhe dos frutos; B: Aspectos gerais da planta. Fonte: O autor

#### 2.1.1 Características botânicas de *Syzygium cumini*

Esta espécie vegetal é uma árvore de grande porte com folhagem sempre verde e densa. O caule apresenta-se com casca grossa em tom acastanhado, esfoliante e em escamas lenhosas além de madeira esbranquiçada, granulada e durável. As folhas são coriáceas, oblongo ovadas a elípticas com 6 a 12 centímetros de comprimento. As flores são perfumadas, branco esverdeadas, em grupos de apenas alguns ou 10 a 40 e são redondas

ou oblongas. O cálice é em forma de funil, com cerca de 4 milímetros de comprimento e dentado. Os frutos são bagas e muitas vezes são arredondados a oblongos, com 1,5 a 3,5 centímetros de comprimento, roxo escuro ou quase preto, carnudos e comestíveis, contém uma única semente grande. Possuem um sabor muito doce, tornando-se ligeiramente adstringentes nas bordas da polpa à medida que a fruta amadurece. A fruta tem uma combinação de sabor doce, levemente azedo e adstringente com uma tendência a colorir a língua na cor roxa (AYYANAR; SUBASH-BABU, 2012).

### **2.1.2 Propriedades farmacológicas e composição química de *Syzygium cumini***

*Syzygium cumini* é mais conhecida por seu efeito sobre alterações metabólicas do Diabetes, sendo reportado na literatura seu efeito por diferentes mecanismos de ação, como descrito a seguir:

Nair e Santhakumari (1986) mostraram o efeito antidiabético das sementes da espécie vegetal. Em estudos pré-clínicos em coelhos machos o extrato aquoso reduziu os níveis de açúcar no sangue dos animais de forma dose dependente variando entre 1, 2, 4 e 6g/kg, sendo a dose de 4g/kg a mais efetiva. O extrato foi capaz de reduzir os níveis de glicemia após a terceira hora de administração, além de a apresentar efeito sobre a tolerância de glicose.

Outros estudos mostram que as sementes de *Syzygium cumini* melhoram a resistência à insulina e a disfunção das células  $\beta$  via modulação de PPAR $\gamma$ , dislipidemia, estresse oxidativo e TNF- $\alpha$  em ratos diabéticos tipo 2 (SHARMA *et al.*, 2012). Outro estudo mostrou que a suplementação feita com o pó das sementes de *Syzygium cumini* tem um efeito preventivo, evitado obesidade, intolerância a glicose, hiperlipidemia, inflamação e fibrose no fígado além de efeito sobre o estresse oxidativo em modelo animal induzido com dieta rica em gordura e carboidratos em ratos obesos (ULLA *et al.*, 2017).

As cascas do caule da espécie vegetal são utilizadas para a preparação de chá com efeito antidiabético. Perera *et al.* (2017) concluíram que o uso das cascas em preparações para chás com efeito antiabético tem comprovação científica devido a presença de compostos como ácido gálico(PATEL; GOYAL, 2011), umbelliferona (RAMESH; VISWANATHAN; PUGALENDI, 2007) e ácido

elágico que são comprovadamente antidiabéticos, (MUTHENNA; AKILESHWARI; REDDY, 2012)

As folhas da espécie vegetal também apresentam propriedades sobre o metabolismo. De Bona *et al.* (2010) em um estudo clínico feito no Rio Grande do Sul demonstraram que o extrato das folhas de *Syzygium cumini* diminuiu a atividade da adenosina desaminase e 5'Nucleotidase, enzimas importantes que são expressas em quadros de diabetes e hipertensão, além de reduzir o dano oxidativo em plaquetas de pacientes diabéticos. Sanches *et al.* (2016) mostraram que o extrato de *S.cumini* rico em polifenóis, extraídos da folha, melhora a sensibilidade à Insulina periférica e a função de ilhotas pancreáticas em modelo experimental induzida por L-glutamato monossódico em ratos obesos. Nesse estudo, além do efeito antioxidante frente ao radical livre 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH), é demonstrado também um aumento da atividade lipolítica, desaceleração tanto no ganho de peso quanto no acúmulo de triglicerídeos nos animais tratados, além da melhora a tolerância a glicose.

Em um estudo de revisão Ayyana, Subash-Babu e Ignacimuthu (2013) fazem um compilado de estudos apresentando a espécie vegetal *S. cumini* como um proeminente agente terapêutico para tratamento do diabetes comprovando seu uso na prática popular, através de estudos científicos

Por ser uma espécie rica em compostos fenólicos, estudos que mostram a atividade antioxidante são constantemente encontrados na literatura. Ruan *et al.* (2008) fazem uma avaliação de extratos das folhas de *S. cumini*. Nesse estudo foram avaliadas as frações metanólica, aquosa, acetato de etila, clorofórmica e *n*-hexânica em ensaios de atividade antioxidante tais como DPPH, poder de redução do ferro (FRAP), dentre outros. Foi observado um potente efeito antioxidante em todas as frações do extrato frente aos ensaios testados.

Mohamed *et al.* (2013) observaram o efeito antioxidante e antimicrobiano dos extratos metanólico e cloreto de metileno, além do óleo essencial das folhas de *S.cumini*. Os diferentes extratos apresentaram efeito inibitório sobre os microrganismos *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*. Eshwarappa *et al.* (2014) também relata o efeito antioxidante das folhas em extrato aquoso e metanólico, além de observar seu efeito sobre a eliminação

de óxido nítrico em valores semelhantes aos do ácido ascórbico, usado como controle positivo em comparação ao extrato metanólico.

Outros estudos também revelam o potencial antioxidante de outras partes da planta. Mesmo em diferentes condições de pH, os frutos apresentam constituintes bioativos como carotenoides e em condições de pH mais elevados foi observado uma tendência em aumento da atividade antioxidante (FARIA; MARQUES; MERCADANTE, 2011). O suco dos frutos é retratado como um antioxidante natural e seu uso foi assegurado por não causar quaisquer alterações em enzimas hepáticas e nem em marcadores renais como ácido úrico, além de não causarem quaisquer alterações histopatológicas (EL-ANANY; ALI, 2013). Também há evidências desse potencial nas sementes (PRIYA; PRAKASAN; PURUSHOTHAMAN, 2017)

O extrato aquoso das folhas apresentou atividade antialérgica. Em estudo realizado em camundongos, o qual inibiu a formação de edema, degranulação de mastócitos e liberação de histamina, bem como a inibição da acumulação de eosinófilos e produção de CCL11 /eotaxina e IL-5 (BRITO *et al.*, 2007).

Barh e Viswanathan (2008) mostraram os efeitos inibitórios e indutor de apoptose sobre células de carcinoma humano HPV-positivas do extrato metanólico obtido dos frutos maduros. Parmar *et al.*, (2010) relataram o efeito quimiopreventivo dos frutos de *S. cumini* em camundongos com papiloma induzido por DMBA (7,12-dimetilbenzil(a)-antraceno).

Chanudom e Tangpong (2015) mostraram o efeito anti-inflamatório do extrato aquoso das folhas de *S. cumini* em úlceras gástricas induzidas por indometacina em camundongos. Nesse estudo o extrato apresentou forte atividade antioxidante e anti-inflamatória explicada capacidade de quebra de NO e redução dos níveis de TNF- $\alpha$  no processo inflamatório, reduzindo assim a inibição da COX-1 e diminuindo a expressão de COX-2, resultando na redução dos graves danos causados pela indometacina nas células gástricas.

A atividade antimicrobiana e antifúngica também é relatada na literatura para esta espécie vegetal. Vasavi; Arun e Rekha (2013) mostraram o efeito inibidor do extrato etanólico das folhas de *S. cumini* sobre o microorganismo *Chromobacterium violaceum*. Yadav *et al.* (2017) descreve o potencial do extrato metanólico das sementes frente ao *Bacillus subtilis*, cujo mecanismo de

ação envolve a alteração da parede celular bacteriana, redução do tamanho e o vazamento do conteúdo celular. Khan *et al.* (2017) mostrou o efeito de diferentes extratos vegetais em comparação com antifúngicos tradicionais. Dentre os estes, o extrato etanólico das folhas de *S. cumini* apresentou atividade antifúngica satisfatória, inclusive contra a cepa C14, uma das mais resistentes avaliadas no estudo. Um estudo recente utilizou formulações farmacêuticas de uso tópico (pomadas e fitas) preparadas com nanopartículas obtidas a partir de compostos das folhas de *S. cumini* e prata para tratamento de feridas em diabéticos. A formulação apresentou efeito antimicrobiano e acelerou o processo de cicatrização, além de uma alta citocompatibilidade e atividade anti-inflamatória (SIGLA *et al.*, 2017).

No sistema cardiovascular, a espécie vegetal *S. cumini* tem se mostrado uma proeminente fonte de moléculas bioativas, apresentando um potencial uso para tratamento de doenças cardiometabólicas por promover além do efeito anti-hiperglicêmico e anti-hiperlipidêmico, uma atividade cardioprotetora, anti-inflamatória, entre outras (CHAGAS *et al.*, 2016).

Ribeiro *et al.* (2014) demonstraram o efeito anti-hipertensivo das folhas de *S. cumini* em ratos espontaneamente hipertensos (SHR). Nesse estudo, animais foram tratados por oito semanas com o extrato hidroalcoólico das folhas (HESc) e apresentaram uma redução na pressão arterial média, batimentos cardíacos, além de efeito sobre a reatividade vascular, com redução da responsividade arterial. O HESc interage abrindo canais de cálcio na musculatura lisa vascular de artérias mesentéricas.

Raffaelli *et al.* (2014) mostraram que as folhas possuem atividade sobre agregação plaquetária em pacientes diabéticos. O extrato aquoso causou menor agregação plaquetária e menor dano oxidativo, avaliada por meio da mensuração de lipoperóxido e níveis de óxido nítrico. O extrato ainda estimulou a atividade da bomba  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase.

### **2.1.3 Composição fitoquímica de *S. cumini***

Diferentes partes da planta têm sido estudadas ao longo do tempo. Vários compostos e moléculas bioativas de interesse farmacológico têm sido identificadas. As folhas apresentam-se ricas em flavonoides e outros fenólicos

tais como: miricetina (MAHMOUD *et al.*, 2001) e quercetina (AYYANAR; SUBASH-BABU, 2012), taninos e terpenos (CHAGAS *et al.*, 2015).

Sharma e Vishnoi (2017) realizaram o *screening* fitoquímico desta espécie vegetal, tanto para as folhas, quanto para as cascas em extrações feitas com etanol ou etanol 50%. Os resultados revelam que a folha apresenta presença moderada de taninos e terpenos e fortemente de glicosídeos, fenóis, flavonoides, esteroides e saponinas. Estas últimas encontradas intensamente no extrato etanólico das folhas.

## 2.2 Saponinas

Segundo Costa (2005) as saponinas são heterosídeos formados por uma parte aglicônica de natureza esteróide ou triterpênica, conhecidos usualmente por sapogeninas, ligadas a longas cadeias glucídicas. Essas moléculas estão presentes em grande parte das plantas e alimentos de origem natural tais como espargos, feijões, amoras-pretas, ervilhas, batatas, beterraba (DINI *et al.*, 2001). Por possuírem um caráter anfifílico, essas moléculas são, por vezes, capazes de desestabilizar a membrana celular ou ainda formar complexos com esteroides, proteínas e fosfolipídeos de membranas o que possibilitam ações biológicas variadas (SIMÕES *et al.*, 2017).

Um dos mais clássicos exemplos da presença de saponinas é o da planta conhecida popularmente no Brasil como “erva-saboeira” ou saponaria (*Saponaria officinalis* L.) uma planta nativa da Europa e que tem sido usada por séculos como uma forma artesanal de sabão (SPARG; LIGHT; STADEN, 2004).

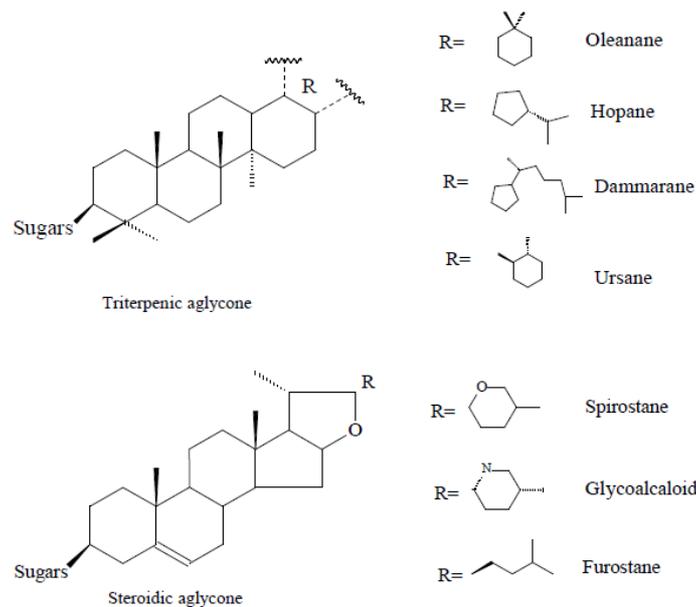
### 2.2.1 Características químicas

As saponinas são classificadas estruturalmente em dois grupos de acordo com sua parte aglicona: esteroidais e triterpênicas. Alguns autores ainda distinguem um terceiro grupo de saponinas, os de heterosídeos com aminas esteroidais, entretanto este grupo apesar de possuírem propriedades de saponinas, são biogeneticamente pseudoalcalóides (BRUNETON, 1995).

- Saponinas esteroidais: Possuem um esqueleto com 27 átomos de carbono que constam habitualmente com 6 estruturas cíclicas. Podem

ainda ser subdivididas de acordo com o sexto ciclo após o anel ciclopentanoperidrofenantreno, podendo ser espirostano ou furostano. Ocorrem exclusivamente em angiospermas monocotiledôneas, portanto, menos frequentes.

- Saponinas triterpênicas: são produtos, como a maioria dos triterpenóides, da ciclização do (3S)-2,3-epoxi-2,3-hidroesqualeno. Podem também se subdivididas de acordo com o seu esqueleto. Saponinas triterpênicas do tipo dammaranicas são tetracíclicas e pouco frequentes. Outras do tipo Oleanano, Ursano, Lupano são pentacíclicas. Saponinas triterpênicas são mais comumente encontradas, podendo inclusive ser produzidas por animais marinhos e algumas pteridófitas. Ocorrem com



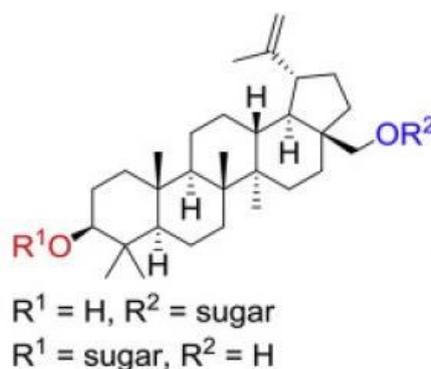
maior frequência em Angiospermas dicotiledôneas

**FIGURA 2:** Diferentes possibilidades de saponinas. Fonte: CHAIEB (2010)

As saponinas também podem ser classificadas com base na quantidade de cadeias glicosídicas presentes em sua estrutura (BÖTTCHER; DRUSCH, 2017):

- Monodesmosídicas: possuem uma única cadeia glucídica, classicamente se encontra em posição C-3, tanto nas saponinas esteroidais quanto nas triterpênicas.

- Bidesmosídicas: possuem duas cadeias glucídicas. Pode haver uma formação de éster carboxílico em C-28 quando a saponina é triterpênica ou esterificação do hidróxido em C-26 quando esteroidal.
- Tridesmosídeos: possuem três cadeias glucídicas. Bem raros e poucos são conhecidos



**FIGURA 3.** Exemplo de saponina triterpênica monodesmoídeo ou bidesmosídeo. Adaptado de Korda *et al.* (2018)

Oleszek (2002) descreve sobre os métodos cromatográficos para determinação de saponinas em plantas. Nesse trabalho são citados métodos como cromatografia em camada delgada (TLC – thin-layer chromatographic), tanto por densitometria utilizando clorofórmio-água-metanol ou butanol-ácido acético-água, quanto TLC colorimétrica utilizando mais frequentemente corante de Ehrlich ou vanilina mensurados a  $\lambda=515-560$  nm. Cromatografia Gasosa (CG), apesar de saponinas não serem facilmente volatilizáveis devido ao seu tamanho. Neste caso utilizam-se técnicas de derivatização acrescentando-lhes grupamentos éteres acetílicos, metílicos ou trimetilsilílicos. Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC – High-performance liquid chromatography) tem sido o método mais indicado e mais utilizado para determinação de saponinas em amostras, geralmente utilizando colunas  $C_{18}$  normal ou em fase reversa. O grande problema é a detecção por UV, como alternativa geralmente utilizam-se baixos comprimentos de onda, algo em torno de 200 nm. Uma alternativa mais eficaz seria o de conjugar HPLC ao espectrômetro de massas ou com ressonância nuclear magnética. Há ainda a alternativa de se separar e quantificar esses compostos por eletroforese capilar.

Oleszek e Bialy (2006), dentre alguns ensaios clássicos, citam que imunoenaios com anticorpos monoclonais frente a drogas de baixo peso

molecular tem se tornado uma ferramenta importante nas análises de saponinas por sua alta sensibilidade e especificidade. Ensaios com ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay) têm se mostrado mais eficazes do que o clássico HPLC. Algumas saponinas presentes no *ginseng* por exemplo, podem ser identificadas por essa técnica como ginsenosídeo Rb1 (faixa de medição do ensaio ELISA de 20 a 400 ng / ml), ginsenosídeo Rg1 (faixa de medição 0,3-10 µg / ml). Alguns trabalhos citam a cromatografia em coluna a baixa pressão como método para separação de saponinas. A grande dificuldade é encontrar a fase móvel e a fase estacionária adequada. Ao utilizar-se sílica em gel, por exemplo, o isolamento não ocorre de forma tão eficaz, sendo por vezes necessário o uso de colunas em fase reversa. A cromatografia líquida com ionização por eletrospray acoplada ao espectrometro de massas (LC/ESIMS- Liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry), surgiu justamente devido a dificuldade de se analisar alguns compostos por cromatografia líquida acoplada ao UV. Várias espécies de plantas contendo saponinas foram analisadas por esse método que consiste em preparar a amostra injetando-a de forma indireta no sistema, passando antes por um processo de ionização após diluição em solvente, recebendo uma voltagem específica, e fazendo-o emergir de um capilar em forma de aerossol e fluem para o espectrômetro de massas induzidos pelos efeitos da atração eletrostática e pelo vácuo (LANÇA, 2013).

### **2.2.2 Utilizações de saponinas de origem vegetal**

A aplicação de saponinas em citometria de fluxo tem sido de grande utilidade para as pesquisas que envolvem esse método. O uso de anticorpos monoclonais (AcMc) como marcadores celulares é essencial durante o estudo imunofenotípico das doenças oncohematológicas. A expressão de antígenos de superfície é característica que define a linhagem celular, sendo esta característica a base para a marcação com os AcMc específicos. Células com linhagens comprometidas por alterações oncóticas expressam antígenos diferentes que também podem ser marcados por AcMc específicos auxiliando assim ainda mais o diagnóstico preciso. Entretanto alguns antígenos específicos de linhagem localizam-se no núcleo ou citoplasma da célula.

Pereira *et al.* (2007) discorre sobre o uso de saponinas em citometria de fluxo como alternativa para a permeabilização celular. Nesse estudo foi utilizada saponinas comerciais como permeabilizante de membrana celular, possibilitando a entrada de marcadores como: mieloperoxidase (MPO), a deoxinucleotidiltransferase terminal (TdT), CD22 e CD33. Todos marcadores intracelulares.

Lorent *et al.* (2013) padronizou um método para permeabilização celular utilizando duas saponinas monodesmosídicas derivadas da aglicona hederagenina ( $\alpha$ -hederina e  $\delta$ -hederina). Behbehani *et al.* (2014) mostraram que a permeabilização parcial transiente com saponina permite a aplicação de métodos que otimizam o processo de marcação celular com fluorescência.

Saponinas são utilizadas como adjuvantes na composição de vacinas. Algumas são capazes de estimular respostas das células do sistema imune.

As saponinas da espécie vegetal *Quillaja saponaria* são comercialmente conhecidas como Quil A<sup>®</sup>. Essa formulação é mistura parcialmente purificada de saponinas e um dos adjuvantes para vacinas veterinárias mais utilizados (SUN; XIE; YE, 2009). Moghimipour e Handali (2015) citam as saponinas da espécie *Quillaja saponaria* com capacidade de estimular resposta imune humoral e celular frente a patógenos.

Tafaghodi, *et al.* (2016) mostraram a eficácia na imunização contra leishmaniose tegumentar por microesferas de alginato, carregadas com de *Leishmania major* autoclavadas (ALM) e saponinas de quillaja.

As saponinas extraídas das folhas de outra espécie do mesmo gênero, *Quillaja brasiliensis*, mostrou capacidade de aumentar a imunidade específica a longo prazo e promover o efeito de preservação da dose em vacinas frente ao vírus da diarreia bovina viral (BVDV – Bovine viral diarrhea vírus). Quando inoculados por via subcutânea em camundongos, promoveram uma forte resposta de anticorpos a longo prazo abrangendo IgG1 e IgG2a específicas, aumentaram a avidéz de anticorpos IgG e aumentaram significativamente a produção de IFN- $\gamma$  em células T CD4 + e T CD8 + (CIBULSKI *et al.*, 2018).

