



UFAM

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA MULTI-INSTITUCIONAL DE PÓS-
GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

**Efeito do extrato aquoso das folhas de *Eugenia punicifolia*
(Khunt) DC em modelos experimentais relacionados à Síndrome
Metabólica**

DENISE MORAIS LOPES GALENO

MANAUS
2014

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA MULTI-INSTITUCIONAL DE PÓS-
GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

DENISE MORAIS LOPES GALENO

**Efeito do extrato aquoso das folhas de *Eugenia punicifolia*
(Khunt) DC em modelos experimentais relacionados à Síndrome
Metabólica**

Tese de Doutorado apresentado ao Programa de pós-graduação Multi-Institucional em Biotecnologia da Universidade Federal do Amazonas, como pré-requisito para a obtenção do título de Doutora em Biotecnologia.

Orientadora: Prof. (a) Dra. Rosany Piccolotto Carvalho
Co-Orientador: Prof^o. Dr Emerson Silva Lima

MANAUS
2014

Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

G153e Galeno, Denise Morais Lopes
Efeito do extrato aquoso das folhas de *Eugenia punicifolia* (Khunt)
DC em modelos experimentais relacionados à Síndrome Metabólica
/ Denise Morais Lopes Galeno. 2014
127 f.: il. color; 31 cm.

Orientadora: Rosany Piccolotto Carvalho
Coorientador: Emerson Silva Lima
Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Universidade Federal do
Amazonas.

1. Pedra de cacá. 2. Síndrome metabólica. 3. Enzimas digestivas.
4. Hipertensão. I. Carvalho, Rosany Piccolotto II. Universidade
Federal do Amazonas III. Título

"Para realizar grandes conquistas, devemos não apenas agir, mas também sonhar; não apenas planejar, mas também acreditar."

"O segredo de um grande sucesso esta no trabalho de uma grande equipe".

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me conceder sabedoria, força e persistência para nunca desistir diante dos obstáculos.

Ao Meu esposo, Victor Galeno, pela compreensão nos tantos momentos de ausência, ansiedade, nervosismo e pelo apoio em todas as horas, na certeza de um sonho realizado.

Aos meus filhos que ainda estão chegando, que me deram coragem e garra pra seguir em frente, mesmo diante de tantas dificuldades.

À minha mãe, Ana Carlota, pelo incentivo e entusiasmo para com as minhas vitórias.

Ao meu pai, José Rocha, pelos ensinamentos de vida e por depositar confiança nas minhas escolhas.

À minha irmã, Patrícia Morais, por sempre acreditar nas minhas conquistas.

Ao meu sobrinho Renan, pela simpatia e alegria.

Aos meus irmãos, Neon e Leonardo, pelo carinho incondicional.

À minha orientadora, Profa. Dra. Rosany Piccolotto Carvalho, pela paciência diante dos meus anseios, pela dedicação nas correções, por depositar confiança nos meus propósitos e sempre me apoiar nos momentos decisivos.

Ao meu Co-Orientador, Prof. Dr. Emerson Silva Lima, por ter me dado a oportunidade de estudar uma espécie de planta com potencial, pelos conhecimentos novos aprendidos, pela dedicação e pelo estímulo científico.

À amiga Rita de Cássia Mascarenhas Netto, pelo incentivo, discussões científicas, colaboração nos experimentos e ajuda na escrita do trabalho.

À amiga Alessandra Alves da Silva Magalhães, pelo companheirismo e palavras de incentivo sempre.

Aos técnicos de laboratório Rejane Souza de Aquino Sales, Arleilson Sousa Lima e Reginaldo Souza, pela ajuda nos experimentos dessa pesquisa, pelo comprometimento e seriedade.

Aos técnicos do biotério, por terem cuidado dos animais utilizados nos experimentos, seres indispensáveis nessa pesquisa.

À professora Dra. Geane Antiques Lourenço, por ter se dedicado a ajudar na aquisição dos animais dessa pesquisa e nos ensaios de toxicidade.

Aos professores que participaram da banca de qualificação, Dra. Ana Paula de Araújo Boleti, Dra. Silvana Cristina Pando e Dr. José Wilson do Nascimento Corrêa, pelo aprimoramento na escrita da tese.

Ao professor Dr. Carlos Cleomir Pinheiro, por ter nos emprestado o equipamento de pressão arterial não invasivo, pela amizade e simpatia.

Ao professor Dr. José Wilson do Nascimento Corrêa, pela ajuda na fase pioneira e no decorrer dessa pesquisa.

Aos meus alunos de iniciação científica, Fernando Villalaz Chiong Neto, Raphael Holanda Santos, Zinalton Gomes de Andrade e Marcílio Pontes de Souza, seres fundamentais no desenvolvimento desta pesquisa, principalmente nessa fase de gravidez ao qual me encontro.

Aos professores do DCF, pelo convívio, ensinamentos e auxílio sempre que busquei.

Às secretárias do setor de Pós graduação, em especial à Nubiane, pela presteza e simpatia.

À Coordenação do Programa de Pós-graduação Multi-Institucional em Biotecnologia.

À CAPES, pelo apoio financeiro.

Agradeço a todos que de uma forma, direta ou indireta, ajudaram na realização da presente pesquisa.

RESUMO

Galeno, D.M.L. Efeitos da *Eugenia punicifolia* (Khunt) DC em modelos experimentais relacionados à Síndrome Metabólica. Manaus, 2014. 133p. Tese (doutorado)- Programa de Pós-graduação Multi-Institucional em Biotecnologia da Universidade Federal do Amazonas

A espécie *Eugenia punicifolia* é uma planta popularmente conhecida como "pedra-ume-caá", distribuída amplamente na região amazônica. No estado do Amazonas, essa espécie tem sido bastante utilizada na medicina popular para tratar distúrbios hiperglicêmicos e inflamatórios. No entanto, estudos envolvendo outros parâmetros encontrados na síndrome metabólica (SM) ainda não foram elucidados. A SM se caracteriza por um transtorno complexo, representado por um conjunto de fatores de risco cardiovascular que envolve deposição central de gordura, hipertensão arterial, disfunção endotelial e resistência à insulina. Estudos têm evidenciado que a suplementação nutricional com plantas que atuem efetivamente com os mecanismos patogênicos desta síndrome representa um potencial eficaz para o problema. Este projeto teve como objetivo analisar atividades biológicas *in vitro* e *in vivo* do extrato aquoso das folhas da *E. punicifolia* (EEP), enfatizando a atividade inibitória de enzimas digestórias, enzima conversora de angiotensina (ECA), efeitos antioxidantes, hipolipemiantes, citotóxicos e anti-hipertensivos. Os ensaios de inibição enzimática, assim como a determinação da atividade da ECA no soro de ratos wistars foram realizados utilizando um método indireto fluorimétrico e os testes de viabilidade celular, antioxidantes, determinação da presença de compostos fenólicos e flavonoides por meio de ensaios colorimétricos. A avaliação do EEP sobre os parâmetros pressóricos foi realizada mediante a utilização de cinco grupos experimentais, os quais foram divididos randomicamente em: Grupo normotenso (2R), Grupo hipertenso (2R1C), Grupo hipertenso enalapril (ENAL), Grupo hipertenso extrato 150 mg/kg/dia (EEP150) e Grupo hipertenso extrato 300 mg/kg/dia (EEP300). Os efeitos do EEP na pressão sistólica foram adquiridos de forma indireta por plestimografia de cauda em ratos conscientes. Os parâmetros bioquímicos foram avaliados no plasma dos ratos por meio de kits apropriados. Nesse estudo foi mostrado, pela primeira vez, que o EEP apresentou atividade sequestradora de radicais livres nos testes de ABTS^{•+}, DPPH[•] e O₂^{•-} (CI₅₀=10,5 ± 1,2; 28,84 ± 0,54; e 38,12 ± 2,6 µg/mL, respectivamente). O EEP também exibiu atividade antioxidante celular *in vitro* de maneira concentração-dependente, além de não evidenciar efeitos citotóxicos celulares. Ademais, o EEP inibiu 70,8% a atividade da ECA na concentração de 0,3 mg/mL (CI₅₀ de 24 ± 0,7 µg/mL), inibiu as atividades das enzimas α-amilase (CI₅₀=122,8 ± 6,3 µg/mL), α-glucosidase (CI₅₀= 2,9 ± 0,1 µg/mL) e xantina oxidase (CI₅₀= 23,5 ± 2,6 µg/mL). O EEP150 reduziu a pressão sistólica em 21,7% e o EEP300 em 16,8%. O efeito hipotensor do EEP se correlacionou com a redução da atividade da ECA no plasma e também diminuiu o colesterol total (48%), triglicerídeos (52%), VLDL (52%) e LDL (55%). Além disso, o EEP não causou toxicidade crônica e nem aguda renal, hepática ou neurotóxica. O EEP mostrou atividades antioxidantes, hipotensores, hipolipemiantes e inibiu as enzimas digestórias e a ECA. Essas atividades provavelmente estejam relacionadas à presença de compostos antioxidantes, como fenóis e flavonoides presentes no extrato, que atuam inibindo enzimas chaves do metabolismo dos carboidratos e a enzima conversora de angiotensina. Estes achados podem fundamentar estudos clínicos posteriores para melhor avaliar o potencial do EEP sobre a SM.

Palavras-Chaves “Pedra ume caá”, síndrome metabólica, antioxidante, enzimas digestivas e hipertensão arterial.

ABSTRACT

Galeno D.M.L. Effects of *Eugenia punicifolia* (Khunt) DC related to metabolic syndrome in experimental models . Manaus, 2014. 133p. Thesis (Ph.D.) - Graduate Program Multi - Institutional Biotechnology, Federal University of Amazonas.

The *Eugenia punicifolia* species is a plant popularly known as "pedra-ume-cao", widely distributed in the Amazon region. In the state of Amazonas, this species has been widely used in folk medicine to treat inflammatory and hyperglycemic disorders. However, studies involving other parameters found in the metabolic syndrome (MS) have not yet been elucidated. The MS is characterized by a complex disorder, represented by a number of cardiovascular risk factors involving central adiposity, hypertension, endothelial dysfunction and insulin resistance. Studies have shown that nutritional supplementation with plants that effectively address the pathogenic mechanisms of this syndrome represents an effective improvement for the problem. This project aim was to analyze biological activities *in vitro* and *in vivo* of the aqueous extract of the leaves of *E. punicifolia* (EEP), emphasizing the inhibitory activity digestive enzymes, angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitor, antioxidants, hypolipemiant, cytotoxic and anti antihypertensive effects. Enzyme inhibition assays, as well as the determination of the ACE activity in Wistar rats serum were performed by the fluorometric method and the indirect tests of cell viability, antioxidants, determining the presence of flavonoids and phenolic compounds were performed by colorimetric assays. The evaluation of the EEP on blood pressure parameters was performed by using five experimental groups, which were randomly divided into: normotensive group (2R), the hypertensive group (2R1C), enalapril hypertensive group (ENAL), extract hypertensive group 150 mg/kg/day (EEP150) and extract hypertensive group 300 mg/kg/dia (EEP300). The effects of EEP in systolic pressure were acquired indirectly by tail plethysmography in conscious rats. Biochemical parameters were measured in rat's plasma through appropriate kits. The study has shown, for the first time, that EEP exhibited scavenging activity on ABTS⁺, DPPH[•], and O₂^{•-} (IC₅₀=10.5 ± 1.2; 28.84 ± 0.54 and 38.12 ± 2.6 µg/mL, respectively). The EEP also exhibited cellular antioxidant activity *in vitro* concentration-dependent manner, and did not show cell cytotoxic effects. Furthermore, the EEP inhibited ACE activity (70.8%) using the concentration of 0.3 mg/mL (IC₅₀ of 24.3 ± 0.7 mg/mL), and inhibited the activities of the enzymes α-amylase (IC₅₀ = 122.8 ± 6.3 mg/mL), α-glucosidase (IC₅₀ = 2.9 ± 0.1 mg/mL) and xanthine oxidase (IC₅₀ = 23.5 ± 2.6 mg/mL). Both the EEP150 (21.7%) and the EEP300 (16.8%) reduced systolic blood pressure. The hypotensive effect of EEP correlated with the reduction of plasma ACE activity and also reduced total cholesterol (48%), triglycerides (52%), VLDL (52%) and LDL (55%). In addition, the EEP wasn't cause renal, hepatic or neurotoxic acute or chronic toxicity. The EEP showed antioxidants, hypotensive, hypolipidemic effects and digestive enzymes and ACE were inhibited. These activities are probably related to the presence of antioxidant such as phenols and flavonoids compounds present in the extract, which act by inhibiting key enzymes of carbohydrate metabolism and angiotensin converting enzyme. These findings may support further clinical studies to further evaluate the potential of EEP on the SM.

Keywords: "pedra ume caá", metabolic syndrome, antioxidant, digestive enzymes and hypertension.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Taxas de mortalidade por doenças cardiovasculares (DCV's) e suas diferentes causas no Brasil.....	25
Figura 2: Representação esquemática da estrutura primária da ECA somática.....	28
Figura 3- Vias de síntese e metabolismo das angiotensinas.....	31
Figura 4- Ramo e planta da <i>Eugenia punicifolia</i> (Kunth) DC.....	51
Figura 5- Delineamento experimental.....	55
Figura 6- Atividade antioxidante do EEP medida pelo ensaio de DCF	77
Figura 7- Citotoxicidade do EEP em células 3T3-L1.....	78
Figura 8- Inibição da α -amilase, α -glucosidase and xantina oxidase.....	79
Figura 9: Percentagem da Inibição da enzima conversora de angiotensina (ECA) pelo extrato de <i>E.punicifolia</i> (A) e pelo captopril (B).....	83
Figura 10- Diferença da pressão sistólica (PS) entre os grupos normotensos (2R) e hipertensos induzidos (2R1C).....	88
Figura 11: Evolução da pressão arterial sistólica (PS) entre os grupos.....	89
Figura 12: Valores de Fluorescência relativa entre os grupos.....	92

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Critérios para a definição da Síndrome Metabólica.....	21
Tabela 2- Espécies vegetais do gênero <i>Eugenia</i> com potencial terapêutico relacionado à SM.....	48
Tabela 3- Outras Espécies vegetais com potencial terapêutico relacionado à SM.....	48
Tabela 4- Atividade sequestrante de radicais livres pelo EEP expressa pelos valores da CI_{50}	74
Tabela 5- Variável antropométrica e consumo dos animais durante o teste de toxicidade aguda.....	86
Tabela 6: Parâmetros toxicológicos hepáticos e renais após a administração do EEP...	87
Tabela 7: Variáveis bioquímicas entre os grupos hipertensos e normotensos	95

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

2R1C	Dois-rins, um clipe
ABTS ⁺⁺	Ácido 2,2'-azinobis-3-etilbenzotiazolino-6-sulfônico
ACh	Acetilcolina
AGL	Ácidos graxos livres
AI	Angiotensina I
AII	Angiotensina II
ALT	Alanina aminotransferase
ANOVA	Análise de variância
ANP	Peptídeo natriurético natural
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AST	Aspartato aminotransferase
AT ₁	Receptores da angiotensina 1
AT ₂	Receptores da angiotensina 2
BK	Bradicinina
C-t	Colesterol total
Ca ⁺⁺	Cálcio
CCK	Colecistoquinina
CE	Catequina
CI ₅₀	Concentração inibitória de 50%
CO ₂	Gás carbônico
COX	Ciclooxigenase
DAG	Diacilglicerol
DCF	Diclorofluoresceína
DCFH-DA	Diacetato de 2'7'-diclorofluoresceína
DCV's	Doenças cardiovasculares
DL ₅₀	Dose letal capaz de matar 50%
DM	Diabetes Mellitus
DMSO	Dimetil sulfóxido
DNA	Ácido desoxorribonucléico
DPPH [·]	2,2- difenil-1-picrilhidrazila

ECA	Enzima conversora de angiotensina
ECA 2	Enzima conversora de angiotensina II
EDHF	Fator de hiperpolarização derivado do endotélio
EEP	Extrato aquoso das folhas da <i>E. puniceifolia</i>
ERNs	Espécies reativas de nitrogênio
EROS	Espécies reativas de oxigênio
FC	Frequência cardíaca
EDRF	Fator de relaxamento derivado do endotélio
HIP-HIS-LEU	Hipuril-L-histidina-L-leucina
HIS-LEU	L-histidina-L-leucina
GAE	Equivalente de ácido gálico
GMPc	Monofosfato cíclico de guanosina
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
HAS	Hipertensão arterial sistêmica
HDL	Lipoproteína de alta densidade
HMG-CoA	3-hidroxi-3-metil-glutaril-coenzima A redutase
IECA's	Inibidores da enzima conversora de angiotensina
IL-1	Interleucina 1
IL-6	Interleucina 6
IMC	Índice de massa corpórea
IMCL	Lipídeos intramiocelulares
IP3	1-4-5-trifosfato de inositol
IRS	Receptores de insulina
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
LOX	Lipooxigenase
NADPH	Fosfato de dinucleotídeo de nicotinamida e adenina
NBT	Azul de nitrotetrazólio
NEP	Endopeptidase neutra
NCEP-ATP III	Programa de Educação Nacional do Colesterol
NO [·]	Óxido nítrico
O ₂ ^{·-}	Ânion superóxido
O ₂	Oxigênio

OCL ⁻	Ânion hipoclorito
OH ⁻	Radical hidroxila
OMS	Organização Mundial da Saúde
ONOO ⁻	Peroxinitrito
PA	Pressão arterial
PEP	Prolil-endoropeptidase
PCP	Prolilcarboxipeptidase
OS	Pressão sistólica
PO ₂	Pressão parcial de oxigênio
PCO ₂	Pressão parcial de dióxido de carbono
PGI ₂	Prostaciclina
PKC	Proteína quinase C
PMS	Fenazina metassulfato
PNP	p-nitrofenilpalmitato
QE	Equivalente de quercetina
RI	Resistência insulínica
RVP	Resistência vascular periférica
SM	Síndrome metabólica
SNC	Sistema nervoso central
SNA	Sistema nervoso autônomo
SOD	Superóxido dismutase
SRA	Sistema renina angiotensina
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
XO	Xantina-oxidase

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 OBJETIVOS	19
2.1 Objetivo Geral.....	19
2.2 Objetivos Específicos.....	19
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	20
3.1 Aspectos Gerais da Síndrome metabólica (SM).....	20
3.2 Fisiopatogenia da Síndrome metabólica	24
3.2.1 Hipertensão arterial	24
3.2.2 Diabetes Mellitus	36
3.2.3 Obesidade.....	40
3.2.4 Estresse oxidativo.....	44
3.3 Plantas medicinais usadas no tratamento da SM.....	46
3.4 <i>Eugenia punicifolia</i> (Kunth) DC.....	50
4 MATERIAIS E MÉTODOS	54
4.1 Matéria prima-vegetal	54
4.2 Preparo do extrato seco de <i>Eugenia punicifolia</i>	54
4.3 Delimitação experimental.....	55
4.4 Experimentos <i>in vitro</i>	56
4.4.1 Determinação do teor de compostos fenólicos totais.....	56
4.4.2 O ensaio de teor total de flavonoides	56
4.4.3 Ensaio antioxidantes químicos.....	57
4.4.3.1 Atividade de varredura do radical ABTS ⁺ (ácido 2,2'-azino-bis-3- etilbenzotiazolino-6-sulfônico).....	57
4.4.3.2 Atividade sequestradora do radical DPPH [·] (2,2- difenil-1-picrilhidrazila).....	58
4.4.3.3 Atividade de sequestradora do ânion radical superóxido(O ₂ ⁻).....	59
4.4.3.4 Análise do sequestro do Óxido nítrico (NO [·]) <i>in vitro</i>	60
4.5 Cultura de Células.....	61
4.5.1 Atividade antioxidante celular	61
4.5.2. Ensaio de viabilidade celular	62
4.6 Testes de inibição enzimática	63
4.6.1 Teste de inibição da α -amilase salivar.....	63
4.6.2 Teste de inibição de α -glucosidase	64
4.6.3 Teste de inibição da lipase.....	65
4.6.4 Teste de inibição de xantina oxidase.....	65
4.6.5 Teste de inibição da enzima conversora de angiotensina (ECA).....	66
4.7 Experimentos <i>in vivo</i>	67
4.7.1 Animais de experimentação	67
4.7.2 Avaliação da toxicidade aguda do EEP.....	67
4.7.3 Indução da hipertensão renovascular em ratos e tratamento farmacológico	68
4.7.4 Determinação da pressão arterial sistólica de ratos Wistars.....	70
4.7.5 Quantificação da atividade da enzima conversora de angiotensina (ECA) no plasma de ratos normotensos e hipertensos renais	71
4.7.6 Análise bioquímica plasmática.....	71
4.8 Análise Estatística.....	72

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	73
5.1 Resultados dos ensaios <i>in vitro</i>	73
5.2 Resultados dos ensaios <i>in vivo</i>	85
6 CONCLUSÃO	99
7 REFERÊNCIAS	100
ANEXO	133
Anexo A-Aprovação do comitê de ética.....	133
Anexo B-Artigo.....	134

1 INTRODUÇÃO

A síndrome metabólica (SM) é caracterizada pela agregação de fatores de risco cardiovascular como obesidade, dislipidemia, resistência insulínica (RI) e hipertensão arterial (HA), que juntos representam um aumento da mortalidade estimada em 2,5 vezes (I DIRETRIZ BRASILEIRA DE DIAGNÓSTICO E TRATAMENTO DA SÍNDROME METABÓLICA, 2005; PIMENTA *et al.*, 2013).

No Brasil, no ano de 2009, aproximadamente 300 mil pessoas morreram de doenças cardiovasculares (DCV's), que têm sido agravadas por distúrbios metabólicos, como agravante (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2011). Sendo assim, a SM representa um grave problema de saúde pública, principalmente, porque investigações constataram que a prevalência da doença vem se elevando nas populações mais jovens, o que aumenta ainda mais a preocupação social (SALAROLI *et al.*, 2007). Com base nas diretrizes do Programa de educação nacional do colesterol (NCEP-ATP III), um pouco mais de um terço dos adultos nos Estados Unidos são portadores da SM (NCEP-ATP III, 2001).

O diagnóstico da doença pode ser feito através da presença de três ou mais destes cinco critérios: glicemia de jejum elevada (glicemia >100 mg/dL ou diabetes), pressão arterial (PA) aumentada (sistólica >130 mmHg e/ou diastólica >85 mmHg), circunferência da cintura (>88 cm na mulher e >102 cm no homem), triglicérides aumentados (>150 mg/dL) e HDL diminuído (<40 mg/dL em homens e <50 mg/dL em mulheres) (NCEP-ATP III, 2001; TIBANA; PRESTES, 2013).

Dados da vigilância de fatores de risco e proteção para doenças crônicas indicaram que 22,7% da população adulta brasileira apresentou pelo menos um desses critérios e 14,2% dois ou mais, que contribuem de forma significativa com o aumento da prevalência da SM

(FORD; GILES; DIETZ, 2002) e com o risco aumentado de probabilidade de morte, tanto pelas DCV's, cerebrovasculares e diabetes associadas (KASSI *et al.*, 2011).

Outros fatores de risco cardiovasculares como estresse oxidativo, estilo de vida inadequado (tabagismo, sedentarismo, dieta hipercalórica/hiper-gordurosa) e herança genética (diabetes, coronariopatia e dislipidemia) também estão associados ao desenvolvimento da SM. Dentre esses, o estresse oxidativo parece exercer papel relevante na patogênese da SM e da HA (UNGER; PATIL, 2009).

A produção exagerada de ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$) pela parede vascular tem sido observada em diferentes modelos de hipertensão, em especial na hipertensão renal. Evidências apontam que o excesso do $O_2^{\cdot-}$ possa contar com a diminuição da disponibilidade de óxido nítrico (NO^{\cdot}) e, conseqüentemente, disfunção endotelial, contribuindo para a evolução da hipertensão e DCV's associadas (FERREIRA *et al.*, 2011).

Callera, Varanda e Bendhack (2000), observaram que em modelos de hipertensão arterial em ratos, o relaxamento de vasos dependente do endotélio encontrava-se reduzido. Evidências apontam que o desequilíbrio da produção e a liberação de fatores contráteis e relaxantes derivados do endotélio vascular estão associados ao desencadeamento da hipertensão arterial sistêmica (HAS). Na HA existe um predomínio de fatores contráteis que induzem o aumento da resistência vascular periférica (RVP), hipertrofia e hiperplasia da parede vascular (BATLOUNI, 2001).

Também tem sido demonstrado que o aumento da angiotensina II (AII) presente em pacientes hipertensos compromete a sinalização à insulina e induz a RI. Tal aumento resulta em hiperatividade do fosfato de dinucleotídeo de nicotinamida e adenina (NADPH) oxidase endotelial, sistema enzimático gerador de espécies reativas (CAI *et al.*, 2004). O aumento da AII também incrementa a produção de endotelina, um peptídeo envolvido na constrição dos vasos sanguíneos, e que culmina no aumento da PA.

Assim sendo, a disfunção endotelial é uma manifestação importante presente na SM que está associada ao estresse oxidativo (FERREIRA *et al.*, 2011). Pacientes com hipertensão arterial estão mais expostos à lesão vascular, em função da elevada atividade do sistema renina-angiotensina (SRA). Assim, uma estratégia eficiente no controle da hipertensão é o uso de inibidores da enzima conversora de angiotensina (IECA's), anti-hipertensivos que inibem a AII e, conseqüentemente, seus efeitos deletérios (COGOLLUDO, VIZCAÍNO, TAMARGO, 2005; IANZER *et al.*, 2007).

Em decorrência desses achados, nas últimas décadas, tem havido interesse crescente na busca por fármacos alternativos que amenizem os efeitos da AII no desenvolvimento da HA e, conseqüentemente, da SM, pois em sua maioria, são eficazes, de baixo custo, possuindo uma grande importância para a saúde pública (GASPAROTTO JUNIOR, 2010). O Governo Federal tem incentivado a utilização de plantas medicinais para o tratamento de doenças, e recentemente, foi publicada uma lista de fitoterápicos que foram disponibilizados pelo Sistema Único de Saúde (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2012).

No Brasil, o uso de produtos naturais como terapia alternativa é bastante difundido, pois uma grande parte da população não tem acesso à assistência médica e o elevado custo dos medicamentos tornam esses produtos inacessíveis para a população dos países de terceiro mundo (LEAL-CARDOSO *et al.*, 2004). Parente e Rosa (2001) relataram que além da carência de recursos dos órgãos públicos de saúde e o aumento no preço dos medicamentos alopáticos, os efeitos colaterais apresentados por alguns destes medicamentos são fatores que também aumentam o interesse e a busca pela medicina tradicional.

A Organização Mundial da Saúde (OMS) acredita que a prática do uso de plantas medicinais é tida como a principal opção terapêutica de aproximadamente 80% da população mundial (WHO, 2003). O aumento do consumo de fitoterápicos pode estar associado ao fato de que as populações estão questionando os perigos do uso abusivo e irracional de produtos

farmacêuticos, e procuram substituí-los por plantas medicinais (TOMAZZONI; NEGRELLE; CENTA, 2006). LIMA-LANDMAN *et al.*, (2007) afirmam que a utilização de extratos de plantas apresenta grande relevância terapêutica, uma vez que a pesquisa de produtos naturais tem sido o auge de grandes descobertas de fármacos potenciais.

Dentre as espécies de plantas que vem despertando interesse científico, destaca-se a *Eugenia punicifolia*, pertencente à família Myrtaceae, que se distribui geograficamente por quase toda a região amazônica do Brasil, Paraguai e Venezuela (SOUZA; MORIM, 2008). Dados acerca dessa espécie mostraram que ela vem sendo largamente utilizada como um agente terapêutico natural para o tratamento de distúrbios hiperglicêmicos, sendo por isso, denominada pela população de insulina vegetal (BRUNETTI *et al.*, 2006). Outrossim, em algumas comunidades da região Amazônica, a aplicação popular da *E. punicifolia* envolve o uso de suas folhas frescas para infusão e decocção, um processo que consiste na extração de óleos essenciais e as diversas substâncias orgânicas presentes na planta (BRITO *et al.*, 2007).

Dados de Grangeiro *et al.*, (2006) mostraram que o extrato aquoso de *E. punicifolia* apresentou efeitos pró-colinérgicos, por apresentar atividade inibitória da acetilcolinesterase. Foi visto que o extrato recuperou totalmente os efeitos de antagonistas competitivos nicotínicos na junção neuromuscular do diafragma de ratos. Desde então, investigações utilizando outros modelos experimentais e diferentes frações químicas do extrato da planta estão sendo realizadas, na tentativa de reconhecer a classe de compostos capazes de aumentar a neurotransmissão colinérgica.

Considerando que algumas propriedades da espécie ainda não foram esclarecidas e que o seu efeito hipoglicemiante (BRUNETTI *et al.*, 2006) corresponde a uma das bases clínicas para o tratamento da SM, é compreensível considerar a descrição de uma nova ferramenta natural com interesses voltados para a prevenção e/ou cura de condições associadas à SM. Essa pesquisa tende a contribuir com a síntese de um produto

biotecnológico de interesse comercial e colaborar com o uso sustentável da biodiversidade brasileira, fortalecimento da agricultura familiar, geração de emprego e renda, desenvolvimento industrial e tecnológico, auxiliando na ampliação do mercado de fitoterápicos. Para tanto, neste projeto foram investigadas as atividades biológicas *in vitro* e *in vivo* do extrato aquoso de *E. punicifolia*, enfatizando efeitos hipotensores, hipolipemiantes e antioxidantes, que até o momento, não existem na literatura. Esse estudo visa à triagem de novos potenciais fitoterápicos que atuem no controle e tratamento da SM.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

-Estudar as atividades do extrato aquoso das folhas de *E. punicifolia* em modelos experimentais *in vivo* e *in vitro* relacionados à síndrome metabólica.

2.2 Objetivos Específicos

- Avaliar o potencial antioxidante do extrato das folhas de *E. punicifolia*;
- Averiguar o efeito do extrato das folhas de *E. punicifolia* sobre a inibição de enzimas digestórias e sobre a enzima conversora de angiotensina;
- Verificar a toxicidade do extrato das folhas de *E. punicifolia* em modelos *in vivo* e *in vitro*;
- Determinar o efeito do extrato das folhas de *E.punicifolia* sobre a pressão arterial e sobre o perfil bioquímico de ratos com hipertensão renovascular;

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Aspectos Gerais da Síndrome Metabólica (SM)

A SM representa uma situação clínica, caracterizada pela presença de RI, obesidade abdominal, Diabetes Mellitus tipo II (DM2), elevação da PA e dislipidemia (MCNEILL *et al.*, 2005). Dados de prevalência da SM são muito preocupantes, uma vez que relatos apontam que 47 milhões de americanos são portadores da doença e que esta aumenta com a idade e com o índice de massa corpórea (IMC) (FORD *et al.*, 2002).

Pesquisas representativas no Brasil ainda são escassas, em virtude da ausência de um consenso na sua definição e nos pontos de corte dos seus componentes (NCEP-ATP III, 2001, TIBANA; PRESTES, 2013). No entanto, dados epidemiológicos quanto à prevalência da SM no Brasil têm sido descritos em diferentes grupos étnicos. Um estudo realizado na população de Vitória (Espírito Santo, Brasil) mostrou uma incidência geral de 25% com maior prevalência em homens com risco aumentado de hipertensão, hiperglicemia e hipertrigliceridemia, em mulheres com baixo nível sócio-econômico e na população mais idosa (SALAROLI *et al.*, 2007).

Pesquisas têm contribuído com o diagnóstico da doença, buscando sugerir uma classificação universal que, se adotada, facilitaria as comparações entre os estudos (TIBANA; PRESTES, 2013) (Tabela 1).

Tabela 1- Critérios para definição da Síndrome Metabólica.

	OMS, 1998	NCEP: ATP III, 2001	IDF, 2006
Diagnóstico de SM formado por	Resistência à insulina e presença de mais de 2 componentes	3 dos 5 componentes	Circunferência abdominal alterada e mais 2 componentes
Componentes			
	OMS, 1998	NCEP: ATP III, 2001	IDF, 2006
Resistência à insulina	TDG, GJA, DM tipo 2 ou sensibilidade à insulina diminuída		
Obesidade	Razão cintura-quadril >0,90 cm e /ou IMC >30kg/m ² e /ou Circunferência abdominal >97 cm	Circunferência abdominal: Homens ≥ 102 cm Mulheres ≥88 cm	Circunferência abdominal: Homens ≥ 94 cm Mulheres ≥80 cm
Lipídeos séricos (mg/dL) em jejum	TG ≥150 e/ou HDL < 35 (Homens) HDL <39 (Mulheres)	TG ≥150 e/ou HDL < 35 (Homens) HDL <39 (Mulheres)	TG ≥150 e/ou HDL < 35 (Homens) HDL <39 (Mulheres)
Pressão arterial (mmHg)	≥140/90	≥130/85 ou uso de anti-hipertensivos	≥130/85 ou de anti-hipertensivos
Glicose sérica (mg/dL) em jejum	TDG, GJA ou DM tipo II	>110	>100

OMS=Organização Mundial da Saúde; NCEP-ATP III = Programa de Educação Nacional do Colesterol Painel III do tratamento de adultos; IDF=Federação Internacional do Diabetes; TDG=Tolerância diminuída à glicose; GJA=Glicemia de jejum alterada; DM=Diabetes Mellitus; SM=Síndrome metabólica; TG = Triglicerídeos
Fonte: TIBANA; PRESTES, 2013.

Acerca desses critérios que definem a SM, Ervin (2009), mostrou que a obesidade abdominal (53%), a hipertensão (40%), e a hiperglicemia (39%) eram os fatores de risco mais frequentes, seguidos pela hipertrigliceridemia (31%) e o baixo HDL (25%). Outro estudo com 702 estudantes universitários de uma instituição pública de Fortaleza observou que cerca de 26% dos alunos estavam acima do peso, 3% eram hipertensos, 70% sedentários, 8% fumantes, 7% consumiam álcool, 12% tinham elevados níveis de glicose sanguínea, 23% níveis altos de triglicerídeos (TG), 10% elevado nível de colesterol total (C-t), 6% elevada

concentração sérica da lipoproteína de baixa densidade (LDL) e 12% baixos níveis da lipoproteína de alta densidade (HDL). Através dessa pesquisa, os autores constataram uma prevalência da SM de 1,7%, onde pelo menos 30% dos estudantes manifestavam pelo menos um desses componentes, 12% pelo menos dois (FREITAS *et al.*, 2012).

Pontes e Sousa (2009) mostraram que 37,5% de praticantes amadores de futebol se enquadravam nos critérios clínico-diagnósticos da SM. Os valores percentuais dos componentes mais prevalentes foram: obesidade abdominal (60%), hipertensão (41%), hipertrigliceridemia (34,4%) baixo HDL (28,1%) e aumento da glicemia (15,6%). Com base nesse achado, deve existir um consenso que, independente da supervisão e controle periodizado, a atividade física regular é salutar e pode ser um componente protetor para várias doenças crônicas não transmissíveis (MATSUDO *et al.*, 2002).

Picon *et al.*, (2006) concluíram que a DM2 estava intrinsecamente relacionada ao desenvolvimento da SM, pois dos 753 pacientes diabéticos entrevistados, 87% apresentavam outros critérios clínicos diagnósticos da SM. Segundo Lemieux *et al.*, (2000), pacientes com hiperinsulinemia, comumente apresentam a tríade lipídica representada por aumento de TG, LDL e redução de HDL. A presença de HA associada à obesidade na infância e na adolescência contribui três vezes mais com o desenvolvimento da SM (BRANDÃO *et al.*, 2000; FORD *et al.*, 2002). Em algumas populações sul-asiáticas, a RI e a hiperinsulinemia pós-prandial ocorre comumente em indivíduos com IMC acima de 25 kg/m² e, dessa forma, pode contribuir com o aumento da prevalência de DM2 e o desenvolvimento prematuro de DCV's e SM (ABBASI *et al.*, 2002).

