



NELMA NEYLANNE PINHO MUNIZ OLIVEIRA

**EFFECT OF *Tribulus terrestris* AS ANTIOXIDANT,
VASORELAXANT, AND INHIBITOR OF α -GLUCOSIDASE
AND LIPOXYGENASE**

**LAVRAS-MG
2019**

NELMA NEYLANNE PINHO MUNIZ OLIVEIRA

**EFFECT OF *Tribulus terrestris* AS ANTIOXIDANT, VASORELAXANT, AND
INHIBITOR OF α -GLUCOSIDASE AND LIPOXYGENASE**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Plantas Mediciniais, Aromáticas e Condimentares, área de concentração em Bioatividade de Plantas Mediciniais, para a obtenção do título de Doutora.

Profa. Dra. Suzan Kelly Vilela Bertolucci
Orientadora

Profa. Dra. Aline Carvalho Pereira
Coorientadora

**LAVRAS-MG
2019**

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

Oliveira, Nelma Neylanne Pinho Muniz.

Effect of *Tribulus terrestris* as antioxidant, vasorelaxant, and inhibitor of α -glucosidase and lipoxygenase / Nelma Neylanne Pinho Muniz Oliveira. - 2019.

93 p. : il.

Orientador(a): Suzan Kelly Vilela Bertolucci.

Coorientador(a): Aline Carvalho Pereira.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Lavras, 2019.

Bibliografia.

1. Farmacologia cardiovascular. 2. Fitoquímica. 3. Plantas medicinais. I. Bertolucci, Suzan Kelly Vilela. II. Pereira, Aline Carvalho. III. Título.

NELMA NEYLANNE PINHO MUNIZ OLIVEIRA

**EFFECT OF *Tribulus terrestris* AS ANTIOXIDANT, VASORELAXANT, AND
INHIBITOR OF α -GLUCOSIDASE AND LIPOXYGENASE**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Plantas Mediciniais, Aromáticas e Condimentares, área de concentração em Bioatividade de Plantas Mediciniais, para a obtenção do título de Doutora.

APROVADA em 22 de fevereiro de 2019.

Dr. Geraldo Célio Brandão UFOP

Dra. Grazielle Caroline da Silva UNILAVRAS

Dra. Aline Carvalho Pereira UFLA

Dr. Rodrigo Ferreira de Moura UFLA

Profa. Dra. Suzan Kelly Vilela Bertolucci
Orientadora

Profa. Dra. Aline Carvalho Pereira
Coorientadora

**LAVRAS-MG
2019**

Dedico este trabalho aos professores Raimundo (em memória), Suzan e Aline como forma de expressar toda minha gratidão por todos os esforços dedicados a mim e à ciência.

AGRADECIMENTOS

À Deus pela dádiva da vida, por mais esta etapa concluída e pela força nos momentos mais difíceis;

Aos meus pais Leda e Franklim Oliveira e tia Nelma por sempre me apoiarem, serem meu suporte, dando força mesmo distantes e por fazerem o possível e o impossível para que eu conseguisse mais essa conquista;

Ao meu amor João Paulo Gomes Viana, meu exemplo, mesmo longe fisicamente durante tantos anos, contribuiu com a realização deste sonho apoiando e incentivando emocionalmente e academicamente.

À Universidade Federal de Lavras (UFLA) e ao Departamento de Agricultura (DAG) pela oportunidade de fazer uma pós-graduação;

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudos e à Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) pelo auxílio financeiro para a pesquisa;

Ao programa de Pós-graduação em Plantas Medicinais, Aromáticas e Condimentares pela oportunidade de me qualificar em uma área tão amada;

Ao professor Dr. Raimundo Vicente de Sousa (em memória), meu orientador, que partiu em 2018 precocemente para perto do Pai, agradeço pela orientação, apoio e por ter deixado ensinamentos valiosos;

A professora Dra. Suzan Kelly Vilela Bertolucci que me acolheu como orientadora desde os meus primeiros dias no mestrado mesmo não sendo oficialmente até o final do doutorado quando se tornou minha orientadora oficial, sempre disponibilizando equipamentos, reagentes e todos os materiais do Laboratório de Fitoquímica/DAG/UFLA necessários para a realização dos experimentos, pela contribuição financeira com recurso próprio para estes experimentos, pelo transporte de animais, pela identificação dos constituintes químicos da espécie, pela atenção e preocupação destinadas a mim e, acima de tudo, pelos exemplos de organização e de amor e dedicação pela arte de ensinar e orientar;

A professora Dra. Aline Carvalho Pereira pela orientação na área de farmacologia cardiovascular, por ter disponibilizado seu tempo, inclusive, para ajudar na execução dos experimentos de farmacologia, pelo auxílio na análise dos dados e com a compra de materiais e animais com seu próprio recurso financeiro, e principalmente, pelas constantes palavras de carinho, incentivo e apoio que fizeram a diferença para que eu conseguisse concluir este trabalho;

Ao professor Dr. José Eduardo Brasil Pereira Pinto, coordenador do programa de Pós-graduação em Plantas Medicinais, Aromáticas e Condimentares, pelo trabalho árduo e dedicado para conseguir recursos, equipamentos e materiais para nossas pesquisas, pelas lições de vida, disponibilidade em ajudar, motivação e confiança destinada a mim.

Ao pesquisador Dr. Smail Aazza a quem agradeço pelo rigor científico repassado e por todos os ensinamentos teóricos e práticos sobre atividades antioxidante e de inibição enzimática que foram imprescindíveis para execução da pesquisa;

Ao professor Dr. Rodrigo Maia de Pádua da Universidade Federal de Minas Gerais pelas análises fitoquímicas do extrato e frações no UPLC;

A todos os professores do programa de Pós-graduação em Plantas Medicinais, Aromáticas e Condimentares da Universidade Federal de Lavras e dos demais programas aos quais fiz disciplinas por terem contribuído para minha formação, pelos ensinamentos transmitidos e pela disponibilidade em ajudar;

Aos meus amigos do Pará Ana Paula Medeiros, Carolina Germano, Fernanda Nayara, Lucinda Helena, Rafael Marlon e Tainá Rocha pelo auxílio nos estudos, experimentos, análises, cálculos, formatações, e principalmente, pela amizade e preocupação que sempre destinaram a mim e pelos momentos divertidos que proporcionaram fora do ambiente acadêmico fazendo esta caminhada ficar mais leve;

À Sâmia Torres por sempre ter estado disposta a me ajudar e pelo auxílio nas análises fitoquímicas;

Ao Wesley Naves, Heitor Roza, Natália Ruiz, Wanderley Bittencourt e Karina Schulz pelo auxílio nos experimentos com atividades antioxidante e de inibição enzimática;

Ao Alan Honorato pela coleta e transporte do fruto de *T. terrestris* e por ter me dado a oportunidade de ver a espécie sendo cultivada,

À Nelma Ferreira pelo incentivo, carinho e conselhos de mãe durante todos esses anos em Lavras;

A técnica do Laboratório de Fitoquímica Anette Boari pela ajuda nos experimentos e cuidar de todos nós como uma mãe;

Aos técnicos do Laboratório/Horto de Plantas Medicinais Dico, Paulinho e Giulia pela ajuda no cultivo;

À secretária do programa de pós-graduação Ana Luiza Rufini pelo auxílio com assuntos acadêmicos/administrativos;

Ao Departamento de Medicina Veterinária (DMV) e Laboratório de Fisiologia e Farmacologia Veterinária pela estrutura que proporcionou a realização dos experimentos de farmacologia;

Aos técnicos do Laboratório de Fisiologia e Farmacologia Veterinária William César Cortez e Juliana Tensol pela ajuda nos experimentos de farmacologia;

Ao motorista da Universidade Federal de Lavras José Heitor Belarmino pelo transporte dos animais da UFMG à UFLA;

À Janina Guilarducci pelo auxílio com o transporte e cuidado com os animais;

Ao Sr. Elmo José do Carmo Silva do Centro de Bioterismo da UFMG pelo fornecimento dos animais;

À Andréa Patrícia por ter sido meus braços direito e esquerdo nos experimentos de farmacologia, abrindo mão muitas vezes dos seus compromissos e aulas para auxiliar no laboratório;

À Hívila Machado, Gabriela Almeida e Hebe Freire pelo auxílio nos experimentos de farmacologia;

Aos técnicos do Biotério Central Multiusuário da Universidade Federal de Lavras Érika Aparecida, Daniel e à médica veterinária responsável técnica Samantha Mesquita pelo cuidado e auxílio com os animais.