Turmagambetova *et al.* (2017) comparam as frações ricas em saponinas isoladas das raízes de três diferentes espécies vegetais *Allochrusa gypsophiloides*, *Saponaria officinalis* e *Gypsophila paniculata* utilizadas como adjuvantes em vacinas contendo a subunidade H7N1 do vírus *influenza*. Por

suas propriedades físico-químicas, as saponinas são capazes de formar combinações com lipídios e antígenos formando os chamados complexos imunoestimulatórios (ISCOMs).

Outra aplicação bastante estudada das saponinas é seu uso como inseticida. Algumas saponinas possuem a capacidade de interferir no comportamento alimentar dos insetos, outras capazes de regular seu crescimento geralmente causando distúrbios e falhas na muda. Há ainda saponinas com um potencial de entomotoxicidade (CHAIEB, 2010).

Jiang *et al.* (2018) citam o uso de extratos ricos em saponinas de *Quillaja saponária* e *Chenopodium quinoa* como biopesticidas. De um modo geral, extratos enriquecidos em saponinas têm sido registrados pela U.S. Environmental Protection Agency (Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos) como biopesticidas.

As características físico-químicas das saponinas, como já citadas, conferem a elas um perfil comercialmente proveitoso como emulsificante natural e biosurfactante. As saponinas de origem vegetal além realizar o processo de emulsificação, possuem a capacidade de estabilizar de formulações (McCLEMENTS & GUMUS, 2016).

Kregiel *et al.* (2017) atribuem as saponinas a presença de uma aglicona lipossolúvel e uma cadeia de açúcar solúvel em água, a natureza anfifílica dessas moléculas, confere a possibilidade de formação de espuma (com fases líquido-gasosas) com efeito emulsionador (com fases líquido-líquido) e capacidade de dispersão (com fases líquido-sólido). Saponinas com uma cadeia de açúcar têm as melhores características de formação de espuma. Os compostos com duas ou três cadeias de açúcar mostram diminuição da capacidade de formação de espuma.

Upadhyay *et al.* (2018) enfatiza uma das principais utilizações das saponinas pela indústria farmacêutica: a produção de compostos a base de esteroides. Recentes avanços nas vias biossintéticas são elencados em mais de duzentos trabalhos científicos demonstrando a importância dessa classe de metabolitos para fins de produção de fármacos com esteroides.

### **2.2.3 Propriedades farmacológicas das saponinas**

Por sua propriedade de interagir com a membrana das células, algumas atividades farmacológicas que têm sido relatadas são baseadas nesse princípio. Outras devido a sua característica de modulação no sistema imunológico.

Sparg, Light e Staden (2004) reportam o potencial biológico das saponinas estudadas na época tais como: atividade hemolítica, molucicida, anti-inflamatória, antifúngica, antimicrobiana, antiparasitária, citotóxica/antitumoral, antiviral, dentre outras.

Allan, Abou-Taleb e Aboobia (2017) mostraram o potencial antimicrobiano e pesticida da saponina de soja. Observaram a atividade antimicrobiana *in vitro* frente a bactérias Gram-positivas (*Staphylococcus aureus* e *S. epidermiditis*), bactérias Gram-negativas (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Agrobacterium tumefaciens*, *Erwinia amylovora* e *E. carotovora*), *Candida albicans* e fungos patogênicos de plantas (*Fusarium oxysporium* e *Botrytis cinerea*). Também uma atividade inseticida contra insetos *Tribolium castaneum*, *Rhyzopertha dominica* e *Sitophilus oryzae*. Além disso, foi determinada a atividade nematicida da saponina de soja contra o nematóide *Meloidogyne incognita*.

O potencial citotóxico de algumas saponinas lhes confere atividade explorado sobretudo para estudos frente a células cancerígenas e tumorais.

Koczurkiewicz *et al.* (2015) destacaram os principais mecanismos de ação pelos quais as saponinas apresentam efeito anticâncer em estudos *in vitro*. A atividade citostática de alguns compostos dessa classe de metabólitos tem sido relacionada a capacidade de ativar a parada do ciclo celular, através do dano no fuso mitótico ou por um efeito direto nas vias de sinalização que regulam a proliferação celular. Várias saponinas triterpênicas possuem atividade antiproliferativa como as saponinas isoladas da espécie vegetal *Pulsatilla chinensis* (pulsatilla a), fração rica em ginsenosídeos isoladas do ginseng, fração saponina isolada de *Camelia oleifera*, saponinas isoladas de *Astragalus membranaceus*. O Efeito pró-apoptótico de saponinas tem sido demonstrado tanto pela via independente como a dependente de caspases. O ginsenosídeo Rh2, saponinas isoladas de *Playcodon grandiflorum*, ginsenosídeo Rk1, saponinas isoladas de *Anemone raddeana*, entre outros, são exemplos de compostos que mostraram esse efeito. Este último, age via

redução de Bcl-2 (célula B linfoma 2) e Bax (Bcl-2 associado a proteína X). O efeito anti-metástase observado por alguns mecanismos como a degradação da matriz extracelular, bloqueio do processo de angiogênese e bloqueio da migração celular. Ginsenosídeos, saponinas totais isoladas de *Actinidia valvata*, saponinas isoladas de *Baccopa monnieri*, saponinas isoladas de *Lysimachia ciliata* são exemplos de compostos que agem por estes mecanismos.

Kim *et al.* (2016) demonstraram o efeito antitumoral de saponinas e saponinas complexadas com fosfolipídios isoladas do *Panax notoginseng* em células de câncer de pulmão humano (NCI-H460) e célula de câncer de mama humano linhagem (BT474). *In vivo*, ratos com câncer de mama induzidos por DMBA tiveram a progressão da doença diminuída de forma significativa, em contrapartida apresentaram um aumento nos níveis de enzimas antioxidantes incluindo SOD (superóxido dismutase), CAT (catalase) e GPx (glutathione peroxidase).

O ginsenosídeo Rg3 foi utilizado como princípio ativo para preparação de micelas utilizando o polímero [Pluronic® F-127](#). Essa preparação além de prevenir a cardiotoxicidade causada pela doxorrubicina foi capaz de aumentar sua eficácia anticancerígena superando a resistência multidrogas apresentada por células tumorais de mama (LI *et al.*, 2017).

O potencial anti-inflamatório das saponinas também pode ser observado em alguns estudos. Jang *et al.* (2016) mostraram o efeito de saponinas totais isoladas das raízes de *Panax ginseng* em macrófagos ativados por lipopolissacarídeos (LPS). Nesse estudo as saponinas inibiram a produção de citocinas inflamatórias, além do NO em macrófagos RAW 264.7, estimulados por LPS, modulando a ativação de vias de sinalização intracelular, incluindo NF-κB e múltiplas vias de sinalização MAPK. Feng *et al.* 2016 relataram o efeito anti-stress das saponinas totais do ginseng em ratos no estímulo estressante induzido por suspensão da cauda, por 7 dias. Os níveis de cortisol foram mensurados e os animais tratados com as saponinas apresentaram concentrações significativamente menores em relação aos animais que não receberam tratamento.

Tian *et al.* (2017) descreveram as atividades biológicas de saponinas isoladas de espécies vegetais do gênero *Smilax*. Os compostos encontrados

apresentaram atividade antifúngica, citotóxica, anti-inflamatória e efeito inibitório de vias de sinalização intracelular. Saponinas isoladas das espécies do gênero *Trilium* foram reportadas com potencial citotóxico, anti-inflamatório, antifúngico e antioxidante (RAHMAN *et al.*, 2017)

Singh *et al.* (2017) descreveram os benefícios para a saúde proporcionados por saponinas encontradas em sementes oleaginosas comestíveis. Destacaram-se as saponinas da soja conhecidas como “*soyasaponins*” com atividade imunomoduladora, inibidora de infecção por HIV, inibidora de replicação viral, antitumoral e hepatoprotetora.

Del Hierro *et al.* (2018) descreveram os efeitos de saponinas no trato gastrointestinal. Os mecanismos de interação desses compostos influenciam diretamente no metabolismo, pois se referem à interferência das saponinas em enzimas digestivas, principalmente sobre lipase pancreática, glucosidase e amilase. Também demonstraram capacidade de reduzir a absorção do colesterol e auxiliar a microbiota intestinal.

#### **2.2.4 Saponinas e o sistema cardiovascular**

Diferentes efeitos farmacológicos são relatados para as saponinas sobre o sistema cardiovascular incluindo cardioproteção, vasorrelaxamento, redução da pressão arterial, no metabolismo lipídico, na aterosclerose como antioxidante, entre outros.

Li, *et al.* (2017) investigaram o efeito cardioprotetor da “*sasanquasaponin*” uma saponina triterpenica isolada de uma erva medicinal chinesa *Camellia oleifera* Abel. Esse fitoquímico apresentou ação cardioprotetora por supressão da isquemia/reperfusão ou hipóxia/reoxigenação induzida pela elevação da concentração intracelular de íon cloreto ( $[Cl^-]_i$ ). Esse estudo revelou a capacidade cardioprotetora da saponina por prevenir a abertura do poro de transição de permeabilidade mitocondrial (mPTP) em células H9c2, que pode estar associada à inibição de  $[Cl^-]_i$ . Outro estudo mostrou a capacidade desse composto de ativar o efluxo celular de cloreto por ativação da PKC $\epsilon$  (proteína Kinase C épsilon), um isotipo de PKC caracterizado por ser independente de cálcio (QIU *et al.*, 2016).

Saponinas isoladas de espécies vegetais do gênero *Panax* (*P. ginseng* e *P. notoginseng*) também apresentam atividade cardioprotetora. Ginsenosideo Rb1, um dos principais componentes do ginseng preveniu a hipóxia/isquemia

em cultura de cardiomiócitos. Outro estudo mostrou que o ginsenosideo Rb1 melhora a função cardíaca e a remodelação na insuficiência cardíaca em ratos tratados por 8 semanas (YAN *et al.*, 2016) e (ZHENG *et al.*, 2017)

Zhang *et al.* (2013) comprovaram que a administração de ginsenosideo Rg1, também isolado do ginseng, tem um efeito benéfico sobre a hipertensão consequente da disfunção cardíaca, em modelo de hipertrofia induzido por constrição transversa de aorta em ventrículo esquerdo de rato. Os mecanismos subjacentes de promover a angiogênese e prevenir parcialmente a fibrose envolveram a ativação de fosfo-Akt e inibição de p38, via de sinal MAPK. Outros estudos relacionaram diferentes vias/mecanismos celulares de cardioproteção com saponinas isoladas do ginseng incluindo: Ginsenosideo Rb3 (MA *et al.*, 2014), Ginsenosideo Rg3 (WANG *et al.*, 2015) e Ginsenosideo Rg5 (YANG *et al.*, 2017).

As saponinas de *P. notoginseng* (PNS- *Panax notoginseng* Saponins) são os mais importantes compostos derivados desse fitoterápico utilizado na medicina tradicional chinesa. Compostos como Rb1, Rg1 e R1 fazem parte da sua composição e possuem diversos mecanismos protetores frente a doenças cardiovasculares (YANG, *et al* 2014). Notoginsenosideo R1 é relatado como cardioprotetor por regular o stress oxidativo e o stress do reticulo endoplasmático, além de ativação da via de sinalização TGF- $\beta$ 1 / TAK1 em um modelo de pós condicionamento isquêmico remoto em pulmão de coelho (YU *et al.*, 2016) (GE *et al.*,2016). Outro estudo mostrou o efeito cardioprotetor de PNS na a fibrogênese miocárdica induzida por isoproterenol, por regular a expressão de miR-29c, um micro RNA envolvido na regulação da sinalização de TGF $\beta$  (LIU *et al.*, 2017).

Outra espécie vegetal que possui saponinas com atividade cardioprotetora é *Astragalus membranaceus*. Seu composto isolado o astragalosideo atenuou a lesão miocárdica em modelo de rato com infarto agudo do miocárdio. Já o astragaloside IV associado a tetrametilpirazina melhorou a remodelação ventricular esquerda e preservou a função cardíaca em modelo de infarto do miocárdio de ratos (YU *et al.*, 2017) (WANG *et al.*, 2017). Estudos em cultura de cardiomiócitos também demonstram o seu efeito cardioprotetor (WANG *et al.*, 2015) (HUANG *et al.*, 2016).

Alguns estudos mostram o potencial cardioprotetor não só de saponinas isoladas, mas também de extratos/fração enriquecida de saponinas extraídas de plantas. Tang *et al.* (2015) relataram o efeito cardioprotetor de saponinas totais de três espécies vegetais frente a isquemia miocárdica induzida por isoprenalina. Yan *et al.* (2015) mostraram que o extrato de saponinas totais de *Aralia taibaiensis* protege contra lesão de isquemia / reperfusão miocárdica por ativação da via da AMPK (proteína quinase ativada por adenosina monofosfato).

Quanto ao potencial vasorrelaxante das saponinas, vários mecanismos têm sido elucidados. Yang, *et al.* (2014) relataram entre outros efeitos cardiovasculares, o efeito vasorrelaxante das saponinas encontradas em *Panax notoginseng* e seus mecanismos. Ginsenosideo Rd, por exemplo, apresenta um efeito de inibição da entrada de cálcio via ROCC (canais de cálcio operados por receptor) e SOCC (*canais de cálcio* operados por estoque) sem efeitos nos canais VDCC (canais de cálcio voltagem dependente) e liberação de cálcio. Wu *et al.* (2016) mostraram o efeito vasorrelaxante da PNS em anéis de artéria aorta e mesentérica de ratos geneticamente modificados para apresentar síndrome metabólica (SHRSP.Z-*Lep<sup>fa</sup>/IzmDmcr*).

Cho *et al.* (2015) estudaram a função vascular do Ginsenosideo Rg5 e observaram o seu efeito vasorrelaxante em anéis de artéria aorta, por uma via endotelial dependente de NO. Também por uma via endotelial, dessa vez por aumento o influxo do  $Ca^{2+}$  e ativar NO sintase endotelial, Zhao *et al.* (2016) comprovaram o efeito do Jujubosideo B, uma saponina isolada das sementes de *Zizyphus jujube*, em reduzir a tensão vascular. Qiu *et al.* (2017) demonstraram o efeito vasorrelaxante da fração saponina total extraída das raízes de *Astragalus membranaceus* em anéis de artéria aorta, por uma via dependente de endotélio.

O efeito anti-hipertensivo de algumas saponinas tem sido estudado ao longo dos anos. Li *et al.* (2013) mostraram que o ginsenosídeo Rg1 em modelo experimental de hipertensão pulmonar tromboembólica crônica reduziu a pressão sistólica do ventrículo direito, além de aumentar a expressão de MMP-2 (Matrix metaloproteinase - 2), uma enzima envolvida no remodelamento cardíaco.

Manivannan *et al.* (2015) estudaram o efeito da diosgenina, uma saponina esteroidal presente em algumas espécies de *dioscoreas*. Além de atuar na remodelação cardíaca e no stress oxidativo induzidos por adenina em modelo experimental de falha renal crônica, o composto preveniu a hipertensão quando administrado em paralelo à adenina, mantendo, portanto, os níveis normais de pressão sistólica nos animais tratados por cinco semanas.

A atividade protetora das saponinas sobre o sistema cardiovascular está intimamente ligada ao seu potencial benéfico cardiometabólico, agindo especialmente sobre os lipídeos. A atividade de diferentes saponinas também foi destacada nas últimas décadas e a de alguns desses metabólitos secundários foi relatada em estudo de revisão sobre o potencial terapêutico anti-obesidade de compostos naturais. (ZAHNG *et al.*, 2014), (SINGH *et al.*, 2015).

Marrelli *et al.*, 2016 descreveram o efeito de saponinas sobre o metabolismo lipídico por diferentes mecanismos relatados a seguir: Efeito inibidor da lipase pancreática em estudos tanto com extratos ricos em saponinas, quanto com compostos isolados. A inibição da lipase pancreática é por exemplo um dos mecanismos de ação da droga Orlistate, um agente eficaz no tratamento da obesidade. Agem também inibindo a adipogênese, impedindo por tanto o acúmulo de gordura nos adipócitos. O principal mecanismo se dá pela ativação da AMPK nos adipócitos. Outro mecanismo envolvendo as saponinas e o metabolismo lipídico é o de regulação do apetite, explicado pela capacidade dessas moléculas de afetar a expressão de peptídeos reguladores do apetite como leptina e neuropeptideo Y. Há também o efeito anti-hiperlipidêmico apresentado tanto em fração rica em saponinas, quanto em compostos isolados.

Outros estudos também relataram o mecanismo de ação das saponinas e seu potencial sobre o metabolismo. O Ginsenosídeo Rb2 por exemplo apresentou capacidade de ativar a AMPK, reduzindo a acumulação lipídica em células hepáticas via a restauração da capacidade autofágica (HUANG., *et al* 2017). O Extrato de *Tithonia diversifolia* rico em saponinas reduziu os níveis de ureia e colesterol, além de causar um aumento de leucócitos, influenciando no sistema imune de ratos Wistar (EJELONU *et al.*, 2017). As saponinas extraídas das folhas de *Genus Camellia* também apresentaram efeito hipolipidêmico,

reduzindo colesterol total, triglicerídeos, LDL e HDL em ratos obesos, induzidos com dieta rica em gorduras. Este efeito foi relacionado com a capacidade antioxidante dessas saponinas em diminuir o nível de MDA (malondialdeído) e aumentar as atividades de SOD (superóxido dismutase) e GSH-Px (Glutathione peroxidase) (GUO *et al.*, 2018). Song e Jang (2018) relataram algumas saponinas com atividade hipolipidêmica presentes em alimentos como chás, sucos, sementes comestíveis e frutas.

“Composto K” é uma saponina encontrada nas raízes de *Panax notoginseng* e é comercializado em sua forma pura, *Compound K*<sup>®</sup> (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Estudos recentes mostraram que o composto K atenua o desenvolvimento de aterosclerose em modelo experimental de camundongos geneticamente modificados C57BL/6 apoE<sup>-/-</sup>, com hipercolesterolemia induzida por ração. Seu mecanismo de ação parece estar envolvido com a ativação do receptor X $\alpha$  do fígado (LXR $\alpha$ ) um receptor que quando ativado atenua a formação de aterosclerose pelo aumento da expressão dos transportadores de efluxo de colesterol ABCA1 e ABCG1, em macrófagos e transportadores de sua excreção, ABCG5 e ABCG8 (ZHOU *et al.*, 2016). Outros mecanismos de ação das saponinas totais de *P. notoginseng* na aterosclerose são discutidas por Duan *et al.* (2017) e incluem sua capacidade de diminuir a concentração de lipídios, ox-LDL no soro e as expressões de CD40 e MMP-9 (Matrix metalopeptidase 9) em ratos apoE (- / -), diminuir o tamanho das placas ateroscleróticas, auxilia no processo de formação do endotélio e reduziu o conteúdo das lesões em células de músculo liso vascular.

Além dos efeitos relatados acima para o tratamento de doenças cardiometabólicas a literatura relata o potencial anti-agregante e anti-adesão plaquetária que algumas saponinas apresentam.

Saponinas isoladas de duas espécies do gênero *Ilex* (*I. kudingcha* e *I. rotunda*) mostraram efeito anti-agregante plaquetário. Foi utilizado sangue de coelhos para obtenção do plasma enriquecido de plaquetas e a agregação induzida por adenosina difosfato (ADP) usando como controle positivo Ozagrel. Algumas saponinas apresentaram efeito anti-agregante plaquetário, com IC<sub>50</sub> inclusive menor em relação ao controle positivo (FAN *et al.*, 2015); (YANG *et al.*, 2015). Do rizoma de *Panacis majoris* foram isoladas e caracterizadas cinco

novas saponinas por Li *et al.* (2016) que juntamente com quatro outras de estrutura química já descrita, isoladas da mesma amostra, foram avaliadas em soro enriquecido de plaquetas, induzidos à agregação pelo método com ADP e pelo método com ácido araquidônico. Algumas apresentaram atividade anti-agregante superior ao ácido acetilsalicílico, usado como controle positivo.

Alguns mecanismos relacionados a esta atividade foram elucidados. Qi *et al.* (2016) concluíram que o efeito anti-agregante plaquetário do Panaxtriol, uma mistura de saponinas do *P. notoginseng* que inclui o ginsenosideo Rg1, notoginsenosideo R1 e ginsenosideo Re, se deve pela supressão da mobilização intracelular de cálcio e pela ativação de duas MAPKs: a ERK2 e p38. Em outro estudo, as saponinas de *Panax quinquefolium* foram combinadas com as drogas anti-agregantes Aspirina<sup>®</sup> e clopidogrel. A associação foi capaz de inibir a adesão plaquetária em células endoteliais da veia umbilical humana lesadas, por regulação da via PI3K/AKT, que é regulatória da proliferação celular, e redução da expressão de COX (WANG *et al.*, 2016).

Outros efeitos das saponinas que regulam o sistema cardiovascular foram descritos por Singh *et al.* (2018) incluindo a capacidade antioxidante, regulação do íon Ca<sup>2+</sup>, atividade inotrópica, pro-angiogênica e etc.

## **2.4 Sistema cardiovascular e suas desordens**

Segundo a Organização mundial da Saúde as doenças cardiovasculares (DCV) são a principal causa de morte no mundo: mais pessoas morrem anualmente por essas enfermidades do que por qualquer outra causa. Estima-se que 17,7 milhões de pessoas morreram por doenças cardiovasculares em 2015, representando 31% de todas as mortes em nível global. (WHO, 2017). No Brasil estima-se que 29,8% dos óbitos são decorrentes de complicações causadas por DCV. (ROCHA; MARTINS, 2017)

Dentre as diversas doenças que acometem o sistema cardiovascular a hipertensão destaca-se por permanecer, por vezes, sem detecção, ser subtratada e mal controlada. Além disso, um número significativo de pessoas com antecedentes de doença cardíaca ou acidente vascular cerebral não têm acesso a medicamentos essenciais, como a aspirina, estatinas, beta-bloqueadores e inibidores da enzima conversora de angiotensina, dentre outros

capazes de reduzir eventos recorrentes e conseqüentemente reduzir a mortalidade (WHO. Technical package for cardiovascular disease management in primary health care, 2016).