Grundy *et al.*, (2005) afirmam que a elevação da glicose plasmática, presente em pacientes diabéticos, pode constituir o principal fator de risco independente para o desenvolvimento das DCV's, que se configura, principalmente, pela presença de distúrbios no metabolismo dos carboidratos e dos lipídeos. Tem sido descrito que a SM é uma doença

multifatorial, que depende de uma complexa interação entre a predisposição genética e fatores ligados ao estilo de vida (MINAME; CHACRA, 2005). Evidências científicas sugerem que o aumento da incidência da SM e as complicações cardiovasculares associadas provavelmente deveram-se às transições epidemiológicas que ocorreram na segunda metade do século XX e trouxeram muitas transformações nos padrões socioeconômicos e culturais da população (MENDONÇA; ANJOS, 2004). A mudança na composição demográfica com ênfase para a urbanização, o envelhecimento da população, alterações nos hábitos alimentares e um estilo de vida sedentário contribuíram significativamente para o incremento da prevalência e incidência da SM (MENSAH *et al.*, 2004).

A ATP III recomenda mudanças no estilo de vida, como o aumento da atividade física e a melhora dos padrões dietéticos, pois a perda de peso melhora o perfil lipídico, reduz a PA e a glicemia, além de melhorar a sensibilidade à insulina. Além desses fatores preventivos, o tratamento medicamentoso das variáveis presentes na SM deve ser considerado, quando não houver melhora no perfil clínico do paciente pelas medidas preventivas supracitadas (SAE-TAN; GROVE; LAMBERT, 2011).

Até o momento, não existe uma droga única recomendada para o tratamento da SM. Duas classes de drogas têm sido prescritas para o tratamento dos principais sintomas da doença, os inibidores da 3-hidroxi-3-metil-glutaril-coenzima A redutase (HMG-CoA) (Rosuvastatina) e os inibidores da ECA. O uso desses fármacos no tratamento da dislipidemia aterogênica e na HA reduzem o risco de eventos cardiovasculares em pacientes com SM (OLTMAN *et al.*, 2008).

Na SM, principalmente nos pacientes com alto risco cardiovascular, os fibratos também têm o seu espaço, principalmente na dislipidemia, na inflamação, na resistência insulínica e nos estados protrombóticos (GRUNDY *et al.*, 2005; SBEM, 2006). Os fibratos reduzem o fluxo de ácidos graxos para o fígado, diminuem a síntese hepática da lipoproteína

de muita baixa densidade (VLDL), estimulam a atividade da lipase lipoprotéica e aumentam a excreção biliar do colesterol hepático (STAELS *et al.*, 1998).

Dessa maneira, mudanças no estilo de vida com a adoção de hábitos saudáveis, dieta equilibrada, prática regular de atividade física, juntamente com a terapia farmacológica convencional são medidas eficazes que auxiliam na prevenção da SM (BURKE *et al.*, 2001; MENSAH *et al.*, 2004). No entanto, além dos medicamentos sintéticos, a medicina tradicional também pode corroborar com o tratamento da doença, principalmente devido à notável biodiversidade brasileira de produtos vegetais. Assim, a utilização de plantas medicinais ou suas partes podem modular a absorção dietética e o metabolismo, promover uma maior utilização da glicose, reduzir a lipogênese, aumentar a resposta vascular e promover efeitos antioxidantes relacionados à SM (SAE-TAN; GROVE; LAMBERT, 2011).

Muitos modelos *in vivo* têm sido estudados a fim de desenvolver fármacos naturais com propriedades de prevenir os fatores de risco relacionados à SM. Um desses modelos é o da indução da hipertensão arterial renovascular, pois como já foi discutido, é um modelo que representa algumas alterações encontradas na SM, como hipertensão, estresse oxidativo e RI. Diante desse modelo experimental, este estudo buscará novas alternativas para prevenir e tratar a SM, a partir de um extrato foliar aquoso de *E. puniceifolia* agregando valor à flora da região Amazônica.

3.2 Fisiopatogenia da Síndrome metabólica

3.2.1 Hipertensão arterial

A hipertensão arterial sistêmica (HAS) é uma condição clínica multifatorial caracterizada por níveis elevados e sustentados de PA > 140/90 mmHg (VI DIRETRIZES BRASILEIRAS DE HIPERTENSÃO, 2010). A PA consiste na força que o sangue exerce contra a parede das artérias ao ser bombeado pelo ventrículo esquerdo, de forma a assegurar a todos os órgãos, uma pressão de perfusão constante e permitir que cada órgão regule seu

próprio fluxo sanguíneo, conforme as suas necessidades (JOYNER; CHARKOUDIAN; WALLIN, 2010).

De acordo com estudos populacionais, a prevalência da HAS no Brasil varia de 25% a 41%, sendo mais prevalente em mulheres, especialmente após a menopausa, em virtude da redução dos níveis de estrógeno que atuam na diminuição da lipogênese (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006; TURHAN *et al.*, 2014). A hipertensão arterial é considerada um dos maiores agravos à saúde no Brasil, e as DCV's estão entre as principais causas de morte em adultos (VI DIRETRIZES BRASILEIRAS DE HIPERTENSÃO, 2010). As DCV's são responsáveis por mais de 308 mil óbitos por ano e a HAS participa de quase a metade delas (Figura 1) (PATEL *et al.*, 2007).

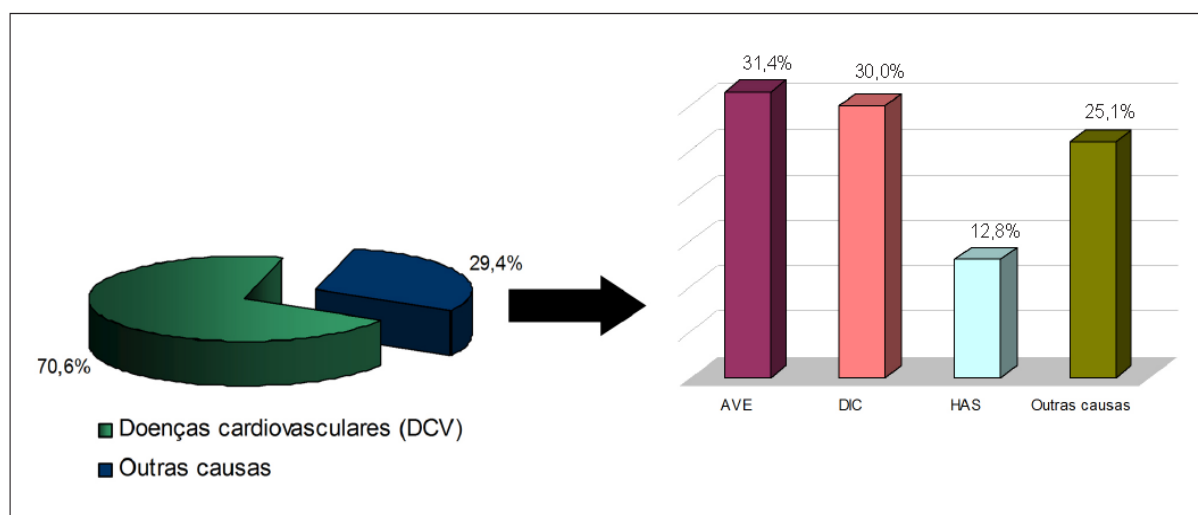


Figura 1- Taxas de mortalidade por doenças cardiovasculares (DCV's) e suas diferentes causas no Brasil. AVE- Acidente Vascular Encefálico; DIC - Doença Isquêmica do Coração; HAS - Hipertensão Arterial Sistêmica. FONTE: Patel *et al.*, 2007.

No Brasil, as DCV's apresentam um cenário preocupante, não só pela elevada taxa de morbimortalidade, mas, principalmente, por elas estarem afetando de forma importante a faixa etária mais jovem (LOTUFO, 1998). A HAS associa-se frequentemente a alterações funcionais e/ou estruturais de órgãos-alvo (coração, encéfalo, rins e vasos sanguíneos) e alterações metabólicas, com conseqüente aumento do risco de eventos cardiovasculares fatais e não fatais (PARK *et al.*, 2007). Indivíduos hipertensos frequentemente apresentam outras

comorbidades associadas, como níveis elevados de C-t, frequência cardíaca (FC), hipertrigliceridemia e Diabetes Mellitus (MARTE; SANTOS, 2007).

A fisiopatogenia da HAS é complexa e envolve a participação de várias moléculas, tecidos e órgãos. Dois mecanismos estão envolvidos no controle dos níveis pressóricos: a regulação neural, que é feita primariamente pelo sistema nervoso autônomo (SNA), por meio dos barorreceptores e quimiorreceptores, e a regulação humoral, que é feita por uma variedade de substâncias liberadas pelas células endoteliais e justaglomerulares renais (MEHTA; GRIENGLING, 2007).

Os barorreceptores, encontrados no arco aórtico e seio carotídeo, são terminações mecanorreceptoras que respondem à deformação ou estiramento das paredes dos vasos onde estão localizados. Eles são os mediadores primários do SNA no controle da PA e da FC (MEHTA; GRIENGLING, 2007). As aferências barorreceptoras são integradas no núcleo do trato solitário, onde normalmente são efetuadas as respostas reflexas de inibição da descarga simpática e intensificação da resposta vagal, em resposta ao aumento da PA. A queda na pressão arterial, por outro lado, produz o efeito oposto na ativação do barorreflexo (ZANUTTO; VALENTINUZZI; SEGURA, 2010).

Os quimiorreceptores, localizados na artéria aorta e carótida, respondem a estímulos químicos que envolvem alterações na pressão parcial de oxigênio (PO_2), pressão parcial de dióxido de carbono (PCO_2) e pH, sendo extremamente importantes nos estados de anóxia e/ou hipóxia, como a que ocorre durante uma isquemia cerebral. Nesse caso, o mecanismo de controle da PA é ativado quando o fluxo sanguíneo no cérebro se tornar insuficiente (MEHTA; GRIENGLING, 2007).

Os quimiorreceptores, estimulados pelo aumento da concentração de gás carbônico (CO_2) e pela diminuição da concentração de oxigênio (O_2) no sangue permitem modificações na pressão sanguínea, a fim de restabelecer o fluxo sanguíneo normal para a região isquêmica,

ou ainda, elevar as concentrações de O₂ no sangue e disponibilizá-lo para os tecidos (FERNANDES *et al.*, 2005).

O controle humoral feito pelas células justaglomerulares presentes nos rins ocorre da seguinte forma: quando as células justaglomerulares da arteríola aferente renal detectam uma queda pressórica, ocorre a liberação de renina (enzima glicoproteica) na corrente sanguínea. Esta enzima atua sobre uma α - globulina plasmática, o angiotensinogênio, formando a angiotensina I (AI), um decapeptídeo de ação inativa. A AI, por sua vez, é convertida em AII, um potente vasoconstrictor, sendo que essa conversão ocorre quase que totalmente nos pequenos vasos dos pulmões, catalisada pela enzima conversora de angiotensina (ECA) (CHIU *et al.*, 1989; MEHTA; GRIENGLING, 2007).

A ECA é uma enzima chave na regulação da função cardiovascular, responsável principalmente, pelo controle da PA. A ECA somática é uma glicoproteína monomérica distribuída em muitos tecidos, como células endoteliais, epiteliais, neuroepiteliais e fluídos biológicos (WEI *et al.*, 1991). Foi originalmente isolada a partir do sangue do cavalo em 1956 e a partir de então, chamada de enzima conversora da hipertensão (SKEGGS; KAHN; SHUMWAY, 1956).

É composta por dois sítios homólogos e funcionalmente ativos: o sítio-N (extremidade amino-terminal) e o sítio-C (extremidade carboxi-terminal) (WEI *et al.*, 1991). O sítio C-terminal possui dois domínios, o domínio citoplasmático hidrofílico e o transmembranar, que é hidrofóbico e ancora a proteína de membrana (Figura 2). Ambos os sítios N e C da ECA somática possuem domínios similares, onde cada um é constituído por uma sequência ativa de aminoácidos (RIORDAN, 2003).

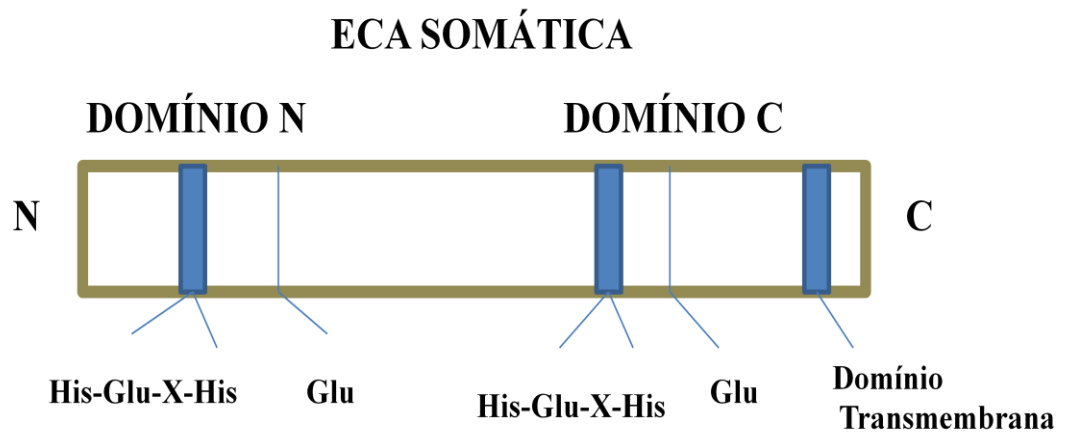


Figura 2: Representação esquemática da estrutura primária da ECA somática. Histidina-Glutamina-X-Histidina (His-Glu-X-His).

Fonte modificada: RIORDAN, 2003.

In vitro, os dois sítios homólogos ativos da ECA, apresentam alta eficiência em converter AI em AII e inativar a bradicinina (BK), um peptídeo vasodilatador (JASPARD; WEI; ALHENC-GELAS, 1993). Fernandez, Neshich e Camargo (2004), considera que o domínio C é primariamente envolvido na regulação da pressão sanguínea, ou seja, na conversão de AI em AII, enquanto a extremidade N-terminal, preferencialmente cliva a BK em outros peptídeos. É provável que um inibidor específico para um ou outro sítio possa ter vantagens especiais (RIORDAN, 2003).

Ondetti e Cushman (1981) comprovaram que substâncias que apresentam potencial de inibir a ECA, e, conseqüentemente, bloqueiam eficientemente a cascata de ativação do SRA, reduzem a formação da AII, de forma a regular os desequilíbrios relacionados à PA. O SRA regula o tônus vascular, o volume dos fluídos corporais, o balanço eletrolítico e a secreção hormonal via ativação da AII (WANG *et al.*, 2007). Esta estimula a liberação de aldosterona pela medula adrenal, promovendo o aumento da absorção de sódio e água, promove efeitos vasoconstritores diretos que levam ao aumento da resistência vascular periférica (RVP) e, conseqüentemente, induzem ao aumento da PA. O aumento da RVP na

fase aguda deve estar associado a fatores neuro-humorais, enquanto na fase crônica existe um reforço produzido pelas alterações estruturais dos vasos (CASTROP *et al.*, 2010).

A ação crônica da AII provoca o aumento do volume de líquido circulante e do débito cardíaco, promovendo hiperatividade simpática, hiperplasia e hipertrofia vascular, bem como, síntese aumentada de endotelina (DIAS *et al.*, 1999). Várias evidências se somam e fortalecem a importância do aumento da atividade simpática, induzida pela AII, na patogênese da hipertensão arterial. As catecolaminas liberadas pelos nervos simpáticos, além de aumentarem o tônus dos vasos de resistência nas fases iniciais da hipertensão, seriam também estimuladoras de mecanismos tróficos nos vasos, os quais manteriam a hipertensão por indução de hipertrofia vascular (GRASSI; MANCIA, 2004).

Estudos de hipertensão arterial em modelos animais tem mostrado a importância da ativação do sistema nervoso simpático na HAS associada à obesidade e a hiperinsulinemia (RHAMOUNI; HAYNES, 2002). O excesso de insulina na corrente sanguínea promove uma hiperatividade simpática, levando à vasoconstrição e aumento do débito cardíaco, com consequente elevação da PA. Cumpre resaltar que o excesso de insulina também causa proliferação da musculatura lisa da parede arterial (HALL *et al.*, 1994).

Dessa forma, AII é o principal peptídeo efetor na vasculatura, cujos efeitos são mediados por duas isoformas de receptores, o AT₁ e o AT₂ (GONZALEZ *et al.*, 2005). A ligação da AII com os receptores AT₁, presentes na musculatura lisa vascular, ativa a proteína G estimulatória, com consequente ativação da enzima fosfolipase C e formação de inositol 1-4-5-trifosfato de inositol (IP3) e diacilglicerol (DAG), que induzem o aumento da concentração intracelular de cálcio e ativação da proteína quinase C (PKC), promovendo vasoconstrição e, conseqüentemente, elevação da PA (CHIU *et al.*, 1989; COGOLLUDO; VIZCAÍNO; TAMARGO, 2005).

Assim, a ativação do receptor AT_1 pode mediar à vasoconstricção vascular, além de proliferação de células musculares lisas vasculares, facilitação simpática e liberação de aldosterona pelo córtex da glândula adrenal. A secreção de aldosterona aumenta a expressão protéica dos canais de sódio no epitélio dos túbulos e ductos coletores, além de aumentar a atividade das bombas $Na^+/K^+/ATPase$, propiciando um importante aumento na reabsorção de água e eletrólitos nos túbulos renais (FERRARIO, 2010).

O receptor AT_2 , de maneira geral, apresenta efeito antagônico ao da ativação do receptor AT_1 . Alguns autores consideram que o receptor AT_2 atenua a ação pressora da AII e medeia a vasodilatação por meio da ativação dos receptores B2 da bradicinina, um importante peptídeo endógeno vasodilatador que atua no relaxamento dos vasos de resistência (FERRARIO, 2010; LEMARIE; SCHIFFRIN, 2010).

Atualmente, sabe-se que o SRA envolve outros peptídeos e enzimas, como a angiotensina III, angiotensina IV e a angiotensina-(1-7), que são peptídeos biologicamente ativos originados do angiotensinogênio. A angiotensina-(1-7) exerce um papel de contrabalanço do sistema em relação à AII (SANTOS, 2003), sendo de grande interesse na fisiologia cardiovascular. As vias de inter-relação entre estes peptídeos se dão a partir de uma série de peptidases. A angiotensina-(1-7) é formada a partir da AI pela endopeptidase neutra (NEP) ou prolil-endopeptidase (PEP), ou a partir da AII via PEP, prolilcarboxipeptidase (PCP) ou pela enzima conversora de angiotensina II (ECA2), que é que é homóloga a ECA em humanos, ratos e camundongos (SIMÕES; SILVA *et al*, 2004) (Figura 3).

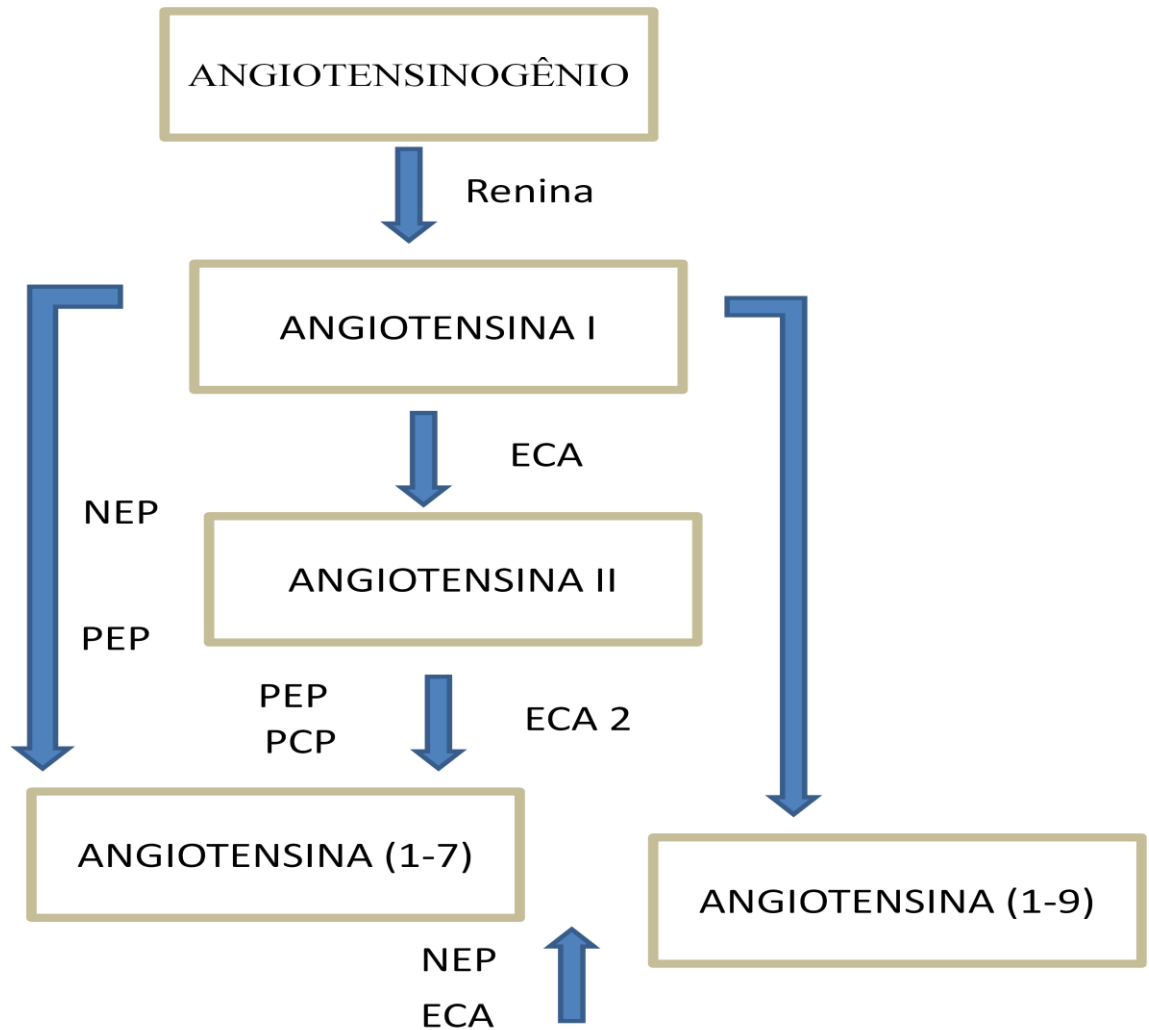


Figura 3: Vias de síntese e metabolismo das angiotensinas. ECA: Enzima conversora de angiotensina; ECA 2: Enzima conversora de angiotensina 2; NEP:Endopeptidase neutra; PEP:Prolil-endopeptidase; PCP:Prolil-carboxipeptidase.

Fonte modificada: MIRANDA, 2006.

Além desses peptídeos e enzimas que participam dos mecanismos de controle da HA, outros sistemas hormonais também são relevantes. O peptídeo natriurético atrial (ANP), o sistema caliceína-cinina e os mediadores endoteliais. O ANP é produzido principalmente no átrio cardíaco de adultos normais, em resposta ao estiramento da parede arterial, e tem propriedade de reduzir a PA em decorrência de uma vasodilatação e da regulação do volume intravascular. Tem sido demonstrado que o ANP pode contribuir com a redução da PA por meio da inibição da atividade da renina plasmática, da redução da concentração de

aldosterona e da liberação de endotelina. Igualmente, este peptídeo também aumenta a taxa de filtração glomerular, a natriurese e a diurese (KUWAHARA; NAKAO, 2010).

Além desses sistemas, células endoteliais também desempenham relevante papel no controle do tônus cardiovascular, regulando a vasomotricidade e a permeabilidade vascular. Estudos mostraram que células do endotélio vascular eram capazes de sintetizar várias substâncias vasoativas, a exemplo do NO[•], que desempenha um papel de grande importância na homeostasia cardiovascular, tanto no controle da RVP, como na agregação plaquetária, uma vez que o NO[•], sendo uma potente substância vasodilatadora, inibe a agregação plaquetária e impede a formação de trombos (FURCHGOTT; ZAWASKI 1980; VANHOUTTE, 2003).

Os mecanismos envolvidos na disfunção endotelial dependem do tipo e da duração da HAS, bem como, da diminuição do fator de relaxamento derivado do endotélio (EDRF) como o NO[•], fator de hiperpolarização derivado do endotélio (EDHF) e prostaciclina (PGI₂). A liberação dos mediadores vasodilatadores a partir do endotélio pode ser estimulada por substâncias endógenas, como a BK, acetilcolina (ACh), adenosina difosfato, substância P, serotonina ou ainda por estímulos mecânicos, como o estresse de cisalhamento (“*shear stress*”), decorrente do aumento da pressão de pulso (VANHOUTTE, 2003).

A maior parte dos efeitos deletérios causados pelo desequilíbrio de substâncias liberadas pelo endotélio vascular tem sido atribuída às propriedades da AII, pois existem evidências clínicas e laboratoriais que sugerem que a HA, *per se*, pode conferir um estado pró-trombótico ou de hipercoagulabilidade, além de ser considerada a maior mediadora do remodelamento vascular. O aumento dos níveis plasmáticos de AII estimula a geração de espécies reativas de oxigênio (EROS), como O₂^{•-} e o peróxido de hidrogênio (H₂O₂), que poderiam explicar a ocorrência de eventos trombogênicos em pacientes hipertensos (LIP, 2000).

Assim sendo, o endotélio apresenta um papel central na manutenção do tônus vascular e da pressão arterial sistêmica, influenciando diretamente a função cardiovascular (ENDEMANN; SCHIFFRIN, 2004). É válido ressaltar que a AII não somente atua nos efeitos fisiológicos imediatos da vasoconstrição e regulação da PA, mas também está envolvida em outros processos como: efeitos pró-inflamatórios (FRANK; EGUCHI, 2003), metabólicos, que incluem a resistência à insulina (IZAWA *et al.*, 2005), produção (EROS) (TOUYZ, 2005), aterosclerose, insuficiência cardíaca congestiva (MEHTA; GRIENGLING, 2007), hipertrofia ventricular esquerda, com conseqüente formação de colágeno, liberação de vasopressina, vasoconstrição renal, contração de células mesangiais, aumento da atividade da bomba Na^+/H^+ proximal e distal dos túbulos renais e inibição da secreção de renina (COGOLLUDO; VIZCAÍNO; TAMARGO, 2005).

A geração de EROS também induz a expressão de genes pró-inflamatórios e a oxidação de partículas de LDL, que predispõem a eventos trombogênicos. Na hipertensão, esses mecanismos estão amplificados, o que aumenta a ativação das oxidases, com maior estresse oxidativo e maior suscetibilidade à aterogênese (MARTE; SANTOS, 2007).

Dentre os modelos que reproduzem a HA e o estresse oxidativo, o método proposto por Goldblatt *et al.*, (1934) que consiste na constrição de uma artéria renal enquanto o rim oposto permanece intacto (“dois-rins, um clipe-2R1C”) leva o estabelecimento da hipertensão. Este modelo é caracterizado por um rápido aumento da renina plasmática em resposta à redução da pressão na artéria renal e conseqüente aumento da AII circulante (KOLETSKY; PAVLICKO; RIVERA, 1971; WIESEL *et al.*, 1997).

Lupu *et al.*, (1972) observaram que à constrição parcial de uma artéria renal de cães, com o rim contralateral íntegro resultava em um aumento transitório da pressão arterial, que retornava aos níveis de normalidade em poucas semanas. Entretanto, reduções muito intensas (maiores que 50%) do fluxo renal unilateral podiam levar a estados hipertensivos mais

prolongados, sendo a severidade da hipertensão proporcional ao grau de obstrução da artéria renal.

A indução da clássica hipertensão renovascular de Goldblatt em ratos é bastante útil, pois cronicamente se assemelha a hipertensão humana devido à estenose unilateral da artéria renal (GOLDBLATT *et al.*, 1934). Esta estenose resulta em queda do fluxo sanguíneo renal e da fração de filtração glomerular (WIESEL *et al.*, 1997). Como resultado tem-se também o desenvolvimento de hipertrofia cardíaca e alterações no relaxamento vascular dependente do endotélio (BEIERWALTES *et al.*, 1995).

Geralmente, o aumento da pressão arterial se inicia poucos minutos após a redução do fluxo renal, atingindo um platô em 2 a 3 semanas. A constrição de apenas uma artéria renal resulta em hipertensão, independentemente da presença ou ausência do rim contralateral. Quando o rim contralateral ao da obstrução é removido, ou quando ambas as artérias renais são parcialmente obstruídas, a pressão arterial se eleva de maneira acentuada e permanente (FAZAN; DA SILVA; SALGADO, 2001).

Segundo ROSA (2008), a constrição da artéria renal contralateral após 30 dias, por meio da colocação de um clipe de prata, promoveu a instalação da hipertensão e da hipertrofia ventricular, assim como também, uma diminuição da sensibilidade dos barorreceptores. Neste período, também foi notado um aumento na modulação simpática para o coração, e um evidente déficit diastólico. Este trabalho comprovou que o tempo de clipe é fundamental no desenvolvimento da hipertensão.

Outros pesquisadores demonstraram que a hipertensão estava presente após 4 e 5 semanas da colocação do clipe na artéria renal, demonstrando a variabilidade inerente ao próprio modelo experimental (KOST *et al.*, 1994; IRIGOYEN; KRIEGER, 1998). Nesse sentido, a literatura tem mostrado a importância do grau de constrição do clipe na artéria em relação ao crescimento do animal, ao longo da experiência, sendo necessário obedecer à

relação peso/grau de estreitamento (DIAS *et al.*, 1999). O mecanismo básico da hipertensão de Goldblatt (2R1C) é o SRA, sendo este o principal fator no desenvolvimento da hipertensão. Esta, é explicada pelo aumento da secreção de renina pelos rins e, portanto, aumento dos efeitos deletérios da AII (DIAS *et al.*, 1999).

Uma ampla gama de estudo fitoterapêuticos estão sendo conduzidos, a fim de isolar princípios ativos que atuem no SRA e, conseqüentemente, promovam ação inibitória sobre a ECA. Portanto, a utilização dos IECA's se mostra benéfica tanto na correção do processo de disfunção endotelial, como na resposta pressora (KRINSKI *et al.*, 2007). Além disso, os IECA's induzem aumento da biodisponibilidade da BK, que ativa a formação de PGI₂ e estimula a liberação de EDRF's (LINZ *et al.*, 1995).

Barbosa-Filho *et al.* (2006) listaram 361 espécies vegetais com essas atividades e mostraram que a fitoterapia apresenta uma modalidade alternativa de terapia de apoio a pacientes com hipertensão leve a moderada, com seus mecanismos de ação concentrados no potencial vasodilatador das plantas. Segundo LIMA-LANDMAN *et al.*, (2007), vários mecanismos poderiam explicar o efeito hipotensor de extratos, seja devido à sua ação sobre o sistema nervoso simpático, bloqueando o SRA, os receptores da angiotensina (AT₁), apresentando efeito direto ou indireto na produção de NO, entre outros mecanismos. Assim, a utilização de anti-hipertensivos naturais pode ser uma estratégia importante no manejo da HAS, que representa um fator de doença cardiovascular e, frequentemente resulta em longo prazo, no desenvolvimento da SM.

Nesse estudo, o efeito do EEP na pressão sistólica de ratos hipertensos, assim como seus efeitos sobre a inibição de ECA foram investigados, visando à triagem de potenciais fármacos que atuem no controle e tratamento da HAS, que representa uma das variáveis clínicas presentes na SM.

3.2.2 Diabetes Mellitus

O Diabetes Mellitus (DM) é uma síndrome de etiologia múltipla, decorrente da falta de insulina e/ou da incapacidade da mesma de exercer adequadamente seus efeitos, caracterizando a RI. O DM corresponde a um dos fatores de risco para as doenças cardiovasculares, fazendo parte da chamada SM (MCLELLAN *et al.*, 2007). O diagnóstico laboratorial é feito por meio da glicemia de jejum de 8 a 12 horas, onde se observa uma glicemia plasmática >100 mg/dL. Algumas vezes o diagnóstico também é feito a partir das complicações crônicas, como neuropatia, retinopatia ou doença cardiovascular aterosclerótica (SBD, 2011).

Os tipos de diabetes mais frequentes são o diabetes tipo I, anteriormente conhecido como diabetes juvenil, que compreende cerca de 10% do total de casos, e o diabetes tipo II, anteriormente conhecido como diabetes do adulto, que compreende cerca de 90% do total de casos. No Diabetes tipo I tem-se destruição das células B pancreáticas, que eventualmente leva ao estágio de deficiência absoluta de insulina. A destruição das células B é geralmente causada por processos autoimunes, como as doenças: tireoidite de Hashimoto, Cushing e a Miastenia gravis, entre outros fatores com etiopatogenia ainda desconhecida (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006).

A DM2 é uma condição genética ou adquirida, onde ocorre uma resposta subnormal da captação de glicose pelas células. Quando se observa uma menor captação de glicose, torna-se necessário uma maior produção de insulina pelo pâncreas, a fim de manter os níveis glicêmicos normais (PESSIN; SALTIEL, 2000). A RI refere-se à diminuição da ação da insulina endógena em seus tecidos-alvo, particularmente, músculos e tecido adiposo. A RI caracteriza-se pela presença de hiperglicemia crônica, frequentemente, acompanhada de dislipidemia, hipertensão arterial e disfunção endotelial (SBD, 2011). A deficiência na secreção de insulina ocorre pela exaustão da capacidade secretora das células B, o que

culmina na sua incapacidade de manutenção das concentrações glicêmicas normais, no período pós-prandial (MCLELLAN *et al.*, 2007).

Dessa forma, o Diabetes Mellitus altera o metabolismo dos carboidratos, gorduras e proteínas e tem como principais sinais clínicos: a polifagia (fome insaciável), polidipsia (sede constante), poliúria (micção excessiva), perda de peso e, às vezes, visão turva (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2012). Em condições normais, em resposta ao aumento dos níveis circulantes de glicose e aminoácidos, que ocorrem, principalmente, após as refeições, a insulina é secretada pelas células B das ilhotas pancreáticas e age em vários tecidos periféricos, incluindo o músculo, o fígado e o tecido adiposo.

Os efeitos metabólicos imediatos da insulina incluem: regulação do metabolismo da glicose que ocorre por meio da redução da produção de glicose hepática (via inibição da gliconeogênese e glicogenólise), aumento da captação de glicose no músculo estriado e tecido adiposo, aumento da síntese de proteínas e ácidos graxos (SALTIEL; KAHN, 2001). Na obesidade a secreção de insulina está aumentada, enquanto que a captação hepática e a eficácia periférica da insulina diminuem. Os ácidos graxos livres aumentados na circulação, pela elevada sensibilidade lipolítica da gordura abdominal e pelo menor efeito antilipolítico da insulina nesse tecido, inibem a depuração hepática de insulina, levando à hiperinsulinemia e à resistência periférica, além do direcionamento desses ácidos graxos para a síntese de triglicérides pelo fígado (SALTIEL; KAHN, 2001).

A insulina é um hormônio peptídico que se liga a receptores protéicos de superfícies celulares, chamados receptores associados à tirosina quinase ou receptores de insulina. Esses receptores, uma vez ativados, promovem a transdução do sinal por meio de uma cascata de sinalização importante para a manutenção do metabolismo da glicose, diferenciação e crescimento celular (SALTIEL; PESSIN, 1999).

Quando a insulina se liga de maneira específica ao seu receptor protéico, ela ativa esse receptor, uma proteína heterotetramérica com atividade quinase, composta por duas subunidades α e duas subunidades β . Uma vez ativado, os receptores associados à tirosina quinase sofrem uma dimerização ou transição alostérica (mudança conformacional), que resulta na ativação de tirosinas quinases intrínsecas e induzem a auto-fosforilação de múltiplos resíduos de tirosina, os quais transmitem o sinal bioquímico a diversos alvos citoplasmáticos (AVRUCH, 1998; ZECCHIN, CARVALHEIRA, SAAD, 2004).