RESUMO GERAL

A espécie *Tribulus terrestris* L. (Zygophyllaceae), popularmente conhecida como abrolhos, é uma erva anual originária da Índia, mas atualmente está distribuída em regiões quentes em todo o mundo. O fruto é tradicionalmente utilizado na medicina chinesa e indiana como tônico, afrodisíaco e para o tratamento de disfunção erétil e doenças cardiovasculares. O objetivo deste estudo foi quantificar fenóis totais e flavonoides, e investigar as atividades antioxidantes, inibitória da α -glicosidase, lipoxigenase e vasorrelaxante em anéis de artéria aorta isolada de rato do extrato etanólico bruto e frações do fruto de *T. terrestris*. Foram utilizados o extrato etanólico bruto (EtOH) e as frações hexânica (HEX), diclorometano (DCM), acetato de etila (EtOAc), n-butanol (BuOH) e aquosa solúvel em metanol (AQSol). A análise por HPLC-DAD foi realizada para se obter os perfis cromatográficos do extrato e frações. As frações acetato de etila e butanólica apresentaram os maiores valores de fenóis totais e flavonoides. Por outro lado, a fração hexânica apresentou o melhor poder quelante de metais e atividade inibitória da lipoxigenase. Com relação à atividade antioxidante, a fração acetato de etila apresentou a melhor capacidade de eliminação dos radicais 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH), o ácido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico) (ABTS) e hidroxil, poder redutor, capacidade antioxidante total e atividade inibidora da α -glicosidase do que o extrato e outras frações. Estes resultados estão intimamente relacionados com os valores de fenóis totais e flavonoides. O perfil fitoquímico mais complexo foi o da fração diclorometano. A adição cumulativa do extrato etanólico bruto ou das frações do fruto de *T. terrestris* em uma pré-contracção induzida por fenilefrina (FEN) (10^{-7} M) promoveu efeito vasorrelaxante de maneira dependente de concentração e independente da presença de endotélio vascular em anéis de artéria aorta isolada de ratos. A melhor atividade vasorrelaxante foi observada após incubar a fração acetato de etila. Em anéis desprovidos de endotélio, a fração EtOAc foi capaz de inibir a contracção cumulativa induzida por FEN (10^{-9} - 10^{-4} M) na concentração 1000 μ g/mL. De maneira semelhante, as contracções induzidas por CaCl_2 (10^{-6} - 3×10^{-2} M) em solução despolarizante de Krebs Henseleit nominalmente sem Ca^{2+} também foram inibidas na concentração 1000 μ g/mL pela fração EtOAc. O vasorrelaxamento promovido pela fração EtOAc frente à contracção com KCl 25 mM não apresentou diferença significativa quando comparado com o vasorrelaxamento promovido frente à contracção com FEN 10^{-7} M assim como quando os anéis foram previamente incubados por 30 minutos com tetraetilamônio (3 mM), glibenclamida (3×10^{-6} M) e 4-aminopiridina (3 mM). Assim, o efeito vasorrelaxante de *T. terrestris* provavelmente pode ser atribuído a redução do influxo de cálcio pelos canais para Ca_vL . As análises com UPLC-ESI-MS indicaram que a fração EtOAc é rica em amidas do ácido cinâmico. Assim, o *Tribulus terrestris* apresenta atividades antioxidante, inibitória da α -glicosidase e lipoxigenase e vasorrelaxante.

Palavras-chave: Abrolhos. Fenóis totais. Canais para cálcio. Amidas do ácido cinâmico.

ABSTRACT

Tribulus terrestris L. species (Zygophyllaceae), popularly known as abrolhos, is an annual herb native to India but is currently distributed in warm regions around the world. The fruit is traditionally used in Chinese and Indian medicine as a tonic, aphrodisiac, for the treatment of erectile dysfunction, and cardiovascular diseases. The aim of this research was to evaluate phenolic contents, *in vitro* antioxidants, lipoxygenase, and α -glucosidase inhibitory activities, as well as vasorelaxant in isolated rat aortic rings of extract and fractions of *T. terrestris* fruits. The crude ethanolic extract (EtOH), hexane (HEX), dichloromethane (DCM), ethyl acetate (EtOAc), *n*-butanol (BuOH), and methanol/water soluble (AQSol) fractions were used. The HPLC-DAD was used for the analysis of fingerprints. The DCM fraction was the more complex chemical profile. The EtOAc and BuOH fractions revealed the best effect for extracting phenolic compounds and flavonoids from *T. terrestris* than the HEX and AQSol fraction. On the other hand, the hexanic fraction showed the best metal chelating power and lipoxygenase inhibitory activity. Concerning *in vitro* antioxidant activities, the EtOAc fraction showed better capacity for scavenging 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), 2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid (ABTS), hydroxyl radical, reductive power, total antioxidant capacity (TAC), and α -glucosidase inhibitory activity than others fractions and the EtOH. These results correlated closely with the levels of phenolic compounds and flavonoids. The cumulative addition of the EtOH or fractions of *T. terrestris* fruit in a pre-contraction induced by phenylephrine (10^{-7} M) induced vasorelaxant effect concentration-dependent manner and independent of the presence of the vascular endothelium in isolated rat aortic rings. The best vasorelaxant activity was observed after incubating the EtOAc fraction. In endothelium-denuded rings, EtOAc was able to inhibit phenylephrine-induced contractions (10^{-9} to 10^{-4} M) in the concentration 1000 $\mu\text{g/mL}$. Likewise, in a nominally Ca^{2+} -free depolarizing Krebs Henseleit solution, EtOAc inhibited CaCl_2 (10^{-6} - 3×10^{-2} M)-induced contractions in the concentration 1000 $\mu\text{g/mL}$. There was not significant difference between the vasorelaxant activity on KCl 25 mM-induced contraction, PHE-induced contraction and in the pretreatment with tetraethylammonium (3 mM), glibenclamide (3×10^{-6} M) and 4-aminopyridine (3 mM). Thus, this vasorelaxant effect can probably be attributed by a reduction in calcium influx through Ca_vL channels and inhibition of calcium mobilization from phenylephrine intracellular stores. UPLC-ESI-MS analyses indicated that the EtOAc was rich in cinnamic acid amides. The EtOAc fraction of *Tribulus terrestris* fruits has *in vitro* antioxidant and lipoxygenase and α -glucosidase inhibitory activities. Among others, EtOAc fraction also has the highest vasorelaxant effect, probably due to the reduction in calcium influx through Ca_vL channels. These effects could be involved the cinnamic acid amides, since EtOAc fraction are rich in these chemical constituents.

Keywords: Abrolhos. Phenols. Calcium channels. Cinnamic acid amides.