### **2.3.1 Fisiologia vascular**

Um dos principais enfoques que se deve ter quando se pesquisa novas drogas com potencial anti-hipertensivo é o de conhecer as vias de sinalização da manutenção do tônus vascular. Células endoteliais e células da musculatura lisa vascular possuem mecanismos fisiológicos que são alvos farmacológicos para o controle dessa doença.

Pintérová (2011) descreve sobre os mecanismos neurais e vasculares da hipertensão. Dentre eles a regulação do processo de vasoconstrição e vasorrelaxamento decorrentes de algumas vias independentes de endotélio. Há destaque para os receptores pós-sinápticos do tipo  $\alpha_{1-D}$  responsáveis por 68% da regulação do tônus vascular. O restante está atribuído aos  $\alpha_2$ -adrenoreceptores. Além das vias moduladas pela norepinefrina, os canais iônicos e seus subtipos são importantes alvos da fisiopatologia causada pela hipertensão. Para a musculatura lisa vascular foram descritos os canais de cálcio voltagem dependente que podem ser de dois tipos: L-VDCC, canais de longa duração, e T-VDCC, canais de baixa condutância ativados por uma despolarização de baixo limiar. Apesar de descrito, o T-VDCC não tem demonstrado tanta influência no influxo de cálcio na musculatura lisa vascular. O principal tipo presente sobretudo na modulação da noradrenalina é o L-VDCC, que em animais SRH parece ser o principal canal responsável pela entrada de cálcio elevada em células musculares lisas. Outra família de canais iônicos que modula a contração vascular são os canais de potássio (K). As células musculares vasculares expressam quatro diferentes tipos de canais de potássio: canal de potássio dependente de cálcio ( $K_{Ca}$ ) que respondem a alterações da concentração do cálcio intracelular podendo estes serem ainda subdivididos em  $BK_{Ca}$  (Canais de potássio de larga condutância ativados por cálcio) e  $SK_{Ca}$  (canais de potássio de pequena condutância ativados por cálcio). Canais de potássio voltagem dependente ( $K_v$ ), que têm sua atividade aumentada em estados de despolarização da membrana. Canais de potássio dependentes de ATP ( $K_{ATP}$ ) respondem a alterações do metabolismo celular.

Canais de potássio *inward rectifier* ( $K_{ir}$ ) regulam o potencial de membrana operando quando há o aumento das concentrações de  $K^+$ ,  $H^+$  e adenosina.

Loh *et al.* (2018) descrevem uma visão geral do microambiente vascular que mantém a regulação do tônus. A princípio o endotélio desempenha uma importante função na manutenção do tônus principalmente por sua capacidade de produção de NO (óxido nítrico) um potencial vasorrelaxante a partir da L-arginina através da eNOS (NO sintase endotelial). Outro fator de relaxamento derivado do endotélio é a prostraciclina ( $PGI_2$ ) capaz de inibir também a agregação plaquetária. O endotélio produz também os chamados fatores de hiperpolarização derivados do endotélio um tipo de sinal elétrico originado do endotélio, o que poderia subsequentemente induzir a corrente hiperpolarizante nas células de musculo liso vascular adjacentes e causar um efeito vasodilatador. Nos vasos, o esse sinal pode ser gerado por vários tipos de reações que ocorrem entre diferentes componentes bioquímicos. O sulfato de hidrogênio é outro fator endotelial importante no vasorrelaxamento, similar ao NO. Este por sua vez é produzido a partir da L-cisteína.

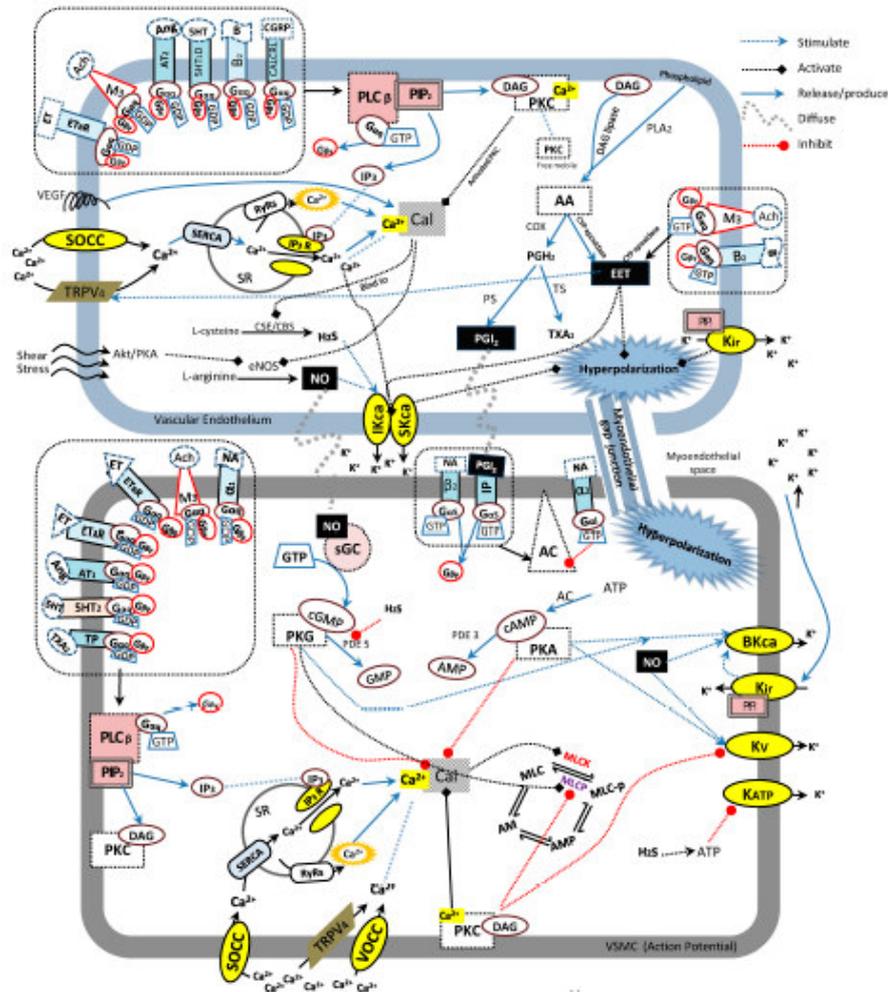


FIGURA 4. Mecanismos de regulação do tônus vascular. Fonte: Loh *et al* (2018).

### 2.3.2 Hipertensão e terapêutica atual

De acordo com a VII Diretriz Brasileira de Hipertensão Arterial da Sociedade Brasileira de Cardiologia (2016) a pressão arterial elevada ou hipertensão é uma condição crônica na qual a pressão sanguínea nas artérias é persistentemente elevada. A hipertensão é classificada em três categorias, com base em pressões sanguíneas em repouso, medida de forma padronizada: hipertensão leve (140 a 159 / 90-99 mmHg), hipertensão moderada (160 a 179/100 a 109 mmHg) e hipertensão grave (180/110 mmHg ou superior). Grande parte das pessoas, mesmo com os níveis pressóricos altos podem ser assintomáticas. A causa da chamada hipertensão primária ou essencial, para a maioria dos adultos é não identificada. Há ainda a chamada hipertensão secundária, na qual há o aumento da pressão arterial devido a condições subjacentes tais como tumores da glândula adrenal, problemas renais, problemas da tireoide, ingestão excessiva de álcool ou uso de certos

medicamentos, como pílulas anticoncepcionais. A pressão arterial (PA) tende a aumentar com a idade, principalmente em homens no início da meia-idade, mais comum mulheres após os 65 anos, e mais comum em negros do que em caucasianos. Em idosos é comum apresentarem a hipertensão sistólica isolada que é uma condição em que a pressão diastólica é normal (menos que 90mmHg), mas pressão sistólica é alta (160mmHg ou maior). O risco de hipertensão arterial é aumentado quando há histórico familiar de hipertensão arterial, obesidade ou morbidez. A hipertensão arterial está associada ao hábito de fumar, dieta rica em sal, ingestão excessiva de álcool, altos níveis de estresse e condições crônicas como diabetes, doença renal e apneia do sono. (WRIGHT; MUSINI, 2018)

Ainda segundo Wright e Musini (2018) fármacos de primeira escolha para o tratamento da hipertensão são os diuréticos tiazídicos em baixas doses, posteriormente em altas doses; betabloqueadores; inibidores da enzima conversora de angiotensina (iECA); bloqueadores de canais de cálcio. Estudos realizados com essas classes de drogas revelam a sua eficácia na terapêutica da hipertensão.

Sorriento *et al.* (2018) sugerem a terapia antioxidante no tratamento da hipertensão. O desequilíbrio entre moléculas conhecidas como espécies reativas com oxigênio (ROS) e espécies reativas com o nitrogênio (RNS), podem causar uma resposta do organismo, levando a lesão vascular e hipertensão. Drogas antioxidantes como *Lazaroid*®, N-acetilcisteína, *Moreover*®, peptídeo gp91ds tem se mostrado eficazes em estudos experimentais para tratamento da hipertensão. Além disso, drogas classicamente já utilizadas na terapêutica como Propranolol, Nebivolol, Carvedilol e Celiprolol têm sido estudadas com enfoque no seu potencial antioxidante.

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo geral**

Investigar o efeito da fração de saponinas (FRS) obtida do Extrato Hidroalcoólico das folhas de *Syzygium cumini* (L.) Skeels no sistema cardiovascular de ratos espontaneamente hipertensos (SHR)

#### **3.2 Objetivos específicos**

- Obter uma fração rica em saponinas (FRS) a partir do extrato hidroalcoólico das folhas de *Syzygium cumini*;
- Avaliar o efeito do uso crônico da FRS sobre a pressão arterial de SHR;
- Mensurar as variáveis do traçado eletrocardiográfico em SHR tratados com a FRS;
- Avaliar a reatividade de artérias mesentéricas isoladas de SHR tratados com a FRS;
- Avaliar o efeito da FRS na reatividade de artérias mesentéricas de SHR não tratados;
- Elucidar o mecanismo de ação da FRS em vasos de resistência de SHR.

### **4 METÉRIAL E MÉTODOS**

#### **4.1 Material Botânico**

As folhas da espécie vegetal *Syzygium cumini* (L.) Skeels, utilizadas nesta pesquisa, foram coletadas no mês de maio de 2016, na Cidade Universitária Dom Delgado, da Universidade Federal do Maranhão (UFMA), em São Luís – MA, Latitude 2°33'13"S e Longitude 44°18'21"W. Esta espécie vegetal encontra-se registrada sob o número 1069, no Herbário Ático Seabra, da UFMA.

#### **4.2 Animais**

Foram utilizados ratos da espécie *Rattus norvegicus* da linhagem SHR (espontaneamente hipertensos) e Wistar normotensos, machos, provenientes

do Biotério Central da UFMA. Os animais com idade média de 60 dias ( $\pm 300$  g) foram acondicionados e mantidos no Biotério Setorial do Laboratório de Pesquisa e Pós-Graduação em Farmacologia. Para a realização dos experimentos os animais foram devidamente acomodados em gaiolas de polipropileno (5 ratos/caixa), em sala climatizada a 22°C com iluminação programada em ciclo claro/escuro de 12 horas. Os animais tiveram acesso *ad libitum* à água e ração (Purina®). Todos os procedimentos foram realizados com aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) sob o número de protocolo nº 23115.005844/2016-21.

#### **4.3 Reagentes, solventes, sais e drogas**

Foram utilizados cloreto de sódio, cloreto de potássio, cloreto de magnésio, cloreto de cálcio, bicarbonato de sódio, fosfato monobásico de sódio, glicose, etanol, cloridrato de noradrenalina, cloridrato de acetilcolina, xilazina e diazepam.

#### **4.4 Extração, fracionamento e caracterização fitoquímica**

Após coleta, as folhas foram selecionadas limpas e deixadas à temperatura ambiente até secagem aparente (cerca de 15 dias) em sala arejada e sem contato direto com incidência solar. Posteriormente, foram secas em estufa a 40 °C com circulação de ar, por cerca de 72 horas. Após esse processo o material foi pulverizado em moinho de facas, tamises de número III obtendo-se um pó moderadamente grosso. 300 g do pó obtido foi submetido ao processo extrativo por maceração utilizando como solvente uma solução hidroalcoólica a 70%, no hidromódulo 1:3 e mantido sob agitação mecânica. Após 72 horas o material foi filtrado e o resíduo novamente posto sob maceração. Este procedimento foi repetido por três vezes e os filtrados (extrato hidroalcoólico) foram reunidos e concentrados em evaporador rotativo à baixa pressão e temperatura de 60° C, obtendo-se assim o extrato hidroalcoólico de *Syzygium cumini* (EHSc).

O EHSc foi submetido ao fracionamento utilizando uma metodologia que está sob depósito de patente (INPI BR 102014003275-4 A2). Resumidamente, este método dispõe de um sistema de agitação por meio de corrente de ar em sistema fechado e de pressão interna positiva que possibilita

a formação de espuma, que é arrastada e purificada em uma sequência de câmaras contendo solvente que retém as impurezas da espuma, resultando em uma fração rica em saponinas (FRS). Este é um processo físico de fracionamento que resultou na separação da FRS. Para confirmação da eficácia do fracionamento a FRS foi submetida à análise fitoquímica descrita em Matos (1997) para as seguintes classes de compostos metabólicos Alcaloides, Antocianidinas e Antocianinas, Auroras, Catequinas, Chalconas, Cumarinas, Fenóis, Flavonas e Favanóis, Flavanonas e Flavanonóis, Leucocianidinas, Saponinas, Taninos e Xantonas.

#### **4.5 Perfil cromatográfico por HPLC–UV / Vis e FIA-ESI-IT-MSn**

Para traçar o perfil cromatográfico, a FRS foi solubilizada em 2,0 mL de metanol / água (9: 1) e aplicada ao cartucho C18 (Strata C18-E, Phenomenex). As amostras foram filtradas através de filtros de membrana (PTFE puro simples 0,22µm, Allcrom) e diluídas em metanol / água (8: 2) para obter uma concentração aproximada da solução de 5,0 mg / mL. Utilizou-se um sistema de HPLC modelo Shimadzu (Shimadzu Corp., Kyoto, Jap), consistindo de um módulo de distribuição de solvente com uma bomba, detector UV-VIS (SPA-10A). A coluna utilizada foi Luna 5µm C18 100 A (250 µm x 4,6 µm). Os solventes de eluição foram A (0,022% para ácido em água) e B (0,02% para ácido acético em metanol). As amostras foram eluídas de acordo com o seguinte gradiente: 95% A, 5% B como inicial em 30 min. A taxa de fluxo foi de 1 mL / min e o tempo de execução foi de 50 min. A temperatura da coluna foi de 20 °C. O volume de injeção da amostra foi de 10 µL. Os dados foram coletados e processados usando o software LC Solution (Shimadzu).

Para o FIA-ESI-IT-MSn, (Flow Injection Analysis - Electrospray Ionization - Ion Trap - Mass Spectrometry) foi realizada uma etapa de limpeza para remover quaisquer contaminantes. A solução foi purificada por extração em fase sólida (SPE) utilizando cartuchos Phenomenex Strata C18 (500 mg de fase estacionária) que foram previamente ativados com 5 mL de MeOH e equilibrados com 5 mL de MeOH: H<sub>2</sub>O (1: 1, v / v). Os compostos foram eluídos dos cartuchos utilizando 1 mL de MeOH: H<sub>2</sub>O (1: 1, v / v) com um volume final de 5 mL. As amostras foram então filtradas através de um filtro

PTFE de 0,22  $\mu\text{m}$  e secas. A amostra foi diluída para 10  $\mu\text{g}$  / mL em solvente HPLC. Alíquotas de 20  $\mu\text{L}$  foram injetadas diretamente no FIA-ESI-IT-MS.

Para este ensaio FIA-ESI-IT-MSn, a infusão de fluxo direto das amostras foi realizada em um analisador de armadilha iônica linear Thermo Scientific LTQ XL equipado com uma fonte de ionização por electrospray (ESI), em modo negativo (Thermo, San Jose, CA, EUA). Utilizou-se tubo capilar de aço inoxidável a 280 °C, voltagem de 5,00 kV, voltagem capilar de -90 V, lente tubular de -100 V e fluxo de 5  $\mu\text{L min}^{-1}$ . Análise de varredura completa foi registrada na faixa m / z de 100-1000. Fragmentações de múltiplos estágios (ESI-MSn) foram realizadas usando o método de dissociação induzida por colisão (CID) contra hélio para ativação de íons. O primeiro evento foi um espectro de massa de varredura completa para adquirir dados sobre íons naquele intervalo de m / z. O segundo evento de varredura foi uma experiência de MS / MS realizada usando uma varredura dependente de dados nas moléculas [M-H] - dos compostos de interesse em uma energia de colisão de 30% e um tempo de ativação de 30 ms. Os íons do produto foram então submetidos à fragmentação adicional nas mesmas condições, até que não mais fragmentos foram observados. A identificação dos diferentes compostos no perfil cromatográfico da amostra foi feita comparando seus tempos de retenção e espectros de UV com dados da literatura.

## **4.6 Testes de atividade farmacológica**

### **4.6.1 Determinação da Pressão Arterial de SHR tratados com a FRS - Método Indireto**

Após adaptação dos animais foi iniciado o tratamento, durante 15 dias, por via oral (v.o., gavagem). Os ratos SHR foram distribuídos randomicamente em 4 grupos (n=5): grupos tratados com FRS nas doses de 10 mg/kg e 50 mg/kg, propranolol (40mg/kg) e grupo controle SHR, que recebeu água (1mL/Kg/dia). Um grupo de ratos Wistar normotenso (n=5) também recebeu água (1mL/Kg/dia, v.o.). A pressão arterial dos animais foi mensurada 3 vezes por semana, pelo método indireto, não invasivo, no qual, os animais previamente aquecidos durante 5 minutos a 45 °C, foram colocados em contensores para o encaixe do manguito de pressão na cauda e do cristal

piezoelétrico (tipo Korotkoff), para registro das pulsações arteriais. Este sistema fica acoplado a um eletroesfigmógrafo, para captação e registro das pressões arteriais (BORGES *et al.*, 1999).

#### **4.6.2 Determinação de parâmetros eletrocardiográficos de SHR tratados com a FRS**

Após o tratamento de 15 dias os animais (n=5) foram anestesiados com cetamina (25 mg/Kg) e diazepam (5 mg/Kg), para posicionamento dos eletrodos de captação (tipo “jacaré”) e posterior análise eletrocardiográfica (ECG), por meio do eletrocardiógrafo digital ECG-PC Delta Life®, linha veterinária, de uso canino, adaptado para roedores, com 7 derivações (D1, D2, D3, V, aVR, aVL e aVF), que analisou os intervalos eletrocardiográficos dos animais durante o experimento. Todos os animais foram submetidos à avaliação eletrocardiográfica por 1 a 5 minutos, para observação da variação dos intervalos eletrocardiográficos PR, RR, complexo QRS e QT. As mensurações e avaliações foram feitas na derivação DII do traçado eletrocardiográfico com ganho 2N e velocidade de 25m/s.

#### **4.6.3 Avaliação das alterações histológicas do coração**

Para este fim, o corte transversal do ventrículo foi feito no ponto médio entre o ápice cardíaco e o sulco atrioventricular, ao nível do músculo papilar. As amostras foram fixadas em paraformaldeído a 4% por 24 horas, após o que, foram submetidas ao processo de desidratação e embebidas em blocos de parafina. Em seguida, fatias de 5µm de espessura foram obtidas das amostras embutidas. Para visualização dos componentes musculares e do tecido fibrótico, utilizou-se a tanto a técnica de coloração com tricrômio de Masson (MTS) quanto a coloração Hematoxilina e Eosina (H&E)

As lesões cardíacas foram avaliadas seguindo nomenclatura adotada internacionalmente (Berridge *et al.*, 2016). Adicionalmente, para a descrição das lesões de hipertrofia da túnica média arterial, recorreu-se à terminologia oficialmente adotada para modelos animais de hipertensão pulmonar (Renne *et al.*, 2009), na qual este tipo de lesão é descrito em detalhe. Foram avaliados ramos das artérias coronárias na parede do ventrículo esquerdo e no septo interventricular com recurso a colorações pela H&E e pelo MTS. Estas lesões

foram avaliadas semi-quantitativamente em microscopia óptica de campo claro atribuindo a cada animal um valor de 0 (histologia normal), 1 (espessamento mínimo da túnica média), 2 (espessamento moderado da túnica média, com lâmina elástica proeminente) ou 3 (espessamento marcado da túnica média, com lâmina elástica proeminente e estreitamento do lúmen arterial).

#### **4.6.4 Avaliação da reatividade de artérias mesentéricas e estimativa de hipertrofia cardíaca de SHR tratados com FRS**

Após o registro eletrocardiográfico os animais foram laparatomizados para identificação e isolamento do coração e da artéria mesentérica superior. Os anéis das artérias (3 a 5 mm) com ou sem endotélio foram cuidadosamente colocados entre fios de aço inoxidável (50  $\mu$ m de diâmetro), suspensos em uma câmara de órgão isolado (5,0 ml), contendo solução de Krebs com a composição (mM): NaCl 118, KCl 5,0, MgCl<sub>2</sub> 1,2, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,2, NaHCO<sub>3</sub> 15,5, CaCl<sub>2</sub> 2,0 e glicose 11,0. As preparações isoladas foram inicialmente equilibradas sob tensão de 1 g, lavadas de 10 em 10 minutos com o líquido nutritivo, durante 60 minutos para a estabilização do órgão e posterior obtenção de curvas concentração-resposta cumulativas de noradrenalina de 10<sup>-9</sup> a 10<sup>-4</sup> M. Os registros das variações de tensão foram realizados em um fisiógrafo composto por um transdutor de força isométrico (F-60, Narco) em um polígrafo Narcotrace 40.