Um desses sinais bioquímicos é a captação de glicose no músculo e no tecido adiposo pelo transportador GLUT 4 estimulado pela insulina. Após a sinalização e fim do estímulo, esse receptor é internalizado por endocitose dependente de clatrina e redirecionado a compartimentos intracelulares de armazenamento (KANZAKI, 2006).

Existe uma classe de proteínas conhecidas como tirosinas fosfatases que regulam de forma negativa o receptor de insulina. As mais estudadas são as proteínas 1B, que interagem diretamente com o receptor de insulina e retira os fosfatos dos sítios de fosforilação, reduzindo a atividade dos mesmos (YOUNGREN, 2007). Portanto, a insulina utiliza a fosforilação e as interações proteína-proteína como ferramentas essenciais para transmitir o sinal. Quando ocorre uma disfunção na atividade desses receptores ou na via de sinalização, ocorre o desenvolvimento de doenças metabólicas e neurodegenerativas, como o diabetes, a obesidade e a doença de Alzheimer (KRONER, 2009).

Devido a esses achados, é importante prevenir e tratar o DM, pois a RI induz um processo crônico de hiperglicemia e hiperinsulinemia, os quais contribuem com o desenvolvimento de doenças renais e cardiovasculares (HOEHN *et al.*, 2009). Uma abordagem prática para o controle do aumento da glicemia plasmática pós-prandial é a redução da absorção de glicose pela inibição de enzimas que hidrolizam os carboidratos ao longo do trato digestivo (SHIM *et al.*, 2003).

Os carboidratos são compostos principalmente de unidades de monossacarídeos e possuem elevado índice glicêmico. O aumento dos níveis de açúcares no sangue aumentam rapidamente os níveis de insulina, que promovem a captação de glicose do sangue para dentro das células do fígado e do músculo esquelético, os quais a armazenam na forma de glicogênio (NEGRE-SALVAYRE *et al.*, 2009; YAMAGISHI *et al.*, 2009).

A hiperglicemia crônica aumenta a síntese de ácidos graxos, e pode resultar no acúmulo de lipídios, aumento do estresse oxidativo por meio da geração de EROS, oxidação de LDL, ativação de plaquetas e geração de trombina. Todos esses fatores aumentam a chance de desenvolver DM2, levando ao desenvolvimento de outras complicações (NEGRE-SALVAYRE *et al.*, 2009; YAMAGISHI *et al.*, 2009).

Evidências científicas reportam uma correlação entre o consumo de alimentos vegetais e a redução da incidência de doenças degenerativas (HUNG *et al.*, 2004). Alguns autores revelaram que produtos naturais podem ser úteis na prevenção do DM, pois algumas espécies apresentaram atividade inibitória sobre enzimas digestórias, como a α -amilase e α -glucosidade através de experimentos *in vitro*, podendo retardar a absorção dos carboidratos (TUNDIS; LOIZZO; MENICHINI, 2010; BARRETT; UDANI, 2011). Em regiões subdesenvolvidas, nas quais a medicina convencional não está totalmente desenvolvida, o uso de plantas no tratamento de desordens hiperglicêmicas ainda permanece como a principal forma de terapia no controle do DM (ROMAM-RAMOS *et al.*, 1991).

A metformina, um agente hipoglicemiante, foi descoberta a partir do uso tradicional da planta *Galega officinalis* (Fabaceae) (VUKSAN; SIEVENPIPER, 2005). Muitos fármacos utilizados no controle glicêmico do diabetes, como a acarbose e o miglitol, e que agem por meio da inibição da α -glucosidase, causam sérios desconfortos gastrintestinais. Portanto, à utilização de ervas medicinais com propósito hipoglicemiante, perpetua, tanto como

complemento da terapia convencional, como proposta profilática (HUNG *et al.* 2004; VAN DE LAAR *et al.*, 2005).

Além da terapia utilizando medicamentos e fitoterápicos, alguns autores indicam a atividade física como adjuvante no tratamento da doença, pois foi demonstrado o aumento da sensibilidade à insulina durante o exercício, independentemente da redução do peso e de mudanças na composição corporal. O principal efeito do exercício na regulação glicêmica pode ser o aumento da expressão de elementos intracelulares da via de sinalização da insulina, em particular dos transportadores de glicose na musculatura esquelética. Além desse, o aumento do fluxo sanguíneo, que ocorre durante a atividade física, poderia acarretar maior disponibilidade de insulina para os tecidos periféricos, contribuindo para a melhora metabólica observada durante o treinamento físico (DEFRONZO; SHERWIN; KRAEMER, 1987). Outro efeito não-insulino-dependente do exercício é a liberação local de BK, a qual estimula a captação de glicose (TAGUCHI *et al.*, 2000). Assim, a terapia farmacológica, associada a modificações no estilo de vida, consumo de dieta equilibrada e prática regular de atividade física contribuem para o controle metabólico e a redução dos fatores de risco para a SM, o DM e as doenças crônicas não transmissíveis (MCLELLAN *et al.*, 2007).

3.2.3 Obesidade

A obesidade é uma epidemia mundial, definida como uma doença crônica de causa multifatorial, que leva ao acúmulo excessivo de gordura corporal, fator este que favorece o balanço energético positivo. É um importante fator de risco para as DCV's, acidente vascular cerebral, DM, distúrbios dos músculo-esqueléticos e alguns tipos de câncer. Assim sendo, a obesidade é um componente importante da SM e é mundialmente considerada, um problema de saúde pública (WHO, 2011).

Um estudo na região Norte realizado com escolares mostrou uma prevalência elevada de excesso de peso (20%). O excesso de peso, dislipidemia, história familiar positiva para DCV's, sedentarismo foram os fatores de risco mais encontrados. Em relação ao gênero, foi constatado que escolares do sexo masculino eram mais ativos e menos propensos a desenvolverem hipertensão em comparação com os escolares do sexo feminino. Além disso, nessa população, foi observada associação entre obesidade e alterações do perfil lipídico, principalmente entre os escolares sedentários e menores de dez anos, ratificando a importância do estímulo à alimentação saudável e à prática física regular desde a fase pré-escolar (RIBAS; SILVA, 2014).

A fisiopatologia da obesidade envolve uma deposição em excesso da gordura no tecido adiposo, que via lipólise, libera ácidos graxos livres (AGL) circulantes (FRIEDMAN; HALAAS, 1998). Conseqüentemente, os TG e os ácidos graxos em excesso ficam estocados nas fibras musculares esqueléticas, na forma de lipídeos intramiocelulares (IMCL), que estão fortemente associados com a deficiência do metabolismo da glicose, estresse oxidativo, perda na produção de energia, resistência à insulina e eventualmente desenvolvimento de DM2 (CLARK *et al.*, 2011).

Além disso, os AGL liberam adipocinas, como a leptina, adiponectina, resistina e citocinas pró-inflamatórias como o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e a interleucina 6 (IL-6) (KAHN *et al.*, 2006). O aumento dessas citocinas no obeso está associado à diminuição da expressão dos receptores de insulina (IRS), que diminuem a transdução do sinal (HOTAMISLIGIL *et al.*, 1996). Tem sido relatado o aumento na expressão do fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α) na gordura de roedores e de humanos obesos, e esse fator, *per se*, pode promover a fosforilação do IRS-1 em serina, resultando em menor atividade quinase do receptor de insulina e RI (HOTAMISLIGIL *et al.*, 1996).

Também tem sido observado, que as adipocinas, como a leptina e a adiponectina, influenciam profundamente o metabolismo e o gasto energético (ROSEN; SPIEGELMAN, 2006). A leptina é um hormônio neuropeptídeo, pertencente à família das citocinas, que é produzida no tecido adiposo e em baixos níveis no epitélio gástrico e na placenta (ZHANG *et al.*, 1994). Ela age em receptores no sistema nervoso central (SNC) e em outros locais para inibir a ingestão alimentar e promover o gasto energético (FRIEDMAN; HALAAS, 1998). A ausência da leptina produz muitos sinais clínicos observados em animais diabéticos e obesos, como hiperfagia, redução da temperatura corporal, redução do gasto energético e inatividade (COLEMAN, 1978).

Para alguns autores, o mecanismo pelo qual a leptina e outros agentes anorexígenos reduzem o apetite, parece envolver a inativação hipotalâmica da MAPK (proteína quinase ativada), pela hiperleptinemia gerada pela adiposidade excessiva, elevando os níveis locais de malonil CoA e inibindo a fome (HALAAS; FRIEDMAN, 1997). A leptina parece funcionar em grande parte dentro do sistema de longa duração e influencia a quantidade de alimento consumido em relação à quantidade de energia gasta. No entanto, a leptina é degradada no estômago após uma refeição ou após a administração da colecistoquinina (CCK), indicando que ela também pode funcionar no sistema em curto prazo ou localmente no trato gastrointestinal (BADO *et al.*, 1998).

A concentração de leptina plasmática se correlaciona com o teor de gordura corporal, o qual está aumentado em sujeitos obesos, o que sugere que a obesidade humana, geralmente está associada à insensibilidade à leptina (MAFFEI *et al.*, 1995). Assim, a leptina desempenha papel importante na obesidade que está também associada à inflamação, como previamente relatado. Esse processo inflamatório é uma condição ativadora de neutrófilos que também resulta na geração de espécies reativas, como o superóxido, causando estresse oxidativo (FERREIRA *et al.*, 2011).

Além da leptina, a adiponectina é uma proteína também secretada especificamente pelo tecido adiposo, e vem sendo alvo de muitos estudos em relação à obesidade, pois parece apresentar propriedades anti-aterogênicas, anti-inflamatórias e regulatórias em relação à sensibilidade à ação da insulina (HOPKINS *et al.*, 2007). Matsuzawa *et al.*, (2004) afirmaram que baixas concentrações da adiponectina (hipoadiponectinemia) estão diretamente associadas ao desenvolvimento de doenças como a obesidade, diabetes e aterosclerose. Por outro lado, em indivíduos saudáveis, altas concentrações de adiponectina estão independentemente associadas ao aumento da sensibilidade à insulina e redução do risco de desenvolvimento do DM2 (SPRANGER *et al.*, 2003).

Por conseguinte, a adiponectina parece atuar como um agente sensibilizador à ação da insulina, por reduzir a produção de glicose e aumentar a ação da insulina hepática (BERG *et al.*, 2001). Fonseca-Alaniz *et al.*, (2007) mostraram que existe uma correlação inversa entre os níveis circulantes de adiponectinas e o risco de obesidade, resistência à insulina e outras doenças cardiovasculares. Quanto à ação da adiponectina sobre a estrutura e função vascular, esta parece estimular a vasodilatação arterial, aumentando a produção de óxido nítrico e inibindo a proliferação e migração das células endoteliais, o que confere um efeito protetor marcante contra o desenvolvimento das DCV's (GOLDSTEIN; SCALIA, 2004).

Como dito, a causa fundamental da obesidade é o desequilíbrio energético entre a ingestão de calorias e o gasto. Portanto, uma alternativa de tratamento contra a obesidade seria a inibição da digestão e absorção de gordura da dieta por meio da utilização de produtos naturais com atividade inibidora da lipase (KURIHARA *et al.*, 2003). Um fármaco sintético com essa propriedade é o orlistat, um potente inibidor competitivo da lipase gástrica e pancreática, no entanto, a utilização desse fármaco vem apresentando diversos efeitos colaterais gastrointestinais, que limitam o seu uso (WEIGLE, 2003).

Considerando a elevada prevalência de sobrepeso e obesidade ao longo dos anos (WHO, 2011), existe a necessidade de novos estudos que apontem substâncias naturais potenciais que evitem o aumento dessa prevalência e reduza as elevadas taxas de mortalidade.

3.2.4 Estresse oxidativo

As espécies reativas de oxigênio (EROS) são constantemente produzidas como subprodutos do corpo humano durante o metabolismo celular. Estes subprodutos nocivos podem causar danos oxidativos em macromoléculas funcionais, tais como o ácido desoxirribonucleico (DNA), proteínas e lipídios, causando desde danos, à morte celular (APEL; HIRT, 2004). As principais EROS são: ânion radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), ânion hipoclorito (OCL^-) e radical hidroxila (OH^{\cdot}). Além das EROS, também existe as espécies reativas de nitrogênio (ERNs), que incluem o óxido nítrico (NO^{\cdot}) e o peroxinitrito ($ONOO^-$), também produzidos pelo metabolismo celular (GUTTERIDGE, 1995).

O estresse ou dano oxidativo pode ser definido como qualquer distúrbio celular entre pró-oxidantes e antioxidantes, em favor dos oxidantes. Em condições normais, o organismo por meio da ação de antioxidantes endógenos, como o ácido ascórbico, a glutatona e o α -tocoferol ou enzimas de defesa como a superóxido dismutase (SOD) e a catalase mantém o equilíbrio entre a formação de radicais livres e a sua remoção, possibilitando a inativação desses radicais (GUTTERIDGE, 1995).

Os antioxidantes são considerados substâncias que, em baixas concentrações, possuem uma afinidade maior que qualquer outra molécula para interagir com os radicais livres, cedendo-lhe um elétron e prevenindo a oxidação de seus substratos. Já os radicais livres são espécies químicas extremamente reativas, pois são átomos ou moléculas que contém elétrons desemparelhados, livres para se ligar a qualquer outro elétron. Podem ser

produzidos pelo organismo, sendo a maioria, por reações bioquímicas envolvendo o oxigênio (BACALLAO *et al.*, 2001).

Além dos antioxidantes produzidos endogenamente e das enzimas que catalisam o metabolismo das EROS, algumas frutas e vegetais são excelentes fontes antioxidantes obtidas exogenamente (CHU *et al.*, 2002, SUN *et al.*, 2002). Adicionalmente, vários estudos têm comprovado os efeitos antioxidantes provenientes de plantas amazônicas e relacionam seu consumo ao baixo risco de doenças degenerativas (APEL; HIRT, 2004; GARCIA-ALONSO *et al.*, 2004). Os principais compostos estudados com essa atividade são: os tocoferóis (vitamina E), o ácido ascórbico (vitamina C), os polifenóis, o selênio e os carotenóides (HASLAM, 1996; VALKO *et al.*, 2004).

Os compostos fenólicos são antioxidantes primários que agem como sequestradores de radicais livres e bloqueadores de reações em cadeia. Eles estão largamente distribuídos na natureza e são derivados dos ácidos benzóico e cinâmico, bem como de flavonoides. Os flavonoides são uma classe de compostos naturais de considerável interesse científico e terapêutico. Entre os flavonoides, a quercetina (3,5,7,3'-4'-pentahidroxi flavona) têm sido estudada nas últimas décadas, destacando-se o seu potencial antioxidante, anticarcinogênico e seus efeitos protetores aos sistemas renal, cardiovascular e hepático (NIJVELDT *et al.*, 2001).

Fontes específicas de flavonoides encontrados na dieta são: vinho tinto, chá preto, cerveja, frutas (maçã, uva, morango), vegetais (cebola, couve, vagem, brócolis), grãos, nozes, sementes e especiarias. A quercetina representa cerca de 95% do total dos flavonoides ingeridos na dieta (NIJVELDT *et al.*, 2001).

Estudos também sugerem um provável efeito antiinflamatório destes compostos antioxidantes, devido à ação inibitória sobre enzimas como a ciclooxigenase (COX) e lipooxigenase (LOX), envolvidas na biossíntese dos eicosanóides, a partir do ácido araquidônico (MOREIRA; MANCINI-FILHO, 2004). Os compostos fenólicos de ocorrência

natural têm recebido muita atenção, sobretudo por inibirem a peroxidação lipídica e LOX *in vitro* (HASLAM, 1996; SOARES, 2002). A peroxidação lipídica se deve a reações de oxidação nos ácidos graxos da membrana lipoprotéica, que afeta à integridade estrutural e funcional da membrana celular, alterando sua fluidez e permeabilidade (LIMA; ABDALLA, 2001).

Estudos também mostraram uma correlação positiva entre a atividade antitrombocítica dos flavonoides e a suas propriedades antioxidantes. Foi relatado que a atividade plaquetária está aumentada em pacientes que apresentam fatores de riscos coronarianos, como o elevado nível de colesterol LDL, HAS, diabetes e consumo de cigarro (GRYGLEWSKI *et al.*, 1987).

Considerando a importância das plantas medicinais como fonte de novas drogas úteis para o tratamento de diversas patologias, é plausível que estudos voltados para a busca de novos produtos naturais que atuem contra o processo degenerativo de doenças crônicas não transmissíveis, aumente no decorrer das décadas (NATHAN, 2002). As pesquisas têm-se dirigido no sentido de encontrar novos compostos com atividade antioxidante que possam contribuir com a prevenção dos seus efeitos deletérios relacionados ao estresse oxidativo (GONZAGA *et al.*, 2007).

3.3 Plantas medicinais usadas no tratamento da SM

A terapia por meio de plantas medicinais constitui uma tradição milenar, cujo uso está relacionado a conhecimentos empíricos, credices e tradições culturais, onde os medicamentos foram inicialmente aplicados por algumas populações, como a indígena e a ribeirinha na região Amazônica. Atualmente, a medicina tradicional ou alternativa continua sendo utilizada no tratamento e na cura de enfermidades, principalmente pela população menos favorecida (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2012; VAN STADEN *et al.*, 1999).

Cerca de 25% de todos os fármacos prescritos são obtidos a partir de precursores naturais, enquanto que 50% são de origem sintética, mas relacionados aos princípios isolados das plantas medicinais (CECHINEL; YUNES, 1998). Segundo Rates (2001), das 252 drogas consideradas básicas e essenciais pela OMS, 11% são originárias de plantas.

O Brasil é o país de maior biodiversidade do planeta, e detém um valioso conhecimento tradicional associado ao uso de plantas medicinais. Nesse sentido, a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos, aprovada por meio do Decreto Nº 5.813 de 22 de junho de 2006, estabeleceu diretrizes e linhas voltadas à garantia do acesso seguro e uso racional de plantas medicinais e fitoterápicas. Os fitoterápicos foram classificados como medicamentos pela portaria nº 22/ 1967 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e pela resolução – RDC nº 17/2000 (NETTO; BALBINO; CARVALHO, 2006).

Apesar da grande biodiversidade de plantas Amazônicas, apenas 5 a 15% de aproximadamente 250.000 espécies de vegetais superiores foram explorados como fonte de novos fármacos (RATES, 2001). Além disso, muitas substâncias exclusivas de plantas brasileiras encontram-se patenteadas por empresas e órgãos governamentais estrangeiros, porque a pesquisa nacional não recebe o devido incentivo (FERREIRA *et al.*, 2008). No entanto, é importante destacar que a descoberta de novos medicamentos derivados de plantas representou uma estratégia de sucesso para o tratamento de muitas doenças.

Estudos *in vitro* e em modelos animais têm comprovado a eficácia das plantas medicinais no tratamento e prevenção da SM (RATES, 2001; HOSTETTMANN; MARSTON, 2002). Silveira (2011) afirma que o consumo de frutos e vegetais melhora a sensibilidade insulínica, o perfil lipídico, a pressão arterial, o estresse oxidativo e a inflamação, condições fisiopatológicas relacionadas à SM. Tais efeitos se devem à presença de compostos bioativos nas plantas que atuam de forma sinérgica protegendo o organismo.

Diversas são as pesquisas envolvendo estudos pré-clínicos relacionados à SM que utilizam plantas medicinais ou suas partes no tratamento ou prevenção da doença (Tabela 2 e 3)

Tabela 2- Espécies vegetais do gênero *Eugenia* com potencial terapêutico relacionado à SM

Espécie	Efeito	Referência
<i>Eugenia jambolana</i>	Efeito hipoglicemiante e hipolipemiante em coelhos diabéticos induzidos por aloxano	(SHARMA <i>et al.</i> , 2003)
<i>Eugenia punicifolia</i>	Efeito benéfico sobre o estado diabético em ratos diabéticos induzidos pós streptozotocina. Atividade antioxidante do extrato metanólico em ensaios <i>in vitro</i> Atividade antioxidante e inibidora de enzimas relacionadas à SM	(BRUNETTI <i>et al.</i> , 2006) (GONZAGA <i>et al.</i> , 2007) (GALENO <i>et al.</i> , 2014)
<i>Eugenia operculata</i>	Efeito inibitório <i>in vitro</i> sobre a α -glicosidase, maltase e sucrase	(MAI; CHUYEN, 2007).
<i>Eugenia polyantha</i>	Atividade antioxidante dose-dependente e sua relação com o teor de fenóis totais.	(LELONO; TACHIBANA; ITOH, 2009)
<i>Eugenia Uniflora</i>	Excelente capacidade antioxidante correlacionada com o alto teor de fenólicos	(BAGETTI <i>et al.</i> , 2009)
<i>Eugenia jambolana</i>	Potente atividade hipolipidêmica a partir do princípio ativo isolado do extrato etanólico em coelhos diabéticos.	(SUMAN <i>et al.</i> , 2011)

Fonte: Própria.

Tabela 3- Outras Espécies vegetais com potencial terapêutico relacionado à SM.

Espécie	Efeito	Referência
<i>Alpinia speciosa</i>	Queda dose-dependente da pressão arterial e respostas inotrópicas em átrios isolados	(MENDONÇA <i>et al.</i> , 1991)
<i>Cassia auriculata</i> L.	Potente efeito inibitório sobre a α -glucosidase, proporcionando efeito anti-hiperglicêmico em ratos	(ABENSUDARA, MATSUIT; MATSUMOTO, 2004)
<i>Bactris Gasipaes</i>	Efeito benéfico no metabolismo lipídico e redução do ganho de peso	(CARVALHO <i>et al.</i> , 2013)

<i>Bauhinia forficata</i> L.	Efeito hipoglicêmico e hipolipidêmico em ratos diabéticos induzidos por Alozano.	(LINO <i>et al.</i> , 2004)
<i>Cecropia adenopus</i>	Efeito hipotensor em ratos normotensos	(CONSOLINI; MIGLIORI, 2005)
<i>Gardenia jasminoides</i>	Melhora a função hepática de camundongos através do seu efeito hepatoprotetor e atividades hipolipidêmicas	(LEE; OH; LIM, 2006)
<i>Hancornia speciosa</i>	Efeito anti-hipertensivo dependente da inibição da ECA	(ENDRINGER, 2007).
<i>Cecropia glaziovii</i>	Efeitos anti-hipertensivos em ratos normotensos, com hipertensão espontânea (SHR), induzidos por L-NAME e em ratos com hipertensão renal.	(LIMA-LANDMAN <i>et al.</i> , 2007).
<i>Averrhoa carambola</i> L.	Redução da glicemia de jejum em ratos	(FERREIRA <i>et al.</i> , 2008)
<i>Dicksoniaceae</i>	Relaxamento vascular e efeito hipotensor em ratos anestesiados	(YANNA <i>et al.</i> , (2009)
<i>Alpinia officinarum</i>	Efeito anti-obesidade e hipolipemiante em modelo de rato obeso induzido por dieta	(XIA <i>et al.</i> , 2010)
<i>Myrica esculenta</i>	Inibição da ECA	(NHIEM <i>et al.</i> , 2010)
<i>Abacopteris penangiana</i>	Propriedades hipolipidêmicas e anti-inflamatórias em camundongos hiperlipidêmicos induzidos por dieta	(LEI <i>et al.</i> , 2011)
<i>Alpinia officinarum</i>	Efeito anti-obesidade e hipolipemiante em modelo de rato obeso induzido por dieta	(XIA <i>et al.</i> , 2010)
<i>Myrica esculenta</i>	Inibição da ECA	(NHIEM <i>et al.</i> , 2010)
<i>Abacopteris penangiana</i>	Propriedades hipolipidêmicas e anti-inflamatórias em camundongos hiperlipidêmicos induzidos por dieta	(LEI <i>et al.</i> , 2011)
<i>Passiflora Edulis</i>	Efeitos hipolipidêmicos e hipoglicêmicos	(CORRÊA <i>et al.</i> , 2014)
<i>Passiflora nepalensis</i>	Efeitos anti-hipertensivos e cronotrópicos negativos em ratos normotensos e hipertensos renais	(PATEL <i>et al.</i> , 2011)
<i>Ammi majus seeds</i> L.	Atividade anti-hiperlipidêmica, anti-inflamatória, analgésica e antipirética em ratos e camundongos.	(KORIEEM <i>et al.</i> , 2012)

<i>Rhodomyrtus tomentosa</i>	Efeito varredor de radicais livres em experimentos <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>	(LAVANYA; VORAVUTHIKUNCHAI; TOWATANA, 2012)
<i>Crataegus pinnatifida</i> Bge	Efeitos hiperglicêmicos, hipertrigliceridêmicos e hipercolesterolêmicos em camundongos diabéticos e dislipidêmicos induzidos por dieta.	(SHIH <i>et al.</i> , 2013)

Fonte: Própria.

Como se pode observar, existe uma vasta gama de produtos naturais que compõem o arsenal terapêutico no tratamento das desordens relacionadas à SM. A busca por novas drogas tem ganhado força ao longo dos anos, resultando em inúmeros relatos sobre as atividades significativas dos agentes naturais, uma vez que são considerados menos tóxicos e com menos efeitos secundários que os agentes sintéticos conhecidos (SAE-TAN; GROVE; LAMBERT, 2011).

3.4 *Eugenia punicifolia* (Kunth) DC

A espécie *E. punicifolia*, conhecida como “pedra-ume caá”, é um arbusto ou arvoreta de até 8 metros de altura, que se distribui amplamente na região Amazônica. Faz parte da família Myrtaceae que constitui uma das maiores famílias da flora brasileira. A esta família pertence cerca de 130 gêneros e 3800 espécies (WILSON *et al.*, 2001). No Brasil, a família está bem representada por 23 gêneros e 1000 espécies (LANDRUM; KAWASAKI, 1997).

O levantamento taxonômico dessa família realizado por Arantes e Monteiro em 2002 (Uberlândia-MG) mostrou a existência de 36 espécies, distribuídas entre nove gêneros, sendo a *Eugenia*, o mais numeroso. As espécies do gênero *Eugenia* são encontradas principalmente na América Central e América do Sul (MERWE *et al.*, 2005), distribuindo-se desde o Brasil até o norte e nordeste da Argentina, Uruguai e Paraguai (CONSOLINI *et al.*, 1999).

A espécie *punicifolia* é uma das mais comuns encontradas no cerrado com floração ocorrendo de agosto a novembro e frutos de agosto a janeiro (ARANTES; MONTEIRO 2002). Sua morfologia foliar é muito diversificada, com folhas lanceoladas, elípticas ou abovadas, de coloração amarelada a verde- escura, com pedúnculos que variam muito de

tamanho e ápice curtamente acuminado (SILVA; PINHEIRO, 2007; SILVA, 2009). Esta espécie apresenta ramos jovens, com córtex esfoliante em película fina marrom-avermelhada, cilíndricos, frequentemente pubéculos; ritidoma rugoso e estriado; râmulos achatados e pubescentes (ARANTES; MONTEIRO, 2002).

Suas folhas são facilmente distinguíveis por serem brilhantes na face adaxial e as nervuras visivelmente impressas e salientes dos dois lados (Figura 4). Apresenta inflorescências racemosas com flores pediceladas inseridas nas axilas foliares. Durante o pico de floração, as folhas se destacam da folhagem dando um aspecto branco (SILVA; PINHEIRO, 2007).



Figura 4- Ramo e planta da *Eugenia puniceifolia* (Kunth) DC.
Fonte adaptada: Silva, 2009

Os frutos, quando imaturos, têm formato elíptico, tornando-se subglobosos e de coloração avermelhada ao amadurecer, sendo bastante apreciados e usados como alimentos (FISCHER *et al.*, 2005).

Segundo Silva (2009), a família Myrtaceae tem um grande potencial econômico para o Brasil, pois entre suas espécies, são encontrados vegetais medicinais, ornamentais, produtores de madeira e de frutos comestíveis. Isto posto, espécies da mesma família da *E. puniceifolia*, como a “goiaba” (*Psidium guajava* L.), a “jabuticaba-preta” (*Myrciaria truncifolia* O. Berg) e a “pitanga” (*E.uniflora* L.) são bastante utilizadas pela população como

comestíveis, tanto na forma *in natura* (frescos ou em sucos), quanto na forma de compotas, doces e geléias (CONSOLINI *et al.*, 1999).

Em conformidade com Vilar *et al.*, (2006), a espécie “pitangão” (*E. neonitida* Sobral) é considerada uma fonte rica de macro e micronutrientes para a alimentação humana e os frutos da “cagaiteira” (*E. dysenterica* DC.) são processados para produzir doces e sorvetes, ou consumidos *in natura* por populações que habitam o cerrado do Brasil central.

O uso medicinal da família Myrtaceae também já foi destacado em estudos de Lorenzi e Matos (2002), eles mostraram que o “eucalipto” (*Eucalyptus globulus* L.) pode ser empregado no tratamento da gripe, congestão nasal e sinusite. O “camu-camu” (*Myrciaria dúbia* (Kunth) Mc Vaugh) por apresentar alto teor de vitamina C, flavonoides e antocianinas, tem sido usado como antioxidante e anti-obesidade (NASCIMENTO *et al.*, 2013).

Também tem sido demonstrado que membros do gênero *Eugenia* têm várias propriedades medicinais relacionadas à presença de compostos antioxidantes, incluindo antinociceptiva e anti-inflamatória (GUIMARÃES *et al.*, 2009) antifúngica (BANSOD; MAHENDRA, 2008), anti-diabética (BRUNETTI *et al.*, 2006), anti-hipertensiva (CONSOLINI *et al.*, 1999), anti-diarréica, diurética, anti-reumática, anti-febril e antioxidante (VÉLASQUEZ *et al.*, 2003; GONZAGA *et al.*, 2008).

Tem sido descrito que a espécie *E. puniceifolia* pode interferir na neurotransmissão colinérgica nicotínica e, conseqüentemente, modular o processo inflamatório, no entanto, o exato mecanismo ainda está para ser elucidado. Acredita-se que o extrato ative o receptor nicotínico da acetilcolina ou atue de forma competitiva com um antagonista específico no sítio do receptor. Os autores sugerem que o provável mecanismo envolvido é a redução de proteínas inflamatórias como o TNF- α , a expressão do NFkB, a IL-1b, entre outros mediadores inflamatórios (LEITE *et al.*, 2010). Vários outros estudos também demonstraram

que a ativação desses mecanismos colinérgicos além de atenuar a inflamação, acentuam a regeneração muscular (SANTOS, 2010).

Nesse estudo pretendemos verificar outros efeitos biológicos da espécie *E. puniceifolia* tanto em modelos *in vivo* como *in vitro* que possam se associar com os efeitos farmacológicos já conhecidos e corroborar com o tratamento da síndrome metabólica e suas condições associadas.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Matéria prima-vegetal

As folhas de *E. puniceifolia* foram fornecidas pela Embrapa-AM Ocidental, colhidas em diferentes épocas do ano, com aproximadamente um ano de idade e em fase reprodutiva. Uma vez coletadas, as folhas foram armazenadas em sacos plásticos e identificadas pelo botânico Valdely Ferreira Kinupp do Herbário do Instituto Federal de Educação Ciência e Tecnologia do Amazonas, através do número da exsicata (6789). As amostras foram coletadas em quantidades suficientes para realização do processo experimental. A coleta do material biológico proposto para estudo foi autorizada pelo CGEN (Autorização n.º. 34/2008).

Após o recebimento da matéria-prima vegetal, as folhas foram manualmente selecionadas para tratamento individual, com eliminação de elementos estranhos (terra, insetos, galhos, outras plantas, etc) e partes que estivessem em condições indesejáveis (manchadas, danificadas, descoloridas, etc). As folhas foram secas por sete dias em estufa de circulação de ar a $40 \pm 5^\circ\text{C}$ de temperatura. Após a secagem, as folhas foram moídas em moinho de facas (1 mm) e armazenadas em garrafas de poliestireno à temperatura ambiente.

4.2 Preparo do extrato seco de *E. puniceifolia*

O EEP foi preparado usando a infusão como método de extração por 15 minutos, sendo a relação droga: solvente (água Mili –Q) de 7,5% (m/V). O produto seco foi obtido por aspersão, utilizando uma solução extrativa aquosa, em equipamento Mini Spray drier (modelo MSD 1,0 de Labmaq, São Paulo, Brasil). Como adjuvantes de secagem foram empregados o dióxido de silício coloidal (Aerosil[®] 200, HDK N-20 Wacher Chemie/Alemanha) e a celulose microcristalina (Avicel[®] PH 101, CMC, Guarulhos/São Paulo) na concentração de 30%. Após o preparo do produto, o EEP foi protegido da luz e da umidade, sendo acondicionado em frasco opaco, hermético e armazenado em dissecador (BASTOS, 2011).

4.3 Delineamento experimental

Neste projeto investigou-se as atividades biológicas *in vitro* do EEP sobre enzimas digestivas, enzima conversora de angiotensina, efeitos antioxidantes químicos e celulares, efeitos assim como efeitos citotóxicos. Os experimentos *in vivo*, envolvendo as atividades sobre a pressão arterial e metabolismo lipídico, assim como os efeitos tóxicos agudos também foram realizados. O delineamento experimental pode ser observado na Figura 5 abaixo.

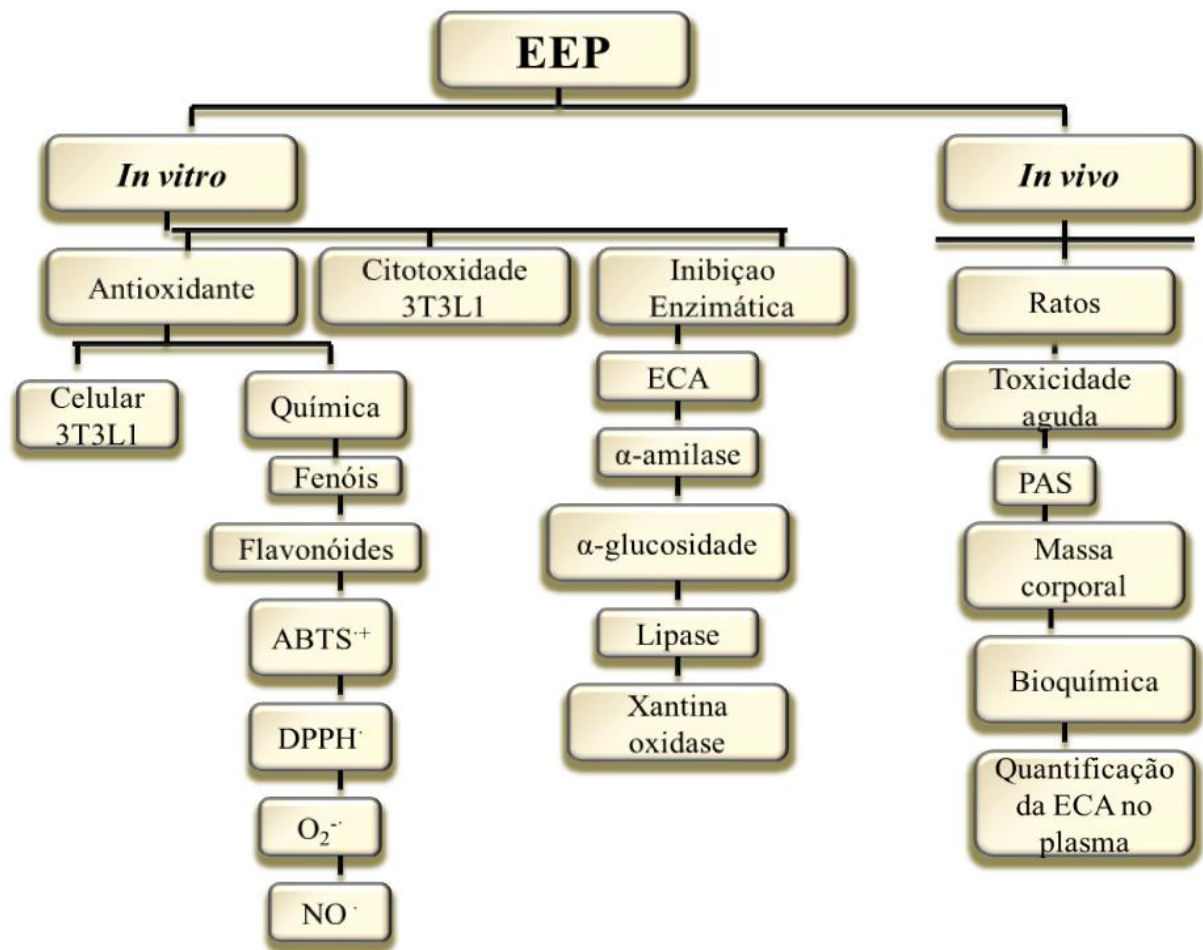


Figura 5- Delineamento experimental
Fonte: Própria

4.4 Experimentos *in vitro*

4.4.1 Determinação do teor de compostos fenólicos totais

A quantificação dos compostos fenólicos totais presentes na amostra do EEP foi determinada espectrofotometricamente de acordo com a metodologia descrita por Xu e Chang (2009), utilizando o reagente de Folin-Ciocalteu e o ácido gálico como substância padrão.