LISTA DE FIGURAS

PRIMEIRA PARTE

Figura 1 - <i>Tribulus terrestris</i> L.....	18
Figura 2 - Fruto de <i>Tribulus terrestris</i> L.	22
Figura 3 - Metabolismo do ácido araquidônico.....	31
Figura 4 - Mecanismo de contração do músculo liso	34

SEGUNDA PARTE - ARTIGOS

ARTIGO 1

Figure 1 - Principal component analysis based on data of response of extract and fractions of <i>Tribulus terrestris</i> and phenol contents, antioxidant and enzyme inhibitory activities	56
Figure 2 - Reductive potential of extract and fractions of <i>Tribulus terrestris</i> fruit at 700 nm.	59
Figure 3 - HPLC Fingerprint of extract and fractions of <i>Tribulus terrestris</i> fruit at 210nm.....	61

ARTIGO 2

Figure 1 - Effect of EtOH of <i>Tribulus terrestris</i> on Phe 10^{-7} M induced pre-contractions in isolated rat thoracic aorta artery rings	73
Figure 2 - Maximum relaxant effect (E_{max}) of <i>Tribulus terrestris</i> EtOH and its fractions on Phe 10^{-7} M induced pre-contractions in isolated rat aorta.	75
Figure 3 - The potency of the EtOH and its fractions of <i>Tribulus terrestris</i> fruits on phenylephrine-induced contraction on isolated rat aorta.....	75
Figure 4 - Effect of EtOAc fraction of <i>Tribulus terrestris</i> on Phe 10^{-7} M induced pre-contractions in isolated rat thoracic aorta rings	76
Figure 5 -Representative original record of the effect of fraction of <i>Tribulus terrestris</i> on the isolated rat aortic rings contracted by phenylephrine 10^{-7} M	77
Figure 6 - Effect of EtOAc fraction of <i>Tribulus terrestris</i> on Phe-induced concentration-response curves in endothelium-denuded preparations.....	78
Figure 7 - Vasorelaxant effect induced by EtOAc fraction of <i>Tribulus terrestris</i> on Phe 10^{-7} M or KCl 25 mM pre-contracted endothelium-denuded rat aortic rings	79
Figure 8 - Effect of EtOAc fraction of <i>Tribulus terrestris</i> on $CaCl_2$ -induced contractions in isolated rat thoracic aorta rings.....	80
Figure 9 - Effect of EtOAc fraction of <i>Tribulus terrestris</i> on potassium channels	81
Figure 10 - Chromatographic profiles obtained by UPLC with DAD (A) and ESI-MS detector with negative (B) and positive (C) mode ionization for the ethyl acetate fraction of <i>Tribulus terrestris</i>	82
Figure 11 - Chemical structures of constituents 1-5.....	83
Figure 12 - Isolated rat aorta in Krebs Henseleit solution aerated with carbogenic mixture. ...	89
Figure 13 - Data acquisition system (AECAD 04F, AQCAD 2.5.0., AVS Projetos, SP).....	89
Figure 14 - Organ bath - AVS Projetos, SP.....	89
Figure 15 - Experimental protocols on Phe (10^{-7} M) or KCl 25mM induced pre-contractions on isolated rat aorta.....	90
Figure 16 - Spectra obtained by UPLC-ESI-MS, in the negative mode, for the ethyl acetate fraction of fruits of <i>Tribulus terrestris</i> enriched in cinnamic acid amides	93

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

4-AP	4-aminopyridine
ABTS	2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid
ACh	Acetylcholine
ADP	Adenosina difosfato
AQSol	Water/metanol soluble fraction
ATP	Adenosina trifosfato
BuOH	Butanolic fraction
Ca ²⁺	Íons cálcio
CaCl ₂	Calcium chloride
CAT	Catalase
Cav1.2	Calcium channel, voltage-dependent, L type, alpha 1C subunit
CavL	L-type calcium channel
Cl ⁻	Íons cloreto
COX	Ciclooxygenase
DAG	Diacilglicerol
DCM	Dichloromethane fraction
DCV	Doenças cardiovasculares
DM	Diabetes mellitus
DPPH	2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl
E ⁻	Sem endotélio vascular funcional
E ⁺	Com endotélio vascular funcional
EC ₅₀	The half maximal effective concentration
ECA	Enzima conversora de angiotensina
EDHF	Fator hiperpolarizante derivado do endotélio
EDRF	Fator relaxante derivado do endotélio
E _{max}	Maximal effect
EROs	Espécies reativas de oxigênio
EtOAc	Ethyl acetate fraction
EtOH	Crude ethanolic extract
GAE	Gallic acid equivalent
GDP	Guanosina difosfato
GLIB	Glibenclamide
GPx	Glutathione peroxidase
Gq/11	Proteína Gq/11
GTP	Guanosina trifosfato
H ₂ O ₂	Radical peróxido de hidrogênio
HEX	Hexanic fraction
IC ₅₀	The half maximal inhibitory concentration
IP ₃	1,4,5 - trisfosfato de inositol
K ⁺	Íons potássio
KCl	Potassium chloride
KH ₂ PO ₄ .H ₂ O	Fosfato de potássio monohidratado
LOX	Lipoxygenase
MgSO ₄ .7H ₂ O	Sulfato de Magnésio heptahidratado
MLCK	Cinase da cadeia leve da miosina
n	Number of animals
NA	Not available
Na ⁺	Íons Sódio

NaCl	Cloreto de Sódio
NaHCO ₃	Bicarbonato de Sódio
NO	Óxido nítrico
O ²⁻	Ânion superóxido
OH ⁻	Radical hidroxila
PAS	Pressão arterial sistêmica
PGH ₂	Prostaglandina H ₂
PHE	Phenylephrine
PIP ₂	4,5 - difosfato de inositol
PKC	Proteína cinase C
PLC	Fosfolipase C
QE	Quercentin equivalent
ROCCs	Canais para cálcio operados por receptor
Rpm	Rotações por minuto
RS	Retículo sarcoplasmático
SOCCs	Canais para cálcio operados por estoques
SOD	Superóxido dismutase
TAC	Total antioxidant capacity
TEA	Tetraethylammonium
TFC	Total Flavonoids Content
TPC	Total Phenolic Content
UPLC-ESI-MS	Ultra-performance liquid chromatography-electrospray ionization–mass spectrometry

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
2 REFERENCIAL TEÓRICO	17
2.1. Plantas medicinais e o tratamento de doenças	17
2.2. <i>Tribulus terrestris</i>	17
2.2.1 Aspectos gerais da espécie	17
2.2.2 Química de <i>Tribulus terrestris</i>	18
2.2.3 Uso Popular	22
2.2.4 Propriedades farmacológicas de <i>Tribulus terrestris</i>	22
2.3 Espécies reativas de oxigênio (EROs)	24
2.4 Antioxidantes	25
2.5 Métodos de avaliação da atividade antioxidante	26
2.5.1 Sequestro do radical DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil)	27
2.5.2 Sequestro do radical ABTS (2,2-azino-bis-3-etil-benzotiazolina-6-ácido sulfônico)	27
2.5.3 Sequestro do radical hidroxil	28
2.5.4 Poder redutor	28
2.5.5 Capacidade antioxidante total (Redução do fosfomolibdênio)	29
2.6 Diabetes mellitus	29
2.7 Inflamação	30
2.8 Artérias	31
2.8.1 O endotélio	32
2.8.2 Músculo liso vascular	32
2.8.2.1 Mecanismo de contração do músculo liso	33
2.9 Doenças cardiovasculares	35
3 CONSIDERAÇÕES FINAIS	37
REFERÊNCIAS	38
ARTICLE 1 - ANTIOXIDANT, LIPOXYGENASE, AND α-GLUCOSIDASE INHIBITORY ACTIVITIES OF <i>Tribulus terrestris</i> FRUIT	47
1 INTRODUCTION	47
2 MATERIAL AND METHODS	48
2.1 Chemicals and equipments	48
2.2 Extract and fractions preparation	49
2.3 Determination of total phenolic content (TPC)	49
2.4 Flavonoids content	49
2.5 DPPH (2,2-diphenyl-2-picrylhydrazyl) radical scavenging assay	50