#### **4.6.5 Avaliação do efeito vasorrelaxante da FRS em artéria mesentérica**

Artérias mesentéricas superiores de SHR não tratados (n=3-5) foram isoladas e montadas em fisiógrafo, conforme descrito anteriormente no item. Quando necessário, o endotélio foi removido friccionando suavemente os fios de aço inoxidável colocados na luz do vaso. A presença ou ausência de endotélio funcional foi confirmada pela adição de Acetilcolina ( $\cong$  EC<sub>75</sub> 3 x 10<sup>-4</sup> M) na a contração induzida com noradrenalina ( $\cong$  EC<sub>75</sub> 3 x 10<sup>-5</sup> M). Foram considerados com endotélio intacto quando atingiam 75% de relaxamento. Posteriormente as artérias foram lavadas com solução de Krebs até retornarem aos níveis basais. Este procedimento foi adotado para os protocolos a seguir:

#### **4.6.5.1 Avaliação atividade vasorrelaxante da FRS na contração induzida pela Noradrenalina em artéria mesentérica de SHR**

Após o procedimento o tônus da preparação foi aumentado pela adição de uma concentração submáxima ( $\cong EC_{75} 3 \times 10^{-5} M$ ) de noradrenalina e em seguida foram obtidas curvas concentração-resposta cumulativas para a FRS nas concentrações de 1, 5, 10, 50, 100 e 500  $\mu g/mL$ . Este procedimento foi realizado para anéis de artéria com e sem endotélio funcional.

#### **4.6.5.2 Avaliação do efeito vasorrelaxante da FRS em artéria mesentérica de SHR em solução despolarizante de KCl (80mM)**

Para avaliar o envolvimento de canais de potássio no efeito vasorrelaxante da FRS, as preparações de artérias de SHR não tratados foram submedidas ao aumento do tônus vascular substituindo-se o líquido nutritivo de Krebs por uma solução despolarizante de Krebs com KCl a 80 mM, com a seguinte composição (nM): NaCl 82,3; KCl 80; MgCl<sub>2</sub> 1,2; NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,2; NaHCO<sub>3</sub> 15,5; CaCl<sub>2</sub> 2,0 e glicose 11,0. Após a contração das preparações foram obtidas curvas concentração-resposta cumulativas para a FRS nas concentrações 1, 5, 10, 50, 100 e 500  $\mu L/mL$ .

#### **4.6.5.3 Avaliação do efeito vasorrelaxante da FRS em artéria mesentérica de SHR em solução despolarizante de KCl (20mM)**

Para investigação do envolvimento de canais de cálcio sobre o efeito vasorrelaxante da FRS, preparações de artérias mesentéricas foram despolarizadas por substituição do líquido nutritivo de Krebs por uma solução despolarizante de Krebs com KCl a 20 mM, com a seguinte composição(nM): NaCl 142,3; KCl 20; MgCl<sub>2</sub> 1,2; NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,2; NaHCO<sub>3</sub> 15,5; CaCl<sub>2</sub> 2,0 e glicose 11,0. O aumento do tônus vascular foi obtido pela adição de uma concentração submáxima ( $\cong EC_{75} 3 \times 10^{-5} M$ ) de noradrenalina e em seguida foram obtidas curvas concentração-resposta cumulativas para a FRS (1, 5, 10, 50, 100 e 500  $\mu L/mL$ ).

#### **4.6.5.4 Avaliação do efeito da FRS na reatividade vascular ao cálcio**

Neste protocolo as artérias mesentéricas de SHR sem endotélio não tratados (n= 4) foram montadas em câmara de órgão isolado, contendo

solução de Krebs que foi substituída, após 60 minutos de estabilização da preparação, pelo líquido nutritivo de Krebs despolarizante (60mM de K<sup>+</sup>, sem Ca<sup>2+</sup>) com a seguinte composição (nM): NaCl 63,0 KCl 60,0, MgCl<sub>2</sub> 1,2, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,2, NaHCO<sub>3</sub> 15,5 e glicose 11,0, o que provocou imediata contração do órgão. Após 60 minutos de lavagens sucessivas, o tônus basal foi recuperado, permitindo-se obtenção de curvas concentração - resposta cumulativas de cálcio (10<sup>-5</sup> a 10<sup>-1</sup>M) na ausência e posteriormente na presença da FRS na concentração de 500 µg/mL.

#### **4.7 Atividade antioxidante**

A atividade antioxidante da FRS foi avaliada pelo método do DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazila). A solução de DPPH foi preparada a partir da dissolução de 2,4 mg de DPPH em 100 mL de etanol. A FRS liofilizada foi diluída em etanol em diferentes concentrações (30 a 960 µg/mL). Utilizando volumes fixos de 1900 µL de solução de DPPH (24 µg/mL) e de solução contendo a amostra (100 µL) nas diferentes concentrações, obtendo concentrações finais de 1,5, 3, 6, 12, 24, 48 µg/mL. As leituras foram realizadas em espectrofotômetro a 515 nm, utilizando etanol como branco, conforme o quadro abaixo. Os ensaios foram feitos em triplicata (SÁNCHEZMORENO *et al.*, 1998, com adaptações).

#### **4.8 Docagem molecular**

Os componentes químicos presentes na FRS foram otimizados no programa Gaussian 09 (GAUSSIAN *et al.*, 2009). As propriedades geométricas, eletrônicas e vibracionais foram obtidas com a Teoria do Funcional da Densidade (DFT) usando o funcional híbrido B3LYP combinado como o conjunto de base 6311++G(d,p). Cálculos de frequência foram realizados para verificar se cada estrutura estava em seu estado mínimo de energia.

A estrutura cristalográfica da proteína atribuída ao canal de cálcio é a mesma obtidas por TANG *et al.*, 2016 para os cálculos de docagem molecular. Os cálculos foram desenvolvidos no programa Autodock 4.2. As estruturas 3D da proteína e os ligantes, presente na composição química da FRS, foram preparadas para simulação com o AutoDock Tools (ADT), versão 1.5.6. No

complexo ligante-enzima todos os átomos de hidrogênios não-polares foram removidos e cargas de Gasteiner. Na região do sítio ativo onde os ligantes estarão docados foi criada uma caixa com dimensão apropriada (60x60x60) partindo das coordenadas x,y,z: 64.661; 28.719, 215.023 (TANG 2016). Apenas a conformação que apresentou melhor energia de cada molécula foi analisada.

#### **4.9 Análise Estatística**

Os resultados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão das médias e avaliados por meio do teste *t* de Student em conjunto com regressão linear (experimentos *in vitro*) ou da análise de variância (one-way ANOVA) seguida pelo teste de Turkey (experimentos *in vivo*). As diferenças foram consideradas significativas quando  $P < 0,05$ , usando o software Graphpad Prism version 5.0.

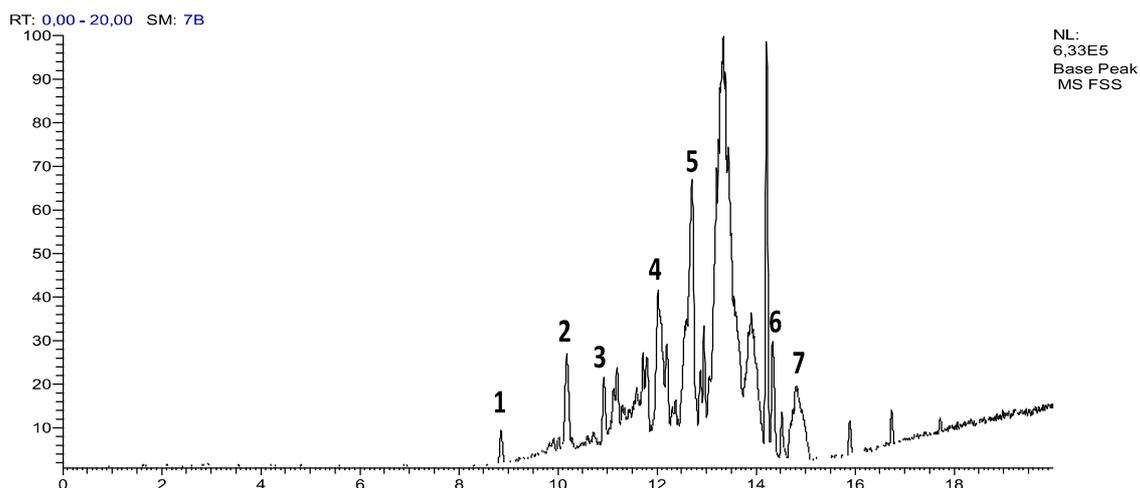
### **5. RESULTADOS**

#### **5.1 Obtenção da Fração rica em saponinas de *Syzygium cumini***

O fracionamento do extrato hidroalcoólico resultou em uma fração rica em saponinas (FRS) com rendimento de 0,4% p/p. Submetida à análise fitoquímica descrita em Matos (1997) mostrou-se fortemente positiva para saponinas, traços de compostos fenólicos e ausência das demais classes metabólicas de compostos que foram avaliadas (Alcaloides, Antocianidinas e Antocianinas, Auroras, Catequinas, Chalconas, Cumarinas, Fenóis, Flavonas e Favanóis, Flavanonas e Flavanonóis, Leucocianidinas, Taninos e Xantonas).

#### **5.2 Caracterização química**

O perfil cromatográfico da FRS resultou na presença das saponinas identificadas como: 3-p-coumaroyl maslinic acid, Ellagic acid, Maslinic acid derivate (Louceoside B), Maslinic acid 3-glucoside, além da presença de Dhelphindin diglucoside, Myricetin raminoside e Procyanidin (Figura 5, Tabela 1).



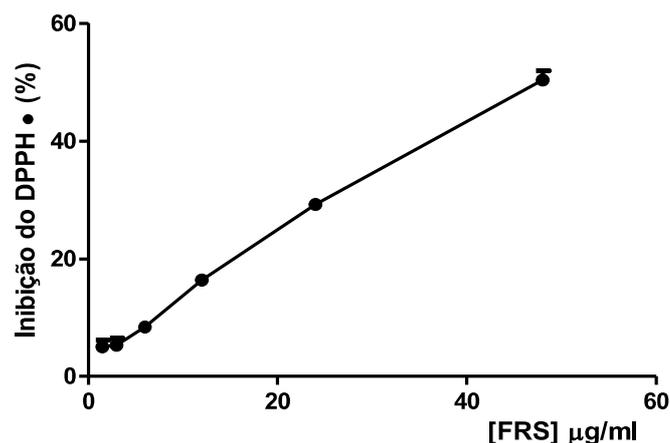
**FIGURA 5.** Perfil cromatográfico da fração rica em saponina de *S.cumini* (FRS), determinado por HPLC-UV/Vis e FIA-ESI-IT-MSn.

**Tabela 1.** Compostos identificados na fração rica em saponina de *S.cumini* (FRS), determinados por HPLC-UV/Vis e FIA-ESI-IT-MSn..

	[M-H] <sup>-</sup>	MS <sup>n</sup> fragmento	Composto
1	617	355	3-p-coumaroyl maslinic acid
2	301	285; 229; 185	Ellagic acid
3	625	463; 301	Dhelfhindin diglucoside
4	463	316; 271	Myricetin raminoside
5	577	407; 425	Procyanidin
6	811	489; 453	Maslinic acid derivative (Luceoside B)
7	633	453; 425	Maslinic acid 3-glucoside (LuceosideO)

### 5.3 Teste de atividade antioxidante da FRS frente ao DPPH

A FRS mostrou possuir capacidade antioxidante frente ao radical livre DPPH, inibindo sua atividade em até 49,5 % e apresentando IC<sub>50</sub> de 23,61 ± 0,01 µg/ml, conforme mostra a figura 6.

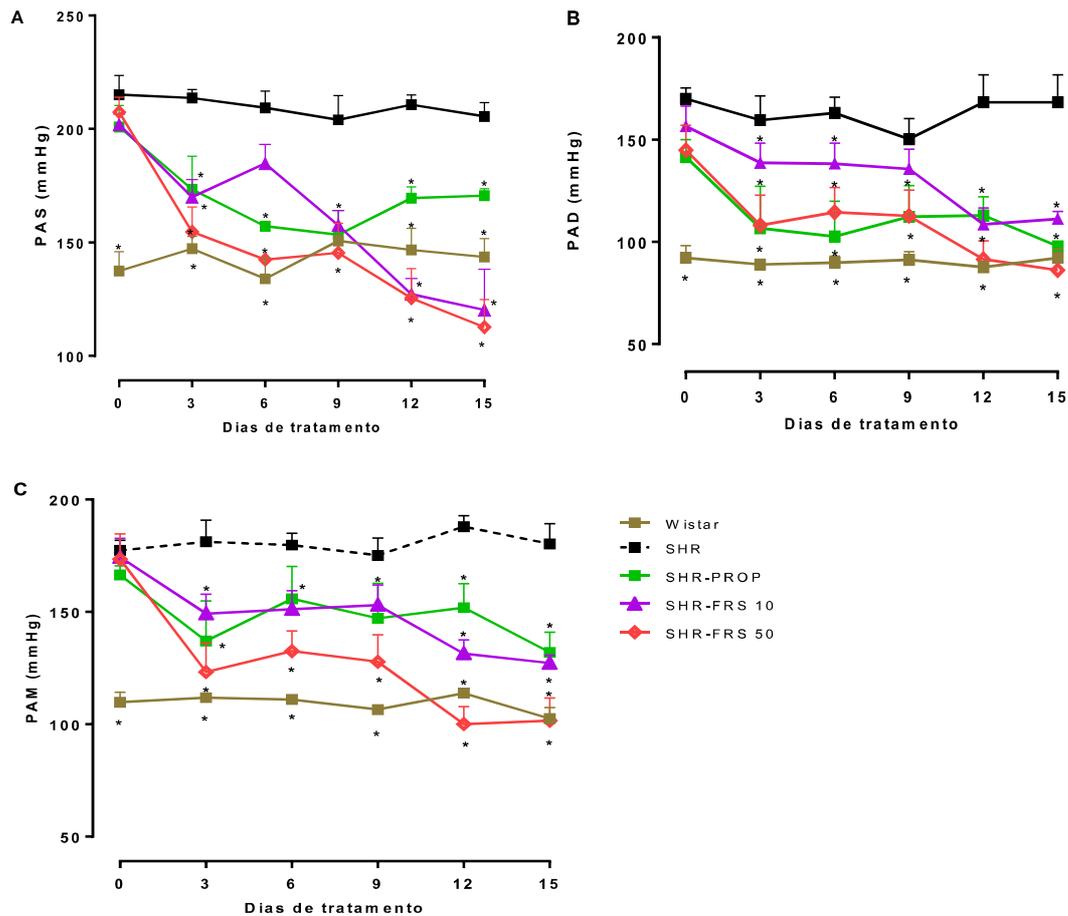


**FIGURA 6.** Inibição do DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazila) induzido pela fração rica em saponinas de *S. cumini* (FRS). Valores expressos como como média  $\pm$  E.P.M do % de inibição do DPPH.

## 5.4 Avaliação do efeito *in vivo* da FRS no sistema cardiovascular

### 5.4.1 Efeito da FRS sobre a pressão arterial de SHR

Os ratos espontaneamente hipertensos (SHR) tratados por via oral, diariamente, por 15 dias, com a FRS apresentaram diminuição significativa dos níveis pressóricos. Tanto a dose de 10 mg/kg quanto a de 50 mg/kg reduziram a pressão arterial sistólica (PAS), pressão arterial diastólica (PAD) e pressão arterial média (PAM), em relação ao grupo SHR. O efeito anti-hipertensivo da FRS iniciou a partir do 3º dia e foi mantido até o 15º dia de tratamento. Neste período a redução da PAM foi de 26,6% e 42,28%, para as doses de 10 e 50 mg/kg, respectivamente (Figura 7). O propranolol (40 mg/kg/dia), utilizado como fármaco padrão, conforme esperado, reduziu a pressão arterial que atingiu 20,64% para a PAM, no final do tratamento. Neste protocolo foram utilizados ratos Wistar normotensos como controle negativo (Figura 7).



**FIGURA 7.** Efeito do tratamento oral com fração rica em saponina de *S. cumini* (FRS) nas doses de 10 mg/kg (SHR-FRS 10) e 50 mg/kg. (SHR-FRS 50) e, propranolol (40 mg/kg, SHR-PROP) sobre (A) - pressão arterial sistólica (PAS), (B) - pressão arterial diastólica (PAD) e (C) - pressão arterial média (PAM) de SHR, durante 15 dias. Os grupos SHR e Wistar receberam água (1,0 mL/kg). Resultados expressos como média  $\pm$  E.P.M dos valores pressóricos dos animais (n=5). \*p<0,05 vs SHR (ANOVA, Tukey).

**TABELA 2.** Valores da Pressão Arterial Média (PAM) de SHR tratados por via oral, diariamente, durante 15 dias, com a fração rica em saponina de *S. cumini* (FRS), nas doses de 10 mg/kg (SHR-FRS 10) e 50 mg/kg (SHR-FRS 50).

TEMPO (Dia)	GRUPOS - PAM (mmHg)				
	Wistar	SHR	SHR-PROP	SHR-FRS 10	SHR-FRS 50
0	109,80 ± 4,41 <sup>#</sup>	177,4 ± 4,55 <sup>*</sup>	166,3 ± 4,15 <sup>*</sup>	174,3 ± 8,30 <sup>*</sup>	173,4 ± 11,40 <sup>*</sup>
3	111,8 ± 1,60 <sup>#</sup>	181,2 ± 9,54 <sup>*</sup>	137,0 ± 17,92 <sup>#*</sup>	149,3 ± 8,55 <sup>#*</sup>	123,2 ± 13,01 <sup>###*</sup>
6	111,0 ± 1,75 <sup>#</sup>	179,7 ± 5,24 <sup>*</sup>	155,8 ± 14,50 <sup>#*</sup>	151,2 ± 8,33 <sup>#*</sup>	132,6 ± 9,03 <sup>###*</sup>
9	106,5 ± 1,92 <sup>#</sup>	175,1 ± 7,19 <sup>*</sup>	147,1 ± 16,61 <sup>#*</sup>	153,0 ± 9,10 <sup>#*</sup>	127,8 ± 12,01 <sup>###*</sup>
12	113,8 ± 2,03 <sup>#</sup>	182,9 ± 5,43 <sup>*</sup>	151,9 ± 10,62 <sup>#*</sup>	131,5 ± 6,02 <sup>#*</sup>	100,1 ± 7,81 <sup>###*</sup>
15	102,50 ± 5,00 <sup>#</sup>	180,30 ± 9,00 <sup>*</sup>	132,0 ± 9,00 <sup>#*</sup>	127,3 ± 3,44 <sup>#*</sup>	101,6 ± 10,03 <sup>###*</sup>

SHR-PROP = Propranolol (40 mg/Kg, v.o.). \* $p < 0,05$  vs Wistar; ### $p < 0,01$  vs SHR; # $p < 0,05$  vs SHR (ANOVA, Tukey).

### 5.3.2 Efeito da FRS sobre os parâmetros eletrocardiográficos de ratos SRH

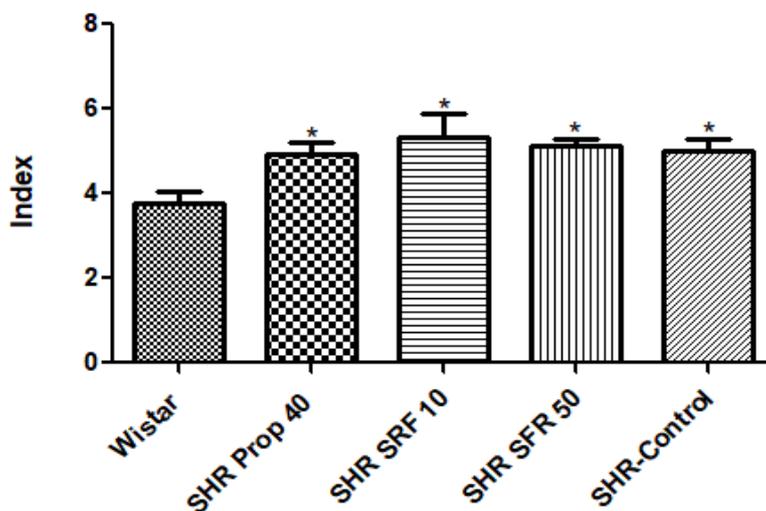
Após 15 dias de tratamento com a FRS nas doses de 10 e 50 mg/kg/dia(v.o.) os SRH apresentaram diminuição entre os intervalos PR e QT e QT corrigido para ambas as doses e, uma redução do intervalo RR para a dose de 10 mg/kg/dia. Alterações na frequência cardíaca também foram observadas, sendo que a dose 10 mg/kg/dia aumentou a FC e a dose de 50 mg/kg/dia induziu uma redução, quando comparados com os SHR (tabela 3).

### 5.3.4 Estimativa da hipertrofia cardíaca dos SHR tratados com a FRS

Foram mensurados os pesos relativos dos corações dos SRH tratados com a FRS nas doses de 10 e 50 mg/kg/dia (v.o.). Os órgãos avaliados dos animais tratados, em ambas as doses, assim como dos animais tratados com propranolol na dose de 40 mg/kg/dia (v.o.) não apresentaram diferença significativa quando comparados aos SHR (figura 8).