Primeiramente o EEP (1 mg/mL) foi diluído em etanol, posteriormente o reagente Folin Cicalteal foi preparado por diluição de uma solução-mãe (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemanha) com água destilada (1/10, v/v). As amostras (10 μ L), em triplicata, foram colocadas em microplacas de 96 poços de fundo chato e adicionados a 290 μ L de etanol. Fez-se a primeira leitura (A_1) no leitor de Elisa na absorvância (Abs) de 620 nm (Detector multimodo- DTX 800). Posteriormente, em outros poços, adicionou-se 10 μ L das amostras, que foram misturadas com 50 μ L do reagente Folin Cicalteal e incubadas por 8 minutos no escuro. Após, 0,4% de carbonato de sódio (m/v) (240 μ L) foi adicionado à mistura e a reação foi novamente incubada por 5 minutos e seguiu-se a segunda leitura (A_2). O ácido gálico foi utilizado como substância padrão da reação utilizando as mesmas condições do extrato e o etanol como controle negativo da reação. A atividade foi calculada pela fórmula:

$$\% \text{ de fenóis} = 100 - (\text{Abs } A_2 - A_1 / \text{Abs}_{\text{controle}}) \times 100$$

Os resultados foram expressos em miligrama por equivalente de ácido gálico por grama do extrato.

4.4.2 O ensaio de teor total de flavonoides

A determinação do teor total de flavonoides foi realizada de acordo com o método modificado de De Chang *et al.*, (2002). Primeiramente, o extrato (30 μ L) foi diluído em etanol (1 mg/mL) e em seguida adicionado 270 μ L de etanol. Fez-se a primeira leitura (A_1) da absorvância no comprimento de onda 405 nm, em leitor de Elisa (DTX 800 Detector multimodo). Posteriormente, em outros poços 30 μ L do extrato foi acrescido de 90 μ L de

etanol em cada cavidade da microplaca de 96 poços de fundo chato. Logo após, foi adicionado 6µL de cloreto de alumínio a 10% (m/v) e 6µL de acetato de potássio a 1M, ambos diluídos em água destilada. Para finalizar, foi adicionado 168 µl de água destilada. A placa foi incubada por 30 minutos à temperatura ambiente e, em seguida, foi feita a determinação da absorbância (A₂). A quercetina foi utilizada como padrão da reação utilizando as mesmas condições do extrato e o etanol como controle negativo da reação. A determinação da concentração de flavonoides foi feita pela seguinte fórmula:

$$\% \text{ de flavonoides} = 100 - (\text{Abs } A_2 - A_1 / \text{Abs}_{\text{controle}}) \times 100$$

Os resultados foram expressos em miligrama por equivalente de quercetina por grama do extrato.

4.4.3 Ensaio antioxidantes químicos

4.4.3.1 Atividade de varredura do radical ABTS^{•+} (ácido 2,2'-azinobis-3-etilbenzotiazolino-6-sulfônico)

O ensaio do ABTS^{•+} baseou-se no método de Re *et al.* (1999) com modificações para adaptar o volume a microplaca. ABTS foi dissolvido em água MilliQ mantendo-se uma concentração de 7 mM. Uma solução catiônica de ABTS^{•+} foi preparada pela reação da solução estoque de ABTS com 5 mL da solução de persulfato de potássio (5 mM) que reagiu estequiometricamente por 12-16 horas, em temperatura ambiente e ausência de luz, resultando numa oxidação completa do ABTS^{•+}.

Uma vez formado o radical ABTS^{•+} foi feita uma diluição (1:7) com água milliQ. O ensaio foi realizado na seguinte forma: em uma placa de 96 poços de fundo chato foi adicionado 100 µL da solução de ABTS^{•+} com 200µL de água. Esta solução foi monitorada no leitor de microplaca (DTX 800, Beckman) a 714 nm até obter absorbância aproximadamente de 1,00 (±0,1). Em seguida, 30 µL do EEP em diferentes concentrações (5, 10, 25, 50 e 100 µg / mL) foram adicionadas a 170 µL de água (Leitura A₁). Em seguida,

adicionou-se 100 μL da solução de ABTS^{++} e a reação foi incubada por 15 minutos a temperatura ambiente e na ausência de luz. Após a incubação foi realizada a leitura A_2 . Para expressar a atividade antioxidante foi calculado a CI_{50} . Os valores de CI_{50} denotam a concentração da amostra que é necessária para varrer 50% do radical livre. Quanto maior o consumo do radical por uma amostra, menor sua CI_{50} e maior a sua atividade antioxidante (CLEYTON *et al.*, 2007). Como padrão da reação foi usado o ácido ascórbico e o ácido gálico. No branco foi adicionado 30 μL do extrato acrescido de 270 μL de água milliQ e no controle foi utilizado água milliQ no lugar do extrato/ padrão . A atividade antioxidante foi calculada usando a seguinte equação:

$$\% \text{ de inibição do radical } \text{ABTS}^{++} = 100 - (A_2 - A_1 / \text{Abs}_{\text{controle}}) \times 100$$

4.4.3.2 Atividade sequestradora do radical DPPH^{\cdot} (2,2- difenil-1-picrilhidrazila)

O radical DPPH^{\cdot} é um radical livre estável gerado de forma similar ao ABTS^{++} , por reações químicas ou enzimáticas. O sequestro do radical ocorre quando em contato com substâncias antioxidantes o que evidencia uma descoloração da solução, caracterizando a reação de redução (MOLYNEUX, 2004). Por ação de um antioxidante, o DPPH^{\cdot} , de coloração púrpura, é reduzido a difenil-picril-hidrazina, de coloração amarela, podendo ser verificado o decréscimo da absorbância (SÁNCHEZ-MORENO, 2002).

A medida da atividade sequestradora de DPPH^{\cdot} foi realizada de acordo com o método de MAHMOUDI *et al.*, (2009) com algumas modificações relacionadas ao volume alterado para microplaca. Inicialmente foi pesado 2 mg de DPPH^{\cdot} e dissolvido em 12 mL de etanol absoluto. Em uma placa de 96 poços de fundo chato foi adicionado 170 μL da solução etanólica de DPPH^{\cdot} mais 30 μL de DMSO. Esta solução foi monitorada pela leitura em 492 nm no leitor de microplaca (DTX 800, Beckman) até obter absorbância aproximadamente 1,00 ($\pm 0,1$). Posteriormente foi adicionado mais 100 μL da solução etanólica de DPPH^{\cdot} .

Diferentes concentrações do extrato (5, 10, 25, 50 e 100 µg / mL) foram adicionadas na microplaca, em um volume igual (30µL), para uma solução etanólica (170 µL) e fez-se a leitura A_1 no leitor de microplaca (DTX 800, na absorvância de 492 nm). Em seguida, 100 µL da solução etanólica de DPPH[·] (100 mM) foi adicionado e a reação foi incubada por 30 minutos (no escuro e a temperatura ambiente) e feito a leitura A_2 . A avaliação quantitativa da atividade antioxidante foi feita monitorando-se o consumo do radical livre DPPH[·] pelo EEP e os resultados foram quantificados por meio da medida do decréscimo da absorvância de soluções com diferentes concentrações (SÁNCHEZ-MORENO, 2002). Foi utilizado ácido ascórbico e o ácido gálico como antioxidantes padrões. No branco foi adicionado 30 µL do EEP com 270 µL de etanol e no controle foi usado etanol no lugar do extrato/padrão. Os experimentos foram repetidos em triplicatas.

A atividade antioxidante foi calculada usando a seguinte equação:

$$\% \text{ de inibição do radical DPPH}^{\cdot} = 100 - (A_2 - A_1 / \text{Abs}_{\text{controle}}) \times 100$$

4.4.3.3 Atividade de sequestradora do ânion radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$)

A atividade sequestradora do radical $O_2^{\cdot-}$ foi medida pelo método azul de nitrotetrazólio (NBT) (ÖZTÜRK *et al.*, 2007). A formação do ânion radical superóxido procedeu-se por meio de uma mistura de fenazina metassulfato (PMS) (10 µM), nicotinamida adenina dinucleotídeo (NADH) (390 µM) e NBT (250 µM) diluídos em tampão fosfato (0,1 M, pH 7.4). Com o auxílio de pipetas multicanal, em cada poço de uma microplaca foi adicionado 100µL de NADH, 100µL de NBT e 50µL de diferentes concentrações do EEP (5, 10, 25, 50 e 100 µg / mL). A reação foi incubada à temperatura ambiente durante 5 min e foi feita a primeira leitura (A_1) da reação a 560 nm (DTX 800, Beckman, CA, USA). Em seguida foi misturado 100 µL de PMS à solução, e essa mistura foi incubada por mais 5 minutos a temperatura ambiente. A absorvância foi lida novamente (A_2) no mesmo comprimento de

onda. Como padrão foi utilizado o ácido ascórbico e o ácido gálico utilizando as mesmas condições do extrato e o tampão fosfato como controle da reação. A atividade sequestradora do radical foi medida pela redução da absorvância e foi calculada usando a seguinte equação:

$$\% \text{ de Inibição} = 100 - (\text{Abs } A_2 - A_1 / \text{Abs}_{\text{controle}} \times 100)$$

4.4.3.4 Análise do sequestro do radical do Óxido nítrico (NO[·]) *in vitro*

Para avaliação do sequestro do NO[·] foi utilizada a metodologia descrita por Govindarajan *et al.*, (2003), onde o reagente Griess Illosvoy foi modificado usando naftil - etilenodiamina dicloridrato (0,1% w/v), ao invés da sulfanilamina (5%). A reação ocorreu por meio de uma mistura contendo 2 mL de nitroprussiato de sódio (10 mM), 0,5 mL de tampão fosfato (10 mM, pH 7,2) e 0,5 mL do EEP em diferentes concentrações (5, 10, 25, 50 e 100 µg/mL) foi incubada a 25 ° C por 150 minutos. Após a incubação foi adicionado 1 mL de ácido sulfanílico (0,33% em 20% de ácido acético glacial). A mistura foi deixada em repouso por 10 minutos para completar a diazotação do nitrito com a sulfanilamida e, em seguida, foi adicionado 1 mL de naftil-etilenodiamina dicloridrato, que foi homogenizada e deixada em repouso por 30 minutos a 25 ° C. Foi formado um composto de cor rosa que é cromófora em luz difusa. A absorvância destas soluções foram medidas em leitor de microplaca (DTX 800, Beckman) a 540 nm. Como padrão foi utilizado o ácido ascórbico utilizando as mesmas condições do extrato e o tampão fosfato como controle.

O procedimento é baseado no princípio de que, o nitroprussiato de sódio em solução aquosa e pH fisiológico gera espontaneamente óxido nítrico, que interage com o oxigênio para produzir íons nitrito (EBRAHIMZADEH *et al.*, 2009).

A atividade antioxidante foi calculada usando a seguinte equação:

$$\% \text{ de inibição} = 100 - (\text{Abs}_{\text{amostra}} / \text{Abs}_{\text{controle}}) \times 100$$

4.5. Cultura de Células

Células da linhagem 3T3-L1 (fibroblastos embrionárias de camundongos) foram obtidas do banco de dados do Rio Janeiro e foram mantidas em laboratório de cultura da Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade Federal do Amazonas. As células 3T3-L1 foram cultivadas em meio Eagle Dulbecco modificado (DMEM), suplementado com 10% de soro fetal bovino (FBS) (Sigma), penicilina (100 U / mL) e estreptomicina (100 U/mL). As células foram incubadas a 37° C numa atmosfera umidificada contendo 5% de CO₂.

4.5.1 Atividade antioxidante celular

A atividade antioxidante celular foi avaliada na linhagem celular de fibroblastos de camundongos (3T3-L1) segundo o método descrito por Wolfe e Liu (2007). A determinação da capacidade antioxidante do EEP foi feita pela detecção indireta dos radicais livres por fluorimetria, empregando diacetato de 2'-7'-diclorofluoresceína (DCFH-DA) como substrato. O DCFH-DA, após sofrer desacetilação por esterases intracelulares pode ser oxidado por espécies reativas de oxigênio (EROS) gerando um composto fluorescente (2'-7'-DCF).

O método mede a capacidade de compostos de impedir a formação de DCF, e assim diminuir a fluorescência celular. Células 3T3-L1 foram semeadas a uma densidade de 6×10⁴ células/poço em uma microplaca de 96 poços contendo 100 µL de meio de crescimento. Vinte e quatro horas após a incubação em estufa de CO₂ a 37 °C, o meio de crescimento foi removido e os poços foram lavados com PBS. Depois, 100 µL de DCFH-DA (10 µM) dissolvido em tampão Hank's foi adicionado e incubado durante 30 min na estufa. Em seguida as células foram lavadas com 100 µL de PBS e diferentes concentrações (50, 25, 12, 6,25; 3,125; 1,56 µg/mL) do EEP (100 µL) foram adicionadas. A quercetina foi utilizada como padrão da reação na concentração de 5 µg/mL nas mesmas condições do extrato.

A fluorescência foi medida imediatamente no leitor de microplaca (DTX 800, Beckman) com comprimento de onda de excitação de 485 nm e comprimento de onda de emissão de 535 nm. Controles com/sem DCFH-DA também foram realizados. De todas as concentrações das amostras foi subtraído o valor de fluorescência do branco no respectivo tempo. O potencial antioxidante foi expresso em unidades de fluorescência. O percentual de inibição da fluorescência foi calculado para o tempo de 60 minutos conforme a fórmula abaixo:

$$\% \text{ inibição} = 100 - (\Delta F_{\text{amostra}} / \Delta F_{\text{controle}}) \times 100, \text{ onde } \Delta F = \text{fluorescência aos 60 minutos} - \text{fluorescência no tempo 0}.$$

4.5.2. Ensaio de viabilidade Celular

A citotoxicidade do EEP em células fibroblásticas (3T3-L1) foi determinada pelo método de Alamar Blue de acordo com Nakayama *et al.*, (1997). O ensaio de Alamar Blue é um ensaio colorimétrico que envolve a redução celular do resazurina a resorufina. A viabilidade celular foi determinada utilizando-se o corante vital Azul Tripán (Merck) 0,4% p/v, em PBS e a contagem das células realizada em microscópio invertido LEITZ, com a utilização de um hemocitômetro, preenchido com uma alíquota da suspensão de células homogeneizada. Resumidamente, as células aderentes (5×10^3 células / poço) foram cultivadas em placas de 96 poços de cultura de tecidos, e expostas ao EEP (50, 25, e 12,5 $\mu\text{g/mL}$) durante 24, 48 e 72 h. Após a incubação, 10 μL da solução de Alamar Blue (0,4% de resazurina diluída em PBS 1:20) foi adicionada e as células foram incubadas durante 2h a 37° C em estufa de CO₂ a 5%. A fluorescência foi medida (excitação de 545 nm e emissão a 595 nm) e expressa como percentagem das células controle após a subtração da fluorescência. A doxorrubicina (5 $\mu\text{g/mL}$) foi utilizada como padrão da reação. O controle consistiu de poços contendo célula + DMSO + resazurina e como branco, poços contendo célula + meio de

crescimento + resazurina. Os ensaios foram realizados em triplicata. A viabilidade foi calculada conforme a fórmula abaixo:

$$\% \text{ Viabilidade} = F_{\text{amostra}} \times 100 / F_{\text{controle}}, \text{ onde } F_{\text{amostra}} = (\text{fluoresc\^encia da c\^elula} + \text{meio} + \text{subst\^ancia} + \text{resazurina}); F_{\text{controle}} = (\text{fluoresc\^encia da c\^elula} + \text{meio} + \text{resazurina})$$

4.6 Testes de inibi\c7\~ao enzim\^atica

Os testes de inibi\c7\~ao enzim\^atica foram realizados em microplacas de fundo chato (Global Trade) com 96 po\c7\~os e a leitura efetuada em Leitor de Microplaca (DTX 800, Multimo Detector, Beckman Coulter). Todos os testes foram realizados em triplicata. A partir dos resultados de porcentagem de inibi\c7\~ao foi calculada a concentra\c7\~ao capaz de inibir 50% da atividade enzim\^atica (CI_{50}). O efeito inibit\^orio das enzimas foi comparado com o efeito das drogas padr\~oes utilizadas nas concentra\c7\~oes a partir de 1 mg/mL, em concentra\c7\~oes decrescentes.

4.6.1 Teste de inibi\c7\~ao da α -amilase salivar

O teste de inibi\c7\~ao da α -amilase foi realizado de acordo com Subramanian *et al.*, (2008) com algumas modifica\c7\~oes. A inibi\c7\~ao da α -amilase se baseia no princ\^ipio da degrada\c7\~ao de um substrato de amido e a posterior rea\c7\~ao com o reagente (iodo), que revelará a inibi\c7\~ao da enzima pelo extrato. Uma vez que o EEP iniba a enzima, o substrato reagirá com o iodo gerando uma colora\c7\~ao azulada.

Nos po\c7\~os teste foram adicionados 10 μ L do EEP (1-1000 μ g/mL) dilu\^ido em DMSO (50 % v. v.) (Proqu\^imicos, Bangu, Rio de Janeiro, Brasil) e 10 μ L da enzima α -amilase (3.3 U; Sigma Aldrich Chemical, Co, USA) dilu\^ida em \c3\~gua deionizada na concentra\c7\~ao 0,1 mg/mL. A placa foi incubada em banho-maria a 37 $^{\circ}$ C por 5 minutos. Posteriormente, foram adicionados 30 μ L do substrato da amilase (Labtest $^{\circ}$, Lagoa Santa, MG, Brasil) em cada um dos po\c7\~os, e as amostras foram incubadas por mais 8 minutos,

seguidas pela leitura a 620 nm (DTX 800, Beckman, CA, USA). Então, 100 µL do reativo da α-amilase (Labtest®) e 150 µL de água destilada foram adicionados na microplaca e incubados por mais 5 minutos a 37° C. Foi utilizado o DMSO (dimetil- sulfóxido) como controle e a quercetina (1-1000 µg/mL) como padrão, utilizando as mesmas condições do extrato. No branco foi adicionado 10 µL do extrato acrescido de 290 µL de DMSO.

A segunda reação foi lida novamente no mesmo comprimento de onda. A inibição foi calculada utilizando a fórmula:

$$\% \text{ de Inibição} = 100 - (\text{Abs } A_2 / A_1 / \text{Abs}_{\text{controle}}) \times 100$$

4.6.2 Teste de inibição da α-glucosidase

A atividade inibitória da α-glucosidase foi determinada de acordo com Andrade-Cetto *et al.*, (2008), com pequenas modificações, por meio da medição da liberação de 4-nitrofenol a partir do 4-nitrofenil-α-D-glicopiranosídeo (4-NPGP). Foi utilizado tampão fosfato de sódio 10 mM, pH 6,9, 5mM de 4-NPGP, 2U da enzima obtida de *Saccharomyces cerevisiae* E.C 3.2.1.20 (Sigma Aldrich Chemical, Co, EUA), EEP, DMSO como controle negativo e quercetina como padrão nas mesmas concentrações do extrato. Os testes foram feitos em triplicata com as concentrações iniciadas em 1 mg/mL que sofreram diluições seriadas (5-8 vezes).

A reação foi iniciada pela adição de 20 µL do EEP, DMSO ou quercetina com 180 µL da enzima α-glucosidase, que foram incubados a 37° C por 2 minutos. Depois foram adicionados em cada poço 150 µL do reagente de cor 4-nitrofenil-α-D-glicopiranosídeo (Sigma) e foi feita à primeira leitura (A_1) no leitor de Elisa numa absorvância de 405 nm. A placa foi incubada mais uma vez, nas mesmas condições, por um período de 15 minutos. Após foi feita uma segunda leitura (A_2) no mesmo comprimento de onda. A inibição foi calculada usando a fórmula abaixo:

$$\% \text{ de Inibição} = 100 - (\text{Abs } A_2 - A_1 / \text{Abs}_{\text{controle}}) \times 100$$

4.6.3 Teste de inibição da lipase

Para a determinação da atividade inibitória da lipase foi utilizado o procedimento descrito por Slanc *et al.*, (2009). Foi preparada uma solução (5 mg/mL) de lipase do porco (Sigma, Steinheim, a Alemanha). O reagente de cor foi preparado a partir de uma solução 10 mM de p-nitrofenilpalmitato (PNP) (Sigma, Steinheim, a Alemanha) em acetonitrila na concentração final 3,33 mM. O EEP e o Orlistat foram diluídos 5 vezes em sequencia, a partir da concentração de 1 mg/mL. A composição da mistura da reação foi: 20 µL do EEP, DMSO (controle negativo) ou droga padrão (orlistat) acrescida de 180 µL da enzima que foram incubados por 2 minutos a 37 °C. Após, foi adicionado 130 µL do tampão Tris-HCl (75mM; pH=8.5) seguido pela primeira leitura a 415 nm (A₁). A segunda leitura (A₂) foi feita após 15 minutos da adição de 20 µL de PNP, o reagente de cor, e absorbância lida novamente no mesmo comprimento de onda. A inibição foi calculada segundo a fórmula:

$$\% \text{ de Inibição} = 100 - (A_2 - A_1 / \text{Abs}_{\text{controle}}) \times 100$$

4.6.4 Teste de inibição de xantina oxidase

A atividade da xantina oxidase foi medida por meio da formação do ácido úrico a partir da xantina conforme o método de COS *et al.*, (1998). O reagente 1 foi preparado a partir de uma mistura da xantina oxidase (667 mM) em EDTA (0,1 mM) e hidroxilamina (0,2 mM) em 50 mM de tampão fosfato (100 mmol / L; pH 7,5). Em cada poço da placa foram adicionados 40 µL da enzima xantina, 15 µL do EEP (200 - 12.5 µg/mL), DMSO (controle negativo), ou alopurinol (padrão) que foram incubados por 5 minutos a 37° C. Então, 95 µL do reagente 1 foi adicionado à mistura e incubado novamente por 30 minutos a 37 ° C . A absorbância foi medida no leitor de microplaca (DTX 800, Beckman, CA, USA) a 295 nm.

Posteriormente, 150 μL do reagente de ácido úrico foi adicionado à mistura e a absorvância foi medida novamente. A porcentagem de inibição da atividade da xantina oxidase foi calculada de acordo com a fórmula:

$$\% \text{ de Inibição} = 100 - (A_2 - A_1 / \text{Abs}_{\text{controle}}) \times 100$$

4.6.5 Teste de inibição da enzima conversora de angiotensina (ECA)

A atividade de inibição da enzima conversora de angiotensina (ECA) foi determinada pelo método fluorimétrico indireto, descrito por Serra *et al.*, (2005), com adaptações. A solução da ECA foi obtida a partir de um extrato acetônico de pulmão de coelho (Sigma) na concentração de 100 mg/mL em tampão fosfato (5mM; pH: 8,0). O teste de inibição da ECA foi determinada pela inibição da liberação do dipeptídeo-L-histidina-L-leucina (His-Leu) formado após hidrólise do substrato tripeptídico sintético Hipuril-L-histidina-L-leucina (Hip-His-Leu) (5 mM) pela ECA. O dipeptídeo His-Leu formado foi acoplado uma substância fluorescente, o orto-ftaldialdeído (2% em metanol; 10mL) e a fluorescência resultante foi quantificada por fluorímetro (excitação = 360 nm e emissão=500 nm).

O teste procedeu-se da seguinte forma: Em poços distintos foram adicionados 10 μL do EEP ou tampão fosfato (controle) ou Captopril (padrão) para então ser adicionado 40 μL da solução enzimática. Após 5 minutos de incubação a 37° C foi adicionado 50 μL do Hip-His-Leu e incubado por uma hora a 37° C. Em seguida foi adicionado 150 μL de NaOH (0,28 M) e 15 μL de orto-ftaldialdeído (2% em metanol) e a reação foi novamente incubada por trinta minutos no escuro e a temperatura ambiente. Posteriormente, 50 μL de HCl (3N) foi adicionado e a reação incubada por mais trinta minutos no escuro. Por fim, foi efetuada a centrifugação da microplaca a 2000 rpm por 10 minutos, onde 200 μL do sobrenadante foi transferido para um placa escura e efetuado a leitura no Leitor de Elisa (DTX 800, Multimodo

Detector, Beckman Coulter) em excitação = 360 nm e emissão=500 nm. O cálculo de porcentagem de inibição foi:

$$\% \text{ inibição} = 100 - (\text{Abs}_{\text{amostra}} / \text{Abs}_{\text{controle}}) \times 100$$

O extrato com atividade inibidora de ECA superior a 50% sofreu diluições seriadas a partir de 10 mg/mL.

4.7 Experimentos *in vivo*

4.7.1 Animais de experimentação

Foram utilizados 42 ratos machos (*Rattus norvegicus*), da cepa Wistar, pesando entre 200-350g nos experimentos de toxicidade (n=12) e pressão arterial (n=30). Esses animais foram provenientes do biotério Central do Campus da Universidade Federal do Amazonas (UFAM). Todos os animais foram mantidos em gaiolas de plástico com maravalha de pinho autoclavada, sob o ciclo claro-escuro de 12 horas, mantidos em condições controladas de temperatura (21° C) com livre acesso à água e ração apropriada para roedores. Todos os protocolos experimentais seguiram estritamente as normas internacionais de cuidados com animais de laboratório e estavam de acordo com as normas preconizadas pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEEA) - UFAM. Este projeto foi devidamente submetido e aprovado pelo CEEA-UFAM sob o número de protocolo nº 77/2012, atendendo as normas de cuidados com animais.

4.7.2 Avaliação da toxicidade aguda do EEP

Os testes de toxicidade aguda foram realizados de acordo com os critérios estabelecidos pela Resolução nº. 90 de 16 de março de 2004 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e Parra *et al.*, (2001) com adaptações. Os animais (n=12) em jejum de 1-2 horas foram divididos em dois grupos: Grupo 1: Ratos que receberam o EEP na dose única de 2 g/kg (v.o) e Grupo 2: Ratos Wistars controle que receberam solução salina

(0,9%; v.o) seguindo as mesmas condições experimentais. O volume máximo administrado foi de 0,1 para cada 100 g/peso.

Após a administração do EEP/salina, os animais foram observados acuradamente por 60 minutos em gaiolas individuais, tendo a bandeja coberta com papel branco. O período de observação ocorreu durante as primeiras 48 h até o 14º dia após a administração. Durante esse período foi realizado alguns testes para avaliação da toxicidade, como os testes de coordenação motora, reflexo corneal, resposta ao aperto da cauda, marcha (ataxia) e tônus muscular. Também foram avaliados parâmetros comportamentais como o estado de consciência, irritabilidade, resposta ao toque, presença de alterações relacionadas ao sistema nervoso (tremores, convulsões, sedação, analgesia, anestesia, lacrimejamento, ptose palpebral, defecação, poliúria, piloereção, hipotermia, ritmo respiratório), alterações no peso corporal, quantificação do consumo de água e ração, letalidade e reversibilidade dos sintomas, usando-se a metodologia modificada proposta por Malone e Robichaud, (1983).

Ao final do teste, os animais foram anestesiados com cetamina (90 mg/kg, i.p) e xilazina (10 mg/kg i.p) procedendo-se à coleta de sangue caudal, para obtenção do plasma e avaliação dos parâmetros bioquímicos. Nesse estudo não se objetivou o cálculo da dose letal mediana (DL₅₀), pois segundo Svendsen (1978), essa determinação tem caído em desuso na maioria dos países, sendo substituída por outros estudos de toxicidade, especialmente o emprego de doses fixas.

4.7.3 Indução da hipertensão renovascular em ratos e tratamento farmacológico

Para a obtenção de ratos com hipertensão renovascular (2R1C) foi utilizada a técnica descrita por Goldblatt *et al.*, (1934). Primeiramente, os ratos foram anestesiados com a combinação de cetamina (90 mg/kg, i.p) e xilazina (10 mg/kg i. p) e após atingir o plano anestésico, os animais foram colocados numa prancha de madeira de 30 x 35 cm e fixados com fitas adesivas nas 4 patas. A seguir, foi realizada a tricotomia dos pelos na parede

anterior do abdômen e antissepsia com álcool iodado a 2%. Também foi colocado um pano fenestrado que delimitou o campo operatório. Os animais foram submetidos a uma laparotomia mediana para exposição do pedúnculo renal e colocação de um clipe de prata (2 x 5 cm) com 0,2 mm de abertura na artéria renal esquerda. Os animais normotensos passaram por uma cirurgia fictícia, onde sofreram o procedimento cirúrgico, no entanto, não foi colado o clipe na artéria.

No pós-operatório imediato, os animais receberam tratamento com antibiótico (pencil pronto) em dose única por via intramuscular (1 mL/Kg). Além disso, os animais receberam rifamicina sódica diariamente no local da incisão, durante todo o período de cicatrização cirúrgica (DIAS *et al.*, 1999). Os animais operados foram mantidos em gaiolas individuais e receberam ração e água *ad libitum*. A indução da hipertensão renovascular e a avaliação do efeito pressórico do EEP foram realizadas no laboratório de Fisiologia do Departamento de Ciências Fisiológicas da Universidade Federal do Amazonas (UFAM).

A escolha desse modelo experimental foi baseada nos trabalhos publicados por Lima-Landman *et al.*, (2007) que consideram o rato Wistar como a melhor espécie animal para se estudar os efeitos anti-hipertensivos de um extrato, uma vez que esse animal apresenta reatividade vascular e função renal muito semelhante às encontradas nos seres humanos. Ademais, também foi selecionado o tratamento do extrato por via oral, pois essa via é considerada a mais segura para testes farmacológicos de extratos desconhecidos.

Após o procedimento cirúrgico, 30 ratos machos foram divididos e distribuídos aleatoriamente em cinco grupos experimentais como descritos abaixo:

Grupo Normotenso (2R) → Ratos normotensos, manipulados cirurgicamente (cirurgia fictícia) que receberam veículo (salina, 0,9%; v.o) após à terceira semana da cirurgia.

Grupo Hipertenso salina (2R1C) → Ratos com hipertensão renovascular que receberam veículo (salina, 0,9%; v.o) após à terceira semana da cirurgia.

Grupo Hipertenso EEP 150 mg/kg/dia (EEP150) → Ratos com hipertensão renovascular que receberam EEP na dose de 150 mg/kg/dia; v.o, após à terceira semana da cirurgia.

Grupo Hipertenso EEP 300 mg/kg/dia (EEP300) → Ratos com hipertensão renovascular que receberam EEP na dose de 300 mg/kg/dia; v.o, após à terceira semana da cirurgia.

Grupo Hipertenso Enalapril 20 mg/kg/dia (ENAL) → Ratos com hipertensão renovascular que receberam enalapril na dose de 20 mg/kg/dia; v.o, após à terceira semana da cirurgia.

As doses das substâncias administradas foram ajustadas de acordo com o peso dos animais, que foram pesados duas vezes por semana. O período de tratamento de todos os grupos experimentais compreendeu 21 dias ininterruptos após a terceira semana da clipagem da artéria renal ou cirurgia fictícia, no caso do Grupo 2R. O tratamento de todos os grupos foi via gavagem, ou seja, injetado diretamente no esôfago por meio de uma cânula introduzida pela cavidade oral (RODRIGUES, 2005). Conforme Lima-Landman *et al.*, (2007), o volume máximo administrado não ultrapassou 1 mL/kg. Para obter uma adequação do procedimento de gavagem, todos os animais controle (Grupo 2R e 2R1C) receberam o mesmo volume de veículo e as aferições pressóricas foram realizadas antes do procedimento de gavagem a fim de não estressar o animal. Ademais, tanto o EEP como o enalapril foram diluídos em solução salina (0,9%).

4.7.4 Determinação da pressão arterial sistólica de ratos Wistars

A pressão arterial sistólica foi determinada de forma não-invasiva por pletismografia de cauda (“*tail-cuff*”) acoplado a um medidor de pressão digital modelo LE 501 (Lettica PanLab, Barcelona, Espanha) (Lima-Landman *et al.*, 2007). A pressão arterial caudal foi aferida antes e após a cirurgia de implante do clipe na artéria renal até a sexta semana,

respeitando um período de sete dias após o procedimento cirúrgico. Durante o período de tratamento, a pressão sistólica foi verificada 3 vezes por semana.

Para a aferição da PS, o animal foi previamente aquecido em estufa entre 40° e 45° C durante 10 minutos. Este método foi utilizado por ser amplamente empregado, depender de técnica simples, ser rápido e não necessitar do uso de anestésico (DIAS *et al.*, 1999). As aferições pressóricas foram reproduzidas em média 5 vezes para confirmação dos dados e para adaptação dos animais. Foram considerados hipertensos os animais que apresentaram pressão arterial sistólica superior a 160 mmHg.

4.7.5 Quantificação da atividade da enzima conversora de angiotensina (ECA) no plasma de ratos normotensos e hipertensos (2R1C)

A quantificação da ECA no plasma de ratos foi realizada conforme o método de Santos, Krieger e Greene (1985), que utiliza uma metodologia similar à descrita no teste de inibição da ECA. Para a realização desse ensaio foi coletado o plasma dos animais pertencentes aos Grupos 2R, 2R1C, GHE300 e GHenal. As amostras do sangue foram obtidas por punção cardíaca (após anestesia profunda), onde aproximadamente 1 mL de sangue foram coletados usando uma seringa heparinizada (500 UI). Em seguida, o sangue foi centrifugado a 2500 rpm, durante 10 minutos. O plasma foi armazenado a -20°C, até o momento do teste. A fluorescência relativa foi determinada nos grupos estudados.

4.7.6 Análise bioquímica plasmática

Ao final dos experimentos com os animais, os mesmos foram anestesiados com os mesmos anestésicos descritos acima e, aproximadamente, 2 mL de sangue, via punção cardíaca foram coletados utilizando uma seringa heparinizada. O sangue foi coletado em frasco e após a coleta, centrifugado a 3000 rpm por 10 minutos para a obtenção do plasma, que foi armazenado a -20°C até a sua utilização.

O plasma foi utilizado para determinar as concentrações séricas de C-t, HDL, LDL, VLDL, TG, glicose, creatinina, uréia, albumina, proteínas, ácido úrico, aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT) por meio de kits enzimáticos específicos para cada substância (BRANCO *et al.*, 2011). Todas as análises foram determinadas em analisador automático Cobas Mira ® (Roche Diagnostics), usando kits BIOCLIN ® no laboratório de atividade biológica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Os animais foram previamente submetidos a jejum prévio de 12 horas, para evitar possíveis interferências nas dosagens.