2.6 Capacity for scavenging 2,2-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS) -----	50
2.7 Hydroxyl radical scavenging assay -----	50
2.8 Total antioxidant capacity (TAC)-----	51
2.9 Chelating Metal Ions -----	51
2.10 Reductive Potential -----	51
2.11 Capacity to inhibit lipoxygenase-----	52
2.12 Inhibition of α -glucosidase activity -----	52
2.13 HPLC fingerprints-----	52
2.14 Statistical analysis -----	53
3 RESULTS AND DISCUSSION -----	53
3.1. Total phenolic content (TPC) -----	53
3.2 Total flavonoids content (TFC)-----	55
3.3 Antioxidant activity -----	55
3.3.1 DPPH (2,2-Diphenyl-2-picryl-hydrazyl) radical scavenging assay -----	55
3.3.2 ABTS (2,2-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)) radical scavenging assay -----	57
3.3.3 Hydroxyl radical scavenging assay -----	57
3.3.4 Total antioxidant capacity (TAC) -----	57
3.3.5 Chelating Metal Ions -----	58
3.3.6 Reductive Potential -----	58
3.4 Capacity to inhibit lipoxygenase -----	59
3.5 Inhibition of the α -glucosidase activity -----	60
3.6 HPLC fingerprints -----	60
4 CONCLUSIONS-----	62
REFERENCES-----	63
ARTICLE 2 - VASORELAXANT ACTIVITY OF THE EXTRACT AND FRACTIONS OF <i>Tribulus terrestris</i> IN ISOLATED RAT AORTA -----	68
1 INTRODUCTION-----	68
2 MATERIAL AND METHODS-----	69
2.1 Extract and fractions preparation -----	69
2.2 Animals -----	69
2.3 Chemicals -----	70
2.4 Solutions-----	70
2.5 Vascular reactivity -----	70
2.5.1 Preparation of isolated rat thoracic aorta rings -----	70
2.5.2 Experimental protocols -----	71

2.5.2.1 Effects of the crude ethanolic extract and fractions of <i>Tribulus terrestris</i> fruit on aortic contraction induced by PHE or KCl -----	71
2.5.2.2 Investigation of EtOAc effect on Phe-induced concentration-response curves in endothelium-denuded preparations-----	71
2.5.2.3 Investigation of EtOAc effect on CaCl ₂ -induced contractions -----	71
2.5.2.4 Evaluation of K ⁺ channels involvement in EtOAc-induced vasorelaxant response -----	72
2.6 UPLC-ESI-MS analysis -----	72
2.7 Statistical analysis -----	72
3 RESULTS AND DISCUSSION -----	73
3.1 Effect of the EtOH of <i>Tribulus terrestris</i> on Phe induced pre-contractions -----	73
3.2 Effect of EtOAc fraction on Phe induced pre-contractions -----	76
3.3 Effect of EtOAc fraction on Phe-induced concentration-response curves in endothelium-denuded preparations-----	78
3.4 Effect of EtOAc fraction on KCl 25mM induced pre-contractions-----	79
3.5 Effect of EtOAc fraction on CaCl ₂ -induced contractions -----	80
3.6 Effect of EtOAc fraction on potassium channels -----	80
3.7 UPLC-ESI-MS analysis -----	81
4 CONCLUSIONS-----	83
REFERENCES-----	85
CONCLUSÃO-----	88
Attachment 1 -----	89
Attachment 2 -----	93

PRIMEIRA PARTE

1 INTRODUÇÃO

A espécie *Tribulus terrestris* foi identificada em 1.753 por Lineu e desde então vem sendo uma das plantas medicinais mais utilizadas em todo o mundo. Na medicina tradicional chinesa, *T. terrestris* tem sido muito utilizada como diurética e para tratar doenças hepáticas e cardiovasculares. Na Grécia Antiga, os frutos secos eram usados como tônico e laxante. Na medicina indiana e ayurveda, a planta era utilizada como afrodisíaca (ZHU et al., 2017). A partir da década de 1970 no leste da Europa, especialmente na Bulgária, iniciou-se a utilização de *T. terrestris* no tratamento da infertilidade, impotência e disfunção erétil (ANGELOVA et al., 2013). No Brasil, tem ocorrido o aumento no consumo da espécie nos últimos anos com o intuito de melhorar a espermatogênese (MARTINO-ANDRADE et al., 2010).

Diversos países já possuem preparações fitoterápicas à base de *Tribulus terrestris* como é o caso da Bulgária (KAMENOV et al., 2017), Brasil (MARTINO-ANDRADE et al., 2010), Austrália (ROGERSON et al., 2007), Estados Unidos (COMBARIEU et al., 2003), dentre outros. Alguns fitoterápicos utilizam todas as partes aéreas da planta, outros somente o fruto. Segundo consta em monografias das Farmacopeias indiana (2014) e chinesa (2015), é no fruto onde estão os princípios ativos responsáveis pelas atividades biológicas relatadas para a espécie.

Diante da relevância mundial de *Tribulus terrestris*, muitos estudos têm sido conduzidos. Entretanto, eles têm demonstrado resultados controversos, além do fato de muitas pesquisas apresentarem apenas triagens havendo carência de informações sobre o mecanismo de ação. Además, o uso da espécie tem ocorrido de forma indiscriminada, não havendo padronização em relação a dose segura a ser utilizada, reforçando a necessidade de estudos científicos que forneçam segurança ao uso e que comprovem a eficácia da espécie (ABUDAYYAK et al., 2015; NEYCHEV; MITEV, 2016).

No presente estudo objetivou-se avaliar os efeitos do extrato etanólico bruto e suas frações obtidas do fruto de *Tribulus terrestris* como potencial agente de inibição das atividades das enzimas α -glicosidase e lipoxigenase, bem como avaliar as atividades antioxidante e vasorrelaxante em aorta isolada de rato.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1. Plantas medicinais e o tratamento de doenças

O interesse nos efeitos sinérgicos entre substâncias com o intuito de aplicações terapêuticas tem aumentado nos últimos anos em função de recentes mudanças de paradigmas. A busca de ligantes seletivos com um único mecanismo de ação, abordagem anteriormente mais frequente na busca de candidatos a fármacos, vem cedendo lugar ao desenvolvimento de terapias múltiplas. A combinação de substâncias é promissora no controle e tratamento de doenças complexas, pois permite a atuação simultânea sobre múltiplos alvos, garantindo maior eficácia e menor chance de resistência aos fármacos empregados. Assim, o tratamento farmacológico de várias doenças já envolve combinações de diversos medicamentos como na terapia da hipertensão arterial, aterosclerose e diabetes mellitus (WAGNER, 2011; CASANOVA; COSTA, 2017).

Estudos têm mostrado que as plantas medicinais são potentes agentes terapêuticos. Dentro deste contexto, as plantas medicinais podem ser utilizadas para o tratamento de diversas enfermidades como diabetes mellitus, hipertensão arterial, doenças inflamatórias, alérgicas e neurodegenerativas, no combate ao estresse oxidativo, dentre outras e apresentando menos efeitos indesejáveis que os fármacos sintéticos. Às vezes, os extratos de plantas medicinais exibem atividades biológicas mais promissoras do que os constituintes isolados, pois interações sinérgicas podem ser observadas entre os constituintes químicos de extratos vegetais produzindo efeitos mais potentes que uma única substância (FABRICANT; FARNSWORTH, 2001; BALUNAS; KINGHORN, 2005; JUNIO et al., 2011).