**TABELA 3.** Efeito da fração rica em saponinas (FRS) de *S. cumini*, nas doses de 10 mg/Kg (SHR-FRS 10) e 50 mg/Kg (SHR-FRS 50) sobre parâmetros eletrocardiográficos de SHR, após 15 dias de tratamento.

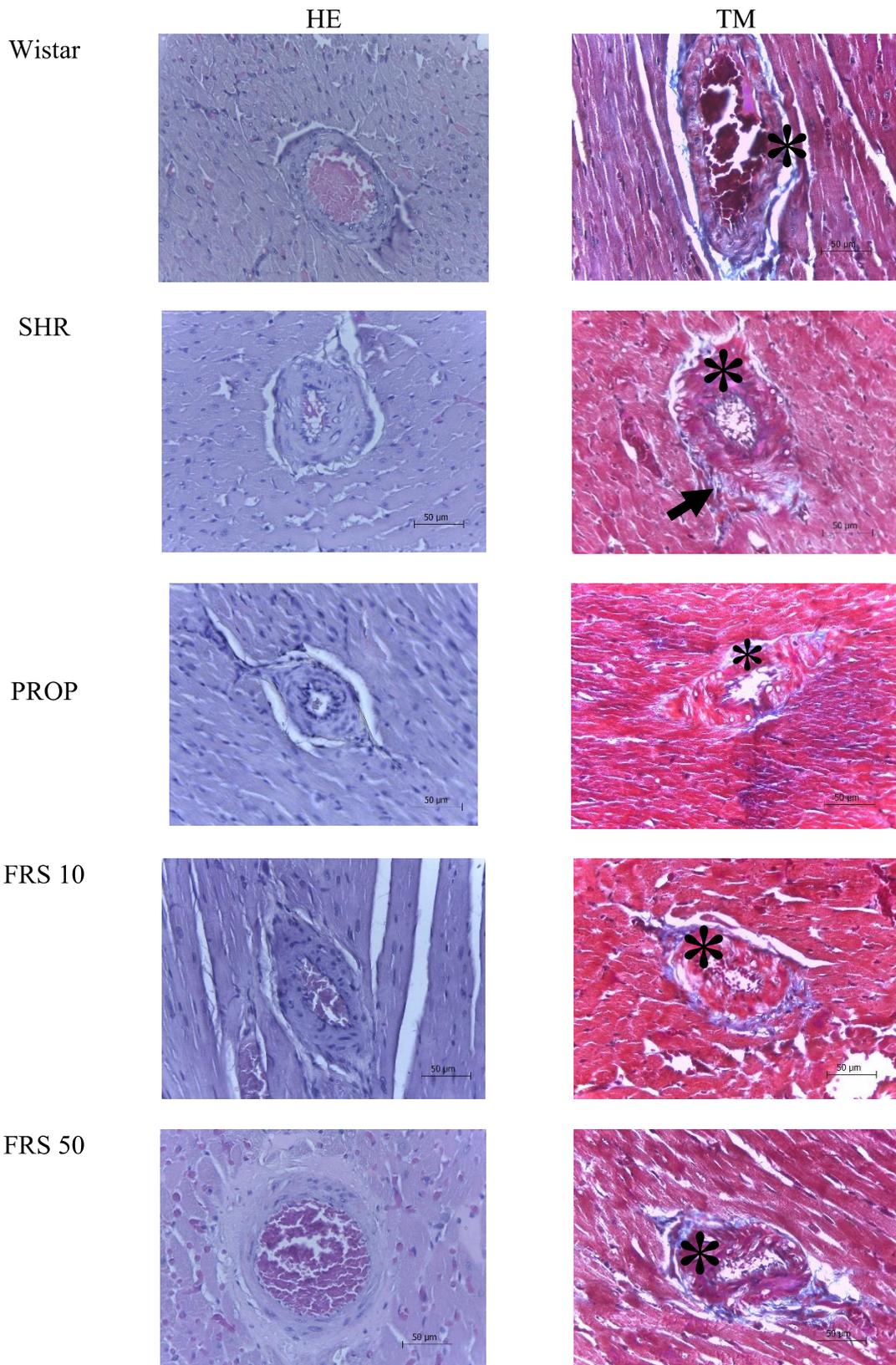
\*\*\* p < 0,001 vs Wistar; \*\* p < 0,01 vs Wistar \*p < 0,05 vs Wistar; ###p < 0,01 vs SHR; #p < 0,05 (ANOVA, Tukey)



**FIGURA 8.** Peso relativo dos corações de ratos espontaneamente hipertensos (SHR) tratados com fração rica em saponina de *S. cumini* (SHR-FRS 10 mg/Kg e SHR-FRS 50 mg/Kg) ou propranolol (SHR-PROP, 40 mg/Kg). Resultados expressos como média ± E.P.M do peso relativo dos corações (peso do órgão/peso corporal.10<sup>-3</sup>). \*p < 0.05 vs Wistar (ANOVA, Tukey).

#### 5.4 Análise histopatológica do tecido cardíaco de SHR tratados com a FRS

O grupo de controle negativo (Wistar) não apresentou alterações histopatológicas. Os grupos SHR, SHR-FRS 10, SHR-FRS 50 e SHR-PROP exibiram frequência variável de hipertrofia da túnica média das artérias cardíacas, caracterizada pela hipertrofia do músculo liso da túnica média, pela presença de uma lâmina elástica interna proeminente e pelo aumento da razão entre a espessura da túnica média e o diâmetro total das artérias. Não se observou espessamento significativo da túnica adventícia. A frequência e a severidade das lesões foram mais elevadas no grupo de SHR, diminuindo nos vários grupos tratados, em particular nos animais tratados com propranolol (40mg/Kg) e com a FRS (50 mg/kg). Não foram observadas alterações inflamatórias ou degenerativas em nenhum grupo experimental (Figura 9).

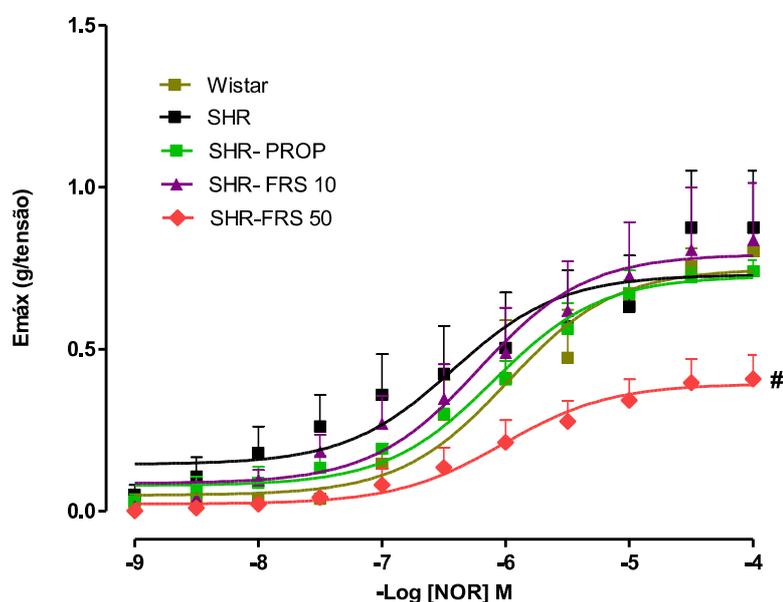


**Figura 9** - Imagens histológicas representativas de artérias cardíacas (400x) coradas pela hematoxilina e eosina (H&E, coluna da esquerda) e pelo Tricrômico de Masson (TM, coluna da direita). Grupo Wistar: animais wild-type sem alterações. Notar artérias cardíacas exibindo túnica média de espessura normal. SHR: spontaneously hypertensive rats sem tratamento. Notar artérias cardíacas exibindo marcado espessamento da túnica média com estreitamento

do lúmen arterial. Na coloração pelo Tricrômico de Masson verifica-se que apenas a túnica média ( em vermelho, indicada por asteriscos) é afetada, enquanto a espessura da túnica adventícia (a azul, indicada por seta) permanece inalterada. PROP: animais SHR tratados com propranolol. Notar espessamento ligeiro a moderado da túnica média. FRS 10: animais SHR tratados com fração rica em saponina de *S. cumini* 10 mg/kg notar espessamento ligeiro a moderado da túnica média. FRS 50: animais SHR tratados com fração rica em saponina de *S. cumini* 50 mg/kg notar espessamento ligeiro a moderado da túnica média.

### 5.3.3 Efeito da FRS no tônus vascular

Após o tratamento por 15 dias a FRS reduziu a reatividade vascular observada em anéis de artéria mesentérica superior isolados de SHR tratados na dose de 50 mg/kg/dia (v.o.), porém não foram observadas alterações significativas na dose de 10 mg/Kg. Animais tratados com a dose de 50 mg/kg/dia apresentaram uma diminuição da responsividade à noradrenalina a partir da concentração  $10^{-7}$ , quando comparados com SHR não tratados. A curva concentração-resposta obtida mostrou um deslocamento à direita, como mostrado na figura 10

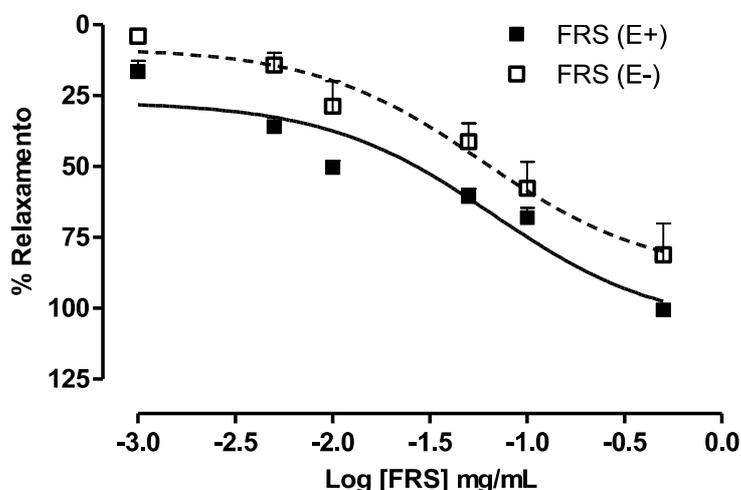


**FIGURA 10.** Curva concentração resposta de noradrenalina (NOR) em anéis de artéria mesentérica sem endotélio funcional, isoladas de SHR tratados com fração rica em saponina de *S. cumini* na dose de 10 mg/kg (SHR-FRS 10) e de 50 mg/kg (SHR-FRS) ou propranolol (SHR-PROP, 40 mg/Kg). Resultados expressos como média  $\pm$  E.P.M. ( $n = 5$ ). # $p < 0.05$  vs SHR. (ANOVA, Tukey).

## 5.4 Avaliação do efeito vasorrelaxante *ex vivo* da FRS em anéis de artéria mesentérica de SHR

### 5.4.1 Efeito vasorrelaxante da FRS em anéis de artéria mesentérica com e sem endotélio funcional

A figura 11 mostra que a FRS (0,001 a 0,5 mg/mL) induziu vasorrelaxamento tanto em anéis de artéria mesentérica com endotélio intacto, quanto em artérias sem endotélio funcional. Não houve diferença significativa no efeito da FRS observado tanto na ausência como na presença do endotélio ( figura 11). Os valores de  $EC_{50}$  foram de  $6,7 \cdot 10^{-2}$  mg/mL e  $5,94 \cdot 10^{-2}$  mg/mL e o  $pD_2$  foram de  $1,35 \pm 0,42$  e  $1,31 \pm 0,23$  para anéis com e sem endotélio funcional respectivamente. Devido a este resultado os demais protocolos foram realizados com artérias mesentéricas sem endotélio.



**FIGURA 11.** Efeito vasorrelaxante da fração rica em saponinas (FRS) em anéis de artéria mesentérica de SHR com (E+) ou sem (E-) endotélio funcional. Resultados expressos como média  $\pm$  E.P.M. ( $n = 3-5$ ), ANOVA.

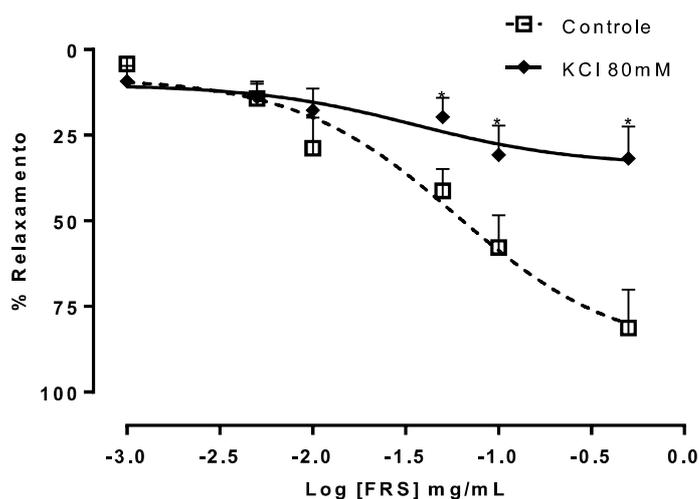
### 5.4.2 Efeito vasorrelaxante da FRS em artérias mesentéricas de SRH despolarizadas com KCl 80 mM

Houve redução na capacidade da FRS de promover vasorrelaxamento em anéis de artéria mesentérica quando a contração da musculatura lisa vascular foi promovida pela solução de Krebs despolarizante contendo KCl 80

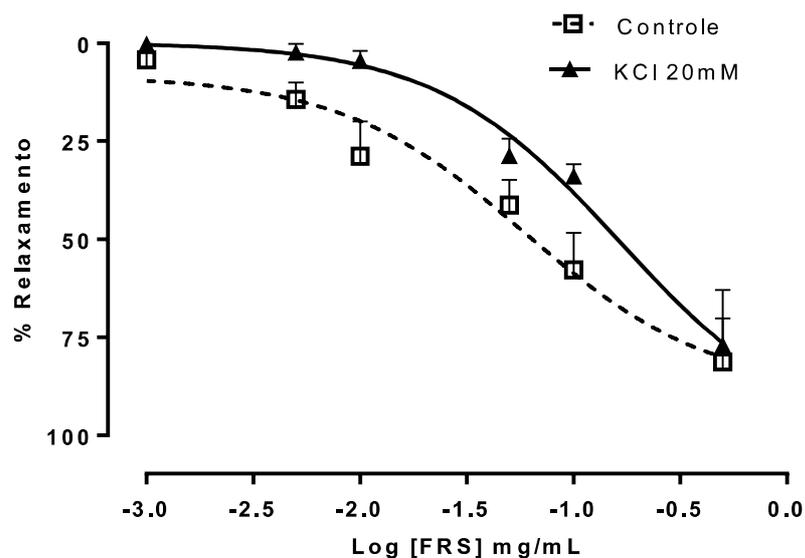
mM (Figura 12), quando comparado com o relaxamento provocado em anéis de artéria mesentérica pré-contraídos com noradrenalina. O valor da  $EC_{50}$  foi de  $3,58 \cdot 10^{-2}$  mg/mL,  $pD_2$  de  $2,061 \pm 0,48$  e  $E_{max}$  de  $31,77 \pm 9,19$ .

#### 5.4.3 Efeito vasorrelaxante da FRS em anéis de artéria mesentérica de SRH despolarizadas com KCl 20 mM

A figura 13 mostra que a FRS promoveu vasorrelaxamento em anéis de artéria mesentérica sem endotélio funcional (E-) contraídos com noradrenalina, na presença e ausência de solução de Krebs despolarizante contendo KCl 20mM (tabela 9). O valor da  $EC_{50}$  foi de  $0,1664 \cdot 10^{-2}$  mg/mL,  $pD_2$   $1,311 \pm 0,24$  e  $E_{max}$  de  $76,97 \pm 14,04$ .



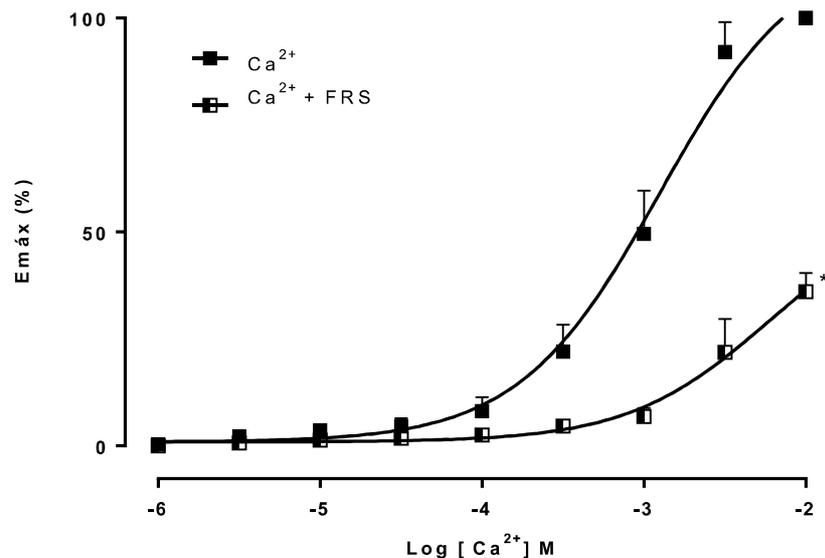
**FIGURA 12.** Efeito vasorrelaxante da fração rica em saponinas (FRS) em anéis de artéria mesentérica de SHR sem endotélio funcional pré-contraídos com solução de Krebs a 80 mM (KCl 80 mM) ou com noradrenalina (Controle). Resultados expressos como média  $\pm$  E.P.M. ( $n = 3-5$ ). \* $p < 0,05$  vs NOR. (ANOVA, Tukey).



**FIGURA 13.** Efeito vasorrelaxante da fração rica em saponinas (FRS) em anéis de artéria mesentérica de SHR sem endotélio funcional pré-contráídos com noradrenalina sem (Controle) e com incubação de solução despolarizante de Krebs (KCl 20 mM). Resultados expressos como média  $\pm$  E.P.M. ( $n = 3-5$ ) (ANOVA, Tukey).

### 5.5 Efeito da FRS na reatividade de artérias mesentéricas de SHR ao cálcio

Em anéis de artéria mesentérica sem endotélio funcional, isolados de SHR, a FRS inibiu a contração causada pelo influxo de cálcio na musculatura lisa vascular, quando em presença de uma solução despolarizante de Krebs contendo KCl 60 mM, 0  $\text{Ca}^{++}$  (Figura 13). A incubação da FRS 0,5 mg/mL reduziu o efeito máximo da contração em até  $63,9 \pm 4,4\%$ . Os valores de  $\text{pD}_2$  foram de  $2,88 \pm 0,16$  e  $1,82 \pm 0,45$  na ausência ou presença da FRS, respectivamente.



**FIGURA 14.** Curvas concentração-resposta para o cálcio na ausência ( $\text{Ca}^{2+}$ ) ou presença da fração rica em saponinas 0,5 mg/mL ( $\text{Ca}^{2+}$  + FRS) em anéis de artéria mesentérica de SHR sem endotélio funcional. Resultados expressos como média  $\pm$  E.P.M. ( $n = 4$ ). \* $p < 0,01$  vs  $\text{Ca}^{2+}$  + FRS (ANOVA, Tukey).

## 6. Docagem molecular de compostos presentes na FRS de *S. cumini*

Os resultados dos cálculos de otimização das moléculas geraram 5 complexos Canal de cálcio ( $\text{Ca}_v$ )-ligante. Através da ancoragem molecular é possível identificar que o composto *LucyosideO* mostrou melhor eficácia por ter apresentado menor energia de ligação (tabela 4).

A afinidade entre os ligantes *3-p-coumaroyl maslinic acid* e *LucyosideO* com o sítio ativo indicaram que as interações ajudam no encaixe destes no canal. Estes ligantes apresentaram energias de ligação de -5,79 kJ/mol e -7,27 kJ/mol enquanto o de referência (Verapamil) apresentou -5,99 kJ/mol, mostrando assim uma menor afinidade se comparado ao *LucyosideO*.

Além das energias envolvidas na formação do complexo também foi analisada a constante de inibição ( $k_i$ ), no qual os valores apresentados (tabela 4) dão indício de uma boa ação inibitória dos ligantes que foram ancorados.

**TABELA 4.** Valores de energia de ligação (kcal/mol), eficácia do ligante (kcal/mol) e constante de inibição ( $k_i$ ) das melhores conformações pelos ligantes.

Compostos	Energia de ligação (kcal/mol)	Eficácia do ligante (kcal/mol)	$k_i$ ( $\mu\text{M}$ )
<b>3-p-coumaroyl maslinic acid</b>	-5,79	-0,13	57,3
<b>Dhelphindin diglucoside</b>	-4,33	-0,1	666,17
<b>LucyosideB</b>	-5,16	-0,09	164,89
<b>LucyosideO</b>	-7,27	-0,16	4,7
<b>Verapamil</b>	-5,99	-0,18	40,74

Fontes: Dados da pesquisa.

Os valores apresentados indicam que os ligantes *3-p-coumaroyl maslinic acid* e *LucyosideO* são os ligantes com maior potencial de inibição na formação do complexo.