Após a obtenção direta dos valores de HDL, as concentrações plasmáticas de LDL e VLDL foram obtidas a partir da fórmula de Friedewald, Levy e Fredrickson (1972): $LDL \text{ (mg/dL)} = C\text{-t} - (VLDL + HDL)$, onde; $VLDL \text{ (mg/dL)} = TG / 5$.

4.8 Análise estatística

Os resultados dos experimentos foram expressos como média \pm desvio padrão da média. As múltiplas comparações foram realizadas com o teste paramétrico One-way Anova seguido do teste de Tukey ou Dunnett para múltiplas comparações ou Two-way Anova quando houver a necessidade de comparação dos dados com duas variáveis seguidos pelos *post hoc* Bonferroni. Diferenças entre dois grupos foram comparadas utilizando o teste t pareado ou não pareado. Foram considerados estatisticamente significativos os resultados que apresentaram probabilidade de ocorrência da hipótese nula menor que 5% ($p < 0,05$). Todas as análises foram realizadas usando o software GraphPad Prism 6.0. Para os testes *in vitro*, a concentração inibitória de 50% (CI_{50}) foi obtida por regressão linear simples utilizando o programa Microcal TM Origin Versão 6.0 da Microcal Software Inc., e os resultados foram apresentados em forma de figuras e tabelas.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nesse estudo foi evidenciado que extrato aquoso das folhas de *E. puniceifolia* apresentou várias propriedades medicinais envolvendo algumas das características presentes na SM.

5.1 Resultados dos ensaios *in vitro*

Os primeiros resultados mostraram que o EEP apresentou teor de fenóis e flavonoides de $21,6 \pm 1,0$ mg por equivalente de ácido gálico (GAE/g) e $2,62 \pm 0,5$ mg por equivalente de quercetina (QE/g), respectivamente. Um estudo realizado por Reynertson *et al.*, (2008) com espécies de plantas do mesmo gênero, também demonstrou a presença de polifenóis. O teor de fenóis totais encontrados em extratos vegetais de outras espécies, como na *Caesalpinia spinosa* foi de 0,5 mg por equivalente de ácido gálico (GAE/g) e o de flavonoides foi de 3,08 mg por equivalente de catequina (QE/g) (SKOWYRA *et al.*, 2013), resultado este com menor teor de fenóis e valores similares aos de flavonoides encontrado no presente trabalho.

De acordo com Cai *et al.*, (2004) existe uma correlação importante entre a atividade antioxidante e os metabólitos secundários, incluindo o grupo de polifenóis derivados de plantas. Vários estudos expressam que as plantas medicinais são fontes ricas de antioxidantes e, portanto, podem ser utilizadas como agentes terapêuticos (APEL; HIRT, 2004; ESPÍN; GARCÍA-CONESA; TOMÁS-BARBERÁN, 2007).

Truong *et al.* (2007) identificaram que a capacidade antioxidante dos compostos estudados era mais fortemente correlacionada com a presença de fenóis totais do que com o teor de flavonoides, assim como reportado nesse estudo. Contrariando esse achado, alguns autores revelaram que os flavonoides são os maiores grupos de constituintes ativos presentes

no gênero *Eugenia* (LUNARDI *et al.*, 2001; MAHMOUDI *et al.*, 2009), juntamente com os esteróides, terpenos, taninos e antraquinonas (CONSOLINI ; SARUBBIO, 2002).

Além de quantificar o teor de fenóis e flavonoides, atividades antioxidantes envolvendo ensaios químicos também foram realizadas. Como apresentado na Tabela 4, o EEP foi capaz de promover efeitos sequestradores de radicais livres de maneira concentração-dependente, e esses efeitos foram comparados com o ácido gálico e o ácido ascórbico nas mesmas concentrações.

Tabela 4. Atividade sequestrante de radicais livres pelo EEP expressa pelos valores da CI_{50}

AMOSTRA	ABTS ^{•+} μg/mL	DPPH [•] μg/MI	O ₂ ^{•-} μg/MI	NO [•] mg/mL
EEP	10,5 ± 1,2 ^{a*}	28,84 ± 0,5 ^a	38,12 ± 2,6 ^a	2,36 ± 0,6 ^a
Ácido Gálico	1,03±0,1 ^b	1,14±0,2 ^b	11,67±0,5 ^b	0,9±0,0 ^b
Ácido Ascórbico	4,84±0,3 ^c	2,74±0,3 ^c	89,5±5,3 ^c	0,2±0,0 ^b

Os valores representam média ± desvio padrão da média com leituras em triplicatas. Valores com letras diferentes dentro da mesma coluna são significativamente diferentes entre si (p<0,05). *p<0,05, denota diferença estatística entre ABTS^{•+} vs. DPPH[•]. Análise realizada pelo teste *one-way* ANOVA seguido do pos-teste de Tukey para múltiplas comparações. CI_{50} -Concentração da amostra necessária para varrer 50% dos radicais livres.

As atividades sequestradoras de radicais livres pelo EEP foram estatisticamente menores (p<0,05) do que os antioxidantes conhecidos, tais como o ácido gálico e o ácido ascórbico (Tabela 4). No entanto, deve ser considerado que o EEP é um extrato bruto que contém uma mistura de compostos que dificultam a comparação com substâncias isoladas.

A capacidade antioxidante do EEP detectada pelo ensaio com ABTS^{•+} foi significativamente superior ao ensaio do DPPH[•] (*p<0,05). De acordo com os achados de Kim *et al.*, (2002), esse resultado poderia ser justificado pelo fato de que o ensaio com ABTS^{•+} é baseado na geração de um radical azul ou verde, que é aplicável a sistemas

antioxidantes hidrofílicos e lipofílicos, enquanto que o ensaio do DPPH[·] usa um radical dissolvido em meio orgânico, que é mais aplicável aos antioxidantes hidrofóbicos. Como o EEP é hidrofílico, a maior atividade sequestradora para o radical ABTS^{·+} pode ser esperada. Alguns estudos envolvendo a atividade antioxidante de vegetais também mostraram uma menor capacidade antioxidante medida pelo ensaio do DPPH[·] quando comparado ao do ABTS^{·+} (FLOEGEL *et al.*, 2011).

Um estudo comparativo sobre a atividade sequestradora do radical DPPH[·] a partir do extrato de *E. agregata* e *Stipitata* mostraram valores de CI₅₀ de 74,1 µg/mL e 79,0 µg/mL, respectivamente (REYNERTSON; BASILE; KENNELLY, 2005). Os estudos com extratos de outras espécies vegetais, como o própolis, mostraram valores de CI₅₀ para ABTS^{·+}, DPPH[·] e O₂^{·-} de 14,3; 31,8 e 9,9 µg/mL respectivamente (ILHAMI *et al.*, 2010). Conforme observado na tabela 4, a atividade antioxidante encontrada nos estudos supracitados foi inferior à encontrada no presente estudo, mostrando que o EEP possui um potencial maior para essa atividade.

A possível explicação para a atividade antioxidante a partir de extratos vegetais pode ser devido à presença de diferentes compostos, tais como a vitamina C, vitamina E, compostos fenólicos (flavonoides, ácidos fenólicos e taninos), compostos nitrogenados, tocoferóis e carotenóides que protegem o corpo contra as EROS e ERNs (DIPLOCK *et al.*, 1998; MÉLO; LIMA; MACIEL, 2006). A bioatividade desses compostos deve-se a capacidade de: quelar metais como o ferro e o cobre, inibir enzimas envolvidas na cascata inflamatória, inibir a oxidação e sequestrar radicais livres (ANTOLOVICH; PRENZLER; PATSALIDES, 2002).

Estudos mostram que a SM está associada a uma fração elevada de LDL oxidado, o que pode resultar no aumento do risco futuro de infarto miocárdico (HOLVOET, 2008). Portanto, fontes naturais com atividade antioxidante são importantes para a descoberta de

novas moléculas que possivelmente tenham impacto sobre doenças que possuem o estresse oxidativo como um de seus efeitos deletérios (SANTOS, 2006).

Além do potencial antioxidante químico relatado acima, a atividade antioxidante celular também foi estudada usando células embrionárias de fibroblastos de camundongos (murinos) (3T3-L1). Estas células foram pré-tratadas por 30 min com 10 μM de DCF-DA e lavadas com PBS. Depois as células foram tratadas com EEP em diferentes concentrações (25, 6,25 e 1,12 $\mu\text{g/mL}$) e em seguida os níveis de fluorescência foram medidos no comprimento de onda de 485 nm de excitação e 520 nm de emissão.

Como resultado, observou-se que o EEP reduziu de maneira concentração-dependente os níveis intracelulares das EROS (94,6, 84,3 e 64,3%), quando utilizada três concentrações do EEP (25, 6,25 e 1,12 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente). Os valores de inibição da oxidação a partir da quercetina (5 $\mu\text{g/mL}$) não foram significativamente diferentes quando comparado ao EEP na concentração de 25 $\mu\text{g/mL}$ (Figura 6).

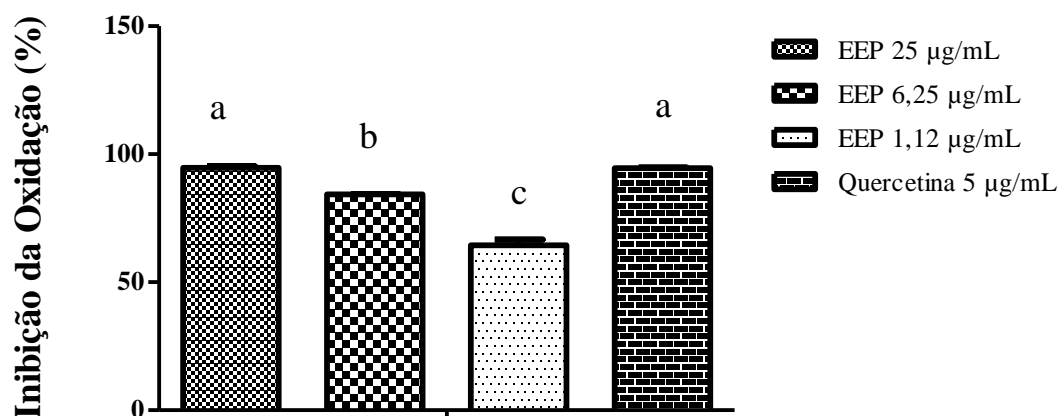


Figura 6- Atividade antioxidante do EEP medida pelo ensaio de DCF. Os resultados foram expressos em percentual de inibição da oxidação e os valores representam as médias \pm DP de três repetições. Letras diferentes significam diferenças estatísticas entre os grupos ($p < 0,05$), através do teste *one-way* ANOVA seguido do teste de Tukey para múltiplas comparações.

Os estudos recomendam que a quercetina seja utilizada como droga padrão nos ensaios que quantificam a atividade antioxidante celular, pois trata-se de um composto puro, de fácil acesso e de boa estabilidade (WOLFE; LIU, 2007). A quercetina é um flavonóide importante na dieta, presente em diversos legumes, frutas, sementes, nozes, chá e vinho tinto, com ação antioxidante robusta contra os efeitos maléficos do estresse oxidativo (FORMICA; REGELSON, 1995; RICE-EVANS; MILLER, 1996).

Wolfe e Liu (2007) também observaram que o aumento da fluorescência decorrente da formação da diclorofluoresceína (DCF) também foi inibido por compostos fitoquímicos como a quercetina e extratos de frutos de maneira concentração-dependente. O valor da CI_{50} para a quercetina foi de 5.5 μ M. Portanto, a redução da fluorescência celular, quando comparada a células controle (poços com DCF e sem o inibidor), indica capacidade antioxidante do extrato. Com base nesses resultados, pode-se dizer que o EEP é um antioxidante natural e pode ser considerado de valor na prevenção dos efeitos nocivos da produção excessiva de radicais livres no corpo humano, uma vez que eles são prejudiciais para a saúde.

O potencial citotóxico do EEP também foi avaliado utilizando a mesma linhagem de células do teste antioxidante celular (3T3-L1). As células foram tratadas com o EEP (50, 25, e

12,5 $\mu\text{g} / \text{mL}$) e os resultados mostraram que não ocorreram efeitos tóxicos, quando comparados com a doxorrubicina, uma droga quimioterápica. Foi visto que após 24, 48 e 72h, a doxorrubicina (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) promoveu 47,3%, 71% e 78,5% de letalidade, respectivamente (Figura 7).

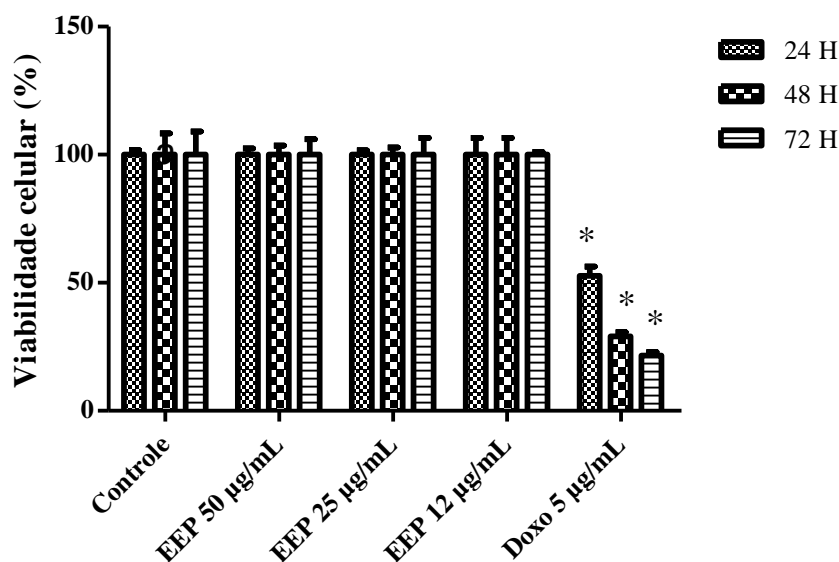
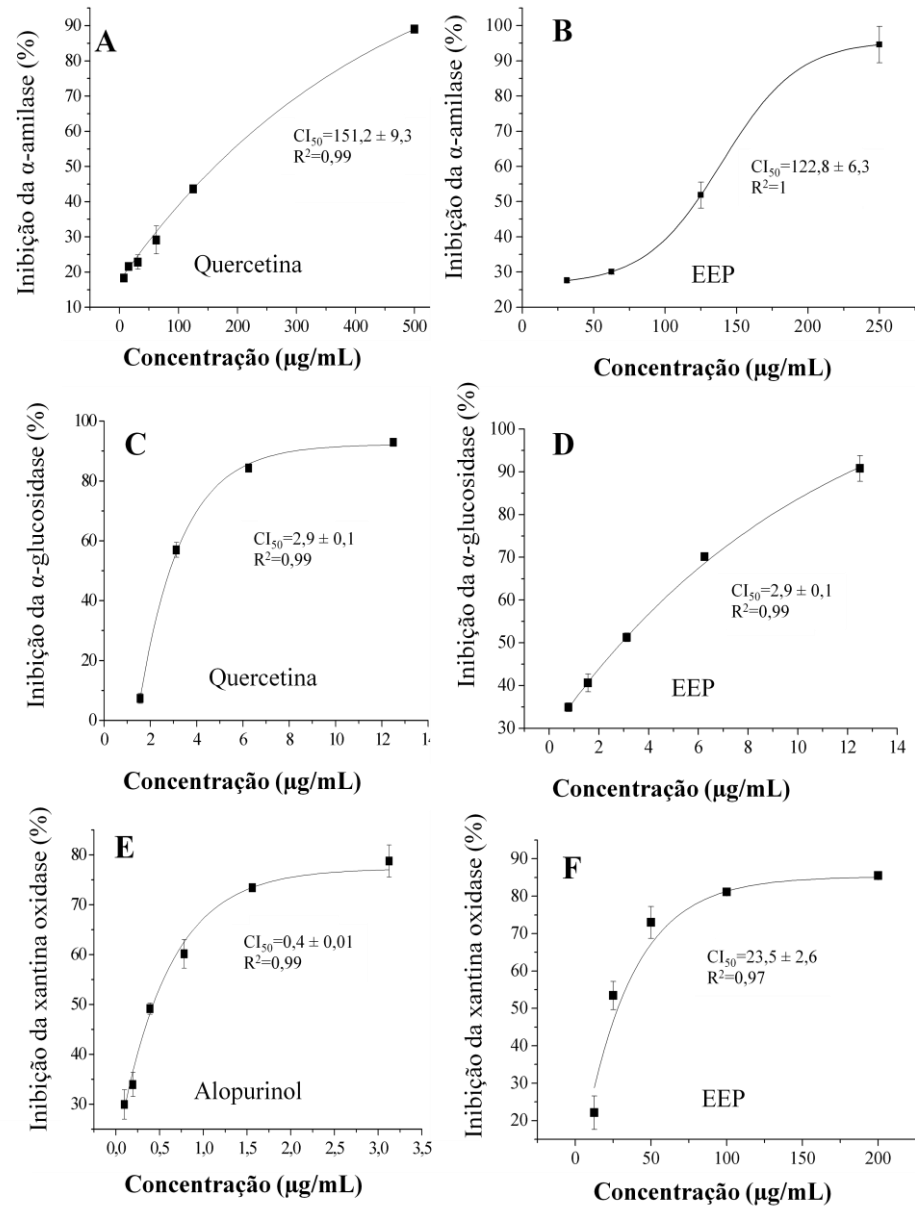


Figura 7- Citotoxicidade do EEP em células 3T3-L1. Células aderentes (5×10^5) cultivadas em placas de 96 poços de cultura de tecidos. Os resultados foram expressos em percentual de viabilidade celular e os valores representam as médias \pm DP de três repetições. * ($p < 0,05$; vs. controle, EEP). Análise pelo teste *two-way* ANOVA seguido do pos test de Bonferroni. Controle (células tratadas com veículo, DMSO); Doxo: Doxorrubicina.

A realização dos testes de viabilidade celular *in vitro* vem se tornando uma etapa cada vez mais frequente a partir de materiais naturais, em especial de origem vegetal (DAVID *et al.*, 2007). Os ensaios de citotoxicidade *in vitro* devem ser os primeiros a serem realizados, analisando-se a conveniência e importância dos testes *in vivo*. De acordo com o Instituto nacional do câncer, valores de $CI_{50} \leq 30 \mu\text{g}/\text{mL}$ devem ser considerados significativos para extratos brutos de origem vegetal, bem como valores de $CI_{50} \leq 4 \mu\text{g}/\text{mL}$ para substâncias puras (INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER, 2011). Esses valores são relevantes para considerar um extrato bruto promissor para posterior purificação e caracterização de seus constituintes ativos.

Nesse estudo, também se buscou avaliar o efeito do EEP sobre algumas enzimas como a α -amilase, α -glucosidase e xantina oxidase por meio de ensaios *in vitro* (Figura 8).



Como mostrado na Figura 8A e 8B, o EEP inibiu a enzima α -amilase salivar de maneira mais eficiente que a inibição da quercetina, droga padrão utilizada ($CI_{50} = 122,8 \pm 6,3$

$\mu\text{g/mL}$ vs. $151,2 \pm 9,3 \mu\text{g/mL}$). Em relação à enzima α -glucosidase (Figura 8C e 8D), notou-se que o EEP apresentou atividade inibitória idêntica como ao da quercetina ($\text{CI}_{50}=2,9 \pm 0,1 \mu\text{g/mL}$). Como observado, pode-se constatar que o EEP inibiu as atividades da α -amilase e da α -glucosidase de maneira concentração-dependente. No entanto, a atividade sobre a enzima α -glucosidase foi superior a da α -amilase. Ademais, o EEP não inibiu significativamente a atividade da lipase quando testado até a concentração de $200 \mu\text{g/mL}$. O percentual encontrado foi de apenas $17,2 \pm 1,3\%$.

Ahmed, Chandra e Timmaiah (2009) acharam que o extrato da *E. jambolana*, pertencente a família Myrtaceae, também apresentou atividade inibitória sobre as enzimas digestórias. Os valores da CI_{50} , para a α -amilase e α -glucosidase foram de 2,4 e $66,0 \text{ g/mL}^{-1}$, respectivamente. No trabalho de KIM *et al.*, (2011), o extrato do *Allium cepa* mostrou valores inferiores aos encontrados no EEP do presente estudo. Os valores de CI_{50} para a α -glucosidase foi de $1,3 \text{ mg/mL}$ e o da α -amilase superiores a 3 mg/mL .

Diferente dos resultados encontrados na figura 8, outras pesquisas mostraram uma predominância de extratos com maior atividade biológica sobre a inibição da α -amilase. A alta polaridade dos extratos confere a presença de moléculas que possivelmente são capazes de interagir de maneira mais eficiente com essa enzima, como as flavononas (KIM; LEE, 2006), taninos (KANDRA *et al.*, 2004) e outros compostos polifenólicos (QIANG; YUANPING; YAO, 2006).

Adyanthaya *et al.*, (2010) relataram que o retardo na absorção dos carboidratos pela inibição de enzimas digestórias desempenha um papel chave no controle do Diabetes Mellitus e pode explicar os efeitos hipoglicemiantes em modelos animais. Estudos indicaram que o extrato metanólico das folhas de *E. puniceifolia* produziu um efeito benéfico sobre o estado diabético, melhorando o metabolismo dos carboidratos e das proteínas (BRUNETTI *et al.*, 2006).

Jung *et al.* (2006) e Kim *et al.*, (2011) afirmaram que compostos fenólicos e flavonoides, como a quercetina, a isoquercetina e a rutina encontrados em extratos vegetais tem potencial de inibir a enzima α -glucosidase e a α -amilase. Li *et al.*, (2009) mostraram que a quercetina apresentou uma atividade mais potente que a acarbose, uma droga antidiabética, no controle da glicemia sanguínea. O mecanismo de ação deveu-se a uma ligação da quercetina com a α -glucosidase por meio de uma interação hidrofóbica. As medidas de cinética enzimática mostraram uma inibição mista, tanto não-competitiva como competitiva. A inibição da lipase foi considerada não satisfatória, pois segundo Slanc *et al.*, (2009), um percentual de inibição inferior a 40% é considerada irrelevante.

No que diz respeito à inibição da xantina-oxidase (XO), o EEP mostrou uma menor atividade (Figura 8F) em comparação com o alopurinol (Figura 8E). Os valores de CI_{50} para o EEP foram $23,5 \pm 2,6 \mu\text{g/mL}$ e de $0,4 \pm 0,0 \mu\text{g/mL}$ para o alopurinol. A XO é uma flavoproteína que catalisa a oxidação da hipoxantina para a xantina e gera ânions superóxidos e ácido úrico (ESPÍN; GARCÍA-CONESA; TOMÁS-BARBERÁN, 2007).

O resultado da menor inibição da XO pelo EEP pode ser explicado pela inibição do radical $O_2^{\cdot-}$, uma vez que este é gerado durante o ensaio, podendo interferir no resultado encontrado (ZAJÁ CZ *et al.*, 2007). Tem sido demonstrado que os inibidores da XO podem ser úteis para o tratamento de doenças hepáticas, gota e doenças crônicas, tais como o DM2, que são causadas pela produção de ácido úrico e ânion superóxido (HEBER *et al.* 2007; LIN; HUANG; LIN, 2000). A XO é considerada uma importante fonte biológica de radicais superóxidos que contribui para o estresse oxidativo nos organismos e está envolvida em vários processos patológicos tais como a inflamação, o câncer, a aterosclerose e o envelhecimento (HALLIWELL *et al.*, 1992).

O potencial inibidor de extratos sobre enzimas, tais como a XO, α -amilase e α -glicosidase, se devem à presença de taninos no material vegetal (ZAJÁ CZ et al. 2007). McDougall *et al.*, (2005) também concluíram que a presença de taninos nos extratos estudados poderia ser o fator responsável pelo elevado potencial inibitório sobre as enzimas α -amilase salivar e α -glucosidade. Segundo Galeno (2014), o extrato das folhas de *E. puniceifolia* possui cerca de 18,5 mg/g de taninos. Com base nessa pesquisa, podemos supor que os efeitos do EEP apresentados na figura 8 devem-se em parte a presença desses compostos fenólicos.

Loo e Huang *et al.*, (2007) ao estudarem as frações ricas em taninos extraídas de *Garcinia mangostana* (Clusiaceae) sugerem que a interação entre enzimas e os compostos polifenólicos tem caráter específico e essa ligação depende mais da estrutura química, principalmente da presença de hidroxilas na posição orto-fenol dos taninos do que do teor de polifenóis encontrado (HASLAM, 1996). A reação entre taninos e enzimas digestivas pode permitir além dos efeitos hipoglicemiantes, alternativas que possam auxiliar no tratamento da diabetes e da obesidade. A presença de taninos no EEP e as atividades encontradas demonstram atividade promissora do extrato como alternativa para controlar a incidência da SM. Assim, a utilização de fitoterápicos que atuem no combate da hiperglicemia poderia representar uma inovação terapêutica com uma possível aplicação clínica importante.

Outro propósito desse estudo foi verificar a atividade do EEP sobre a inibição da ECA. Nos ensaios preliminares, os dados mostraram que na concentração de 0,3 mg/mL, o extrato foi capaz de inibir em até 70,8% a atividade da enzima. Já captopril, droga inibidora do sistema renina-angiotensina, inibiu 83,6% a atividade da ECA, utilizando a concentração de 0,003 mg/mL.

Após esse resultado inicial, utilizou-se repetidas concentrações do EEP e do captopril a fim de avaliar a CI_{50} , ou seja, a concentração responsável por inibir 50% à atividade da enzima (Figura 9A e 9B).

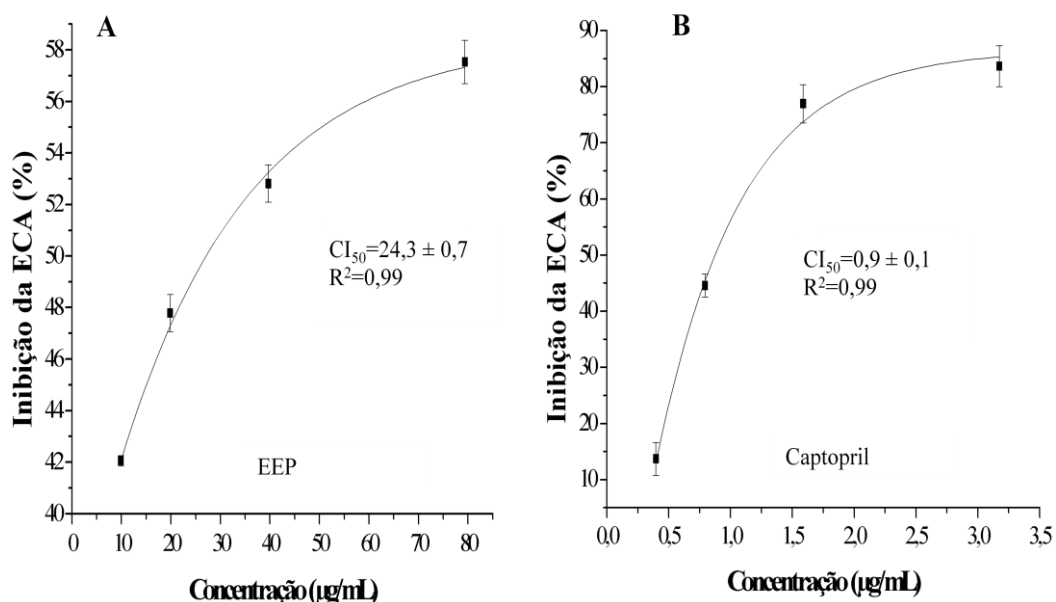


Figura 9: Inibição da enzima conversora de angiotensina (ECA) pelo extrato de *E.punicifolia* (A) e pelo captopril (B). Os dados foram expressos como CI_{50} (média \pm desvio padrão da média dos valores em triplicatas). As concentrações do *E.punicifolia* (EEP)/captopril foram diluídas conforme o volume final do poço da microplaca.

Conforme se pode observar na figura 9A acima, o EEP foi capaz de inibir a atividade da ECA de maneira concentração-dependente, apresentando uma CI_{50} de $24,3 \pm 0,7$ µg/mL. O captopril que foi usado como substância padrão também foi capaz de inibir a ECA e o valor da CI_{50} foi de $0,9 \pm 0,1$ µg/mL (Figura 9B).

Para efeito comparativo, os estudos de Akinyemi *et al.*, (2013) revelaram que o extrato aquoso de duas variedades de gengibre também inibiu a ECA de maneira concentração dependente (25-125 µg/mL) e os valores encontrados foram uma CI_{50} de 27,5 µg/mL e 87,0 µg/mL em relação ao extrato de gengibre vermelho e branco, respectivamente. Wagner (1991) mostrou que flavonoides isolados das espécies *Lespedezae capitata*, *Cistus clusii* e *Amelanchier ovalis* também apresentaram atividade inibidora da ECA, cujo percentual

de inibição variaram de 37 a 66% utilizando concentrações que variaram de 0,14 a 0,33 mg/mL. A completa inibição da ECA também já foi vista a partir do extrato metanólico das folhas de *Musanga cecropioides* utilizando a concentração final de 0,33 mg/mL. Frente a esses achados, a atividade do EEP sobre a ECA é considerada superior, pois as concentrações utilizadas variaram de 9,9 a 79 µg/mL.

Na literatura tem sido descritos alguns compostos derivados de plantas com capacidade de inibir a atividade da ECA *in vitro*, entre eles: as proantocianidinas (LACAILLE-DUBOIS; FRANCK; WAGNER, 2001, WAGNER, 1993;), taninos (UENO *et al.*, 1988), peptídeos (WAGNER, 1993), xantonas (CHEN; LIN 1992), terpenóides (MORIGIWA *et al.*, 1986), e flavonoides (WAGNER, 1993; LACAILLE-DUBOIS *et al.*, 2001). Häckl *et al.*, (2002) também verificaram que a quercetina também inibe a ECA. Eles observaram que ao tratar animais com quercetina em diferentes doses, tanto por via oral como via intravenosa, essa foi capaz de potencializar o efeito hipotensor da BK e reduzir o efeito pressor da angiotensina I de forma similar ao captopril. Levando em conta a presença de alguns desses compostos antioxidantes no EEP, como os taninos (GALENO *et al.*, 2014) e os flavonoides, o efeito da inibição da ECA observado na Figura 9A pode ser explicado.

Conforme já discutido na revisão desse estudo, embora exista uma similaridade estrutural dos domínios N e C da ECA, eles também são sutilmente diferentes na especificidade do substrato. Eles hidrolisam a BK de forma quase igual, no entanto, o domínio C pode hidrolisar a AI e o substrato Hipuril-His-Leu de forma mais eficiente (DEDDISH *et al.*, 1998; FERNANDEZ, NESHICH; CAMARGO 2004). Uma vez que o EEP possua esse composto com especificidade em inibir o sítio C da ECA, este não poderá mais hidrolisar o substrato tripeptídico sintético Hipuril-L-histidina-L-leucina (Hip-His-Leu) e, conseqüentemente formar o dipeptídeo L-histidina-L-leucina (His-Leu).

Dentro da cascata enzimática do SRA, a ECA remove o tripeptídeo (Hip-His-Leu) da angiotensina I para formar o octapeptídeo fisiologicamente ativo, a AII, um dos mais potentes vasoconstritores conhecidos. A AII também estimula a síntese e liberação de aldosterona pelo córtex adrenal, o que aumenta a pressão sanguínea em decorrência da retenção de sódio e, assim, a retenção de água nos túbulos distais. Com base nessa teoria, nosso estudo mostrou uma redução da fluorescência no ensaio de inibição da ECA, que foi quantificada em fluorímetro. Conforme Nhiem *et al.*, (2010), a inibição da ECA por produtos naturais pode ser uma estratégia importante para prevenir e tratar a SM relacionada à hipertensão.

5.2 Resultados dos ensaios *in vivo*

Antes de iniciar-se a avaliação das atividades biológicas do EEP, ensaios de toxicidade aguda foram realizados. Nesse ensaio, um grupo de animais (ratos Wistar, n=6) receberam uma dose única de 2 g/kg (v.o) de EEP diluído em solução salina e o outro grupo, recebeu apenas veículo (NaCl 0,9%), também uma única vez. A avaliação dos possíveis efeitos tóxicos do EEP foi realizada por um período ininterrupto de 14 dias.

Foi possível observar que o EEP não causou efeitos tóxicos, assim como também não proporcionou nenhuma mortalidade nos animais estudados. As variáveis observadas foram: sensibilidade, tônus muscular, reflexo palpebral, equilíbrio, analgesia e anestesia, que não se mostraram alteradas durante os 14 dias de acompanhamento dos animais, frente ao grupo controle. Esses resultados mostraram que nesta dose utilizada, também não ocorreram efeitos neurotóxicos aparente. Em relação à variável peso, consumo de água e ração também não houve diferenças estatísticas em relação ao grupo controle (Tabela 5).

Tabela 5: Variável antropométrica e consumo dos animais durante o teste de toxicidade aguda.

Grupo	Peso (g)	Consumo de água (mL)	Consumo de ração (g)
Controle	303,4 ± 5,5 ^a	33,3 ± 1,8 ^a	20,1 ± 0,9 ^a
EEP	307,5 ± 3,7 ^a	31,2 ± 1,2 ^a	20,2 ± 0,8 ^a

Os dados foram expressos como média ± erro padrão da média (n=6). Diferenças entre os grupos foram avaliadas pelo teste t não pareado. Letras idênticas significam que não houveram diferenças significativas entre os grupos, p>0,05.

O EEP mostrou um equilíbrio em relação ao peso e o consumo, frente ao grupo controle (Tabela 5). Portanto, no contexto geral, fica resguardada a segurança relativa do uso popular do EEP até a faixa utilizada. O screening hipocrático é um ensaio bastante útil e comumente usado na triagem preliminar de plantas para detectar atividades farmacológicas e toxicológicas. Na toxicidade aguda, os sinais de toxicidade sistêmica são definidos a partir da redução na massa corporal dos animais experimentais, redução nos consumos de água e ração, alterações no comportamento, apatia e má condição da pelagem, como a presença de pelos arrepiados (TEO *et al.*, 2002).

Segundo Botham (2002), o teste de toxicidade deve ser realizado quando se pretende avaliar o potencial de novas substâncias, uma vez que elas podem causar danos à saúde humana. Segundo a Resolução n.º.90 de 16 de março de 2004 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), o tratamento oral de ratos e camundongos com extrato de plantas utilizado até 2 g/kg não alteram significativamente o comportamento dos cobaias ou induz sinais evidentes de toxicidade.

No experimento de toxicidade aguda, o EEP também não alterou as variáveis bioquímicas analisadas, não causando danos renais ou hepáticos, segundo os parâmetros avaliados, conforme observado na tabela 6 abaixo.

Tabela 6: Parâmetros toxicológicos hepáticos e renais após a administração do EEP

Variáveis bioquímicas						
Grupos	TGO (U/L)	TGP (U/L)	Albumina (g/dL)	Uréia (mg/dL)	Creatinina (mg/dL)	AU (mg/dL)
Controle	206,2±33,9 ^a	77,2±15,3 ^a	2,98±0,1 ^a	58,7±10,2 ^a	0,92±0,2 ^a	0,3±0,1 ^a
EEP	202,0±36,4 ^a	84,2±18,3 ^a	3,08±0,1 ^a	56,5±6,4 ^a	0,98±0,2 ^a	0,3±0,0 ^a

Os dados foram expressos como média ± desvio padrão da média (n=6). Diferenças entre os grupos foram avaliadas pelo teste t não pareado. TGO (transaminase glutâmica oxalacética); TGP (transaminase glutâmica pirúvica); AU(Ácido úrico). Letras idênticas significam que não houveram diferenças significativas entre os grupos. $p>0,05$.