Dentre as plantas medicinais que possuem inúmeras atividades biológicas importantes para a saúde encontra-se *Tribulus terrestris* L.

2.2. *Tribulus terrestris*

2.2.1 Aspectos gerais da espécie

O gênero *Tribulus* pertence à família Zygophyllaceae e atualmente inclui aproximadamente 25 espécies. As espécies se estabeleceram bem em países quentes, áridos e semi-áridos. Dentre essas espécies, 13 foram relatadas como invasoras de áreas cultiváveis, especialmente *T. cistoides* L., *T. longipetalus* Viv., *T. terrestris* L. e *T. zeyheri* Sond. Na África,

são encontradas 5 espécies: *T. cristatus* C. Presl, *T. excrucians* Wawra, *T. pterophorus* C. Presl, *T. zeyheri* e *T. terrestris* L. (NEMANDO; BOATWRIGHT; MAGEE, 2017).

A espécie *Tribulus terrestris* L. (FIGURA 1), popularmente, conhecida como abrolhos, videira da punctura, espinho de três pontas, cabeça de touro, dentre outros, é uma erva anual originária da Índia, mas atualmente com distribuição mundial. Pode prosperar mesmo em climas desérticos e solos pobres. É encontrada na Índia, China, Turquia, Bulgária, África, Brasil, dentre outros. Caracteriza-se por ter frutos com pericarpos espinhosos, folhas pequenas e opostas distribuídas em pares e flores pequenas e amarelas com cinco pétalas cada uma. As sementes são oleosas (HONG et al., 2013; PACANOSKI; TYR; VERES, 2014; EL-SHAIBANY et al., 2015; RAJENDRABHAI, 2017).

Figura 1- *Tribulus terrestris* L.



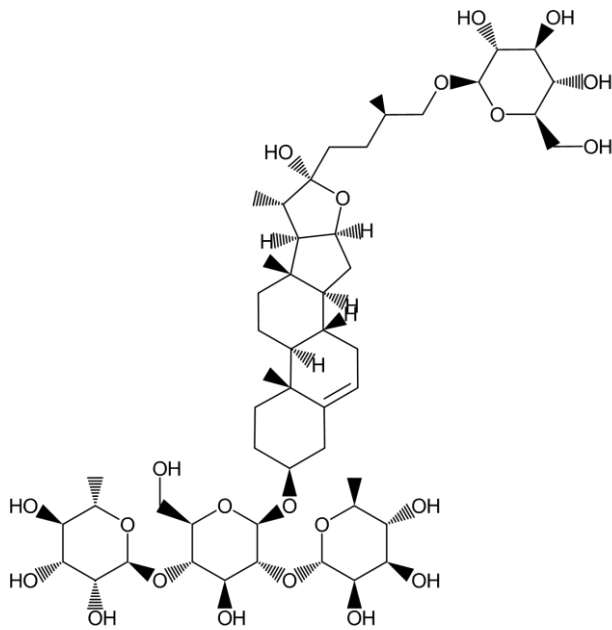
Legenda: Hábito da planta *Tribulus terrestris* L. – Zygophyllaceae (A). Detalhe de um ramo florido da planta (B). Fonte: Arquivo pessoal.

2.2.2 Química de *Tribulus terrestris*

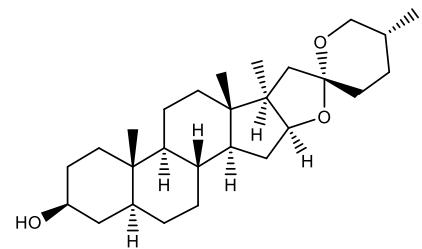
O estudo fitoquímico de *Tribulus terrestris* revelou a presença de saponinas (GANZERA; BEDIR; KHAN, 2001; KANG et al., 2014; WANG et al., 2017), flavonoides (BHUTANI; CHIBBER; SESHADRI, 1969; YEKTA et al., 2008; LI et al., 2017), glicosídeos (NEBIERIDZE et al., 2017; SKHIRTLADZE et al., 2017), alcaloides (WU; SHI; KUO, 1999)

e taninos (MISHRA; RANA; BISHT, 2016). As propriedades biológicas da espécie têm sido atribuídas, em grande parte, a presença destes metabólitos secundários.

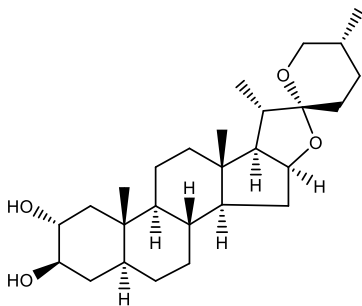
De acordo com a literatura, a composição e a quantidade de saponinas diferem completamente entre diferentes regiões. Dinchev et al. (2008) estudou a química e a atividade biológica de saponinas obtidas das partes aéreas, de caules, folhas e frutos de *Tribulus terrestris* de diversos lugares do mundo como Bulgária, Grécia, Sérvia, Macedônia, Turquia, Geórgia, Irã, Vietnã e Índia. Kang et al. (2014) isolou saponinas da planta inteira oriunda da China. Eles relataram a presença de saponinas esteroidais do tipo furostano e espirostano como a protodioscina (1), tigogenina (2), gitogenina (3), hecogenina (4), diosgenina (5), chlorogenina (6), ruscogenina (7), sarsasapogenina (8), dentre outras. A protodioscina é a mais abundante das saponinas encontradas na espécie e é considerada marcador químico.