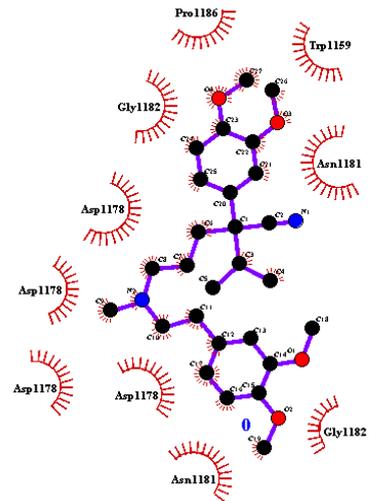
Ao realizar a ancoragem molecular (figura 15 e tabela 5) os ligantes tiveram como padrão 100 corridas possíveis em uma caixa de dimensão 60x60x60. Logo estes apresentaram números de conformações diferentes devido suas formas de torção, dentro deste grau de liberdade, da seguinte forma: *3-p-coumaroyl maslinic acid*= 25; *Dhelphindin diglucoside*= 61; *LucyosideB*= 20; *Lucyoside O*= 26 e verapamil= 52.

Foi realizado o cálculo de volume para todos os ligantes sendo que o valor de referência foi de 458,052 Å<sup>3</sup>, onde os ligantes *3-p-coumaroyl maslinic acid*, *Dhelphindin diglucoside*, *Lucyoside B* e *Lucyoside O* apresentaram respectivamente 617,085 Å<sup>3</sup>, 512,906 Å<sup>3</sup>, 771,751 Å<sup>3</sup> e 626,488 Å<sup>3</sup>.

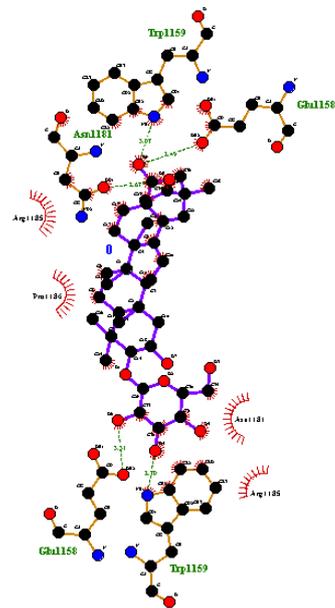
**Figura 15.** Conformação espacial obtida por docagem molecular com o Ca<sub>v</sub> e representação das interações com os resíduos de aminoácidos

Composto	Estrutura tridimensional ligante-receptor	Interações co os resíduos de aminoácidos do receptor
----------	---	--

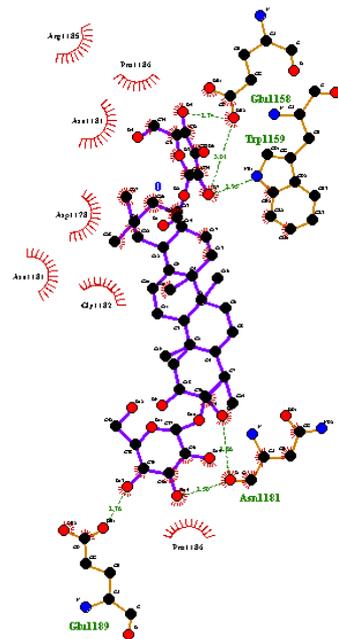
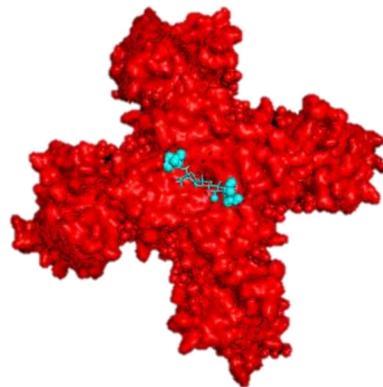
Verapamil



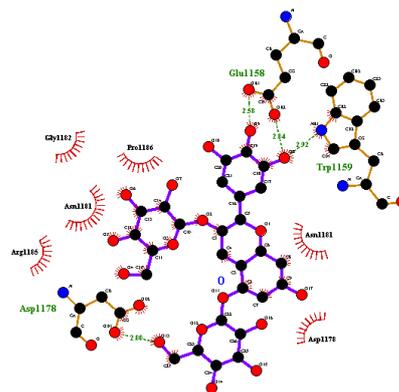
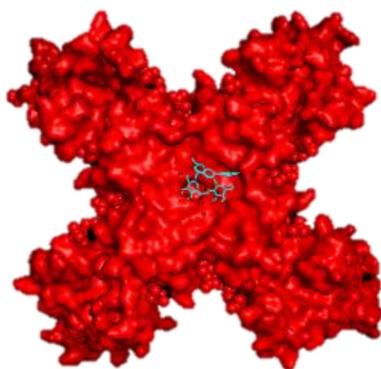
Lucyoside O



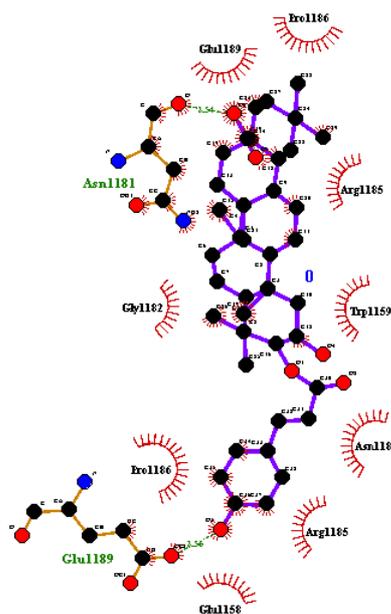
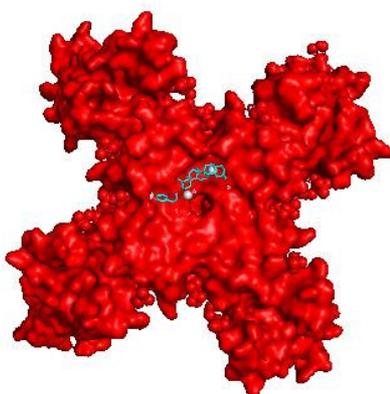
Lucyoside B



*Dhelfhindin diglucoside*



*3-p-coumaroyl maslinic acid*



Fonte: Dados da pesquisa

**TABELA 5.** Resíduos de Aminoácidos e interações com os ligantes

Ligante	Pontes de Hidrogênio	Interações Hidrofóbicas
Verapamil		Pro1186, Trp1159, Asn1181(x2), Gly1182(x2), Asp1178(x4),
<i>Lucyoside O</i>	Trp1159(x2), Glu1158(x2), Asn1181	Arg1185(x2), Pro1186, Asn1181
<i>Lucyoside B</i>	Glu1189(x2), Asn1181, Trp1159	Arg1185, Pro1186(x2), Asn1181(x2), Asp1178, Gly1182
<i>Dhelfhindin diglucoside</i>	Glu1158, Trp1159,	Gly1182, Pro1186,

	Asp1178	Asn1181(x2), Arg1185, Asp1178
3- <i>p-coumaroyl maslinic acid</i>	Glu1189 e Asn1181	Glu1158, Arg1185, Asn1181, Trp1159, Arg1185, Pro1186, Glu1189, Gly1182, Pro1186

## 6. DISCUSSÃO

Neste trabalho foi demonstrado o potencial farmacológico pré-clínico da fração saponina extraída das folhas de *Syzygium cumini* no sistema cardiovascular.

As saponinas são compostos fitoquímicos, que ocorrem em três de cada quatro espécies de plantas. A ampla ocorrência de saponinas na planta é provavelmente atribuído ao seu sabor amargo, que protege a planta contra o ataque de animais. Por várias décadas, as saponinas de materiais vegetais foram consideradas ingredientes indesejáveis em nutrição animal devido ao seu sabor amargo e efeitos prejudiciais no sistema gastrointestinal, quando consumido em altas concentrações (BÖTTCHER e DRUSCH, 2017). Entretanto nas últimas duas décadas, as saponinas foram amplamente pesquisadas e revisadas por diferentes grupos de pesquisa para seu isolamento, elucidação estrutural, distribuição, biossíntese, classificação, importância comercial e farmacológica na forma de composto puro, bem como extrato bruto enriquecido com saponina denominado “saponina total” (SINGH e CHAUDHURI, 2018).

Considerando que a espécie vegetal *Syzygium cumini* é reportada na literatura como rica em saponinas, sobretudo os extratos das folhas quando extraídos com solução hidroetanólica ou etanol (SHARMA e VISHNOI, 2017) e, que estudos anteriores de nosso grupo de pesquisa mostraram que o extrato hidroalcoólico de *S. cumini* possui atividade anti-hipertensiva em ratos espontaneamente hipertensos (SHR) (RIBEIRO *et al.*, 2014), este trabalho

investigou o efeito da fração rica em saponinas de *S. cumini* no sistema cardiovascular de SHR.

A fração rica em saponinas (FRS) de *S. cumini* obtida pelo protótipo de ar comprimido (depósito de patente INP- BR- 1020120182963) apresentou rendimento de 0,4% p/p. Este valor está em concordância com a literatura que relata que o teor de saponina nas plantas é geralmente de cerca de 1% ou inferior, à exceção de espécies conhecidas pela presença marcante desses metabólitos, como na casca da árvore “sabão chileno” (*Quillaja saponaria* Molina), que pode ter teores de saponina de até 5% (BÖTTCHER e DRUSCH, 2017).

A análise fitoquímica da fração comprovou a eficácia do método de extração, pois mostrou a presença de saponinas, traços de compostos fenólicos e ausência das demais classes metabólicas de compostos que foram avaliadas (Alcaloides, Antocianidinas e Antocianinas, Auroras, Catequinas, Chalconas, Cumarinas, Fenóis, Flavonas e Favanóis, Flavanonas e Flavanonóis, Leucocianidinas, Taninos e Xantonas).

O Perfil cromatográfico por HPLC–UV / Vis e FIA-ESI-IT-MSn revelou a presença das saponinas *3-p-coumaroyl Maslinic acid*, *Maslinic acid derivative (Luceoside B)* e *Maslinic acid 3-glucoside (Luceoside O)*, além de *Ellagic acid*, *Dhελphindin diglucoside*, *Myricetin raminoside* e *Procyanidin*. Até o presente momento não foram encontrados na literatura trabalhos que descrevam a presença destas saponinas para a espécie vegetal *Syzygium cumini*.

Os três compostos saponinas caracterizados são de natureza triterpenica com o “esqueleto” ou parte aglicona o *maslinic acid*. Este é um composto triterpenico que foi relatado com efeito protetor sobre células do musculo liso vascular frente ao stress oxidativo. (QIN, QIN & ZHAO, 2014).

A FRS apresentou efeito antioxidante *in vitro* quando ensaiada no método do DPPH, com IC<sub>50</sub> de 23,61 ± 0,01 µg/ml (figura 6). Algumas saponinas apresentam atividade antioxidante, tanto em ensaios com radicais livres como é o caso do teste do DPPH, quanto em ensaios de dosagens enzimáticas ou em ensaios em cultura celular. Saponinas da espécie vegetal *Dianthus basuticus*, por exemplo, apresentaram IC<sub>50</sub> de 6,95 mg/ml (NAFIU e ASHAFI, 2017).

A avaliação da FRS no sistema cardiovascular iniciou pela determinação de seu efeito na pressão arterial de ratos espontaneamente hipertensos (SHR) tratados diariamente com a fração, durante duas semanas. A FRS mostrou ação anti-hipertensiva nas doses de 10 e 50 mg/kg, reduzindo a pressão arterial média (PAM) em SHR (figura 7). A redução da PAM foi observada para as duas doses utilizadas desde os primeiros dias após o tratamento, mantendo-se baixa durante os 15 dias, e atingindo 27% e 42%, de redução no final do tratamento, nas respectivas doses. O efeito anti-hipertensivo da FRS foi dependente de dose, sendo que o da de 10 mg/kg foi semelhante ao observado para o propranolol, que foi utilizado como fármaco anti-hipertensivo padrão (figura 7, tabela 2). A figuras 7 mostra ainda a redução dos níveis pressóricos também sobre a pressão sistólica e diastólica, que acompanharam o mesmo comportamento observado na PAM.

O modelo animal utilizado, ratos espontaneamente hipertensos (SHR) é um modelo de grande importância no estudo experimental da hipertensão devido a semelhança de sua fisiopatologia com a hipertensão essencial em humanos. Desenvolvem o quadro hipertensivo por volta da 4<sup>a</sup> a 6<sup>a</sup> semanas. Estudos *in vivo* mostraram que nos estágios iniciais de hipertensão, os SHRs têm um débito cardíaco aumentado e resistência periférica total normal. À medida que o SHR progride no estado de hipertensão estabelecido, o débito cardíaco retorna aos valores normais e a hipertrofia causada pela força do sangue nos vasos produz um aumento de resistência periférica (DORNAS e SILVA, 2011). A FRS estudada neste modelo animal mostrou-se, portanto, o efeito anti-hipertensivo que pode estar relacionado à redução da resistência vascular periférica dos SHR.

Após o tratamento de 15 dias com a FRS os SHR foram submetidos à avaliação eletrocardiográfica. A FRS, em ambas as doses, alterou parâmetros do eletrocardiograma (ECG), mostrando um efeito cardioprotetor da fração (Tabela 3). O eletrocardiograma (ECG) em ratos apesar de algumas diferenças em relação ao humano, como a falta de onda Q, apresenta semelhanças essenciais e por esse motivo tem sido explorado em pesquisa cardiovascular básica para avaliar o coração sob condições fisiológicas, condições clínicas e em modelos animais de doenças (KONOPELSKI e UFNAL, 2016). SHR servem como um excelente modelo de cardiopatia hipertensiva e caracterizam-se por

apresentarem uma progressiva hipertrofia cardíaca, adaptações moleculares predisponentes a arritmia e em seus estágios mais tardios insuficiência cardíaca (HAZARI *et al.*, 2009)

Ainda segundo Konopelski e Ufnal (2016) um potencial de ação é gerado no coração, iniciado no nó sinoatrial e subsequentemente conduzido através do nó atrioventricular, seu feixe, o feixe de ramos e fibras de Purkinje, atingindo finalmente os cardiomiócitos. Um traçado típico de ECG espelha, repetindo o ciclo de três grandes eventos elétricos, incluindo despolarização atrial (onda P), despolarização ventricular (Complexo QRS) e repolarização ventricular (onda T). Nesse manuscrito, os autores compararam o eletrocardiograma humano com o de ratos e foi utilizado como base para descrever os parâmetros a seguir.

Na dose de 10 mg/kg a FRS apresentou um aumento de 48% na frequência cardíaca (FC) em relação aos SHR não tratados, enquanto que nos grupos tratados com propranolol (40 mg/kg) e FRS 50 mg/kg a FC esteve mantida em valores estáveis.

A FC é medida pelo intervalo R-R no eletrocardiograma e representa o número de contrações do coração durante um período específico, geralmente 1 min (bpm, batidas por minuto). Em ratos a FC é cerca de 5 a 6 vezes maior que em humanos.

O intervalo RR é o tempo entre os picos consecutivos da onda R. Em humanos, a FC também pode ser calculada medindo o tempo entre as ondas Q consecutivas, enquanto em ratos, a FC é calculada usando apenas intervalos RR. Isso ocorre porque o ECG de ratos não possui a onda Q na maioria das derivações e/ou a onda Q pode ser difícil de localizar, especialmente em ECG barulhento e de baixa amplitude (KONOPELSKI e UFNAL, 2016).

Sabe-se que algumas drogas apesar de anti-hipertensivas são capazes de causar o aumento da FC, assim como ocorreu com a FRS. Esse efeito dar-se sobretudo em drogas, como no caso da hidralazina, que atua diminuindo a resistência vascular periférica, devido a uma interferência do movimento do cálcio no músculo liso vascular que é responsável pela vasoconstrição. Em resposta a esse efeito pode ser desencadeada uma resposta reflexa mediada por barorreceptores, o que leva então a estimulação do sistema nervoso simpático e liberação de noradrenalina, que agirá no nodo sinoatrial abrindo

canais de cálcio, aumentando a frequência cardíaca e a contratilidade e, estimulando também o nodo atrioventricular (HERMAN E BHIMJI, 2018). A FRS, na menor dose, poderia estar induzindo aumento na FC por mecanismo reflexo semelhante.

Assim como o propranolol, a FRS em ambas as doses, diminuiu o intervalo PR no eletrocardiograma. O intervalo PR reflete a propagação da despolarização dos átrios para os ventrículos e é determinado pela medição do tempo entre o começo da onda P até o começo do QRS ou complexo RS. A análise da duração do intervalo PR é crucial no diagnóstico de bloqueios atrioventriculares. A diminuição deste intervalo, pode sugerir o efeito cardioprotetor da FRS em relação a redução de eventos como bloqueios atrioventriculares, característico de arritmias, o que é presente no modelo animal espontaneamente hipertenso.

Outro parâmetro eletrocardiográfico que a FRS alterou foi o intervalo QT, que descreve o tempo da onda Q até o final da onda T. Em ratos, esse parâmetro geralmente é medido desde o início do complexo Rs até o final da onda T, devido a dificuldades na detecção de ondas Q. Intervalo QT representa o tempo de despolarização e repolarização de cardiomiócitos ventriculares. A duração patológica deste parâmetro indica distúrbios na atividade elétrica do coração devido a doença cardíaca intrínseca ou efeitos tóxicos de compostos exógenos. Portanto, o intervalo QT prolongado é considerado um indicador útil de cardiotoxicidade. Ambas as doses foram capazes de reduzir o intervalo QT, sugerindo, portanto, que a FRS não provoca nesse aspecto cardiotoxicidade, e indicando seu efeito cardioprotetor.

O Intervalo QT também se correlaciona com a FC, em geral, aumento da frequência cardíaca encurta o intervalo QT, por esse motivo um parâmetro mais objetivo de despolarização e repolarização dos ventrículos utilizado é o QT corrigido (QTc), que leva em conta alterações na frequência cardíaca durante a mensuração. Em SRH o QTc apresenta-se aumentado explicado pelo alongamento do intervalo indicando diferenças nas características de repolarização que é inerente ao modelo animal (HAZARI *et al.*, 2009). A FRS, em ambas as doses, reduziu este parâmetro, comprovando seu efeito cardioprotetor.

Quanto a análise histológica (figura 9) a presença de hipertrofia cardíaca no modelo animal utilizado, SHR, foi amenizada quando tratados com a FRS na dose de 50 mg/Kg caracterizada pela redução da espessura da túnica média dos vasos cardíacos. Estudos mostram que o maslinic acid, substância da qual derivam-se as saponinas presentes na FRS, possui atividade cardioprotetora em modelo experimental de camundongos com hipertrofia induzida por sobrecarga de pressão (LIU et al, 2018).

Na avaliação da FRS sobre a resistência vascular periférica (RPV), a dose maior da fração (50 mg/kg) diminuiu a reatividade da noradrenalina em artéria mesentéricas de animais tratados durante duas semanas (figura 10). Nesta dose a FRS induziu ao deslocamento para a direita, além de redução no efeito máximo da contração de noradrenalina.

Diversas são as vias de sinalização que envolvem a regulação do tônus vascular promovida pela noradrenalina. Receptores  $\alpha$  e  $\beta$  adrenérgicos são ativados na presença deste neurotransmissor. Na musculatura lisa vascular, a maior parte da vasoconstricção é devida a ativação dos receptores  $\alpha_1$  que sinalizam a via intracelular da fosfolipase C, mediada pela proteína  $G_q$ , resultado assim no aumento do  $Ca^{++}$  no citoplasma, seja pelo influxo do meio extracelular, seja pelas reservas de cálcio do retículo sarcoplasmático (PINTÉROVÁ, 2011). Qualquer que sejam os mediadores deste processo, são alvos farmacológicos, sobretudo para o tratamento da hipertensão. Desta forma, o efeito da FRS pode ser devido a interação em um destes mecanismos de sinalização intracelular.

O potencial vasorrelaxante da FRS também foi analisado em artérias mesentéricas de SHR não tratados com a fração. A figura 11 mostr que a FRS induziu relaxamento independente das artérias estarem com ou sem endotélio funcional. Algumas saponinas são capazes de promover efeito vasorrelaxante. Saponinas de *Panax notoginseng* causaram relaxamento em artéria aorta e artéria mesentérica, em modelo experimental de ratos hipertensos SHRSP.ZF, utilizando fenilefrina para causar contração (WU et al., 2016). Jujubosideo B, uma saponina já isolada é reportada como agente vasorrelaxante tanto por ativar a enzima oxido nítrico sintase endotelial, quanto por aumentar o

extracelular através do potencial receptor transiente endotelial (TRPC) (ZHAO *et al.*, 2016).

Assim sendo, devido os efeitos da FRS serem semelhantes em artéria com ou sem endotélio, os estudos prosseguiram, em artérias desprovidas de endotélio funcional, afim de se avaliar o possível mecanismo de ação da FRS diretamente na musculatura lisa vascular.

A contração promovida pela noradrenalina é um efeito via ativação de receptor acoplado a proteína G. Para verificar se o relaxamento provocado pela FRS estaria envolvido com a ativação de proteína G, foi utilizado outro agente contracturante o KCl 80mM, um agente despolarizante. A figura 12 mostram que quando pré contraídos com KCl 80 mM o vasorrelaxamento promovido pela FRS foi bastante atenuado em relação ao provocado, quando pré contraído com noradrenalina em anéis de artéria mesentérica sem endotélio. O KCl 80 mM promove a despolarização da membrana celular, conseqüentemente a abertura de canais de cálcio, além de promover a ativação da via de sinalização RhoA-Rho cinase, uma via independente de cálcio (RATZ *et al.*, 2005). Portanto o vasorrelaxamento de 31,77 % provocado pela FRS poderia estar relacionado com o bloqueio do influxo de cálcio. Outra hipótese ainda seria de que a FRS poderia estar ativando canais para  $K^+$ , efeito não observado devido a alta concentração extracelular de ions  $K^+$  no líquido despolarizante.