Resultados similares também foram encontrados nos estudos de Victoria *et al.*, (2012) e Pereira *et al.*, (2013), onde o óleo essencial das folhas da *E. uniflora* administrado em camundongos e o extrato hidroetanólico de *Morus alba* (*Moraceae*) administrado em ratos Wistars, também não exibiram efeitos toxicológicos agudos sobre as funções hepática e renal, sugerindo o uso dessas espécies na indústria farmacêutica. Estudos toxicológicos a partir de plantas são extremamente importantes para avaliar a relação risco/benefício do seu uso, pois esses dados trazem uma grande contribuição para a utilização segura destes produtos para a população humana e animal (ALEXANDRE *et al.*, 2008).

Não é raro, a ocorrência de intoxicações e efeitos colaterais relacionados ao uso de plantas medicinais. Portanto, a crença na "naturalidade inócua" dos fitoterápicos precisa ser avaliada e divulgada, pois muitas vezes essas informações dificilmente chegam ao alcance dos usuários, pois em sua maioria são indivíduos de baixa escolaridade e acervo à cultura (ALEXANDRE *et al.*, 2008).

Após confirmar a não toxicidade do EEP nos ensaios *in vivo* e *in vitro*, o efeito do EEP na pressão arterial de ratos hipertensos induzidos (2R1C) foi estudado. Para tanto, ratos normotensos foram tornados hipertensos cirurgicamente, por meio da colocação de um clipe

de prata na artéria renal esquerda, caracterizando o modelo de hipertensão renovascular proposto por Goldblatt *et al.*, (1934). A técnica de indução da hipertensão arterial foi considerada satisfatória, como pode ser observado na figura 10 abaixo.

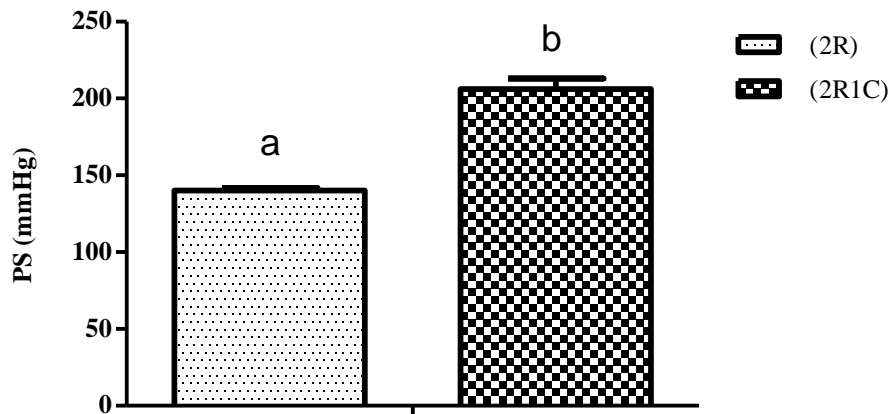


Figura 10- Diferença da pressão sistólica (PS) entre os grupos normotensos (2R) e hipertensos induzidos (2R1C). Os dados foram expressos como média \pm erro padrão (n=7-10). Vs. Controle (2R). O teste utilizado foi o teste t não pareado bicaudal. Letras diferentes significam que houveram diferenças significativas entre os grupos, $p < 0,05$.

Conforme observado na figura 10 acima, a PS aumentou de forma significativa nos ratos submetidos à clipagem da artéria renal esquerda após a 3ª semana de cirurgia. A PS em ratos normotensos variou de $140,1 \pm 1,6$ mmHg para $206,1 \pm 6,9$ mmHg (incremento de 47,1%). Esses achados são similares aos dados da literatura que apontam que a hipertensão já estava presente após a 3ª (ZHOU *et al.*, 2014) e 4ª semana (IRIGOYEN; KRIEGER, 1998) da colocação do clipe na artéria renal.

A hipertensão renal é uma causa comum de hipertensão secundária no homem, decorrente da estenose da artéria renal e hiperplasia vascular. A redução do fluxo sanguíneo renal resulta em anormalidade do SRA, com aumento dos níveis plasmáticos de renina e conseqüentemente AI, que conduz ao aumento subsequente da PA ((DE SIMONE *et al.*, 1992; YERRAM *et al.*, 2012). O modelo de hipertensão de Goldblatt (2R1C) em ratos é um modelo padrão de indução de HA, uma vez que apresenta algumas das similaridades

encontradas na hipertensão renal humana, sendo comumente usado para o screening de drogas anti-hipertensivas (TRACY, 2011).

O efeito do EEP e do enalapril (uma droga anti-hipertensiva) na pressão arterial dos animais hipertensos induzidos também foram avaliados durante 21 dias após o estabelecimento da HA, conforme a figura 11 abaixo.

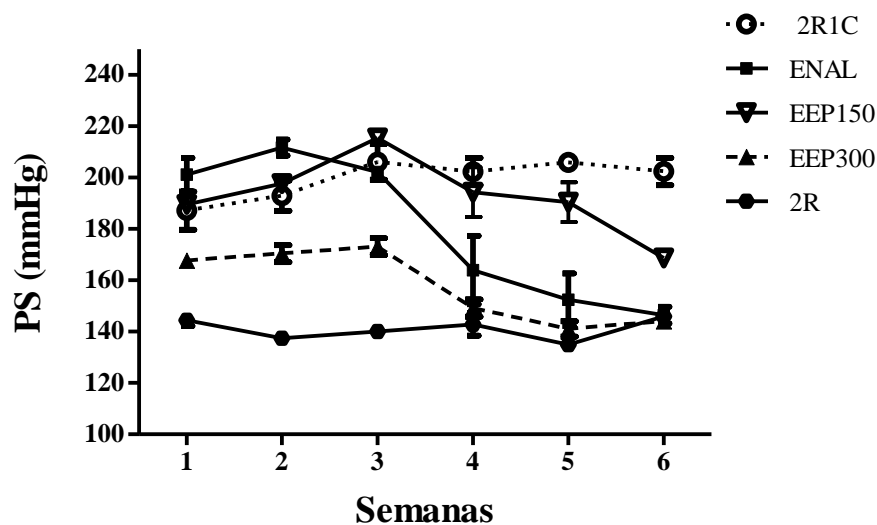


Figura 11: Evolução da pressão arterial sistólica (PS) entre os grupos. Os dados foram expressos como média \pm erro padrão da média (n=5-7). As múltiplas comparações foram feitas pelo teste *Two-way* ANOVA seguida do pós- teste de *Bonferonni* vs. Grupo Hipertenso (2R1C) *** (p<0,001) e as comparações entre dois grupos foram realizadas pelo teste t não pareado. Grupo normotenso (2R); Grupo hipertenso (2R1C); Grupo hipertenso enalapril 20 mg/kg/dia (ENAL); Grupo hipertenso extrato 150 mg/kg/dia (EEP150) e Grupo hipertenso extrato 300 mg/kg/dia (EEP300).

A PS de todos os grupos experimentais foi avaliada por seis semanas e observou-se que a pressão do grupo normotenso (2R) permaneceu relativamente estável durante todo o período do estudo e aumentou regularmente no grupo hipertenso (2R1C) até a 3ª semana, atingindo valores estáveis após essa semana. Por essa razão, optou-se por iniciar o tratamento a partir dessa semana. Os animais hipertensos induzidos foram tratados com duas diferentes doses do EEP (150 mg/Kg/dia e 300 mg/Kg/dia) ou enalapril (20 mg/Kg/dia) após a constatação da hipertensão arterial (3ª semana). No grupo EEP150, os valores da PS caíram de $215,4 \pm 2,6$ mmHg antes do tratamento (3ª semana) para $168,7 \pm 0,3$ mmHg na última semana de tratamento (6ª semana) (redução de 21,7%). Esse grupo ao ser comparado com o

hipertenso (2R1C) apresentou uma queda significativa da PS apenas na 6ª semana após o tratamento (*** $p < 0,001$). Além disso, a queda pressórica observada não atingiu os valores pressóricos observados nos animais normotensos (2R) tratados com solução salina (0,9%).

Já no grupo EEP300, os valores da PS caíram de $173,1 \pm 3,3$ mmHg antes do tratamento (3ª semana) para $144,0 \pm 1,3$ mmHg na última semana de tratamento (6ª semana) (redução de 16,8%). Ao comparar o grupo EEP300 com o grupo 2R1C os valores também foram significativamente menores (*** $p < 0,001$) da terceira a sexta semana de tratamento. Mesmo considerando que o grupo EEP300 apresentou valores de pressão similares aos encontrados no grupo 2R no final do tratamento, não houve diferença significativa entre ele e o grupo EEP150 ($p > 0,05$).

Ao se avaliar os resultados da PS do grupo que recebeu 20 mg/Kg/dia de enalapril, a PS caiu de $202,2 \pm 0,7$ mm Hg, antes do início do tratamento (3ª semana) para $146,4 \pm 3,2$ mmHg na última semana (6ª semana) (redução de 38,1%). Os valores encontrados nesse grupo também foram estatisticamente diferentes do Grupo 2R1C a partir da 3ª semana de tratamento ($p < 0,001$), comprovando seu efeito hipotensor. Por fim, esses resultados mostraram que tanto o grupo EEP150 como o EEP300 mostraram efeitos hipotensores, que foram similares entre si e também em relação ao grupo Enal ($p > 0,05$). Patel *et al.*, (2011) avaliaram o efeito do extrato metanólico da planta *Passiflora nepalensis* Walp. em ratos normotensos e hipertensos renais utilizando diferentes doses do extrato (75, 150 e 225 mg/Kg/dia; i.v) e eles também observaram efeitos anti-hipertensivos de maneira dose-dependente. Esses pesquisadores sugeriram que a atividade hipotensora devia-se ao bloqueio do sistema renina-angiotensina, que é um dos mecanismos importantes causadores da hipertensão arterial.

Estudos similares, com os de Zhou *et al.*, (2014), observaram efeito hipotensor dose dependente ao estudar o extrato etanólico de *Cydonia oblonga* Mill. em ratos com hipertensão

renal e também sugeriram uma possível relação com a inibição da ECA, que não foi determinada. Eles constataram que o extrato reduziu os níveis plasmáticos e renais de AII, renina, endotelina, apelina e aumentou os níveis plasmáticos de óxido nítrico.

Com base nesse resultado, outros mecanismos de ação sistêmicos podem estar envolvidos no efeito hipotensor. A ECA além de hidrolisar a AI em AII, também degrada a apelina, um pequeno peptídeo expresso nos vasos sanguíneos, coração e cérebro e pode regular a contratilidade vascular e miocárdica. Esse peptídeo usualmente segue as concentrações de AII, modulando o seu efeito pressor (NAJAFIPOUR *et al.*, 2012). Além da apelina, outras substâncias como a endotelina e o óxido nítrico podem sofrer alterações mediante a administração de extratos de plantas. A endotelina contrai significativamente as artérias coronárias e renais, elevando a PA e é uma das substâncias vasopressoras potentes conhecidas nos dias de hoje. Já o NO, sendo uma substância vasorrelaxante derivado do endotélio pode mediar a diminuição da entrada de Ca^{++} no músculo liso vascular e também ser um dos supostos mecanismos para os efeitos hipotensores encontrados em plantas (NINAHUAMAN *et al.*, 2007).

Buscando confirmar a participação do EEP sobre o sistema renina-angiotensina, a atividade da ECA foi avaliada no plasma de animais normotensos e hipertensos tratados e não tratados (Figura 12). O objetivo desse teste foi de realizar uma comparação direta da hipotensão ocasionada pelo EEP e pelo enalapril com a redução da atividade da ECA no plasma.

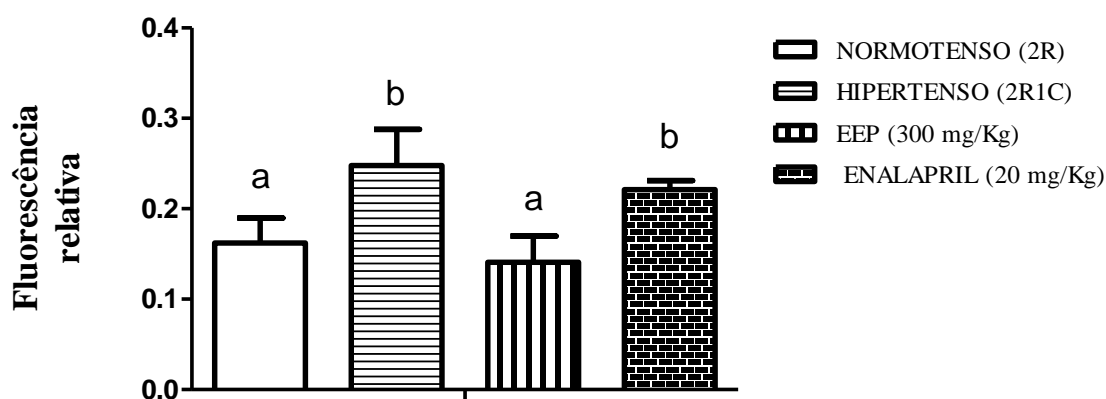


Figura 12: Valores de Fluorescência relativa entre os grupos. Os dados foram expressos como média \pm desvio padrão da média ($n=3-7$). As múltiplas comparações foram feitas pelo teste *One-way* ANOVA seguida do pós-teste de Tukey e as comparações entre dois grupos pelo teste *t* não pareado. Letras diferentes significam que houveram diferenças significativas entre os grupos ($p<0,05$) e letras idênticas que não houveram diferenças significativas ($p>0,05$).

Como observado na figura 12 acima, a atividade da ECA estava presente em todos os grupos experimentais. A quantificação da ECA no grupo de animais tratados com EEP na dose de 300 mg/Kg/dia não foi diferente da encontrada no grupo normotenso (2R) ($p>0,05$) e foi estatisticamente diferente do grupo hipertenso (2R1C) ($p<0,05$). Esses resultados mostram que a ECA provavelmente foi inibida pela ação do extrato, visto que os níveis dessa enzima encontravam-se elevados no grupo hipertenso não tratado (2R1C). Com relação ao grupo enalapril, verificou-se que a atividade da ECA foi similar ao grupo hipertenso (2R1C), não apresentando redução significativa da ECA após o tratamento.

Ninahuaman *et al.*, (2007) determinaram a atividade da ECA no plasma de animais normotensos tratados com veículo e com extrato aquoso de *Cecropia glaziovii* Sneth na dose de 0,5 g/kg/dia durante 60 dias. Eles observaram uma dispersão da atividade da ECA plasmática, pois verificaram que esta se mostrava com atividade elevada, intermediária e baixa no grupo normotenso. Por esse motivo, eles não observaram alteração da atividade da ECA plasmática nos grupos normotensos após 30 dias de tratamento como o extrato, embora tenham observado efeito hipotensor a partir do 14º dia de tratamento em todos os grupos.

Estes mesmos autores ao analisarem a atividade da ECA no grupo que recebeu captopril (50mg/kg/dia), verificaram uma resposta dupla, uma inibição imediata da enzima (50%) que atingiu um pico após 1 hora da administração do fármaco e uma reversão lenta (120%) decorrente de uma *up*-regulação após 12 horas do tratamento. Com base nesse achado, a atividade da ECA aumentada no grupo que recebeu enalapril (Figura 12), pode ser justificada por essa *up*-regulação, uma vez que a coleta do plasma foi realizada após um período superior a 12 horas da última dose de enalapril administrado.

LIMA-LANDMAN *et al.*, (2007), considera que se um extrato apresenta efeito hipotensor e este não se correlaciona com a inibição de ECA plasmática *in vitro*, muito provavelmente o efeito possa ser devido a outros mecanismos de ação, como o bloqueio do influxo de Ca^{2+} na musculatura lisa vascular, entre outros. Como descrito anteriormente, as células endoteliais também desempenham relevante papel na regulação da vasomotricidade (GEWALTIG; KOJDA, 2002).

O endotélio de todos os vasos sanguíneos possui a enzima óxido nítrico sintase endotelial (eNOS), que uma vez ativada, converte a L-arginina em L-citrulina, uma substância inerte, e em NO, um gás volátil que se difunde para a musculatura lisa vascular adjacente e estimula a enzima guanilato ciclase citosólica para produzir o monofosfato cíclico de guanosina (GMPc), responsável pelo relaxamento das células musculares lisas, causando vasodilatação (VANHOUTTE, 2003). O mecanismo de relaxamento envolve a diminuição da concentração de Ca^{++} intracelular, pelo menor influxo de Ca^{++} , inibição da liberação de mais Ca^{++} do retículo endoplasmático e o aumento do sequestro de Ca^{++} para esse mesmo retículo (GEWALTIG; KOJDA, 2002).

Com base na literatura, além da potencial inibição da ECA reportado nesse estudo, outros mecanismos de ação podem estar envolvidos no potencial hipotensor do EEP. Acredita-se que um possível efeito hipotensor do EEP esteja relacionado a esse potencial inibidor sobre

a ECA, atuando por meio de mecanismos de ação similares aos fármacos anti-hipertensivos que atuam inibindo o sistema renina angiotensina.

Após a avaliação do EEP sobre a PA e a quantificação da ECA no plasma dos animais, a análise dos parâmetros bioquímicos dos grupos estudados também foi realizada (Tabela 7).

Tabela 7: Variáveis bioquímicas entre os grupos hipertensos e normotensos

Variáveis	2R	2R1C	EEP150	EEP300	Enal
C-t (mg/dL)	59,2 ± 3,5 ^a	119,2 ± 16,4 ^b	74 ± 13,3 ^a	61 ± 6,8 ^a	68 ± 8,7 ^a
TG (mg/dL)	43,2 ± 5,6 ^a	63,5 ± 8,0 ^b	52,5 ± 13,0 ^{a,b}	30 ± 10,4 ^a	38,0 ± 10,1 ^a
VLDL (mg/dL)	8,6 ± 1,1 ^a	12,7 ± 1,8 ^b	11,9 ± 1,4 ^{a,b}	6,1 ± 2,0 ^a	7,6 ± 2,0 ^a
HDL (mg/dL)	26,8 ± 3,4 ^a	28,8 ± 2,0 ^a	31,8 ± 4,7 ^a	28,3 ± 2,6 ^a	30,4 ± 4,0 ^a
LDL (mg/dL)	24,9 ± 1,3 ^a	65,2 ± 20,7 ^b	39,5 ± 6,9 ^a	28,9 ± 8,9 ^a	31,7 ± 4,2 ^a
Glicose (mg/dL)	111,3 ± 21,2 ^a	94,5 ± 10,6 ^a	90,3 ± 7,4 ^a	99,4 ± 15,0 ^a	63,5 ± 9,6 ^b
TGO (U/L)	38,6 ± 1,8 ^a	39,7 ± 11,0 ^a	159,2 ± 33,2 ^b	26,5 ± 3,2 ^a	117,0 ± 43,1 ^b
TGP (U/L)	22,3 ± 6,8 ^a	204 ± 13,0 ^b	56,5 ± 11,0 ^c	16,9 ± 5,3 ^a	77,0 ± 13,5 ^c
Uréia (mg/dL)	79,3 ± 2,9 ^a	61,5 ± 0,7 ^b	41,0 ± 2,4 ^c	56,9 ± 8,4 ^b	54,1 ± 8,8 ^b
AU (mg/dL)	2,6 ± 0,5 ^a	2,4 ± 0,0 ^a	0,9 ± 0,2 ^b	2,3 ± 0,1 ^a	0,7 ± 0,3 ^b
Creatinina (mg/dL)	0,8 ± 0,2 ^a	0,7 ± 0,0 ^a	0,4 ± 0,0 ^a	0,7 ± 0,1 ^a	0,5 ± 0,0 ^a
Proteínas totais (g/dL)	4,6 ± 0,3 ^a	5,6 ± 0,9 ^a	6,2 ± 0,4 ^b	4,9 ± 0,6 ^a	5,7 ± 0,3 ^a
Albumina (g/dL)	2,3 ± 0,4 ^a	2,5 ± 0,1 ^a	2,8 ± 0,2 ^a	2,3 ± 0,6 ^a	2,7 ± 0,3 ^a

Os resultados foram expressos como média ± desvio padrão (n=5-7). As múltiplas comparações foram feitas pelo teste *One-way* ANOVA seguida do pós- teste de Tukey e as comparações entre dois grupos pelo teste t não pareado. Letras diferentes significam que houve diferenças significativas entre os grupos (p<0,05) e letras idênticas que não houve diferenças significativas (p>0,05). Colesterol total (C-t); Triglicerídeos (TG); Lipoproteína de muita baixa densidade (VLDL); Lipoproteína de baixa densidade (LDL); Lipoproteína de alta densidade (HDL); TGO (transaminase glutâmica oxalacética); TGP (transaminase glutâmica pirúvica); AU (Ácido úrico); Grupo normotenso (2R); Grupo hipertenso (2R1C); Grupo hipertenso enalapril 20 mg/kg/dia (ENAL); Grupo hipertenso extrato 150 mg/kg/dia (EEP150) e Grupo hipertenso extrato 300 mg/kg/dia (EEP300).

Conforme se pode observar na tabela 7, os valores do C-t aumentaram após a indução da hipertensão em relação aos outros grupos (p<0,001). O tratamento com EEP, em ambas as concentrações, ou enalapril foram capazes de reduzir esses valores de forma significativa (p<0,001). Entrementes, o EEP na dose de 300 mg/Kg apresentou uma redução mais pronunciada (48%), frente ao grupo tratado com EEP na dose menor (37,95%) e ao grupo tratado com enalapril (42,9%). Conforme Melo *et al.*, (2012), a faixa de colesterol considerada normal para ratos varia de 55-79 mg/dL.

Em relação aos TG e ao VLDL estas variáveis também se mostraram aumentadas após a indução da hipertensão (incremento de 47% vs. Grupo normotenso, p<0,001). O tratamento com EEP na dose maior foi capaz de reduzir os níveis de TG e VLDL em aproximadamente 52% (p<0,001) frente a apenas 40% do grupo tratado com enalapril (p<0,01). No que diz respeito ao HDL não houve diferenças significativas entre os grupos, mas quanto ao LDL, este aumentou 161,8% após a indução da hipertensão (p<0,01 vs.

normotenso) e foi reduzido em 55,7%, 39,4% e 51,4% após o tratamento com EEP na dose maior, menor e após a administração do enalapril, respectivamente.

Alguns autores consideram que os inibidores de ECA apresentaram efeitos benéficos no metabolismo lipídico. Nandeesha, Purushothaman e Madanmohan (2009) observaram que um grupo de pacientes hipertensos que receberam tratamento com enalapril por oito semanas apresentaram uma redução significativa nos níveis de C-t, TG e VLDL. Essas atividades foram atribuídas à melhora da função endotelial, pois tem sido relatado que a elevação dos ácidos graxos livres prejudica a função endotelial por reduzir a biodisponibilidade de óxido nítrico (OLTMAN *et al.*, 2008). Hernandez *et al.*, (2003) relataram que outros anti-hipertensivos como os antagonistas de cálcio, por possuírem propriedades antioxidantes, reduzem a oxidação do LDL e o seu influxo na parede arterial.

Já Turhan *et al.*, (2014) consideram que os inibidores de ECA podem modular a expressão gênica dos adipócitos e aumentar os níveis de adiponectina, que apresenta um papel relevante no metabolismo lipídico, estando relacionada ao aumento do HDL e a redução dos níveis de TG plasmáticos. Com base nesses dados da literatura, sugere-se que o EEP, por possuir efeitos antioxidantes e atividade inibidora de ECA, possa ser responsável pela atividade hipolipidêmica encontrada na tabela 7.

Outra classe de drogas que também possui efeitos hipolipemiantes são as estatinas, bastante comum no tratamento das hiperlipidemias primárias e secundárias, que tem o propósito de diminuir os níveis das lipoproteínas plasmáticas ricas em colesterol e reduzir os riscos de doença arterial coronariana. O efeito redutor dos níveis de lipídicos se deve a inibição da atividade da enzima HMG-CoA redutase, que tem a propriedade de bloquear a conversão do substrato da HMG-CoA em ácido mevalônico, inibindo os primeiros passos da biossíntese de colesterol (CAMPO; CARVALHO, 2007).

Quanto à glicose, o EEP não reduziu os níveis glicêmicos após o tratamento, uma vez que os valores já estavam dentro dos parâmetros considerados normais (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2012; MELO *et al.*, 2012). Há evidências (HENRIKSEN, 1995) de uma redução da resistência insulínica determinada pelos inibidores da ECA ao nível da musculatura esquelética a partir de um aumento do óxido nítrico mediado pela BK. O aumento no fluxo sanguíneo desencadeado por um IECA para as ilhotas pancreáticas melhora a perfusão das células B, e reduzem a vasoconstrição mediada pela AII no pâncreas (LEUNG, 2003). A redução da RI no fígado e adipócitos causa uma redução na produção hepática de glicose e diminuição dos níveis dos ácidos graxos livres circulantes (TORLONE, 1991).

O EEP não causou dano das células hepáticas e renais, visto que os valores de TGO, também conhecida com enzima aspartato aminotransferase (AST) e TGP ou alanina aminotransferase (ALT), que são indicadores séricos da função hepática e renal estão dentro da faixa considerada normal para ratos Wistars. Segundo Melo *et al.*, (2012), a faixa padrão para o TGO varia de 81-180 U/L e TGP de 36-58 U/L

Os valores de uréia, aqui relatados, divergiram entre os grupos, e também foram diferentes dos encontrados em outros estudos, cujo valores variaram de 30-42 mg/dL (MELO *et al.*, 2012). Já os níveis de creatinina foram similares entre os grupos ($p > 0,05$) e também aos valores observados em outros estudos (0,44-0,64 mg/dL) (BRITO *et al.*, 2005; MELO *et al.*, 2012). Tanto a creatinina como a uréia são compostos, em sua maioria, endógenos, que são filtrados pelos rins e excretados por eles, tornando-se substâncias indicadoras da função renal (BRITO *et al.*, 2005).

A elevação dos níveis séricos da uréia observados na tabela 7 pode ser explicada pela lesão tecidual renal causada pela isquemia decorrente da colocação do clipe na artéria, causando lesões no parênquima renal e diminuindo a capacidade de filtração dos rins.

Portanto, podemos descartar a possibilidade de toxicidade renal pelo EEP, uma vez que os efeitos observados são inerentes ao delineamento experimental.

Os níveis de ácido úrico também encontrados na tabela 7 estão em conformidade com dados da literatura e se enquadram dentro da faixa de normalidade para ratos (0,9-2,0 mg/dL), assim como também os de proteínas totais (5,4-6,6 g/dL) e albumina (2,8-6,1 g/dL) (MELO *et al.*, 2012). Com base nesses achados bioquímicos, o tratamento com EEP nos ensaios *in vivo*, confirmou a não toxicidade do mesmo, assim como efeitos hipolipemiantes.

A massa corporal dos animais também foi verificada duas vezes por semana durante todo o período experimental. Ao final da 6ª semana, observou-se um ganho de peso em todos os grupos, que ocorreu conforme o aumento da idade dos animais. No entanto, o ganho de peso foi menor no grupo que recebeu EEP150 (9%) e EEP 300(6%), quando comparado aos grupos controles 2R (11,8%), 2R1C (11,9%) e ENAL (21,8%). Outros estudos também não verificaram efeito redutor de massa corpórea ao se utilizar um inibidor de ECA (OLTMAN *et al.*, 2008).

Sugere-se que os resultados reportados no presente estudo sejam em decorrência da presença de princípios ativos no EEP, como compostos antioxidantes (fenóis e os flavonoides) que atuam inibindo enzimas chaves do metabolismo dos carboidratos e a ECA. Dessa forma, o EEP pode ter efeito benéfico na síndrome metabólica, uma vez que a dislipidemia, o estresse oxidativo e a hipertensão arterial estão geralmente presentes.

6 CONCLUSÃO

O extrato aquoso das folhas de *E. puniceifolia* (EEP) apresentou atividade sequestrante dos radicais livres ABTS^{•+}, DPPH[•] e O₂^{•-} e atividade antioxidante em fibroblastos murinos, não evidenciando efeitos citotóxicos.

O EEP inibiu enzimas relacionadas ao metabolismo dos carboidratos, como a α -amilase e a α -glucosidase e também apresentou inibição sobre a atividade da enzima conversora de angiotensina (ECA).

O EEP não causou toxicidade aguda renal, hepática ou neurotóxica até a dose de 2 g/Kg, assim como também não proporcionou nenhuma mortalidade nos animais estudados após o tratamento crônico usando doses de 150 mg/kg/dia e 300 mg/kg/dia.

O tratamento com o EEP causou efeitos hipolipemiantes e hipotensores em ratos Wistars hipertensos renais induzidos (Goldblatt 2R1C). A redução da pressão sistólica foi correlacionada com a diminuição atividade da ECA no plasma.

Em síntese, os resultados aqui apresentados sustentam a utilização popular da *E. puniceifolia* como hipoglicemiante, e mostraram, pela primeira vez, uma ação hipolipemiante e hipotensora que podem está associada à presença de compostos fenólicos e flavonoides encontrados na espécie. Dessa forma, considerando a vantagem de efeitos antioxidantes, hipoglicemiantes, hipotensores e hipolipemiantes, assim como a ausência de sinais clínicos de toxicidade, sugere-se que o EEP possa gerar um produto biotecnológico (vide perspectivas futuras), auxiliando na ampliação do mercado de fitoterápicos, por apresentar grande potencial para ser utilizado como terapia adicional às drogas convencionais utilizadas no tratamento e prevenção da síndrome metabólica. Essa pesquisa pode fundamentar estudos clínicos posteriores para melhor avaliar o potencial do EEP sobre o perfil da SM.

7 REFERÊNCIAS

ABBASI, F.; BROWN, B.W.JR.; LAMENDOLA, C.; MCLAUGHLIN, T.; REAVEN, G.M. Relationship between obesity, insulin resistance, and coronary heart disease risk. **Journal of the American College of Cardiology**, v.40, n.5, p.937-43, 2002.

ABENSUNDARA, K.J.M.; MATSUIT, T.; MATSUMOTO, K. α -Glicosidase inhibitory activity of some Sri Lanka plant extracts, one of which, *Cassia auriculata*, exerts a strong antihyperglycemic effect in rats comparable to the therapeutic drug acarbose. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, p. 2541-2545, 2004.

ADYANTHAYA, I.; KWON, Y-I.; APOSTOLIDIS, E.; SHETTY, K. Health benefits of apple phenolics from post-harvest stages for potential Type 2 diabetes management using *in vitro* models. **Journal of Food Biochemistry**, v.34, p.31-49, 2010.

AHMED, F.; CHANDRA, J.N.N.S.; TIMMAIAH, N.V. An *In Vitro* study on the inhibitory activities of *Eugenia jambolana* seeds against carbohydrate hydrolyzing enzymes. **Pharmacognosy**, v.1, n.4, p. 317-321, 2009.

ALEXANDRE, R.F.; BAGATINI, F.; SIMÕES, C.M.O. Potenciais interações entre fármacos e produtos à base de valeriana ou alho. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, p.455-463, 2008.

AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. **Diabetes Care**, v. 35, n.Supplement 1 S64-S71, Jan.2012.

ANDRADE-CETTO, A.; BECERRA-JIMÉNEZ, J.; CÁRDENAS-VÁZQUEZ, R. Alfa-glucosidase-inhibiting activity of some Mexican plants used in the treatment of type 2 diabetes. **Journal of Ethnopharmacology**, v.116, p.27-32, 2008.

ANTOLOVICH M.; PRENZLER P.; PATSALIDES. Methods for testing antioxidant activity. **Analyst**, v.127, p.183-198, 2002.

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução - RE nº 90, de 16 de março de 2004. Dispõe sobre a determinação da publicação da "Guia para a realização de estudos de toxicidade pré-clínica de fitoterápicos". In: Diário Oficial da União, Brasília, 18 mar. 2004b.

APEL, K.; HIRT, H. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. **Annual Review of Plant Biology**, v. 55, p. 373–399, 2004.

ARANTES, A.A.; MONTEIRO, R. A família Myrtaceae na Estação Ecológica do Panga, Uberlândia, Minas Gerais, Brasil. **Lundiana**, v.3, n.2, p.111-127, Rio Claro, SP 2002.

AVRUCH, J. Insulin signal transduction trough protein kinase cascades. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v.182, n.1-2, p.31-48, 1998.

AYODELE, J.; AKINYEMI, A.J.; ADEMILUYI, A.O.; GANIYU OBOH, G. Aqueous Extracts of Two Varieties of Ginger (*Zingiber officinale*) Inhibit Angiotensin I-Converting Enzyme, Iron (II), and Sodium Nitroprusside-Induced Lipid Peroxidation in the Rat Heart In Vitro. **Journal of Medicinal Food**, v.16, n.7, p.641-646, 2013.

BACALLAO, L.L.G.; GOMEZ, L.V.G.; DOMINGUEZ, D.M.R.; GARCIA, E.S. Plantas com propriedades antioxidantes. **Revista Cubana de Investigações Biomedicas**, v.20, p.743-747, 2001.

BADO, A.; LEVASSEUR, S.; ATTOUB, S.; KERMORGANT, S.; LAIGNEAU, J.; BORTOLUZZI, M.; MOIZO, L.; LEHY, T.; GUERRE-MILLO, M.; MARCHAND-BRUSTEL, Y.L.; LEWIN, M.J.M. The stomach is a source of leptin. **Nature**, v. 394, p.790-793, 1998.

BAGETTI, M.; FACCO, E.M.P.; RODRIGUES, D.B.; VIZZOTTO, M.; EMANUELLI, T. Antioxidant capacity and composition of pitanga seeds. **Ciência Rural**, v.39, n.8, p.2504-2510, nov, 2009.

BANSOD, S.; MAHENDRA, R. R. Antifungal Activity of Essential Oils from Indian Medicinal Plants Against Human Pathogenic *Aspergillus fumigatus* and *A. niger*. **World Journal of Medical Sciences**, v.3, n.2, p.81-88, 2008.

BARBOSA - FILHO, J. M.; MARTINS, V. K. M.; RABELO, L. A.; MOURA, M. D.; SILVA, M.S; CUNHA, E. V. L.; SOUZA, M. F. V.; ALMEIDA, R. N.; MEDEIROS, I. A. Natural products inhibitors of the angiotensin converting enzyme (ACE). A review between 1980 - 2000. **Brazilian Journal of Medical and Biological**, v. 16, n. 3, p. 421 - 446, 2006.

BARRETT, M.L.; UDANI, J. A proprietary alpha-amylase inhibitor from white bean (*Phaseolus vulgaris*): A review of clinical studies on weight loss and glycemic control. **Nutrition Journal**, v.10, n.24, 2011.

BASTOS, M. L. Avaliação da viabilidade tecnológica de obtenção de forma farmacêutica sólida contendo altos teores de produto seco por aspersão de *Eugenia punicifolia*. 2011. 110 f. Dissertação mestrado (Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas). Universidade Federal do Amazonas, Amazonas, Manaus.

BATLOUNI, M. Endotélio e hipertensão arterial. **Revista Brasileira de Hipertensão**, v.8, p. 328-338, 2001.

BEIERWALTES, W.H.; D'ANNA, L.P.; CARRETERO, O.; SIGMON, D.H. Nitric oxide synthesis inhibition blocks reversal of two-kidney, one clip renovascular hypertension after unclipping. **Hypertension**, v.25, p.174-179, 1995.

BERG, A.H.; COMBS, T.P.; DU, X.; BROWNLEE, M.; SCHERER, P.E. The adipocyte-secreted protein Acrp30 enhances hepatic insulin action. **Nature Medicine**, v.7, n.8, p.947-53, Agos. 2001.

BOTHAM, P. A. Acute systemic toxicity. **Ilar Journal**, v. 43 Suppl:S, p.27-30, 2002.

BRANCO, A. C. S. C.; DINIZ, M. F. F. M.; ALMEIDA, R. N.; SANTOS, H. B.; OLIVEIRA, K. M.; RAMALHO, J. A.; DANTAS, J. G. Parâmetros bioquímicos e hematológicos de ratos Wistar e camundongos Swiss do Biotério Professor Thomas George. **Revista Brasileira de Ciências da Saúde**, v.15, n.2, p. 209-214, 2011.