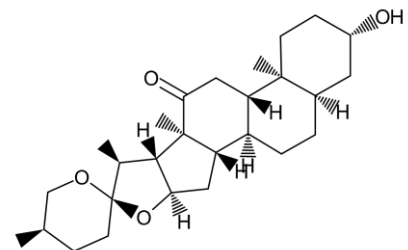
1



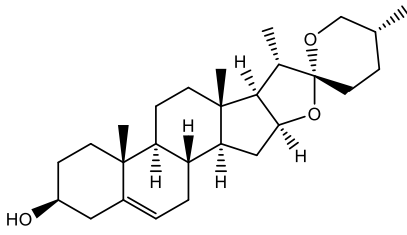
2



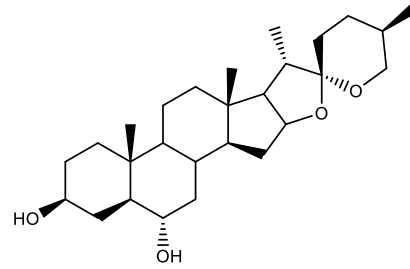
3



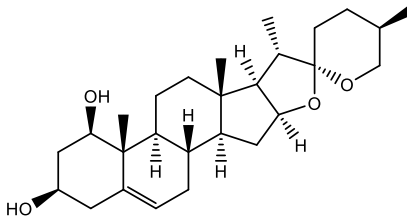
4



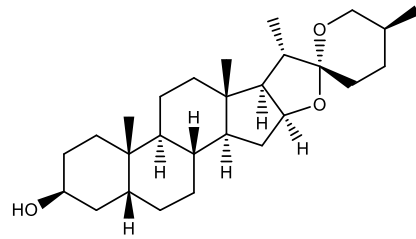
5



6

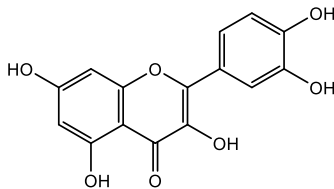


7

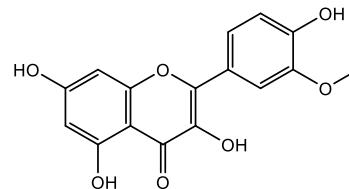


8

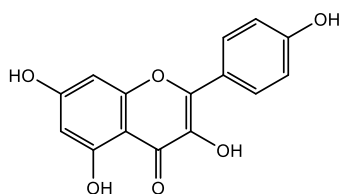
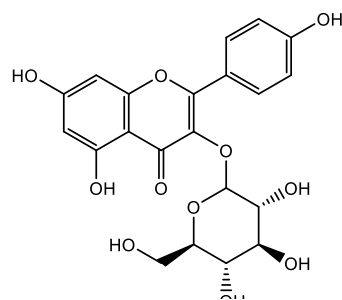
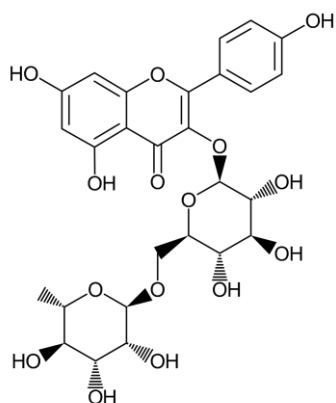
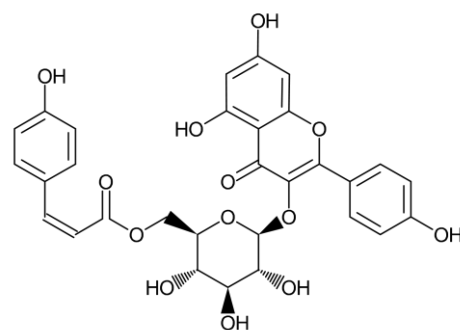
De acordo com a literatura, a quantidade de flavonoides encontrados nas amostras de *T. terrestris* é cerca de 1,5 vezes maior que o conteúdo de saponinas. Os flavonoides que já foram isolados das folhas e frutos de *T. terrestris* são quercetina (**9**), isorhamnetina (**10**), canferol (**11**), canferol-3-O-glicosídeo (**12**), canferol-3-O-rutinosídeo (**13**) e tribulosídeo [canferol-3- β -D-(6-*p*-cumaroil) glicosídeo] (**14**) (BHUTANI; CHIBBER; SESHADRI, 1969; MITRA; MOHAMMAD-MEHDI; MOHAMMAD REZA, 2012).



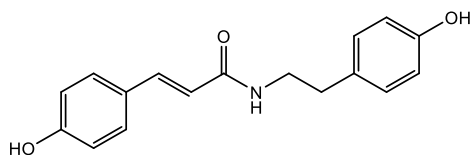
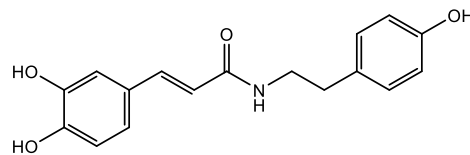
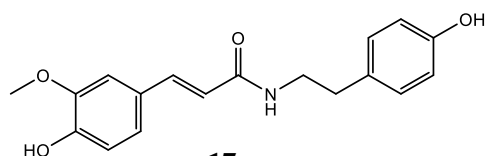
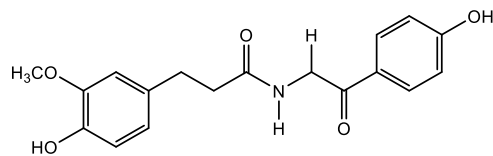
9

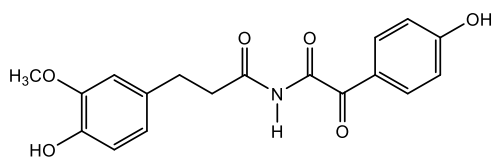


10

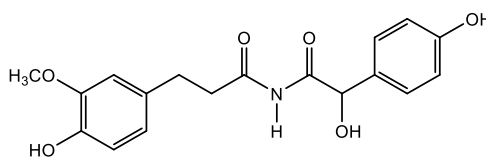
**11****12****13****14**

Estudos realizados por Song et al. (2014) e Song et al. (2016) detectaram nos frutos de *T. terrestris* a presença das seguintes amidas derivadas do ácido cinâmico: *N-trans*-cumaroiltiramina (**15**), *N-trans*-cafeoiltiliramina (**16**), *N-trans*-feruloiltiramina (**17**), terrestriamida (**18**), *N-trans*-feruloilooctopamina (**19**) e terrestrimina (**20**) assim como WU; SHI; KUO (1999) .

**15****16****17****18**



19



20

2.2.3 Uso Popular

O uso de *Tribulus terrestris* tem ocorrido desde a antiguidade na medicina tradicional de regiões da Europa, Ásia e África e norte da Austrália. A utilização tradicional nas medicinas chinesa, indiana (Ayurveda) e europeia determinou sua relevância etnofarmacológica como planta medicinal. Na Farmacopeia chinesa (2015), os frutos de *T. terrestris* (FIGURA 2) têm sido utilizados como diurético, expectorante, combate a tosse, melhora da acuidade visual, para o tratamento do prurido cutâneo, cefaleia, vertigem e obstrução do ducto mamário. Na Índia, os frutos têm sido usados no tratamento da infertilidade, impotência, disfunção erétil e baixa libido. Segundo Mohammed et al., 2014, as raízes e os frutos apresentam propriedades cardiotônicas. No Sudão, a espécie tem sido utilizada na nefrite e no tratamento de outras doenças inflamatórias. No Paquistão, a planta é utilizada como diurética (ZHU et al., 2017).

Figura 2 - Fruto de *Tribulus terrestris* L.



Fonte: Arquivo pessoal.

2.2.4 Propriedades farmacológicas de *Tribulus terrestris*

Muitos estudos têm comprovado que *Tribulus terrestris* apresenta efeitos cardiovasculares benéficos (PHILLIPS; MATHEW; ORIOWO, 2006; TUNCER et al., 2009; ZHANG; LI; YANG, 2010; JIANG et al., 2017), pode ser usado no tratamento da urolitíase (ARASARATNAM; BALAKUMAR; SENTHURAN, 2010) e da disfunção erétil em animais (GAUTHAMAN; GANESAN, 2008) e humanos (KHALEGHI et al., 2016; ASADMOBINI et

al., 2017), como anti-helmíntico (DEEPAK et al., 2002), larvicida (EL-SHEIKH; AL-FIFI; ALABBOUD, 2016), antidiabético (EL-SHAIBANY et al., 2015; SAMANI et al., 2016), anti-inflamatório (KANG et al., 2017; LEE et al., 2017) e antioxidante (HAMMODA et al., 2013; KHATRI; CHHILLAR, 2015; DAKSHAYINI; BASHA, 2018).

Pesquisas avaliando a influência da espécie sobre a libido e espermatogênese em animais e humanos têm sido conduzidas. Um estudo desenvolvido por Hemalatha e Hari (2015) com frutos de *Tribulus terrestris* coletados na Índia sugeriu que o extrato butanólico rico em saponinas pode ser um agente potencial para o tratamento da infertilidade, pois promoveu melhorias na morfologia (qualidade), aumento na quantidade e motilidade dos espermatozoides.

Apesar do crescente interesse mundial pela planta, ainda se tem poucas informações sobre a biodisponibilidade e outros parâmetros farmacocinéticos. Uma pesquisa avaliou a combinação de *Tribulus terrestris* com um agente quimioterápico bastante utilizado, a cisplatina. A quimioterapia baseada em cisplatina é altamente eficiente para o tratamento de pacientes com câncer de pulmão, ovário, cabeça e pescoço e gástrico. No entanto, essa droga é tóxica para células germinativas e causa degeneração de túbulos seminíferos. O intuito da pesquisa foi averiguar se o uso concomitante seria protetor para as células e os resultados foram positivos (ZAHRA, 2018).