Para investigação da participação dos canais de  $K^+$  no mecanismo de vasorrelaxamento da FRS foi realizado o protocolo com KCl 20 mM. Na presença deste agente não houve modificações significativas no efeito vasorrelaxante da FRS (figura 13), descartando a hipótese da participação desses canais no efeito da FRS. Já para a investigação se o efeito da FRS ocorria por bloqueio dos canais de  $Ca^{2+}$  foi realizado o protocolo de influxo de  $Ca^{2+}$ , no qual foram obtidas curvas concentração resposta para o  $CaCl_2$  em um meio despolarizante livre de cálcio. Observou-se que após a incubação com a FRS, houve um bloqueio na contração induzida pelo influxo de cálcio do meio extra para intracelular (figura 14) sugerindo assim o que o potencial vasorrelaxante da FRS envolve o bloqueio dos canais de  $Ca^{2+}$ .

Para confirmação da atividade das saponinas presentes na FRS sobre o canal de cálcio foi realizado o modelo computacional de docagem molecular

elegendo os compostos saponinas presentes na FRS, sendo eles 3-p-coumaroyl maslinic acid, LucyosideB e LucyosideO, além do composto Dhelphindin diglucoside, utilizando como proteína alvo o canal de cálcio CavAb *voltage-gated calcium channel*.

O processo de *docking* molecular evidencia a predição de afinidade de ligação e o modo de ligação da estrutura do ligante no sítio ativo do receptor. Para analisar os resultados, o arquivo de log gerado foi aberto, e uma tabela (tabela 4) com as energias de ligação referente a afinidade de cada ligante em sua melhor conformação, foi analisada.

O composto verapamil é utilizado como referência sendo um fármaco já estudado na literatura (TANG et al., 2016). Através da ancoragem molecular é possível identificar o ligante 3-p-coumaroyl maslinic acid como o melhor ligante em termos energéticos, sendo eficiente pois apresenta a menor energia de ligação como mostra a tabela 8, logo o mecanismo de interação e formação do complexo proteína-ligante ocorre de forma espontânea.

A afinidade entre os ligantes 3-p-coumaroyl maslinic acid e LucyosideO com o sítio ativo indicam que as interações ajudam no encaixe destes no canal. Estes ligantes apresentaram energias de ligação de -9,23 kJ/mol e -7,27 kJ/mol enquanto o ligante de referência apresentou -5,99 kJ/mol, demonstrando assim uma menor afinidade se comparado a estes ligantes.

A eficiência do ligante (EL) é comumente definida como a relação entre a afinidade de um ligante dividido pelo número de átomos pesados na molécula (REYNOLDS, 2015), os ligantes mostraram resultados abaixo do limite inferior de 0,3 considerando este valor em modulo; mas os resultados apresentados comparados ao composto de referência apresentam uma certa semelhança de valores. Sendo os ligantes 3-p-coumaroyl maslinic acid e LucyosideO que apresentaram os melhores valores de EL estes valores estão relacionados a potência do ligante como uma futura droga, logo quanto maior o mais potente ela será.

Além das energias envolvidas na formação do complexo também analisada a constante de inibição ( $k_i$ ), no qual os valores apresentados (tabela 4) dão indício de uma boa ação inibitória dos ligantes que foram ancorados. O uso do  $K_i$  é útil para designar a probabilidade de que um determinado

medicamento vá inibir uma enzima específica e resultar em uma interação medicamentosa clinicamente relevante com um substrato para a enzima.

Como sugere Tang (2016) as conformações geradas pelo verapamil são apenas superficiais pois a sua ação inibitória no canal de cálcio ocorre de forma física impedindo a passagem do cálcio, este mesmo comportamento foi notado nos demais ligantes estudados.

O cálculo de volume feito para todos os ligantes sendo que o valor de referência foi de 458,052 Å<sup>3</sup>(verapamil) onde os ligantes *3-p-coumaroyl maslinic acid*, *Dhelphindin diglucoside*, *LucyosideB* e *Lucyoside O* apresentaram respectivamente 617,085 Å<sup>3</sup>, 512,906 Å<sup>3</sup>, 771,751 Å<sup>3</sup> e 626,488 Å<sup>3</sup>, nota-se que estes ligantes são volumosos e ocorre um impedimento físico que não permite o fluxo no canal.

## 7. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos no presente estudo mostram que a fração rica em saponinas (FRS), extraída das folhas da espécie vegetal *Syzygium cumini*, apresenta grande potencial farmacológico para desordens do sistema cardiovascular.

A extração da FRS a partir das folhas mostrou-se eficaz uma vez que apresentou teor fortemente positivo para saponinas em relação aos demais metabólitos secundários que mostraram traços ou ausência;

A FRS apresentou efeito anti-hipertensivo, além de diminuir a reatividade arterial ao agonista adrenérgico noradrenalina, após uso agudo, por via oral, em ratos espontaneamente hipertensos (SHR);

O mecanismo de ação da fração envolve alteração no influxo de cálcio, pois a FRS diminuiu a responsividade vascular arterial ao cálcio na presença de líquido despolarizante;

A docagem molecular com os compostos identificados na FRS confirmou o mecanismo de ação envolvendo bloqueio de canais de cálcio

A FRS mostrou, nos resultados de avaliação cardíaca, um efeito cardioprotetor por melhorar parâmetros eletrocardiográficos e diminuição de hipertrofia cardíaca observada na histologia dos SHR.

Este estudo mostrou-se inovador e pioneiro em demonstrar o efeito das saponinas de *Syzygium cumini* no sistema cardiovascular.

## **REFERÊNCIAS**

- ALLAM, N.G., ABOU-TALEB, H. K., ABOOBIA, M. M. Antimicrobial and pesticidal activities of soya saponin. **Journal of Basic and Environmental Sciences**. p 262-267, 2017
- ANNA KORDA, ZBIGNIEW PAKULSKI, PIOTR CMOCH, KATARZYNA GWARDIAK, ROMUALD KARCZEWSKI, Synthesis of bidesmosidic lupane saponins – comparison of batch and continuous-flow methodologies, **Carbohydrate Research**, Volume 461, 2018,
- AQIL F, GUPTA A, MUNAGALA R, et al. Antioxidant and antiproliferative activities of anthocyanin/ellagitannin-enriched extracts from *Syzygium*

- cumini* L. (“jamun”, the Indian Blackberry). **Nutrition and Cancer**. Vol. 64(3):428-438, 2012
- AYYANAR, Muniappan; SUBASH-BABU, Pandurangan. *Syzygium cumini* (L.) Skeels: A review of its phytochemical constituents and traditional uses. **Asian Pacific journal of tropical biomedicine**, v. 2, n. 3, p. 240-246, 2012.
  - BARH D, VISWANATHAN G. *Syzygium cumini* inhibits growth and induces apoptosis in cervical cancer cell lines: a primary study. **Ecancermedicalscience**. 2:83. 2008
  - BEHBEHANI, Gregory K. et al. Transient partial permeabilization with saponin enables cellular barcoding prior to surface marker staining. **Cytometry Part A**, v. 85, n. 12, p. 1011-1019, 2014.
  - BORGES, A. C. R. et al. Effect of cholecalciferol treatment on the relaxant responses of SHR arteries to acetylcholine. **Hypertension**, v. 33, n. 4, p. 1068, 1999.
  - BORGES, Antonio CR et al. Recovery of impaired K<sup>+</sup> channels in mesenteric arteries from spontaneously hypertensive rats by prolonged treatment with cholecalciferol. **British journal of pharmacology**, v. 127, n. 3, p. 772-778, 1999.
  - BÖTTCHER, S; DRUSCH, S. Saponins—Self-assembly and behavior at aqueous interfaces. **Advances in colloid and interface science**, v. 243, p. 105-113, 2017.
  - BRITO, F.A. et al . Pharmacological study of anti-allergic activity of *Syzygium cumini* (L.) Skeels. **Braz J Med Biol Res**, Ribeirão Preto , v. 40, n. 1, p. 105-115, Jan. 2007
  - BRUNETON, J. Pharmacognosy, phytochemistry, medicinal plants **Lavoisier Publishing Inc**, c. 1995.
  - Chanudom, L., & Tangpong, J., Anti-inflammation property of *Syzygium cumini* (L.) Skeels on indomethacin-induced acute gastric ulceration. **Gastroenterology research and practice**, v. 2015, 2015.
  - CHO, Y. L., HUR, S. M., KIM, J. Y., KIM, J. H., LEE, D. K., CHOE, J., ... & RYOO, S. Specific activation of insulin-like growth factor-1 receptor by

- ginsenoside Rg5 promotes angiogenesis and vasorelaxation. **Journal of Biological Chemistry**, v. 290, n. 1, p. 467-477, 2015.
- CIBULSKI, S., RIVERA-PATRON, M., SUÁREZ, N., PIREZ, M., ROSSI, S., YENDO, A. C., ... & SILVEIRA, F Leaf saponins of *Quillaja brasiliensis* enhance long-term specific immune responses and promote dose-sparing effect in BVDV experimental vaccines. **Vaccine**, v. 36, n. 1, p. 55-65, 2018.
  - COSTA, A. F. Farmacognosia. Fundação Calouste Gulbenkian. Lisboa, 2005.4 ed, 338
  - DE BONA, K. S., BELLÉ, L. P., SARI, M. H., THOMÉ, G., SCHETINGER, M. R., MORSCH, V. M., ... MORETTO, M. B. *Syzygium cumini* extract decrease adenosine deaminase, 5' nucleotidase activities and oxidative damage in platelets of diabetic patients. **Cellular Physiology and Biochemistry**, v. 26, n. 4-5, p. 729-738, 2010.
  - DEL HIERRO, J. N., HERRERA, T., FORNARI, T., REGLERO, G., & MARTIN, D. The gastrointestinal behavior of saponins and its significance for their bioavailability and bioactivities. **Journal of Functional Foods**, v. 40, p. 484-497, 2018.
  - DUAN, L., XIONG, X., HU, J., LIU, Y., LI, J., & WANG, J. *Panax notoginseng* Saponins for Treating Coronary Artery Disease: A Functional and Mechanistic Overview. **Frontiers in pharmacology**, v. 8, p. 702, 2017.
  - EJELONU, O. C., ELEKOFEHINTI, O. O., & ADANLAWO, I. G. *Tithonia diversifolia* saponin-blood lipid interaction and its influence on immune system of normal wistar rats. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, 87, 589-595, 2017
  - EL-ANANY, A. M., ALI, R.F.M. Biochemical and histopathological effects of administration various levels of Pomposia (*Syzygium cumini*) fruit juice as natural antioxidant on rat health. *Journal of food science and technology*, v. 50, n. 3, p. 487-495, 2013.

- ESHWARAPPA R.S.B, IYER R.S., SUBBARAMAIAH S.R., RICHARD S.A., DHANANJAYA B.L. Antioxidant activity of *Syzygium cumini* leaf gall extracts. *Bioimpacts*, v. 4, n. 2, 2014.
- FAN, Z., ZHOU, L. XIONG, T., ZHOU, J., LI, Q., TAN, Q., ZHAO, Z., JIN, J. Antiplatelet aggregation triterpene saponins from the barks of *Ilex rotunda*. *Fitoterapia*, v. 101, p. 19-26, 2015.
- FARIA A.F, MARQUES M.C, MERCADANTE A.Z. Identification of bioactive compounds from jambolão (*Syzygium cumini*) and antioxidant capacity evaluation in different pH conditions. *Food chemistry*, v. 126, n. 4, p. 1571-1578, 2011.
- FENG, L., LIU, X. M., CAO, F. R., WANG, L. S., CHEN, Y. X., LIAO, Y. H., ... & CHANG, Q.. Anti-stress effects of ginseng total saponins on hindlimb-unloaded rats assessed by a metabolomics study. *Journal of ethnopharmacology*, 188, 39-47, 2016
- GE Z.R., XU M.C., HUANG Y, ZHANG C.J., LIN J., RUAN C.W. Cardioprotective effect of notoginsenoside R1 in a rabbit lung remote ischemic postconditioning model via activation of the TGF- $\beta$ 1/TAK1 signaling pathway. **Experimental and Therapeutic Medicine**. 11(6):2341-2348, 2016
- GUO, N., TONG, T., REN, N., TU, Y., & LI, B. Saponins from seeds of Genus *Camellia*: Phytochemistry and bioactivity. **Phytochemistry**, Volume 149, 2018
- HERMAN, LINDA L.; BHIMJI, STEVE S. Hydralazine. 2017.StatPearls Publishing; 2018 Jan-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK470296/>
- HUANG, H., LAI, S., WAN, Q., QI, W., & LIU, J. Astragaloside IV protects cardiomyocytes from anoxia/reoxygenation injury by upregulating the expression of Hes1 protein. **Canadian journal of physiology and pharmacology**, 94(5), 542-553, 2015
- HUANG, Q., WANG, T., YANG, L., & WANG, H. Y. "Ginsenoside Rb2 Alleviates Hepatic Lipid Accumulation by Restoring Autophagy via

- Induction of Sirt1 and Activation of AMPK." *International journal of molecular sciences* v. 18, n. 5, p. 1063, 2017.
- J PARMAR, J., SHARMA, P., VERMA, P., & GOYAL, P. K Chemopreventive Action of Syzygium cumini on DMBA -induced Skin Papillomagenesis in Mice. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, Vol 11, 2010
  - JANG, K. J., CHOI, S. H., YU, G. J., HONG, S. H., CHUNG, Y. H., KIM, C. H., ... CHOI, Y. H. Anti-inflammatory potential of total saponins derived from the roots of *Panax ginseng* in lipopolysaccharide-activated RAW 264.7 macrophages. **Experimental and therapeutic Medicine**, 11(3), 1109-1115, 2016
  - JIANG, X., HANSEN, H. C. B., STROBEL, B. W., & CEDERGREEN, N What is the aquatic toxicity of saponin-rich plant extracts used as biopesticides?. **Environmental Pollution**, v. 236, p. 416-424, 2018.
  - KHAN S, IMRAN M, IMRAN M, PINDARI N. Antimicrobial activity of various ethanolic plant extracts against pathogenic multi drug resistant Candida spp. **Bioinformation**. 13(3):67-72, 2017.
  - KIM, T. D., THANH, H. N., THUY, D. N., DUC, L. V., THI, T. V., MANH, H. V., ... & THANH, T. B. Anticancer effects of saponin and saponin–phospholipid complex of *Panax notoginseng* grown in Vietnam. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, 6(9), 795-800, 2016
  - KOCZURKIEWICZ, P., CZYŻ, J., PODOLAK, I., WÓJCIK, K., GALANTY, A., JANECKO, Z., & MICHALIK, M. Multidirectional effects of triterpene saponins on cancer cells-mini-review of in vitro studies. **Acta Biochimica Polonica**, 62(3), 2015
  - KREGIEL, D., BERLOWSKA, J., WITONSKA, I., ANTOLAK, H., PROESTOS, C., BABIC, M. AND ZHANG, B.: Saponin-Based, Biological-Active Surfactants from Plants; In Application and Characterization of Surfactants. **InTec**. 2017
  - LANCAS, F. A cromatografia líquida moderna e a espectrometria de massas: Finalmente "compatíveis"? II. A escolha do analisador de massas. **Scientia Chromatographica**. 5. 27-46, 2013

- LI C, DENG W, LIAO X, DENG J, ZHANG Y, WANG D. The effects and mechanism of ginsenoside Rg1 on myocardial remodeling in an animal model of chronic thromboembolic pulmonary hypertension. **European Journal of Medical Research**. 18(1):16, 2013
- LI, L., NI, J., LI, M., CHEN, J., HAN, L., ZHU, Y., ... & ZHU, M. Ginsenoside Rg3 micelles mitigate doxorubicin-induced cardiotoxicity and enhance its anticancer efficacy. *Drug delivery*, 24(1), 1617-1630, 2017
- LI, M., LIU, F., JIN, Y. R., WANG, X. Z., WU, Q., LIU, Y., & LI, X. W.. Five New Triterpenoid Saponins from the Rhizomes of *Panax majoris* and Their Antiplatelet Aggregation Activity. **Planta medica**, v. 83, n. 03/04, p. 351-357, 2017..
- LI, Y. Y., XIAO, L., QIU, L. Y., YAN, Y. F., WANG, H., DUAN, G. L., ... & CHEN, H. P. Sasanquasaponin-induced cardioprotection involves inhibition of mPTP opening via attenuating intracellular chloride accumulation. **Fitoterapia**, v. 116, p. 1-9, 2017.
- LIU, L., NING, B., CUI, J., ZHANG, T., & CHEN, Y implicated in the cardioprotective activity of *Panax notoginseng* saponins against isoproterenol-induced myocardial fibrogenesis. **Journal of ethnopharmacology**, v. 198, p. 1-4, 2017.
- LOH, Y. C., TAN, C. S., CH'NG, Y. S., YEAP, Z. Q., NG, C. H., & YAM, M. F. . Overview of the Microenvironment of Vasculature in Vascular Tone Regulation. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 1, p. 120, 2018.
- LORENT J, LE DUFF CS, QUETIN-LECLERCQ J, MINGEOT-LECLERCQ M-P. Induction of Highly Curved Structures in Relation to Membrane Permeabilization and Budding by the Triterpenoid Saponins,  $\alpha$ - and  $\delta$ -Hederin. **The Journal of Biological Chemistry**.;288(20):14000-14017, 2013
- MA, L., LIU, H., XIE, Z., YANG, S., XU, W., HOU, J., & YU, B. Ginsenoside Rb3 Protects Cardiomyocytes against Ischemia-Reperfusion Injury via the Inhibition of JNK-Mediated NF- $\kappa$ B Pathway: A

- Mouse Cardiomyocyte Model. Wang M, ed. **PLoS ONE**.;9(8):e103628, 2014
- MAHMOUD I. I., MARZOUK M. S., MOHARRAM F. A., EL-GINDI M. R., HASSAN A. M. Acylated flavonol glycosides from *Eugenia jambolana* leaves. **Phytochemistry** 58 1239–1244, 2001
  - MALACHIAS, M. V. B. et al. 7ª Diretriz brasileira de hipertensão arterial. **Arq Bras Cardiol**, v. 107, n. 3, p. 1-103, 2016.
  - MANIVANNAN, J., SHANTHAKUMAR, J., SILAMBARASAN, T., BALAMURUGAN, E., & RAJA, B. Diosgenin, a steroidal saponin, prevents hypertension, cardiac remodeling and oxidative stress in adenine induced chronic renal failure rats. **RSC Advances**, v. 5, n. 25, p. 19337-19344, 2015.
  - MARRELLI M, CONFORTI F, ARANITI F, STATTI G.A. Effects of saponins on lipid metabolism: A review of potential health benefits in the treatment of obesity. **Molecules**. 21:1404, 2016
  - MATOS, F.J.A . Introdução à Fitoquímica Experimental. Fortaleza. Edições Fortaleza: **UFC**, 1997
  - MCCLEMENTS, D. J., & GUMUS, C. E. Natural emulsifiers—Biosurfactants, phospholipids, biopolymers, and colloidal particles: Molecular and physicochemical basis of functional performance. *Advances in colloid and interface science*, v. 234, p. 3-26, 2016.
  - MOGHIMIPOUR, E., & HANDALI, S. Somayeh. Saponin: properties, methods of evaluation and applications. **Annual Research & Review in Biology**, v. 5, n. 3, p. 207, 2015.
  - MOGHIMIPOUR, Eskandar; HANDALI, Somayeh. Saponin: properties, methods of evaluation and applications. **Annual Research & Review in Biology**, v. 5, n. 3, p. 207, 2015.
  - MOHAMED A.A., ALI S.I., EL-BAZ F.K.. Antioxidant and Antibacterial Activities of Crude Extracts and Essential Oils of *Syzygium cumini* Leaves. Carter DA, ed. **PLoS ONE**.;8(4):e60269, 2013

- MURUGANANDAN, S., SRINIVASAN, K., CHANDRA, S., TANDAN, S. K., LAL, J., & RAVIPRAKASH, V. Antiinflammatory activity of *Syzygium cumini* bark. **Fitoterapia** v.72, p.369 – 375. 2001.
- NAFIU M.O., ASHAFA A.O.T. Antioxidant and Inhibitory Effects of Saponin Extracts from *Dianthus basuticus* Burt Davy on Key Enzymes Implicated in Type 2 Diabetes In vitro. **Pharmacognosy Magazine**. 13(52):576-582, 2017
- NAIR, R.B., SANTHAKUMARI, G. Anti – diabetic activity of the seed kernel of *Syzygium cumini* Linn. **Ancient Science of Life**. 6(2):80-84, 1986
- OLESZEK, W. A. Chromatographic determination of plant saponins. **Journal of chromatography A**, v. 967, n. 1, p. 147-162, 2002.
- OLESZEK, W., & BIALY, Z, Chromatographic determination of plant saponins—an update (2002–2005). **Journal of chromatography A**, v. 1112, n. 1-2, p. 78-91, 2006.
- PEREIRA, J., BROCARDO-LIMA, G. A., BETTLER, B., & CHAMONE, D. A. Utilização de saponina em citometria de fluxo: uma alternativa factível para permeabilização celular **Rev. bras. hematol. hemoter.**;29(2):109-113, 2007
- PERERA, P. R. D.; EKANAYAKE, S.; RANAWEERA, K. K. D. S. Antidiabetic Compounds in *Syzygium cumini* Decoction and Ready to Serve Herbal Drink. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2017, 2017.
- PINTÉROVÁ, M.; KUNES, J.; ZICHA, J. Altered neural and vascular mechanisms in hypertension. *Physiological research*, v. 60, n. 3, p. 381, 2011.
- PIO CÔRREA, M. Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas. Rio de Janeiro: **Ministério da Agricultura**. v.2. 777p, 1984
- POZETTI, G.L. Controle de qualidade em homeopatia. Ribeirão Preto: **Instituto Homeopático François Lamasson**, 1989.
- PRIYA S.H, PRAKASAN N, PURUSHOTHAMAN J. Antioxidant activity, phenolic-flavonoid content and high-performance liquid chromatography profiling of three different variants of *Syzygium cumini* seeds: A