BRANDÃO, A.A.; POZZAN, R.; MAGALHÃES, M.E.C.; BRANDÃO, A.P. Aggregation of metabolic abnormalities, overweight and high blood pressure, in young subjects followed-up for a 10-year-period. The Rio de Janeiro Study. **Journal of the American College of Cardiology**, v.35, (Supl A): 264a, 2000.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie**, v. 28, p. 25-30, 1995.

BRITO, M.V.H.; MOREIRA, R.J.; TAVARES, M.L.C.; CARBALLO, M.C.S.; CARNEIRO, T.X.; SANTOS, A.A.S. Copaiba oil effect on urea and creatinine serum levels in rats submitted to kidney ischemia and reperfusion syndrome. **Acta Cirurgica Brasileira**, v.20, n.3, 2005.

BRITO, F.A.; LIMA, L.A.; RAMOS, M.F.; NAKAMURA, M.J.; CAVALHER-MACHADO, S.C.; SIANI, A.C.; HENRIQUES, M.G.M.O.; SAMPAIO, A.L.F. Pharmacological study of anti-allergic activity of *Syzygium cumini* (L.) Skeels. **Brazilian Journal of Medical Biological Research**, v.40, p.105-115, 2007.

BRUNETTI, I. L.; VENDRAMINI, R C.; JANUARIO, A. H.; FRANCA, S.C., PEPATO, M.T. Effects and toxicity of *Eugenia punicifolia* extracts in streptozotocin-diabetic rats. **Pharmaceutical**. v.44, n.1, p.35-43, 2006.

BURKE, V.; HODGSON, J.M.; BEILIN, L.J.; GIANGIULIOI, N.; ROGERS, P.; PUDDEY, I.B. Dietary protein and soluble fiber reduce ambulatory blood pressure in treated hypertensives. **Hypertension**, v.38, n.4, p.821-6, 2001.

CAI, H.; MCNALLY, J.S.; WEBER, M.; HARRISON, D. G. Oscillatory shear stress upregulation of endothelial nitric oxide synthase requires intracellular hydrogen peroxide and CaMKII. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, v.37, n.1, p.121-5, 2004.

CAI, Y.; LUO, Q.; SUN, M.; CORKE, H. Antioxidant activity and phenolic compounds of 112 traditional Chinese medicinal plants associated with anticancer. **Life Sciences**, v.74, p.2157–2184, 2004.

CALLERA, G.E.; VARANDA, W.A.; BENDHACK, L.M. Impaired relaxation to acetylcholine in 2K-1C hypertensive rat aortas involves changes in membrane hyperpolarization instead of an abnormal contribution of endothelial factors. **General Pharmacology**, v.34, n.6, p.379-89, Jun. 2000.

CAMPO,V.L.;CARVALHO, I. Estatinas hipolipêmicas e novas tendências terapêuticas. **Química Nova**, v.30, n.2, p. 425-430, 2007.

CARVALHO, R.P.; GONZAGA LEMOS, J.R.; SALES, R.S.A.; MARTINS, G.M.; NASCIMENTO, C.H.; BAYONA, M.; MARCON, J.L.; BARROS-MONTEIRO, J. The

consumption of red pupunha (*Bactris gasipaes* Kunt) increases HDL-cholesterol and reduces weight gain of lactating and post-lactating wistar rats. **Jornal of Anging Research & Clinical Practice**, v.2, n.3, 2013.

CASTROP, H.; HÖCHERL, K.; KURTZ, A.; SCHWEDA, F.; TODOROV, V.; WAGNER, C. Physiology of kidney renin. **Physiological Reviews**, v. 90, n. 2, p. 607-73, Apr. 2010.

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

CHEN, C.H.; LIN, J.Y. Inhibition of angiotensin I converting enzyme by tetrahydroxanthones isolated from *Tripterospermum lanceolatum*. **Journal of Natural Products**, v.55, p. 691–695, 1992.

CHIU, A.T.; HERBLIN, W.F.; MCCALL, D.E.; ARDECKY, R.J.; CARINI, D.J.; DUNCIA, J.V.; PEASE, L.J.; WONG, P.C.; WEXLER, R.R.; JOHNSON, A.L.; TIMMERMANS, P.B.M.W.M. Identification of angiotensin II receptor subtypes. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 165, n. 1, p. 196-203, 1989.

Cholesterol Education Program [NCEP III]. Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP-ATP III) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III) Final Report 2002. Disponível em <http://www.nhlbi.nih.gov>. Acesso em: 22/10.2012.

CHU, Y. F.; SUN, J.; WU, X.; LIU, R. H. Antioxidant and antiproliferative activities of common vegetables. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.50, p. 6910–6916, 2002.

CLARK, B.A.; ALLOOSH, M.; WENZEL, J.W.; STUREK, M.; KOSTROMINOVA, T.Y. Effect of diet -induced obesity and metabolic syndrome on skeletal muscles of Ossabaw miniature swine. **American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism**, v., 300, p.848 – 857, 2011.

CLEYTON, M.M.S.; HILRIS, R.S.; GERARDO, M.V.J.; MARIANE, C.C.; AYRES, C.L.S.C.; DELTON, S.A.; LUIS, C.D.; CAVALCANTE, E.D.S.; BARROS, P.B.M.; ARAÚJO, M.S.B.; MARIANA, H.C. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Química Nova**, v.30, n.2, 351-355, 2007.

COGOLLUDO, A.; VIZCAÍNO, F.P.; TAMARGO, J. New insights in the pharmacological therapy of arterial hypertension. **Current Opinion in Nephrology and Hypertension**, v, 14, p.423-7, 2005.

COLEMAN, D. L. Obese and Diabetes: two mutant genes causing diabetes-obesity syndromes in mice. **Diabetologia**, v. 14, n.3, p. 141–148, 1978.

CONSOLINI, A.E.; BALDINI, O.A.N.; AMAT, A.G. Pharmacological basis for the empirical use of *Eugenia uniflora* L. (Myrtaceae) as antihypertensive. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 66, n. 1, July, p. 33–39, 1999.

CONSOLINI, A.E.; MIGLIORI, G.N. Cardiovascular effects of the South American medicinal plant *Cecropia pachystachya* (ambay) on rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 96, p. 417–422, 2005.

CONSOLINI, A.E.; SARUBIO, M.G. Pharmacological effects of *Eugenia uniflora* (Myrtaceae) aqueous crude extract on rat's heart. **Journal of Ethnopharmacology**, v.81, p. 57–63, 2002.

CORRÊA, E.M.; MEDINA, L.; BARROS-MONTEIRO, J.; VALLE, N.O.; SALES, R.; MAGALHÃES, A.; SOUZA, F.C.A.; CARVALHO, T.B.; LEMOS, J.R.; LIRA, E.F.; LIMA, E.S.; GALENO, D.M.L.; MORALES, L.; ORTIZ, C.; CARVALHO, R.P. The intake of fiber passionfruit (*Passiflora edulis*) lowers levels of triglyceride and cholesterol decreasing principally insulin and leptin. **Journal of Aging Research & Clinical Practice**, v.3, n.1, 2014.

COS, P.; CALOMME, M.; HU, J.P.; CIMANGA, K.; VAN POEL, B.; PIETERS, L.; VLIETINCK, A.J.; VANDEN BERGHE, D. Structure-activity relationship and classification of flavonoids as inhibitors of xanthine-oxidase and superoxide scavengers. **Journal of Natural Products**, v. 61, p.71–76, 1998.

DAVID, B.; ELISE, M.M.; ERIC, S.W.; GERALD, A.C.; PETER, J.Q. Cryopreservation of Hematopoietic Stem Cells. **American Journal of Hematology**, v.82, n.6, p.463–472, 2007.

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

DE SIMONE, G; DEVEREUX, R. B; CAMARGO, M. J. F; VOLPE, M; WALLERSON, D. C; ATLAS, S. A; LARAGH, J. H. In vivo left ventricular anatomy in rats with two-kidney, one clip and one-kidney, one clip renovascular hypertension. **Journal of Hypertension**, n. 10, p.752-753, 1992.

DEDDISH, P. A.; MARCIC, B.; JACKMAN, H. L.; WANG, H.; SKIDGEL, R. A.; ERDO˝S, E. G. N-domain-specific substrate and C-domain inhibitors of angiotensin-converting enzyme angiotensin-(1-7) and keto-ACE. **Hypertension**, v.31, p. 912–917, 1998.

DEFRONZO, R.A.; SHERWIN, R.S.; KRAEMER, N. Effect of physical training on insulin action in obesity. **Diabetes**, v.36, p.1379-85, 1987.

DIAS, R; TRINDADE, J.C.S; RUDGEL, M.V.C; CURI, P.R. Hipertensão Arterial Experimental e Prenhez em Ratas: Uso do Modelo Goldblatt (1 rim - 1 clipe). **Revista de Ginecologia e Obstetrícia**, v.21.n.4, p.209-214, 1999.

DIPLOCK, A.T.; CHARLEUX, J.L.; CROZIER-WILLI, G.; KOK, F.J.; RICE-EVANS, C.; ROBERFROID, M.; STAHL, W.; VIÑA-RIBES, J. Functional food sciences and defense against reactive oxidative species. **British Journal of Nutrition**, v. 80, n. 1, p. 77-112, 1998.

EBRAHIMZADEH, M.A.; NABAVI, S.M.; NABAVI, S.F.; ESLAMI, B. Antioxidant activity of aqueous extract of *Pyrus boissieriana* fruit. **Pharmacology online**, v.1, p.1318-1323, 2009.

ENDEMANN, D.H.; SCHIFFRIN, E.L. Endothelial dysfunction. **Journal of the American Society of Nephrology**, v.15, p.1983–1992, 2004.

ENDRINGER, D.C. Química e atividades biológicas de *Hancornia Speciosa* Gomes (apocynaceae): inibição da enzima conversora de angiotensina (eca) e efeito na quimioprevenção de câncer. 2007. 259 f. Tese de doutorado. Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais, Departamento de Química Medicinal e Farmacologia Molecular, Universidade Purdue.

ERVIN B.R. Prevalence of Metabolic Syndrome Among Adults 20 Years of Age and Over, by Sex, Age, Race and Ethnicity, and Body Mass Index: United States, 2003–2006. **National Health Statistic Report**, n.13, p.1-8, 2009.

ESPÍN, J.C.; GARCÍA-CONESA, M.T.; TOMÁS-BARBERÁN, F.A. Nutraceuticals: Facts and fiction. **Phytochemistry**, v.68, p. 2986-3008, 2007.

EXPERT PANEL ON DETECTION, EVALUATION AND TREATMENT OF HIGH BLOOD CHOLESTEROL IN ADULTS. Executive summary of the Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP). **JAMA**, v. 285, p. 2486–2497, 2001.

FAZAN JR. R; DA SILVA, V. J. D; SALGADO, H.C. Modelos de hipertensão arterial. **Revista Brasileira de Hipertensão**, v.8, p.19-29, 2001.

FERNANDES, L.G.; ANTUNES, V.R.; BONAGAMBA, L.G.; MACHADO, B.H. Pressor response to chemoreflex activation in awake rats: role of vasopressin and adrenal medulla. **Physiology & Behavior**, v.84, p. 39-44, 2005.

FERNANDEZ, J. H.; NESHICH, G.; CAMARGO, A. C. M. Using bradykinin-potentiating peptide structures to develop new antihypertensive drugs. **Genetics and Molecular Research**, v.3, n.4, p. 554-563, 2004.

FERRARIO, C. M. New physiological concepts of the renin-angiotensin system from the investigation of precursors and products of angiotensin I metabolism. **Hypertension**, v. 55, n. 2, p. 445-52, Feb. 2010.

FERREIRA, A.L.A.; CORREA, C.R.; FREIRE, C.M.M.; MOREIRA, P.L.; BERCHIERI-RONCHI, C.B.; REIS, R.A.S.; NOGUEIRA, C.R. Síndrome metabólica: atualização de critérios diagnósticos e impacto do estresse oxidativo na patogênese. **Sociedade Brasileira de Clínica Médica**, São Paulo, jan-fev, v.9, n.1, p.54-61, 2011.

FERREIRA, E.B.; FERNANDES, L.C.; GALENDE, S.B.; CORTEZI, D.A.G.; BAZOTTEI, R.B. Hypoglycemic effect of the hydroalcoholic extract of leaves of *Averrhoa carambola* L. (Oxalidaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.18, n.3, João Pessoa July/Sept. 2008.

FISCHER, D.C.H.; LIMBERGER, R.P.; HENRIQUES, A.T.; MORENO, P.R.H. Essential Oils from Leaves of Two *Eugenia brasiliensis* Specimens from Southeastern Brazil. **Journal of Essential Oil Research**, v.17, p. 499-500, 2005.

FLOEGEL, A.; KIM, D.; CHUNG, S., KOO, S.; & CHUN, O. K. Comparison of ABTS/DPPH assays to measure antioxidant capacity in popular antioxidant-rich US foods. **Journal of food Composition and Analysis**, 24, 1043–1048, 2011.

FONSECA-ALANIZ, M.H.; TAKADA, J.; ALONSO-VALE, M.I.C.; LIMA, F.B. O tecido adiposo como órgão endócrino: da teoria à prática. **Jornal de pediatria**, v.83, n.5, p.192-203, 2007.

FORD, E.S., GILES, W.H., DIETZ, W.H. Prevalence of the metabolic syndrome among US adults: findings from the Third National Health and Nutrition Examination Survey. **JAMA**, v. 287, p. 356–359, 2002.

FORMICA, J.V.; REGELSON, W. Review of the biology of quercetin and related bioflavonoids. **Food and Chemical Toxicology**, v. 33, p.1061- 1080, 1995.

FRANK, G. D.; EGUCHI, S. Activation of tyrosine kinases by reactive oxygen species in vascular smooth muscle cells: significance and involvement of EGF receptor transactivation by angiotensin II. **Antioxid Redox Signal**, v. 5, n. 6, p. 771-80, Dec. 2003.

FREITAS JR, R.W.F.; ARAÚJO, M.F.M.; MARINHO, N.B.P.; VASCONCELOS, H.C.A.; LIMA, A.C.S.; PEREIRA, D.C.R.P.; ALMEIDA, P.C.; ZANETTI, M.L.; DAMASCENO, M.M.C. Prevalence of the metabolic syndrome and its individual components in brazilian college students. **Journal of Clinical Nursing**, v.22, p.1291–1298, 2012.

FRIEDEWALD, W.T.; LEVY, R.I.; FREDRICKSON, D.S. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma without use of the preparative ultracentrifuge. **Clinical Chemistry**, v.18, p. 499-502, 1972.

FRIEDMAN, J.M.; HALAAS, J.L. Leptin and the regulation of body weight in mammals. **Nature**, v.395, p.763-70, 1998.

FURCHGOTT, R.F.; ZAWADZKI, J.V The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. **Nature**, v. 288, n.5789, p. 373-6, 1980.

GALENO, D.M.L, CARVALHO, R.P., BOLETI, A.P.A, LIMA, A.S., PACHECO, C.C., SOUZA, T.P., LIMA, E.S. Extract from *Eugenia punicifolia* is an Antioxidant and Inhibits Enzymes Related to Metabolic Syndrome. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.172, p. 311–324, 2014.

GARCIA-ALONSO, M.; DE PAASCUAL-TERESA, S.; SANTOS-BUELGA, C.; RIVAS-GONZALO, J.C. Evaluation of the antioxidant properties of fruits. **Food Chemistry**, v.84, n.1, p.13-18, 2004.

GASPAROTTO JUNIOR, A. Avaliação fitoquímica e farmacológica dos efeitos cardiovasculares e renais de *tropaeolum majus* L. (tropaeolaceae) em ratos. 2010. 140 f. Tese de Doutorado (Programa de Pós-Graduação em Farmacologia)- Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

GEWALTIG, M.T; KOJDA, G. Vasoprotection by nitric oxide: mechanisms and therapeutic potencial. **Cardiovascular Research Journal**, v.55, p.250-60, 2002.

GOLDBLATT, H.; LYNCH, J.; HANZEL, R.; SUMMERVILLE, W.W. Studies on experimental hypertension I the production of persistent elevation of systolic blood pressure by means of renal ischemia. **Journal Experimental Medicine**, v.59, n.3, p.347-379, 1934.

GOLDSTEIN, B.J.; SCALIA, R. Adiponectin: A novel adipokine linking adipocytes and vascular function. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 89, n.6, p.2563-8, 2004.

GONZAGA, D.T.G.; POLESE, L.F.; MOHAMAD, S.M.; DA ROCHA, D.R.; ARAÚJO, K.G.L.; FERREIRA, V.F.; SANTOS, W.C. Atividade antioxidante do extrato metanólico de *Eugenia punicifolia* (pedra-ume caá). **31ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química Sociedade Brasileira de Química (SBQ)**, Águas de Lindóia, 2008.

GONZAGA, D.T.G.; SOUZA, R.B.; BRAGA, T.L.; ROCHA, D.R.; ARAÚJO, K.G.L.; FERREIRA, V.; SANTOS, W.C. Atividade antioxidante do extrato hexânico de *Eugenia punicifolia* (pedra-ume caá). **Sociedade Brasileira de Química (SBQ)**. 30ª reunião anual da Sociedade brasileira de química. 2007.

GONZALEZ, M.; LOBOS, L.; CASTILLO, F.; GALLEGUILLOS, L.; LOPEZ, N.C.; MICHEA, L. High-salt diet inhibits expression of angiotensin type 2 receptor in resistance arteries. **Hypertension**, v. 45, n. 5, p. 853-9, May. 2005.

GOVINDARAJAN, R.; RASTOGI, S.; VIJAYAKUMAR, M.; SHIRWAIKAR, R.A.K.S.; MEHROTRA, S.; PALPU, P. Studies on the Antioxidant Activities of *Desmodium gangeticum*. **Biological Pharmaceutical Bulletin**, v.26, p. 1424-1427, 2003.

GRANGEIRO, M.S.; CALHEIROS-LIMA, A.P.; MARTINS, M.F.; ARRUDA, J.F.; GARCEZ-DO-CARMO, L.; SANTOS, W.C. Pharmacological effects of *Eugenia punicifolia* (Myrtaceae) in cholinergic nicotinic neurotransmission. **Journal of the Ethnopharmacology**, v. 108, p. 26-30, 2006.

GRASSI G.; MANCIA G. Neurogenic hypertension: is the enigma of its origin near the solution? **Hypertension**, v.43, n.2, p.154-5, 2004.

GRUNDY, S.M.; CLEEMAN, J.I.; DANIELS, S.R.; DONATO, K.A.; ECKEL, R.H.; FRANKLIN, B.A.; GORDON, D.J.; KRAUSS, R.M.; SAVAGE, P.J.; SMITH, S.C JR.; SPERTUS, J.A.; COSTA, F., Diagnosis and management of the metabolic syndrome: an

American Heart Association/National Heart, Lung, and Blood Institute Scientific Statement. **Circulation**, v.112, n.17, p.285-9, 2005.

GRYGLEWSKI, J. R.; KORBUT, R.; ROBAK, J.; SWIES, J. On mechanism of antithrombotic action of flavonoids. **Biochemical Pharmacology**, v.36, n.3, p.317-322, 1987.

GUIMARÃES, A.G.; MELO, M.S.; BONFIM, R.R.; PASSOS, L.O.; MACHADO, S.M.F.; RIBEIRO, A.S.; SOBRAL, M.; THOMAZZI, S.M.; QUINTANS-JÚNIOR, L.J. Antinociceptive and anti-inflammatory effects of the essential oil of *Eugenia candolleana* DC., Myrtaceae, on mice. **Revista Brasileira de Farmacoognosia**, v.19, n.4, João Pessoa Oct./Dec. 2009.

GUTTERIDGE, J.M.C. Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. **Clinical Chemistry**, v.41, n.12, p.1819-1828, 1995.

HÄCKL, L.P., CUTTLE, G., DOVICH, S.S., LIMA-LANDMAN, M.T., NICOLAU, M. Inhibition of angiotensin-converting enzyme by quercetin alters the vascular response to bradykinin and angiotensin I. **Pharmacology** v.65, n.4, p. 5, p.182–186, 2002.

HALAAS, J.L.; FRIEDMAN, J.M. Leptin and its receptor. **Journal of Endocrinology**, v.155, p.215-6, 1997.

HALL, J.E.; SUMMERS, R.L.; BRANDS, M.W.; KEEN, H.; ALONSO-GARCIA, M. Resistance to metabolic actions of insulin and its role in hypertension. **American Journal of Hypertension**, v.7, p.1492-8, 1994.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C.; CROSS, C.E. Free radicals, antioxidants and human disease: Where are we now? **Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, v.119, p. 598–620, 1992.

HASLAM, E. Natural polyphenols (vegetable tannins) as drugs: Possible modes of action. **Journal of Natural Products**, v. 59, p. 205-215, 1996.

HEBER, D.; SEERAM, N.; WYATT, H.; HENNING, S.M.; ZHANG, Y.; OGDEN, L.G.; DREHER, M.; HILL, J.O. Safety and antioxidant activity of a pomegranate ellagitannin-enriched polyphenol dietary supplement in overweight individuals with increased waist size. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, p. 0050–10054, 2007.

HENRIKSEN, E.J.; JACOB, S. Effects of captopril on glucose transport activity in skeletal muscle of obese Zucker rats. **Metabolism**, v.44, p.267-272, 1995.

HERNANDEZ, R.H.; ARMAS-HERNANDEZ, M.J.; VELASCO, M.; ISRAILI, Z.H.; ARMAS-PADILLA, M.C. Calcium antagonists and atherosclerosis protection in hypertension. **American journal of therapeutics**, v.10, p. 409-414, 2003.

HOEHN, K.L.; SALMON, A.B.; HOHNEN-BEHRENS, C.; TURNER, N.; HOY, A.J.,MAGHZAL, G.J.; STOCKER, R., VAN REMMEM, H.; KRAEGEN, E.W.; COONEY, G.J.; RICHARDSON, A, R.; JAMES, D.E. Insulin resistance is a cellular

antioxidant defense mechanism. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.106, n.42, p.17787-92, 2009.

HOLVOET P. Relations between metabolic syndrome, oxidative stress and inflammation and cardiovascular disease. **Verhandelingen-Koninklijke Academie voor Geneeskunde van België**, v.70, n. 3, p. 193-219, 2008.

HOPKINS, T.A.; OUCHI, N.; SHIBATA, R.; WALSH, K. Adiponectin actions in the cardiovascular system. **Cardiovascular Research**, v.74, n.1, p.11-8, 2007.

HOSTETTMANN, K.; MARSTON, A. Twenty years of research into medicinal plants: Results and perspectives **Phytochemistry Reviews**, v. 1, p. 275 - 285, 2002.

HOTAMISLIGIL, G.S.; PERALDI, P.; BUDAVARI, A.; ELLIS, R.; WHITE, M.F.; SPIEGELMAN, B.M. IRS-1-mediated inhibition of insulin receptor tyrosine kinase activity in TNF-alpha- and obesity-induced insulin resistance. **Science**, v.271, p.665-8, 1996.

HUNG, H.C.; JOSHIPURA, K.J.; JIANG, R.; HU, F.B.; HUNTER, D.; SMITH-WARNER, S.A.; COLDITZ, G.A.; ROSNER, B.; SPIEGELMAN, D.; WILLETT, W.C. Fruit and vegetable intake and risk of major chronic disease. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 96, p. 1577-1584, 2004.

I DIRETRIZ BRASILEIRA DE DIAGNÓSTICO E TRATAMENTO DA SÍNDROME METABÓLICA. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 84, Suplemento I, Abril, 2005.

IANZER, S.R.A.S.; ETELVINO,G.M.; XAVIER,C.H.; SANTOS,J.A.; MENDES,E. P.; MACHADO,L.T.; PREZOTO,B.C.; DIVE,V.; VINCENT, C.A.C.M. Do the cardiovascular effects of angiotensin-converting enzyme (ace) involve ace-independent mechanisms? New insights from proline-rich peptides of *Bothrops jararaca*. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v.322, n.2, 2007.

ILHAMI, G.; BURSAL, E.; SEHITOGLU, M.H.; BILSEL, M.; OREN, A.C. Polyphenol contents and antioxidant activity of lyophilized aqueous extract of propolis from Erzurum, Turkey. **Food and Chemical Toxicology**, v.48, n.8-9, p. 2227–2238, 2010.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER. Estimativas e incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/estimativa>. Acesso em: 10/11/2013.

IRIGOYEN M.C.; KRIEGER E.M. Baroreflex control of sympathetic activity in experimental hypertension. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.31, p.1213-1220, 1998.

IZAWA, Y.; YOSHIZUMI,M.; FUJITA, Y.; KANEMATSU, Y.; ISHIZAWA, K.; TSUCHIYA, K.; OBATA T.; EBINA, Y.; TOMITA, S.; TAMAKI, T. ERK1/2 activation by angiotensin II inhibits insulin-induced glucoseuptake in vascular smooth muscle cells. **Experimental Cell Research**, v. 308, n. 2, p. 291-9, Aug 15 2005.

JASPARD, E.; WEI, L.; AND ALHENC-GELAS, F.. Differences in the properties and enzymatic specificities of the two active sites of angiotensin I-converting enzyme (kininase II): Studies with bradykinin and other natural peptides. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 268, p. 9496–9503, 1993.

JOYNER, M.J.; CHARKOUDIAN, N.; WALLIN, B.G. Sympathetic nervous system and blood pressure in humans: individualized patterns of regulation and their implications. **Hypertension**, v. 56, n. 1, p. 10-6, Jul. 2010.

JUNG, M.; PARK, M.; CHUL, H.L.; KANG, Y.; SEOK-KANG, E.; KI-KIM, S. Antidiabetic agents from medicinal plants. **Current Medicinal Chemistry**, v.13, p. 1–16, 2006.

KAHN, S.E.; HULL, R.L.; UTZSCHNEIDER, K.M. Mechanisms linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. **Nature**, v.444, n.7121, p.840-6, 2006.

KANDRA, L.; GYÉMÁNT, G.; ZÁJÁ CZ, A.; BATTA, G. Inhibitory effects of tannin on human salivary α -amilase. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.319, p.1265-1271, 2004.

KANZAKI, M. Insulin receptors signals regulating GLUT 4 translocation and actin dynamics. **Journal of Endocrinology**, v.53, n.3. p. 267-93, 2006.

KASSI, E.; PERVANIDOU, P.; KALTSAS, G.; CHROUSOS, G. Metabolic syndrome: definitions and controversies. **BMC Medicine**, v. 9, n.48, p. 1-13, 2011.

KIM, D.O.; LEE, K.W.; LEE, H.J.; LEE, C.Y. Vitamin C equivalent antioxidant capacity (VCEAC) of phenolic phytochemicals. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.50, p. 3713–3717, 2002.

KIM, M.; LEE, K. Antithrombotic activity of methanolic extract of *Umbilicaria esculenta*. **Journal of Ethnopharmacology**, v.105, p. 342-345, 2006.

KIM, S.H.; SUNG-HOON, J.O.; YOUNG-IN, K.; JAE-KWAN, H. Effects of Onion (*Allium cepa* L.) Extract Administration on Intestinal α -Glucosidases Activities and Spikes in Postprandial Blood Glucose Levels in SD Rats Model. **International Journal of Molecular Science**, v.12, n.6, p.3757-3769, 2011.

KOLETSKY, S.; PAVLICKO, K.M.; RIVERA, V.J.M. Renin-angiotensin activity in hypertensive rats with a single ischemic kidney. **Laboratory Investigation**, v. 24, p. 41-44, 1971.

KORIEM, K.M.; ASAAD, G.F.; MEGAHED, H.A.; ZAHRAN, H.; ARBID, M.S. Evaluation of the antihyperlipidemic, anti-inflammatory, analgesic, and antipyretic activities of ethanolic extract of Ammi majus seeds in albino rats and mice. **Int Journal of Toxicology**, v.31, n.3, p.294-300, Jun. 2012.

KOST, C. K. JR.; LI, P.; PFEIFER, C. A.; JACKSON, E. K. Telemetric blood pressure monitoring in benign 2-kidney, 1-clip renovascular hypertension: effect of chronic

caffeine ingestion. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 270, p. 1063-1070, 1994.

KRINSKI, K.C.; BAUMGARTNE, M.S.T.; ELSANGEDY, H.M.; BUZZACHERA, C.F.; COLOMBO, H.; KRINSKI, K.; COELHO, R.W. Tratamento da disfunção endotelial. **Arquivos de Ciências da Saúde da UNIPAR**, v. 11, n. 1, p. 57-61, 2007.

KRONER, Z. The relationship between Alzheimer's and diabetes: Type 3 diabetes? **Alternative Medicine Review**, v.14, n.4, p.373-9, 2009.

KURIHARA, H.; ASAMI, S.; SHIBATA, H.; FUKAMI, H.; TANAKA, T. Hypolipemic effect of *Cyclocarya paliurus* (Batal) Iljinskaja in lipid-loaded mice. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 26, p.383-385, 2003.

KUWAHARA, K.; NAKAO, K. Regulation and significance of atrial and brain natriuretic peptides as cardiac hormones. **Journal of Endocrinology**, v.57, n.7, p. 555-65, Jun. 2010.

LACAILLE-DUBOIS, M.A.; FRANCK, U.; WAGNER, H. Search for potential angiotensin converting enzyme (ACE)-inhibitors from plants. **Phytomedicine**, v.8, p. 47–52, 2001.


LANDRUM, L. R.; KAWASAKI, M. L. The genera of Myrtaceae in Brazil: an illustrated synoptic treatment and identification keys. **Brittonia**, v.49, n.4, p. 508-536, 1997.

LAVANYA, G.; VORAVUTHIKUNCHAI, S.P.; TOWATANA, N.H. Acetone Extract from *Rhodomyrtus tomentosa*: A Potent Natural Antioxidant. **Evid Based Complement Alternative Medicine**, v. 2012, n.2012, 8 p, 2012.

LEAL-CARDOSO, J.H.; MOREIRA, M.R.; DA CRUZ, G.M.; DE MORAIS, S.M.; LAHLOU, M.S.; COELHO-DE-SOUZA, A.N. Effects of essential oil of *Alpinia zerumbet* on the compound action potential of the rat sciatic nerve. **Phytomedicine**, v. 11, n.6, p.549-553, 2004.

LEE, S.; OH, P.; LIM, K. Hepatoprotective and hypolipidaemic effects of glycoprotein isolated from *gardenia jasminoides* Ellis in mice. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v.33, n. 10, p. 925–933, 2006.

LEI, Y.; CHEN, J.; WEI, H.; XIONG, C.; ZHANG, Y.; RUAN, J. Hypolipidemic and anti-inflammatory properties of Abacopterin A from *Abacopteris penangiana* in high-fat diet-induced hyperlipidemia mice. **Food and Chemical Toxicology**, v. 49, p.3206–3210, 2011.

LEITE, P.E.; DE ALMEIDA, K.B.; LAGROTA-CANDIDO, J.; TRINDADE, P.; DA SILVA, R.F.; RIBEIRO, M.G.; LIMA-ARAÚJO, K.G.; SANTOS, W.C.; QUIRICO-SANTOS, T. Anti-inflammatory activity of *Eugenia punicifolia* extract on muscular lesion of mdx dystrophic mice. **Journal of Cellular Biochemistry**, v.111, n.6. p.1652-60, 2010. 

LELONO, R.A.; TACHIBANA, S.; ITOH, K. In vitro antioxidative activities and polyphenol content of *Eugenia polyantha* Wight grown in Indonesia. **Pakistan Journal of Biological Sciences**, v.12, n.24, p.1564-70, Dec.2009.

LEMARIE, C. A.; SCHIFFRIN, E. L. The angiotensin II type 2 receptor in cardiovascular disease. **Journal of the Renin-Angiotensin-Aldosterone System**, v. 11, n. 1, p. 19-31, Mar. 2010.

LEMIEUX I.; PASCOT A.; COUILLARD C.; LAMARCHE B.; TCHERNOF A.; ALMÉRAS N.; BERGERON J.; GAUDET D.; TREMBLAY G.; PRUD'HOMME D.; NADEAU A.; DESPRÉS J-PHYPERTRIGLICERIDEMIC WAIST. A marker of the atherogenic metabolic triad (hyperinsulinemia, hyperapolipoprotein B, small dense LDL) in men? **Circulation**, v.102, n.2, p.179-84, 2000.

LEUNG, P.S.; CHAPPELL, M.C. A local pancreatic renin-angitensin systems: endocrine and exocrine roles. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v.35, p.838-846, 2003.

LI, Y.Q.; ZHOU, F.C.; GAO, F.; BIAN, J.S.; FANG SHAN, F. Comparative Evaluation of Quercetin, Isoquercetin and Rutin as Inhibitors of r-Glucosidase. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, p. 11463–11468, 2009.

LIMA, E.S.; ABDALLA, D.S.P. Peroxidação lipídica: mecanismos e avaliação em amostras biológicas. Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.37, n. 3, set./dez., 2001.

LIMA-LANDMAN, A.C.R.; BORGES, R.M.; CYSNEIROS, T.C.M.; DE LIMA, C.; LAPA, A.J. Antihypertensive effect of a standardized aqueous extract of *Cecropia glaziovii* Sneth in rats: An in vivo approach to the hypotensive mechanism. **Phytomedicine**, v. 14, p. 314–320, 2007.

LIN, C.C.; HUANG, P.C.; LIN, J.M. Antioxidant and hepatoprotective effects of *Anoectochilus formosanus* and *Gynostemma pentaphyllum*. **The American Journal Chinese Medicine**, 28, 87–96, 2000.

LINO, C.D.E.S.; DIÓGENES, J.P.; PEREIRA, B.A.; FARIA, R.A.; ANDRADE, NETO M.; ALVES, R.S.; DE QUEIROZ, M.G.; DE SOUSA, F.C.; VIANA, G.S. Antidiabetic activity of *Bauhinia forficata* extracts in alloxan-diabetic rats. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v.27, n.1, p.125-7, Jan, 2004.

LINZ, W.; WIEMER, G.; GOHLKE, P.; UNGER, T.; SCHOLKENS, B.A. Contribution of kinins to the cardiovascular actions of angiotensin-converting enzyme inhibitors. **Pharmacological Reviews**, v.47, p.25-49, 1995.

LIP, G.Y.H. Hypertension and the prothrombotic state. **Journal of Human Hypertension**, v.14, n/10-11, p. 687–990, 2000.

LOO, A.E.K.; HUANG, D. Assay-guided fractionation study of α -amylase inhibitors from *Garcinia mangostana* pericarp. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.55, n.24, p. 9805-9810, 2007.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas Medicinais no Brasil**. Instituto Plantarum, Nova Odessa, 2002.

LOTUFO, P.A. Mortalidade precoce por doenças do coração no Brasil. Comparação com outros países. **Arquivo Brasileiro de Cardiologia**, v. 70, n.5, p.321-5, 1998.

LUNARDI, I.; PEIXOTO, J.J.B.; SILVA, C.C.; SHUQUEL, I.T.A.; BASSO, E.A.; VIDOTTI, G.J. Triterpenic Acids from *Eugenia moraviana*. **Journal of Brazilian Chemical Society**, v.12, n.2, p. 180-183, 2001.

LUPU, A.N.; MAXWELL, M.; KAUFMAN, J.J; WHITE, F.N. Experimental unilateral renal artery constriction in the dog. **Circulation Research**, v. 30, p.567, 1972.

LACAILLE-DUBOIS, M.A.; FRANCK, U.; WAGNER, H. Search for potential Angiotensin Converting Enzyme (ACE)-inhibitors from plants. **Phytomedicine**, v.8, n.1, p.47-52, 2001.

MAFFEI, M.; HALAAS, J.; RAVUSSIN, E.; PRATLEY, R.E.; LEE, G.H.; ZHANG, Y.; FEI, H.; KIM, S.; LALLONE, R.; RANGANATHAN, S. Leptin levels in human and rodent: measurement of plasma leptin and *ob* RNA in obese and weight-reduced subjects. **Nature Medicine**, v.1, p. 1155-1161, 1995.