O extrato aquoso com frutos coletados em Bangalore na Índia mostrou uma redução na lesão de células epiteliais tubulares renais promovidas pelo oxalato e a inibição da cristalização de oxalato de cálcio *in vitro*. O estudo sugere a possibilidade do uso de *Tribulus terrestris* como agente terapêutico no tratamento da urolitíase, e a caracterização de seu(s) composto(s) ativo(s) como uma nova droga para o tratamento de pacientes com urolitíase (AGGARWAL et al., 2010).

Zheleva-Dimitrova, Obreshkova e Nedialkov (2012) analisaram a capacidade de sequestro do radical DPPH de um fitoterápico à base de *Tribulus terrestris* originário da Bulgária e concluíram que a planta eliminou radicais livres sugerindo atividade antioxidante. A análise dos constituintes químicos da planta detectou a presença de fenóis totais e flavonoides e estes metabólitos foram correlacionados com a ação antioxidante. Os autores sugeriram então que a espécie é uma poderosa fonte natural de antioxidantes e pode ser útil no sequestro de radicais livres.

Em relação a sua possível atividade anti-hipertensiva, alguns estudos têm demonstrado que esses efeitos podem estar relacionados ao vasorrelaxamento da musculatura lisa vascular,

possivelmente pela participação dos fatores relaxantes derivados do endotélio (FRDE) tais como o óxido nítrico. Nesse estudo de Phillips, Mathew e Oriowo (2006) foram utilizados os extratos aquoso e metanólico de *Tribulus terrestris* de exemplares coletados no Kuwait e foram administrados na artéria mesentérica de rato.

Um outro estudo com ratos hipertensos analisou os efeitos da administração oral de uma dose única diária de 10 mg/kg do extrato aquoso liofilizado do fruto de *Tribulus terrestris* durante quatro semanas. A pressão arterial sistólica (PAS) dos ratos hipertensos alimentados com a planta foi significativamente menor em comparação com os demais ratos hipertensos que não receberam o tratamento, assim como a atividade da enzima conversora de angiotensina (ECA). Estes resultados indicaram que existe uma correlação negativa entre o consumo da espécie e a atividade da ECA (SHARIFI; DARABI; AKBARLOO, 2003).

As atividades biológicas dos constituintes químicos isolados da espécie também tem sido alvo de pesquisas. A saponina do tipo espirostano tribulosina, obtida a partir do extrato metanólico de *Tribulus terrestris* protegeu o miocárdio de ratos da lesão promovida no modelo farmacológico de isquemia/reperfusão sugerindo que a saponina pode ser uma nova droga para o tratamento de doenças cardiovasculares (ZHANG; LI; YANG, 2010).

Ainda sobre esta saponina, uma pesquisa com extratos de *Tribulus terrestris* preparados utilizando os solventes éter de petróleo, clorofórmio, 50% metanol e água, foi realizada para avaliar a atividade anti-helmíntica *in vitro* utilizando o nematódeo *Caenorhabditis elegans*. A atividade foi detectada apenas no extrato metanólico, o qual foi submetido a fracionamento e obtiveram -se dois constituintes: tribulosina e β -sitosterol-D-glicosídeo. A atividade anti-helmíntica foi atribuída a ambos os constituintes (DEEPAK et al., 2002).

Song et al 2016 relatam que as amidas de ácido cinâmico (**15-20**) isoladas do fruto seco de *Tribulus terrestris* apresentam atividade inibitória sobre α -glicosidade.

Em relação a atividade larvicida, o extrato de éter de petróleo obtido a partir de folhas de *Tribulus terrestris* apresentou atividade contra as larvas e mosquitos adultos do *Aedes aegypti*, o vetor da febre amarela e da dengue (EL-SHEIKH; AL-FIFI; ALABBOUD, 2016).

2.3 Espécies reativas de oxigênio (EROs)

As espécies reativas de oxigênio (EROs) são moléculas capazes de reagir no organismo e conseqüentemente interferir nos processos biológicos e fisiológicos. Elas podem ser radicais livres ou compostos não radicalares. Podem se formar de diferentes formas, dentre elas, durante a redução do oxigênio a água na cadeia de transporte de elétrons na mitocôndria. A capacidade

destas espécies em ocasionar danos depende da caracterização do tipo de radical e das moléculas que estão sendo atingidas (SILVA; GONÇALVES, 2010).

A formação das EROs ocorre também durante o metabolismo celular ou estas são provenientes de fontes exógenas físicas e químicas. Nos processos metabólicos normais, existe a produção constante de EROs e condições com alta produção acarreta em ações deletérias em todos os componentes celulares. As formas mais comuns de EROs encontradas nas células são ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$), radical hidroxil (OH^{\cdot}) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (ANDRADE JÚNIOR et al., 2005; EMRAN et al., 2019).

As espécies reativas de oxigênio podem causar danos oxidativos que são responsáveis pelo desenvolvimento de muitas doenças crônicas e degenerativas como inflamação, distúrbios relacionados à idade, declínio do sistema imune, câncer, aterosclerose, doenças cardiovasculares, doenças neurodegenerativas como Alzheimer e mal de Parkinson. Além disso, o dano oxidativo nas células β -pancreáticas localizadas nas ilhotas de Langerhans pode causar diabetes mellitus (ROZANTSEV; LOSHADKIN, 2001; LOKHANDE et al., 2014).

2.4 Antioxidantes

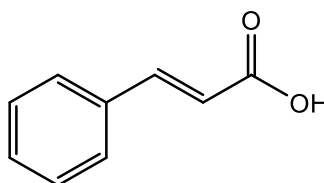
Os antioxidantes são moléculas que podem reduzir significativamente as ações deletérias das espécies reativas de oxigênio, neutralizando-as e prevenindo a incidência dos processos degenerativos. Para se protegerem contra oxidações, os organismos dispõem de mecanismos enzimáticos e não enzimáticos (HALLIWELL, 2012).

Os antioxidantes enzimáticos são formados por diversas enzimas, destacando-se as enzimas glutatona peroxidase (GPx), glutaniona redutase, superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT). Quanto aos antioxidantes não enzimáticos, eles são obtidos pela alimentação e incluem as vitaminas (C, E e A), além de substâncias provenientes do metabolismo secundário das plantas como os fenóis, carotenoides e flavonoides. Entre o último grupo, as flavonas, isoflavonas, flavonas, flavonóis, antocianinas e catequinas são as mais importantes (DEVASAGAYAM et al., 2004; BARBOSA et al., 2010).

Os fenóis são os metabólitos secundários mais frequentemente encontrados em uma ampla variedade de plantas medicinais e tem recebido grande atenção nos últimos anos, pois atuam como moléculas antioxidantes doando elétrons para estabilizar os radicais livres. Eles inibem a peroxidação lipídica e a agregação plaquetária. Essa capacidade antioxidante deve-se a estruturas moleculares redutoras que sequestram ou neutralizam os radicais livres, e atuam

também na quelação de metais de transição, formando intermediários relativamente estáveis (SAHU; KAR; ROUTRAY, 2013).

Um grupo de drogas fenólicas encontradas na medicina são os derivados do ácido cinâmico. O ácido cinâmico (**21**) consiste em um ácido carboxílico aromático de ocorrência natural cuja estrutura molecular é normalmente encontrada na forma trans. Eles são formados pela via biossintética que forma fenilpropanoides, cumarinas, lignanas, isoflavonoides, flavonoides, estilbenos, antocianinas e taninos. Ácidos cinâmicos frequentemente aparecem como conjugados de éster com ácido quínico, conhecidos como ácidos clorogênicos, mas também podem formar ésteres com outros ácidos, açúcares ou lipídeos, ou formar amidas com aminas aromáticas e alifáticas (MIN et al., 2004).