- comparative study. **Journal of Intercultural Ethnopharmacology**. 6(1):107-114, 2017
- QI, H., HUANG, Y., YANG, Y., DOU, G., WAN, F., ZHANG, W., ... LI, L. Anti-platelet activity of panaxatriol saponins is mediated by suppression of intracellular calcium mobilization and ERK2/p38 activation. **BMC Complementary and Alternative Medicine**. 16, 174, 2016.
  - QIU L.H., ZHANG B. Q., LIAN M. J., XIE X. J., CHEN P. Vascular protective effects of Astragalus membranaceus and its main constituents in rats with chronic hyperhomocysteinemia. **Experimental and Therapeutic Medicine**. 14(3):2401-2407, 2017
  - QIU, L., CHEN, H., YAN, Y., LI, Y., WANG, H., LIAO, Z., HUANG, Q. "Sasanguasaponin promotes cellular chloride efflux and elicits cardioprotection via the PKC $\epsilon$  pathway". **Molecular Medicine Reports** 13.4, 2016
  - RAFFAELLI, F., BORRONI, F., ALIDORI, A., TIRABASSI, G., FALLOIA, E., RABINI, R. A., ... & VIGNINI, A. Effects of in vitro supplementation with *Syzygium cumini* (L.) on platelets from subjects affected by diabetes mellitus. **Platelets**, 26(8), 720-725, 2015
  - RAFFAELLI, F., BORRONI, F., ALIDORI, A., TIRABASSI, G., FALLOIA, E., RABINI, R. A. Effects of in vitro supplementation with *Syzygium cumini* (L.) on platelets from subjects affected by diabetes mellitus. **Platelets**, v. 26, n. 8, p. 720-725, 2015.
  - RATZ, P. H.; BERG, K. M.; URBAN, N. H.; MINER, A. S. Regulation of smooth muscle calcium sensitivity: KCl as a calcium-sensitizing stimulus. **American Journal of Physiology-Cell Physiology**, v. 288, n. 4, p. C769-C783, 2005.
  - RIBEIRO, R. M., PINHEIRO NETO, V. F., RIBEIRO, K. S., VIEIRA, D. A., ABREU, I. C., SILVA, S. D. N., ... & BORGES, M. O. D. R *Syzygium cumini* in spontaneously hypertensive rats. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2014, 2014.
  - ROCHA, R.M; MARTINS, W.A. Manual de prevenção cardiovascular **Sociedade de Cardiologia do Estado do Rio de Janeiro**, 1. ed. São Paulo. Planmark, 2017

- RUAN, Z.P.; ZHANG, L.L.; LIN, Y.M. Evaluation of the Antioxidant Activity of *Syzygium cumini* Leaves. *Molecules*. 13, 2545-2556, 2008
- S.G. SPARG, M.E. LIGHT, J. VAN STADEN, Biological activities and distribution of plant saponins, **Journal of Ethnopharmacology**, Volume 94, Issues 2–3, 2004
- Sanches, J. R., França, L. M., Chagas, V. T., Gaspar, R. S., dos Santos, K. A., Gonçalves, L. M., ... & Cappelli, A. P. G. Polyphenol-rich extract of *Syzygium cumini* leaf dually improves peripheral insulin sensitivity and pancreatic islet function in monosodium l-glutamate-induced obese rats. **Frontiers in pharmacology**, v. 7, p. 48, 2016.
- SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; ATHAYDE, M.L. Saponinas. In: SIMÕES, C.M.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P. R. Farmacognosia: da planta ao medicamento .3 ed. Porto Alegre: **Ed. UFRGS/Ed. UFSC**, 2001. cap.27, p.597-619.
- SHARMA, A. K., BHARTI, S., KUMAR, R., KRISHNAMURTHY, B., BHATIA, J., KUMARI, S., & ARYA, D. S. *Syzygium cumini* ameliorates insulin resistance and  $\beta$ -cell dysfunction via modulation of PPAR, dyslipidemia, oxidative stress, and TNF- $\alpha$  in type 2 diabetic rats. J Pharmacol Sci. 119(3):205-13, 2012
- SHARMA, S., & VISHNOI, P. Screening of Phyto-chemical compounds from hydro-ethanolic and ethanolic leaf and bark extracts of *Terminalia arjuna* and *Syzygium cumini*. **Screening**, v. 4, n. 06, 2017.
- SHI-GUANG, W. A. N. G., YAN, X. U., HAO, X. I. E., WEI, W. A. N. G., & XIAO-HU, C. H. E. N. Astragaloside IV prevents lipopolysaccharide-induced injury in H9C2 cardiomyocytes, **Chinese Journal of Natural Medicines**, Volume 13, Issue 2, 2015
- SIMÕES C.M.O, SCHENKEL E.P, MELLO J.C.P, MENTZ L.A, PETROVICK P.R. Farmacognosia: do produto natural ao medicamento. Porto Alegre: UFSC/UFRGS; 2017.

- SINGH, B., SINGH, J. P., SINGH, N., & KAUR, A.. Saponins in pulses and their health promoting activities: A review. **Food chemistry**, v. 233, p. 540-549, 2017.
- SINGH, D., CHAUDHURI, P. K. Structural characteristics, bioavailability and cardioprotective potential of saponins. **Integrative medicine research**, 2018.
- SINGH, G.; SURESH, S.; BAYINENI, V.K.; KADEPPAGARI, R.K. Lipase inhibitors from plants and their medical applications. **Int. J. Pharm. Pharm. Sci.** Vol, 7, 1–5, 2015
- SINGLA, R., SONI, S., PATIAL, V., KULURKAR, P. M., KUMARI, A., MAHESH, S., ... & YADAV, S. K.. Cytocompatible Anti-microbial Dressings of *S zzygium cumini* Cellulose Nanocrystals Decorated with Silver Nanoparticles Accelerate Acute and Diabetic Wound Healing. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 10457, 2017.
- SONG, DE-XING & JIANG, JIAN-GUO. Hypolipidemic Components from Medicine Food Homology Species Used in China: Pharmacological and Health Effects. **Archives of medical research**, 2018.
- SORRIENTO, D., DE LUCA, N., TRIMARCO, B., & IACCARINO, G. The Antioxidant Therapy: New Insights in the Treatment of Hypertension. **Frontiers in physiology**. 9, 258, 2018
- SUN, H. X., XIE, Y., & YE, Y. P. Advances in saponin-based adjuvants. **Vaccine**, 27(12), 1787-1796, 2009
- TAFAGHODI, M., ESKANDARI, M., KHAMESIPOUR, A., & JAAFARI, M. R. Immunization Against Cutaneous Leishmaniasis by Alginate Microspheres Loaded With Autoclaved *Leishmania Major* (ALM) and *Quillaja Saponins*. **Iranian journal of pharmaceutical research: IJPR**, v. 15, n. 2, p. 573, 2016.
- TANG, Y. N., HE, X. C., YE, M., HUANG, H., CHEN, H. L., PENG, W. L., ... & CHEN, H. B. Cardioprotective effect of total saponins from three medicinal species of *Dioscorea* against isoprenaline-induced myocardial ischemia. **Journal of ethnopharmacology**, v. 175, p. 451-455, 2015.

- TIAN, L. W., ZHANG, Z., LONG, H. L., & ZHANG, Y. J. (2017). Steroidal Saponins from the genus smilax and their biological activities. **Natural products and bioprospecting**, v. 7, n. 4, p. 283-298, 2017.
- TURMAGAMBETOVA, A. S., ALEXYUK, P. G., BOGOYAVLENSKIY, A. P., ZAITSEVA, I. A., OMIRTAEVA, E. S., ALEXYUK, M. S., ... & BEREZIN, V. E.. Adjuvant activity of saponins from Kazakhstani plants on the immune responses to subunit influenza vaccine. **Archives of virology**, v. 162, n. 12, p. 3817-3826, 2017.
- ULLA, A., ALAM, M. A., SIKDER, B., SUMI, F. A., RAHMAN, M. M., HABIB, Z. F., ... & REZA, H. M. Supplementation of *Syzygium cumini* seed powder prevented obesity, glucose intolerance, hyperlipidemia and oxidative stress in high carbohydrate high fat diet induced obese rats. **BMC complementary and alternative medicine**, v. 17, n. 1, p. 289, 2017.
- UR RAHMAN, S., ISMAIL, M., KHURRAM, M., ULLAH, I., RABBI, F., & IRITI, M. Bioactive Steroids and Saponins of the Genus Trillium. **Molecules**, v. 22, n. 12, p. 2156, 2017.
- VASAVI, H. S., ARUN, A. B., & REKHA, P. D Inhibition of quorum sensing in *Chromobacterium violaceum* by *Syzygium cumini* L. and *Pimenta dioica* L. **Asian Pacific journal of tropical biomedicine**, v. 3, n. 12, p. 954-959, 2013.
- WANG, C., LI, Y., YANG, X., BI, S., ZHANG, Y., HAN, D., ZHANG, D. Tetramethylpyrazine and Astragaloside IV Synergistically Ameliorate Left Ventricular Remodeling and Preserve Cardiac Function in a Rat Myocardial Infarction Model. **Journal of cardiovascular pharmacology**, v. 69, n. 1, p. 34-40, 2017.
- WANG, M. M., XUE, M., MIAO, Y., KOU, N., XU, Y. G., YANG, L., ... & SHI, D. Z *Panax quinquefolium* saponin combined with dual antiplatelet drugs inhibits platelet adhesion to injured HUVECs via PI3K/AKT and COX pathways. **Journal of ethnopharmacology**, v. 192, p. 10-19, 2016.

- WANG, X., CHEN, L., WANG, T., JIANG, X., ZHANG, H., LI, P., ... & GAO, X., Ginsenoside Rg3 antagonizes adriamycin-induced cardiotoxicity by improving endothelial dysfunction from oxidative stress via upregulating the Nrf2-ARE pathway through the activation of akt. **Phytomedicine**, v. 22, n. 10, p. 875-884, 2015.
- WHO. Technical package for cardiovascular disease management in primary health care. 2016. Disponível em: [http://www.who.int/cardiovascular\\_diseases/hearts/en/](http://www.who.int/cardiovascular_diseases/hearts/en/). Acessado em abril de 2018
- WRIGHT, J. M., & MUSINI, V. M.. First-line drugs for hypertension. **Cochrane Database of systematic reviews**, n. 3, 2018
- WU, T., SUN, J., KAGOTA, S., MARUYAMA, K., WAKUDA, H., & SHINOZUKA, K. *Panax notoginseng* saponins ameliorate impaired arterial vasodilation in SHRSP. Z-Leprfa/lzmDmcr rats with metabolic syndrome. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v. 43, n. 4, p. 459-467, 2016
- YADAV, A. K., SARASWAT, S., SIROHI, P., RANI, M., SRIVASTAVA, S., SINGH, M. P., & SINGH, N. K. Antimicrobial action of methanolic seed extracts of *Syzygium cumini* Linn. on *Bacillus subtilis*. **AMB Express**, v. 7, n. 1, p. 196, 2017.
- YAN, J., DUAN, J., WU, X., GUO, C., YIN, Y., ZHU, Y., ... & XI, M. Total saponins from *Aralia taibaiensis* protect against myocardial ischemia/reperfusion injury through AMPK pathway. **International journal of molecular medicine**, v. 36, n. 6, p. 1538-1546, 2015.
- YAN, X., LIU, J., WU, H., LIU, Y., ZHENG, S., ZHANG, C., & YANG, C, Impact of miR-208 and its target gene nemo-like kinase on the protective effect of ginsenoside Rb1 in hypoxia/ischemia injured cardiomyocytes. **Cellular Physiology and Biochemistry**, v. 39, n. 3, p. 1187-1195, 2016.
- YANG, Bao et al. Antiplatelet aggregation triterpene saponins from the leaves of *Ilex kudingcha*. **Phytochemistry Letters**, v. 13, p. 302-307, 2015.
- YANG, X., XIONG, X., WANG, H., & WANG, J. Protective effects of panax notoginseng saponins on cardiovascular diseases: a

- comprehensive overview of experimental studies. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2014, 2014.
- YANG, Y. L., LI, J., LIU, K., ZHANG, L., LIU, Q., LIU, B., & QI, L. W. Ginsenoside Rg5 increases cardiomyocyte resistance to ischemic injury through regulation of mitochondrial hexokinase-II and dynamin-related protein 1. **Cell death & disease**, v. 8, n. 2, p. e2625, 2017.
  - YU, J., ZHANG, X., & ZHANG, Y. Astragaloside attenuates myocardial injury in a rat model of acute myocardial infarction by upregulating hypoxia inducible factor-1 $\alpha$  and Notch1/Jagged1 signaling. **Molecular medicine reports**, v. 15, n. 6, p. 4015-4020, 2017.
  - YU, Y., SUN, G., LUO, Y., WANG, M., CHEN, R., ZHANG, J., ... & SUN, X. Cardioprotective effects of Notoginsenoside R1 against ischemia/reperfusion injuries by regulating oxidative stress-and endoplasmic reticulum stress-related signaling pathways. **Scientific reports**, v. 6, p. 21730, 2016.
  - ZHANG, W. L., ZHU, L., & JIANG, J. G. Active ingredients from natural botanicals in the treatment of obesity. **Obesity reviews**, v. 15, n. 12, p. 957-967, 2014.
  - ZHANG, Y. J., ZHANG, X. L., LI, M. H., IQBAL, J., BOURANTAS, C. V., LI, J. J., ... & CHEN, S. L. The Ginsenoside Rg1 Prevents Transverse Aortic Constriction–Induced Left Ventricular Hypertrophy and Cardiac Dysfunction by Inhibiting Fibrosis and Enhancing Angiogenesis. **Journal of cardiovascular pharmacology**, v. 62, n. 1, p. 50-57, 2013.
  - ZHAO, Y., ZHANG, X., LI, J., BIAN, Y., SHENG, M., LIU, B., ... & YANG, B. Jujuboside B reduces vascular tension by increasing Ca<sup>2+</sup> influx and activating endothelial nitric oxide synthase. **PloS one**, v. 11, n. 2, p. e0149386, 2016.
  - ZHENG, X., WANG, S., ZOU, X., JING, Y., YANG, R., LI, S., & WANG, F. Ginsenoside Rb1 improves cardiac function and remodeling in heart failure. **Experimental animals**, v. 66, n. 3, p. 217-228, 2017.
  - ZHOU, L., ZHENG, Y., LI, Z., BAO, L., DOU, Y., TANG, Y., LI, X. Compound K attenuates the development of atherosclerosis in ApoE–/–

mice via LXR $\alpha$  activation. **International journal of molecular sciences**,  
v. 17, n. 7, p. 1054, 2016.

## APÊNDICE

**TABELA 1a.** Efeito do tratamento oral, por 15 dias, com a fração rica em saponinas (FRS) de *S. cumini* em parâmetros da curva concentração-resposta à noradrenalina (NOR) em artéria mesentérica de SHR.

GRUPOS	pD <sub>2</sub> (M)	EC <sub>50</sub>	E <sub>max</sub> (g/tensão)	Redução E <sub>max</sub> (%)
Wistar	5,78 ± 0,45	1,033. 10 <sup>-6</sup>	0,80 ± 0,08	8,24
SHR	6,68 ± 0,45	0,22. 10 <sup>-6</sup>	0,87 ± 0,17	-
SHR- PROP	6,00 ± 0,20	0,80. 10 <sup>-6</sup>	0,74 ± 0,03	15,40
SHR- FRS 10	6,11 ± 0,21	0,61. 10 <sup>-6</sup>	0,83 ± 0,17	4,20
SHR- FRS 50	5,79 ± 0,33 <sup>#</sup>	0,95. 10 <sup>-6#</sup>	0,41 ± 0,07 <sup>#</sup>	53,30 <sup>#</sup>

Resultados expressos como média ± E.P.M. (*n* = 5). <sup>#</sup>*p* < 0,05 vs SHR. (ANOVA, Tukey)  
EC<sub>50</sub> (concentração efetiva 50%), pD<sub>2</sub> (- log da EC<sub>50</sub>) e E<sub>max</sub> (efeito máximo da contração)

**TABELA 2a.** Parâmetros das curvas concentração-relaxamento da fração rica em saponinas (FRS) em artéria mesentérica de SHR desprovidos ou não de endotélio, pré-contraídos com noradrenalina

[FRS] mg/mL	% de Vasorrelaxamento em artéria mesentérica		
	E (+)	E (-)	Valores de <i>p</i>
0,001	16,64 ± 3,86	4,16 ± 1,96*	0,0208
0,005	36,00 ± 3,00	14,23 ± 4,17*	0,0343
0,01	50,50 ± 2,5	28,83 ± 8,89	0,2553
0,05	60,63 ± 2,63	41,28 ± 6,39	0,1689
0,1	68,1 ± 3,39	57,76 ± 9,35	0,5921
0,5	100,70 ± 0,23	89,41 ± 8,76	0,5082

Resultados expressos como média ± E.P.M. (*n* = 5). E(+) presença de endotélio funcional; E(-) ausência de endotélio funcional. \**p* < 0,05 vs FRS (E-). (ANOVA, Tukey)

## **ANEXOS**



UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO  
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS-CEUA  
CIAEP:01.0341.2014

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Avaliação do potencial vascular de saponinas extraídas das folhas de *Syzygium cumini* (L.) Skeels" registrada com o nº 23115.005844/2016-21, sob a responsabilidade de Marilene Oliveira da Rocha Borges, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi considerado **Aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA- UFMA) da Universidade Federal do Maranhão em reunião de 21/11/2016.

FINALIDADE	( ) Ensino (X) Pesquisa ( ) Extensão
Vigência da autorização	20 meses 01/06/16 a 01/02/18
Especie/linhagem/raça	Ratos <i>norvegicus</i> , Linhagens Wistar e SHR
Nº de animais	95 ratos SHR e 10 ratos Wistar
Peso/Idade	250-300g, 60 dias
Sexo	Fêmeas e machos
Origem	Bioterio Central da UFMA

Profa. Dra. Lucilene Amorim Silva  
Presidente da Comissão de Ética no uso de animais-CEUA  
UFMA



**Pedido nacional de Invenção, Modelo de Utilidade, Certificado de  
Adição de Invenção e entrada na fase nacional do PCT**

Número do Processo: BR 10 2018 010919 7

**Dados do Depositante (71)**

---

Depositante 1 de 1

Nome ou Razão Social: UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO

Tipo de Pessoa: Pessoa Jurídica

CPF/CNPJ: 06279103000119

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Jurídica: Instituição de Ensino e Pesquisa

Endereço: Cidade Universitária Dom Deigado, Av. dos Portugueses, 1966, Vila  
Bacanga.

Cidade: São Luís

Estado: MA

CEP: 65080-805

País: Brasil

Telefone: (98) 32728710

Fax:

Email: ni1-dapi@ufma.br

**Dados do Pedido**

---

**Natureza Patente:** 10 - Patente de Invenção (PI)

**Título da Invenção ou Modelo de Utilidade (54):** FORMULAÇÃO FARMACÉUTICA A PARTIR DE SAPONINAS DE Syzygium cumini PARA TRATAMENTO DE DESORDENS CARDIOVASCULARES

**Resumo:** A presente invenção está inserida no campo da indústria farmacêutica refere-se a utilização do pó obtido da fração rica em saponinas, extraída das folhas da espécie vegetal Syzygium cumini, como um produto de ação vasorelaxante, anti-hipertensivo, antiarritmico e cardioprotetor, sendo apropriado para preparação de medicamentos destinados ao tratamento, prevenção ou diagnóstico de doenças cardiovasculares.

---

**PETICIONAMENTO ELETRÔNICO** Esta solicitação foi enviada pelo sistema Peticionamento Eletrônico em 29/05/2018 às 14:22, Petição 870180045861

Dados do Inventor (72)

---

Inventor 1 de 4

Nome: MATHEUS BRANDÃO CAMPOS

CPF: 03503561307

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Estudante de Pós Graduação

Endereço: Rua Aidebaran Condomínio Monte Carlo, ap 702

Cidade: São Luis

Estado: MA

CEP: 65060-647

País: BRASIL

Telefone: (98) 961 337704

Fax:

Email: matheustry@hotmail.com

Inventor 2 de 4

Nome: RACHEL MELO RIBEIRO

CPF: 91647657334

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Enfermeiro de nível superior, nutricionista, farmacêutico e afins

Endereço: 91647657334

Cidade: São Luis

Estado: MA

CEP: 65071-363

País: BRASIL

Telefone: (98) 996 091695

Fax:

Email: rachelmeloribeiro@gmail.com

Inventor 3 de 4

---

**PETICIONAMENTO  
ELETRÔNICO**

Esta solicitação foi enviada pelo sistema Petição Eletrônica em 29/05/2018 às 14:22, Petição 870180045861

**FORMULAÇÃO FARMACÉUTICA A PARTIR DE SAPONINAS DE *Syzygium cumini* PARA TRATAMENTO DE DESORDENS CARDIOVASCULARES**

A presente invenção está inserida no campo da indústria farmacêutica refere-se a utilização do pó obtido da fração rica em saponinas, extraída das folhas da espécie vegetal *Syzygium cumini*, como um produto de ação vasorelaxante, anti-hipertensivo, antiarrítmico e cardioprotetor, sendo apropriado para preparação de medicamentos destinados ao tratamento, prevenção ou diagnóstico de doenças cardiovasculares.