MAHMOUDI, M.; EBRAHIMZADEH, M. A.; ANSAROUDI, F.; NABAVI, S. F.; NABAVI, S. M. Antidepressant and antioxidant activities of *Artemisia absinthium* L. at flowering stage. **African Journal of Biotechnology** v.8, n.24, p. 7170-7175, 2009.

MAI, T.T.; CHUYEN, N.V. Anti-hyperglycemic activity of an aqueous extract from flower buds of *Cleistocalyx operculatus* (Roxb.) Merr and Perry. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 71, v.1, p.69-76, 2007.

MALONE, M.H.; ROBICHAUD, R.C. The pharmacological evaluation of natural products – General and specific approaches to screening ethnopharmaceuticals. **Journal of Ethnopharmacology**, v.8, p.127-147, 1983.

MARTE, A.P.; SANTOS, R.D. Bases fisiopatológicas da dislipidemia e hipertensão arterial. **Revista Brasileira de Hipertensão**, v.14, n.4, p.252-257, 2007.

MATSUDO, S.M.; MATSUDO, V.R.; ARAÚJO, T.; ANDRADE, D.; ANDRADE, E.; OLIVEIRA, L.; BRAGGION, G. Nível de atividade física da população do estado de São Paulo: análise de acordo com o sexo, idade, nível sócio-econômico, distribuição geográfica e de conhecimento. **Revista Brasileira de Ciência e Movimento**, v.4, n.10, p.41-50, 2002.

MATSUZAWA, Y.; FUNAHASHI, T.; KIHARA, S.; SHIMOMURA, I. Adiponectin and metabolic syndrome. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 24, n.1, p.29-33, 2004.

MCDUGALL, G.J.; SHPIRO, F.; DOBSON, P.; SMITH, P.; BLAKE, A.; STEWART, D. Different polyphenolic components of soft fruits inhibit amylase and α -glucosidase. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 2760-2766, 2005.

MCLELLAN, K.C.P.; BARBALHO, S.M.; III; CATTALINI, M.; CARLOS, A. Diabetes mellitus do tipo 2, síndrome metabólica e modificação no estilo de vida. **Revista de Nutrição**, v.20, n.5, Sept./Oct. 2007.

MCNEILL, A.M.; ROSAMOND, W.D.; GIRMAN, C.J.; GOLDEN, S.H.; SCHMIDT, M.I.; EAST, H.E.; BALLANTYNE, C.M.; HEISS, G. The metabolic syndrome and 11-year risk of incident cardiovascular disease in the atherosclerosis risk in communities study. **Diabetes Care**, v. 28, n.2, p.385-90, 2005.

MEHTA, P. K.; GRIENGLING, K. K. Angiotensin II cell signaling: physiological and pathological effects in the cardiovascular system. **American Journal of Physiology Cell Physiology**, v. 292, n. 1, p. C82-97, Jan 2007.

MÉLO, E.A., LIMA, V. L. A. G., MACIEL, M.I.S. Polyphenol, ascorbic acid and total carotenoid contents in common fruits and vegetables. **Brazilian Journal of Food Technology**, v.9, n.2, p.89-94, 2006.

MELO, M. G. D.; DÓRIA, G. A. A.; SERAFINI, M. R.; ARAÚJO, A. A. S. Valores de referência Hematológicos e Bioquímicos de Ratos (*Rattus norvegicus* linhagem Wistar) provenientes do biotério central da Universidade Federal de Sergipe. **Scientia plena**, v. 8, n.4, 2012.

MENDONÇA C.P.; ANJOS, L.A. Aspectos das práticas alimentares e da atividade física como determinantes do crescimento do sobrepeso/obesidade no Brasil. **Caderno de Saúde Pública**, v.20, n.3, p.698-709, 2004.

MENDONÇA, V.L.M.; OLIVEIRA, C.L.A.; CRAVEIRO, A.A, RAO.; V.S, FONTELES, M.C. Pharmacological and toxicological evaluation of *Alpinia speciosa*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.86, supl. 2, p.93-7, 1991.

MENSAH.; G.A, MOKDAD, A.H.; FORD, E.; NARAYAN, K.M.; GILES, W.H.; VINICOR, F.; DEEDWANIA, P.C. Obesity, metabolic syndrome, and type 2 diabetes: emerging epidemics and their cardiovascular implications. **Cardioly Clinics**, v.22, n.4, p.485-504, 2004.

MERWE, M.M.; WYK, A.E.; BOTHA, A.M. Molecular phylogenetic analysis of *Eugenia* L. (Myrtaceae), with emphasis on southern Africa taxaz of *Eugenia* L. (Myrtaceae), with emphasis on southern Africa taxa. **Plant Systematics and Evolution**, v. 251, n.1, p. 21 – 34, March, 2005.

MINAME, M.H.; CHACRA, A.P.M. Síndrome metabólica. **Revista da Sociedade de Cardiologia do Estado de São Paulo**, v.15, n.6, p.482-9, 2005.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Disponível em:<
<http://portal.saude.gov.br/portal/saude/default.cfm/>>. Acesso em: 14 de maio 2011.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Portaria, nº. 533, de 28 de março de 2012. Disponível em: <<http://www.brasilsus.com.br/legislacoes/gm/112668-533.html>>. Acesso em 24 de julho 2012.

MINISTÉRIO DA SAÚDE: Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. DIABETES MELLITUS. Cadernos de Atenção Básica – nº 16. Brasília – DF, 2006.

MIRANDA, P.A.C. Efeito do tratamento crônico com enalapril sobre a concentração de glicose, insulina e lipídios do plasma de ratos submetidos ao estresse neurocitoglicopênico. 2006. 70 f. Dissertação apresentada no Programa de Pós-Graduação de Clínica Médica da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais, MG.

MOLYNEUX, P. The use of the stable free radical diphenylpicryl-hydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. **Journal of Science and Technology**, v.26, p. 211-219, 2004.

MOREIRA, A.V.B.; MANCINI-FILHO, J. Influência dos compostos fenólicos de especiarias sobre a lipoperoxidação e o perfil lipídico de tecidos de ratos. **Revista de Nutrição**, v.17, n.4, Campinas Oct./Dec. 2004.

MORIGIWA, A.; KITABATAKE, K.; FUJIMOTO, Y.; IKEKAWA, N. Angiotensin converting enzyme-inhibitory triterpenes from *Ganoderma lucidum*. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v.34, p.3025–3028, 1986.

NAJAFIPOUR, H.; SOLTANI HEKMAT,A.; NEKOOIAN,A.A.; ESMAEILI-MAHANI,S. Apelin receptor expression in ischemic and non-ischemic kidneys and cardiovascular responses to apelinin chronic two-kidney-one-clip hypertension in rats. **Regulatory Peptides**, v, 178, p. 43–50, 2012.

NAKAYAMA, G.R.; CATON, M.C.; NOVA, M.P.; PARANDOOSH, Z. Assessment of the Alamar blue assay for cellular growth and viability in vitro. **Journal of Immunological Methods**, v.204, p.205–208, 1997.

NANDEESHA, H.; PURUSHOTHAMAN P.; MADANMOHAN, T. Effect of antihypertensive therapy on serum lipids in newly diagnosed essential hypertensive men. **Angiology**, v.60, n.2, 2009.

NASCIMENTO, O.V.; BOLETI, A.P.; YUYAMA, L.K.; LIMA, E.S. Effects of diet supplementation with Camu-camu (*Myrciaria dubia* HBK McVaugh) fruit in a rat model of diet-induced obesity. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v.85, n.1, p.355-63, 2013.

NATHAN, C. Points of control in inflammation. **Nature**, v. 420, n. 6917, p. 846-52, 2002.

NEGRE-SALVAYRE, A.; SALVAYRE, R.; AUGÉ, N.; PAMPLONA, R.; PORTERO-OTIN, M. Hyperglycemia and glycation in diabetic complications. **Antioxidants & Redox Signaling**, v.11, n.12, p.3071 – 3109, 2009.

NETTO, E.M.; SHUQAIR, N.S.M.S.Q.; BALBINO, E.E.; CARVALHO, A.C.B. Comentários sobre o registro de fitoterápicos. **Revista Fitos**, v.1, n.3, março, 2006.

NHIEM, N.X.; KIEM, P.V.; MINH, C.V.; TAI, B.H.; CUONG, N.X.; THU, V.K. TUAN, H.L.; JO, A.S.; JANG, H.; KWON, Y.; KIM, Y.H. A New Monoterpenoid Glycoside from *Myrica esculenta* and the Inhibition of Angiotensin I-Converting Enzyme. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, v. 58, n.10, p. 1408—1410, 2010.

NIJVELDT R.J.; VAN NOOD, E.; VAN HOORN, D.E.; BOELEN, P.G.; VAN NORREN, K.; VAN LEEUWEN, P.A. Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 74, p. 418-425, 2001.

NINAHUAMAN, M.F.M.L.; SOUCCAR, C.; LAPA, A.J.; LIMA-LANDMAN, M.T.R. ACE activity during the hypotension produced by standardized aqueous extract of *Cecropia glaziovii* Sneth: A comparative study to captopril effects in rats. **Phytomedicine**, n.14, p.321–327, 2007.

OLTMAN, C.L.; E.P.; DAVIDSON, E.P.; COPPEY, L.J.; KLEINSCHMIDT, T.L.; LUND, D.D.; YOREK, M.A. Attenuation of Vascular/Neural Dysfunction in Zucker Rats Treated With Enalapril or Rosuvastatin. **Obesity**, v.16, p. 82–89, 2008.

ONDETTI, M.A.; CUSHMAN, D.W. Inhibitors of angiotensin-converting enzyme. **Biochemical**. New York, p.165–204, 1981.

ÖZTÜRK, M.; AYDOGMUS-ÖZTÜRK, F.; DURU, M.E.; TOPÇU, G. Antioxidant activity of stem and root extracts of Rhubarb (*Rheum ribes*): An edible medicinal plant. **Food Chemistry**, v.103, n.2, p.623-630, 2007.

PARENTE, C. E. T.; ROSA, M.M.T. Plantas comercializadas como medicinas no Município de Barra do Piraí, RJ. **Rodriguésia**, v. 52, n. 80, p. 47-59, 2001.

PARK, I.U.; TAYLOR, A.L. Race and ethnicity in trials of antihypertensive therapy to prevent cardiovascular outcomes: a systematic review. **The Annals of Family Medicine**, v.5, n.5, p. 444–452, 2007.

PARRA, A.L.; YHEBRA, R.S.; SARDINAS, I.G.; BUELA, L.I. Comparative study of the assay of *Artemia salina* L and the estimate of the medium lethal dose (DL₅₀ value) in mice, to determine oral acute toxicity of plant extracts. **Phytomedicine**, v.8, p.395-400, 2001.

PATEL, A.; ADVANCE COLLABORATIVE GROUP; MACMAHON, S.; CHALMERS, J.; NEAL B.; WOODWARD, M.; BILLOT, L.; HARRAP, S.; POULTER, N.; MARRE, M.; COOPER, M.; GLASZIOU, P.; GROBBEE, D.E.; HAMET, P.; HELLER, S.; LIU, L.S.; MANCIA, G.; MOGENSEN, C.E.; PAN, C.Y.; RODGERS, A.; WILLIAMS, B. Effects of a fixed combination of perindopril and indapamide on macrovascular and microvascular outcomes in patients with type 2 diabetes mellitus (the ADVANCE trial): a randomised controlled trial. **Lancet**, v.370, n.9590, p.829–840, 2007.

PATEL, S.S.; VERMA, N.K.; SHRESTHA,B.; GAUTHAMAN, K. Antihypertensive effect of methanolic extract of *Passiflora nepalensis*. **Revista brasileira de farmacognosia**, Curitiba, v. 21, n. 1, 2011.

PEREIRA, C.B; MARIN, A.; DALMORA, S.L.; NECCHI, R.M.M.; MORESCO, R.N.; 2; MANFRON. M.P. Atividade Anti-inflamatória e Avaliação da Toxicidade do Extrato Hidroetanólico de *Morus alba* (Moraceae). **Revista de Ciência Farmacêutica Básica e Aplicada**, v.34, n.1. p. 43-46, 2013.

PESSIN, J.E.; SALTIEL, A.R. Signaling pathways in insulin action:molecular targests of insulin resistance. **Journal of Clinical Investigation**, v.106, n.2, p.165-9, 2000.

PICON, P.X.; ZANATTA, C.M.; GERCHMAN, F.; ZELMANOVITZ, T.; GROSS, J.L.; CANANI, L.H. Análise dos Critérios de Definição da Síndrome Metabólica em Pacientes Com Diabetes Melito Tipo 2. **Arquivo Brasileiro de Endocrinologia Metabólica**, v.50, n.2, abril, 2006.

PIMENTA, A.M; FELISBINO-MENDES, M.S; VELASQUEZ-MELENDEZ, G.V; Clustering and combining pattern of metabolic syndrome components in a rural Brazilian adult population. **São Paulo Medical Journal**, v.131, n. 4, 2013.

PONTES, L.M.; SOUSA, M.S.C. Estado nutricional e Prevalência de Síndrome Metabólica em Praticantes amadores de Futebol. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, v.15, n.3, Mai/Jun. 2009.

QIANG, H.; YUANPING, L.; YAO, K. Effects of tea polyphenols on the activities of amylase, pepsine, trypsin and lipase. **Food chemistry**, v.101, p.1178-1182, 2006.

RATES, S.M.K. Plants as source of drugs. **Toxicon**, v. 39, p. 603-13, 2001.

RE, R.; PELLEGRINI, N.; PROTEGGENTE, A.; PANNALA, A.; YANG, M.; RICE-EVANS, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS⁺ radical cation decolorization assay. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 26, n. 9/10, p. 1231-1237, 1999.

REYNERTSON, K,A.; BASILE, M.J.; KENNELLY, E.J. Antioxidant Potential of Seven Myrtaceous Fruits. **Ethnobotany Research & Applications**, v.3, p.25-35, 2005.

REYNERTSON, K. A.; YANG, H.; JIANG, B.; BASILE, M. J.; KENNELLY, E. J. Quantitative analysis of antiradical phenolic constituents from fourteen edible Myrtaceae fruits. **Food Chemistry**, v.109, n.4. p. 883–890, 2008.

RHAMOUNI, K.; HAYNES, W.G. Leptin and the central neural mechanisms of obesity hypertension. **Drugs Today** v.38, p.807-17, 2002.

RIBAS, S.A.; SILVA, L.C.S. Factores de riesgo cardiovascular y los factores asociados en escolares en Belém, Pará, Brasil. **Caderno de Saúde Pública**, v.30, n.3, 2014.

RICE-EVANS, C.A.; MILLER, N.J. Antioxidant activities of flavonoids as bioactive components of food. **Biochemical Society Transactions**, v.24, n.3, p.790-5, 1996.

RIORDAN, J.F. Angiotensin-I-converting enzyme and its relatives. **Genome Biology**, v.4, n.8, p. 225. 2003.

RODRIGUES, F.P. Efeito do tratamento crônico com extrato de vinho tinto sobre a função cardiovascular de ratos com hipertensão arterial pulmonar. 2005. 85f. Dissertação de Mestrado da Universidade federal do rio de janeiro. Centro de Ciências da Saúde. Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho.

ROMAM-RAMOS, R.; FLORES-SAENZ, J. L.; PARTIDA-HERNANDEZ, G.; LARA-LEMUS, A.; AND ALARCON-AGUILAR, F. Experimental study of the hypoglycemic effect of some antidiabetic plants. **Archivos de investigacion médica**, v.22, p.87-93, 1991.

ROSA, K.T. Influência dos barorreceptores e da pressão arterial na resposta cardíaca à hipertensão renovascular em ratos. São Paulo, 2008. Disponível em: <[http:// www. Cardiopneumo.incor.usp.br](http://www.Cardiopneumo.incor.usp.br)> Acesso em: 22 out, 2009.

ROSEN, E.D.; SPIEGELMAN, B.M. Adipocytes as regulators of energy balance and glucose homeostasis. **Nature**, v.444, n.7121, p.847-53, 2006.

SAE-TAN, S.; GROVE, K.A.; LAMBERT, J.D. Weight control and prevention of metabolic syndrome by green tea. **Pharmacological Research**, v.64, n2, p.146– 154, 2011.

SALAROLI, L.B.; BARBOSA, G.C.; MILL, J.G.; MOUNA, M.C.B. Prevalência de Síndrome Metabólica em Estudo de Base Populacional, Vitória, ES – Brasil. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v.51, n.7, p.1143-1152, 2007.

SALTIEL, A.R.; KAHN, C.R. Insulin signaling and the regulation of glucose and lipid metabolism. **Nature**, v.414, n.6865, p.799-806, 2001.

SALTIEL, A.R.; PESSIN, J.E. Insulin signaling pathways in time and space. **Trends in Cell Biology**, v.12, n.1, p.89-94, 1999.

SÁNCHEZ-MORENO, C. Review: methods used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological systems. **Food Science and Technology International**, v.8, p.121-137, 2002.

SANTOS, R.A.; SIMOES E SILVA, A.C.; MARIC, C.; SILVA, D.M.; MACHADO, R.P.; DE BUHR, I.; HERINGER-WALTHER, S.; PINHEIRO, S.V.; LOPES, M.T.; BADER, M.; MENDES, E.P.; LEMOS, V.S.; CAMPAGNOLE-SANTOS, M.J.; SCHULTHEISS, H.P.; SPETH, R.; WALTHER, T. Angiotensin (1-7) is an endogenous ligand for the G protein-coupled receptor Mas. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.100, n.14, p.8258-8263, 2003.

SANTOS, A.B. Atividade antioxidantes de estratos vegetais da Flora Brasileira: Estudo com ressonância paramagnética eletrônica (RPE) e teoria do funcional da densidade (TFD). 2006, 103 f. Tese de Doutorado. Faculdade de Filosofia, ciências e letras de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.

SANTOS, R.; KRIEGER, E.M.; GREENE, L.J. An improved fluorometric assay of rat serum and plasma converting enzyme. **Hypertension** v.7, p.244-252, 1985.

SANTOS, T. Anti-inflammatory activity of *Eugenia punicifolia* extract on muscular lesion of mdx dystrophic mice. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 111, n.6, p.1652-60, Dec., 2010.

SERRA, C. P.; CORTES, S. F.; LOMBARDI, J. A.; BRAGA DE OLIVEIRA, A.; BRAGA, F. C. Validation of a colorimetric assay for the in vitro screening of inhibitors of angiotensin converting enzyme (ACE) from plant extracts. **Phytomedicine**, v. 12, n. p. 6 - 7, 2005.

SHARMA, S.B.;NASIR, A.; PRABHU, K.M.; MURTHY, P.S.; DEV, G. Hypoglycaemic and hypolipidemic effect of ethanolic extract of seeds of *Eugenia jambolana* in alloxaninduced diabetic rabbits. **Jornal of Ethnopharmacology**, v.85, n.2-3, p. 201-206, 2003.

SHIH, C.C.; LIN, C.H.; LIN, Y.J.; WU, J.B. Validation of the Antidiabetic and Hypolipidemic Effects of Hawthorn by Assessment of Gluconeogenesis and Lipogenesis Related Genes and AMP-Activated Protein Kinase Phosphorylation. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v.2013, n.2013, p.597067, 2013.

SHIM,Y.J.; DOO, H.K.; AHN, S.Y.; KIM, Y.S.; SEONG, J.K.; PARK, I.S.; MIN, B.H. Inhibitory effect of aqueous extract from the gall of *Rhuz chinensis* on alpha-glucosidase activity and postprandial blood glucose. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 85, p. 283 – 287, 2003.

SILVA, A.L.G.; PINHEIRO, M.C.B. Biologia floral e da polinização de quatro espécies de *Eugenia* L. (Myrtaceae). **Acta botânica Brasileira**, v.21, n.1, p.235-247, 2007.

SILVA, J.O.N. Família myrtaceae no parque estadual das dunas do natal – RN, BRASIL. 2009. 60 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas). Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2009.

SILVEIRA, J.Q. Ingestão habitual do suco de laranja vermelha e fatores de risco para a síndrome metabólica. Dissertação de Mestrado (Programa de Pós-graduação em Alimentos e Nutrição). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, UNESP, 2011.

SIMÕES E SILVA, A.C.; DINIZ, J.S.; REGUEIRA FILHO, A.; SANTOS, R.A. The renin angiotensin system in childhood hypertension: selective increase of angiotensin-(1-7) in essential hypertension. **Journal of the pediatric**, v.45, p.93-98, 2004.

SKEGGS, L. T.; KAHN, J. R.; SHUMWAY, N. P. The preparation and function of the hypertension-converting enzyme. **The Journal of Experimental Medicine**, v.103, p. 295–299, 1956.

SKOWYRA, M.; FALGUERA, V.; GALLEGO, G.; PEIRÓ, S.; ALMAJANO, M.P. Antioxidant properties of aqueous and ethanolic extracts of tara (*Caesalpinia spinosa*)

Pods in vitro and in model food emulsions. **Journal of the Science of food and agriculture**. Ago., 2013.

SLANC, P.; DOLJAK, B.; KREFT, S.; LUNDER, M.; JANES, D., STRUKELJ, B. Screening of selected food and medicinal plant extracts for pancreatic lipase inhibition. **Phytotherapy Research**, v.23, n.6, p. 874-7, 2009.

SOARES, S.E. Ácidos fenólicos como antioxidantes. **Revista de nutrição**, Campinas, v.15, n.1, p.71-81, 2002.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES (SBD). Algoritmo para o tratamento do diabetes tipo 2 – Atualização 2011. Posicionamento oficial SBD número 3 – 2011. Disponível em: <<http://www.diabetes.org.br/attachments/posicionamneto-sbd-n-03-2011.pdf>>. Acesso em 17 de outubro de 2013.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE ENDOCRINOLOGIA E METABOLISMO (SBEM). Projeto Diretrizes: Associação Médica Brasileira e Conselho Federal de Medicina. **Síndrome Metabólica: Tratamento com Fibratos**, 2006.

SOUZA, M.C; MORIM, M.P. Subtribos Eugeniinae O. Berg e Myrtinae O. Berg (Myrtaceae) na Restinga da Marambaia, RJ, Brasil. **Acta Botânica Brasílica**, v.22, n.3, July/Sept., 2008.

SPRANGER, J.; KROKE, A.; MÖHLIG, M.; BERGMANN, M.M.; RISTOW, M.; BOEING, H.; PFEIFFER, A.F. Adiponectin and protection against type 2 diabetes mellitus. **Lancet**, v.361, n.9353, p.226-8, 2003.

STAELS, B.; DALLONGEVILLE, J.; AUWERX, J., SCHOONJANS, K., LEITERSDORF, E., FRUCHART, J.C. Mechanism of action of fibrates on lipid and lipoprotein metabolism. **Circulation**, v.98, p.2088-93, 1998.

SUBRAMANIAM, R.; ASMAWI, M.Z.; SADIKUN, A. In vitro α -glucosidase and α -amylase enzyme inhibitory effects of *Andrographis paniculata* extract and andrographolide. **Acta Biochimica Polonica**, v.55, n.2, p. 391-398, 2008.

SUMAN B.S.; REENU, S.T.; AFREENA, N.; KRISHNA, M.P. Antihyperlipidemic Effect of Active Principle Isolated from Seed of *Eugenia jambolana* on Alloxan-Induced Diabetic Rabbits. **Journal Medicine Food**, v.14, n.4, p.353–359, 2011.

SUN, J.; CHU, Y. F.; WU, X., LIU, R. H. Antioxidant and antiproliferative activities of common fruits. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.50, p.7449–7454, 2002.

SVENDSEN, O. Animal models in toxicological research and toxicity testing. In: SVENDSEN, P & HAU, J.TUFIK,S;LINDSEY,C.J & CARLINI, E.A. Does REM sleep deprivation induce a supersensitivity of dopaminergic receptors in the rat brain. **Pharmacology**, v.16, p.98-105, 1978.

TAGUCHI, T.; KISHIKAWA, H.; MOTOSHIMA, H.; SAKAI, K.; NISHIYAMA, T.; YOSHIZATO, K.; SHIRAKAMI, A.; TOYONAGA, T.; SHIRONTANI, T.; ARAKI, E.; SHICHIRI, M. Involvement of bradykinin in acute exercise-induced increase of glucose

uptake and GLUT-4 translocation in skeletal muscle: studies in normal and diabetic humans and rats. **Metabolism**, v.49, p.920-30, 2000.

TEO, S.; STIRLING, D.; THOMAS, S.; HOBERMAN, A.; KIORPES, A.; KHETANI, V. A 90-day oral gavage toxicity study of p-methylphenidate and d,l-methylphenidate in Sprague-Dawley rats. **Toxicology**, v. 179, p.183-196, 2002.

TIBANA, R.A.; PRESTES, J. Treinamento de Força e Síndrome Metabólica: uma revisão sistemática. **Revista Brasileira de Cardiologia**, v.26, n.1, p.66-76, 2013.

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

TOUYZ, R. M. Reactive oxygen species as mediators of calcium signaling by angiotensin II: implications in vascular physiology and pathophysiology. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 7, n. 9-10, p. 1302-14, Sep-Oct. 2005.

TORLONE, E.; RAMBOTTI A.M.; PERRIELLO, G.; BOTTA, G.; SANTEUSANIO, F.; BRUNETTI, P.; BOLLI, G.B. ACE- inhibition increases hepatic and extra hepatic sensitivity to insulin in patients with type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus and arterial hypertension. **Diabetologia**, v.34, p.119-125, 1991.

TOWLER, D.A.; HAVLIN, C.E.; CRAFT, S.; CRYER, P. Mechanism of Awareness of Hypoglycemia: Perception of Neurogenic (Predominantly Cholinergic) Rather Than Neuroglycopenic Symptoms. **Diabetes**, v.42, n.12, p.1791-1798, 1993.

TRACY, R.E. Renalvasculature in essential hypertension:a review of some contrarian evidence.**Contributions to Nephrology**, v.169,p. 327–336, 2011.

TRUONG T.M.; NGHIEM N.T.; PHAM, G.T.; NGUYEN V.C. Alpha-glucosidase inhibitory and antioxidant activities of vietnamese edible plants and their relationships with polyphenol contents. **Journal of Nutritional Science and Vitaminology**, v. 53, p. 267-276, 2007.

TUNDIS, R.; LOIZZO, M.R.; MENICHINI, F. Natural products as alpha-amylase and alpha-glucosidase inhibitors and their hypoglycaemic potential in the treatment of diabetes: an update. **Mini Medicinal Chemistry Reviews**, v.10, p.315-331, 2010.

TURHAN, D.; KAFKAS, S.; GOKALP, F.; KARUL, A.; BIRINCIUGLU, M. Effects of angiotensin converting enzyme inhibition on adiponectin levels and lipid profile in the ovariectomized-aged rats. **Journal of Pharmacology and Pharmacotherapeutics**, January-March, v.5, Issue 1, 2014.

UENO, H., HORIE, S., NISHI, Y., SHOGAWA, H., KAWASAKI, M., SUZUKI, S., HAYASHI, T., ARISAWA, M., SHIMIZU, M., YOSHIZAKI, M., MORITA, N., BERGANZA, L.H., FERRO, E., BASUALDO, I. Chemical and pharmaceutical studies on medicinal plants in Paraguay. Geraniin an angiotensin-converting enzyme inhibitor from “Paparai mi”, *Phyllanthus niruri*. **Journal of Natural Products**, v.51, n.2, p. 357–359, 1988.

UNGER, B.S; PATIL, B.M. Apocynin improves endothelial function and prevents the development of hypertension in fructose fed rat. **Indian Journal of Pharmacology**, v.41, p. 208-212, 2009.

VALKO, M., IZAKOVIC, M., MAZUR, M., RHODES, C.J., TELSER, J. Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v.266, n. 1-2, p.37-56, Nov., 2004.

VAN DE LAAR, F.; LUCASSEN, P.L.; AKKERMANS, R.P.; VAN DE LISDONK, E.H.; RUTTEN, G.E.; VAN WEEL, C. Glucosidase inhibitors for patients with type 2 diabetes. **Diabetes Care**, v.28, p.154-163, 2005.

VAN STADEN, J. Medicinal plants in southern Africa: utilization, sustainability, Conservation—can we change the mindsets? **Agrícola**, v. 28, p.75–76, 1999.

VANHOUTTE, P.M. Endothelial control of vasomotor function - From health to coronary disease. **Circulation Journal**, v.67, n.7, p. 572-5, 2003.

VELÁZQUEZ, E.; TOURNIERB, H.A.; DE BUSCHIAZZOB, P.M.; SAAVEDRAC, G.; SCHINELLA, G.R. Antioxidant activity of Paraguayan plant extracts. **Fitoterapia**, v.74, Issues 1–2, p.91-97, 2003.

VI DIRETRIZES BRASILEIRAS DE HIPERTENSÃO - DBH VI. **Revista Brasileira de Hipertensão**, v.17, n.1, p.18-21, 2010.

VICTORIA, F.V.; LENARDÃO, E.J.; SAVEGNAGO, L.; PERIN, G.; JACOB, R.G.; ALVES, D.; DA SILVA, W.P.; DA MOTTA, A.S.; NASCENTE, P.S. Essential oil of the leaves of *Eugenia uniflora* L.: Antioxidant and antimicrobial properties. **Food and Chemical Toxicology**, v. 50, p. 2668–2674, 2012.

VILAR, J. S.; SILVA, A. C. A.; COELHO, M. R.; SILVA, A. L. G.; SABAA-SRUR, A. U. O. Potencial nutritivo de frutos de pitangão (*Eugenia neonitida*, SOBRAL). **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.28, n.3, p. 536-538, 2006.

VUKSAN, V.; SIEVENPIPER, J.L. Herbal remedies in the management of diabetes: Lessons learned from the study of ginseng. **Nutrition, Metabolism & Cardiovascular Diseases**, v, 15, p. 149-160, 2005.

WAGNER, H., ELBL, G., LOTTER, H., GUINEA, M.: Evaluation of natural products as inhibitors of angiotensin I-converting enzyme (ACE). **Pharmaceutical and pharmacological letters**, v.1, p. 15–18, 1991.

WAGNER, H. Leading structures of plant origin for drug development. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 38, 105–112, 1993.

WANG, Y.; WANG, W., WANG, Q.; WU, J.; XU, J.; WU, X. [Ca²⁺]_i and PKC- α are involved in the inhibitory effects of Ib, a novel nonpeptide AngiotensinII subtype AT₁ receptor antagonist, on Angiotensin induced vascular contraction in vitro. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 364, n. 1, p.118-23, Dec 7. 2007.

WEI, L.; ALHENC-GELAS, F.; CORVOL,P.; CLAUSER, E. The two homologous domains of human angiotensin I-converting enzyme are both catalytically active. **The Journal of Biological Chemistry**, v.266, p.9002–9008, 1991.

WEIGLE, D.S. Pharmacological therapy of obesity: past, present and future. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v.88, p.2462-2469, 2003.

WHO. Diet Nutrition and the Prevention of Chronic Diseases, Report of a Joint WHO/FAO Expert Consultation. **WHO Technical Report Series**, n.916, 2003.

WHO. Obesity and Overweight: **Factsheet**, n.311. World Health Organization, 2011.

WIESEL, P.; AZZOLAI, L.; NUSSBERGER, J.; PEDRAZZINI, T. Two-kidney, one clip and one-kidney, one-clip hypertension in mice. **Hypertension**, 29, p.1025-1030, 1997.

WILSON, G.W.; O'BRIEN, M.M.; GADEK, P.A. & QUINN, C.J. Myrtaceae revisited: A reassessment of intrafamilial groups. **American Journal of Botany**, v.88, n.11, p.2013-2025, 2001.

WOLFE L.L.; LIU R.H. Cellular Antioxidant Activity (CAA) Assay for Assessing Antioxidants, Foods, and Dietary Supplements. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, v. 55, p. 8896–8907, 2007.

XIA, D.; YU, X.; WANG, H.; REN, Q.; CHEN, B. Anti-Obesity and Hypolipidemic Effects of Ethanolic Extract from *Alpinia officinarum* Hance (Zingiberaceae) in Rats Fed High-Fat Diet. **Journal Medicine Food**, v.13, n.4, p. 785-791, 2010.

XU, B.; CHANG, S. K. C. Total phenolic, phenolic Acid, anthocyanin, flavan-3-ol, and flavonol profiles and antioxidant properties of pinto and black beans (*Phaseolus vulgaris* L.) as affected by thermal processing. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 57, p. 4754-4764, 2009.

YAMAGISHI, S.; MATSUI, T.; UEDA, S.; FUKAMI, K.; OKUDA, S. Clinical utility of acarbose, an alpha-glucosidase inhibitor in cardiometabolic disorders. **Current drug metabolism**, v. 10, p.159-163, 2009.

YANNA, D.; RATTMANN, A.; SANDRA, C.A.; FERNANDA, R.; LAPA, A.; OBDÚLIO, G.; MIGUEL, B.; MARIA. C.A.; MARQUES. A.J.; EDUARDO, S.C.; ADAIR, R.S.;SANTOS, D. Activation of muscarinic receptors by a hydroalcoholic extract of *Dicksonia sellowiana* Presl. HooK (Dicksoniaceae) induces vascular relaxation and hypotension in rats Vascular. **Pharmacology**, v.50, p.27–33, 2009.

YERRAM,P.; KARUPARTHI,P.R.; CHAUDHARY, K. Pathogenesis and management of renovascular hypertension and ischemic nephropathy.Minerva Urologica e nefrologica. **The Italian Journal of Urology and Nephrology**, v.64, p.63–72, 2012.

YOUNGREN, J.F. Regulation of insulin receptor function. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v.64, n.7-8, p.873-91, 2007.

ZAJÁ CZ A.; GYÉMÁ NT G.; VITTORI N, KANDRA L. Allepo tannin: structural and Analyses salivary amylase inhibition. **Carbohydrate Research**, v.342, p.717-723, 2007.

ZANUTTO, B. S.; VALENTINUZZI, M.E.; SEGURA, E.T. Neural set point for the control of arterial pressure: role of the nucleus tractus solitarius. **Biomedical engineering on line**, v. 9, n.4, p. 4, 2010.

ZECCHIN, H.G.; CARVALHEIRA, J.B.;SAAD, M.J,A. Mecanismos moleculares de resistência À insulina na síndrome metabólica. **Revista da Sociedade de Cardiologia do Estado de São Paulo**, v.14, n,4, v.4, p. 574-89, Jul-Ag. 2004.

ZHANG, Y.; PROENCA, R.; MAFFEI, M.; BARONE, M.; LEOPOLD, L.; FRIEDMAN, J.M. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. **Nature**, v. 372, 425–432, 1994.

ZHOU, W.T.; ABDURAHMAN, A.; ABDUSALAM, E.; YIMING,W.; ABLIZ,P.; AJI,Q.; ISSAK,M.; ISKANDAR,G.; MOORE, N.; UMAR, A. Effect of Cydonia oblonga Mill. leaf extracts or captopril on blood pressure and related biomarkers in renal hypertensive rats. **Journal of Ethnopharmacology**, march 2014.

ANEXO

Anexo A- Aprovação do comitê de ética



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CEEA-UFAM)



CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo nº 077/2012- CEEA, sobre “EFEITO DO EXTRATO HIDROETANÓLICO DAS FOLHAS DE *Eugenia punicifolia* (PEDRA DE UME CAÁ) EM RATOS COM HIPERTENSÃO RENOVASCULAR” sob responsabilidade de **Denise Moraes Lopes Galeno**, está de acordo com a legislação Federal pertinente ao uso científico de animais e foi **APROVADO** pelo COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CEEA-UFAM) em reunião de 18/05/2012.

Manaus, 11 de junho de 2012

Prof. Fábio Tonissi Moroni
Presidente da CEEA-UFAM

Anexo B- Artigo