21

Vários estudos têm sido realizados visando a aplicação dos derivados do ácido cinâmico na medicina, isso porque os derivados do ácido cinâmico apresentam importantes atividades biológicas como atividades antioxidante, antimicrobiana (SOVA, 2012), anticâncer (BALTAS; BEDOS-BELVAL, 2011), antifúngica (TAWATA et al., 1996), antimalárica (WIESNER et al., 2002), antituberculose (DE et al., 2012), antiaterogênica (LAPEYRE et al., 2005), inibição da α -glicosidase (SONG et al., 2016; ERNAWATI et al., 2017) e da acetilcolinesterase (TAKAO et al., 2017). Ácidos cinâmicos têm sido utilizados também para alterar a potência, permeabilidade, solubilidade e outros parâmetros de um fármaco (GUZMAN, 2014).

2.5 Métodos de avaliação da atividade antioxidante

Existem várias técnicas *in vitro* para avaliação da atividade antioxidante de extratos vegetais, tendo em vista a grande variedade de constituintes químicos com propriedades antioxidantes, além da complexidade quanto ao seu modo de combater as espécies reativas de oxigênio (SÁNCHEZ-MORENO, 2002).

Estes testes têm se tornado ferramentas usuais e extremamente necessárias na triagem de substâncias bioativas que possam ser utilizadas como fármacos, auxiliando os pesquisadores na avaliação da atividade de constituintes químicos de produtos naturais, bem como obtidos de

fontes sintéticas. Além disso, estes métodos podem auxiliar na escolha das espécies de plantas para estudos químicos e farmacológicos (ALVES et al., 2010).

Dentre os métodos para avaliar a atividade antioxidante estão os ensaios de captura de radicais livres como DPPH (2,2-difenil-picril-hidrazil), ABTS [2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin)6-ácido sulfônico] e radical hidroxil (OH^{\cdot}) (ALAM; BRISTI; RAFIQUZZAMAN, 2013). Outros testes existentes são capacidade antioxidante total pelo método de redução do complexo fosfomolibdênio, poder quelante e poder redutor, dentre outros.

2.5.1 Sequestro do radical DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil)

O método do sequestro do radical DPPH é considerado um recurso fácil e preciso para a avaliação da atividade antioxidante de produtos naturais. A molécula de DPPH é caracterizada como um radical livre estável em virtude da deslocalização do elétron desemparelhado por toda a molécula. Esta deslocalização confere a esta molécula uma coloração púrpura, caracterizada pela absorção em 517 nm. Este ensaio se baseia na medida da atividade antioxidante de uma determinada substância em sequestrar o radical DPPH, reduzindo-o à hidrazina. Quando uma determinada substância que age como doador de átomos de hidrogênio é adicionada a uma solução de DPPH, a hidrazina é obtida com mudança simultânea de coloração púrpura a amarela (MOLYNEUX, 2004).

A partir dos resultados obtidos, determina-se a porcentagem da atividade antioxidante ou sequestradora de radicais livres e/ou porcentagem de DPPH remanescente no meio reacional. Quanto menor a concentração da substância que elimina 50% do radical DPPH (IC_{50}), maior será sua atividade antioxidante (SOUSA et al., 2007).

2.5.2 Sequestro do radical ABTS (2,2-azino-bis-3-etil-benzotiazolina-6-ácido sulfônico)

Outro método bastante utilizado para a determinação da atividade antioxidante por meio de sequestro de radical é o método do radical ABTS. Assim como o método do radical DPPH, o ABTS apresenta boa estabilidade em certas condições de análise, mas apresentam diferenças frente aos antioxidantes e quanto à manipulação. O DPPH é um radical livre que é adquirido dessa forma, sem a necessidade de preparo, enquanto o radical ABTS deve ser gerado por meio de reações enzimáticas ou químicas (ARNAO, 2001).

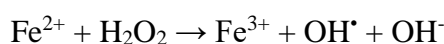
O método do radical ABTS baseia-se na geração do $\text{ABTS}^{\cdot+}$, de coloração azul esverdeada, por meio da reação do ABTS com persulfato de potássio ($\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$) que possui

absorção máxima em 734 nm. Com a adição de uma substância antioxidante, ocorre a redução do $\text{ABTS}^{\cdot+}$ a ABTS promovendo a perda da coloração do meio. Utilizando diferentes concentrações do antioxidante, é possível determinar os valores de IC_{50} (concentração do antioxidante capaz de eliminar 50% do radical ABTS). O método é aplicável ao estudo de antioxidantes hidrossolúveis e lipossolúveis, substâncias puras e extratos vegetais (RE et al., 1999).

2.5.3 Sequestro do radical hidroxil

O radical hidroxil (HO^{\cdot}) é o mais reativo dentre as espécies reativas de oxigênio. Possuem uma meia-vida muito curta sendo bastante deletério. Em experimentos *in vitro*, pode ser sequestrado facilmente devido a sua alta reatividade, porém para que esse resultado se reproduza *in vivo* é necessário que sejam administradas altas concentrações de antioxidante. Este radical frequentemente ataca as moléculas por abstração de hidrogênio e pode ser gerado através da reação do H_2O_2 com metais de transição ou pela homólise da água por exposição à radiação ionizante (RIBEIRO et al., 2005; LIMA; BEZERRA, 2012).

Existem vários métodos para determinar o sequestro do radical hidroxil, um deles é o ensaio utilizando a 2-deoxirribose. Nesta técnica, o radical hidroxil é gerado pela reação do cloreto férrico (FeCl_3) e ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) na presença de ascorbato, que reage para formar Fe^{2+} -EDTA juntamente com ascorbato oxidado. O H_2O_2 reage com Fe^{2+} -EDTA para formar Fe^{3+} -EDTA e radical hidroxil através da reação de Fenton:



O radical formado pode então reagir com 2-deoxirribose para formar produtos que, sob aquecimento com ácido tiobarbitúrico (TBA) em pH baixo, apresentam coloração rosada, com absorvância a 532 nm. Substâncias que tenham propriedades antioxidantes podem competir com a 2-deoxirribose pelo radical, produzindo uma diminuição na intensidade da coloração. Este teste é considerado um método simples e barato de medir a reatividade de algumas moléculas orgânicas (ex. ADP e ATP) frente ao radical hidroxil (ALVES et al., 2010).

2.5.4 Poder redutor

O ensaio antioxidante de determinação do poder de redução do íon ferro está baseado na redução do Fe^{+3} (forma férrica) em Fe^{+2} (forma ferrosa). A substância antioxidante promove a redução alterando a tonalidade da reação entre o ferricianeto de potássio [$\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$], ácido

tricloroacético e cloreto férrico, cuja absorvância pode ser medida no comprimento de onda de 700 nm (MIGUEL et al., 2014; URREA-VICTORIA et al., 2016).

Este método avalia o aumento da absorvância resultante da reação com o antioxidante. Quanto maior a absorvância ou intensidade da coloração, maior o potencial redutor das amostras, ou seja, maior será o potencial antioxidante (ALAM; BRISTI; RAFIQUZZAMAN, 2013).

2.5.5 Capacidade antioxidante total (Redução do fosfomolibdênio)

A capacidade antioxidante total é determinada pelo método do fosfomolibdênio, que se baseia na determinação espectrofotométrica da redução do Mo^{+6} a Mo^{+5} , com formação subsequente de fosfato de Mo^{+5} , que apresenta absorção máxima a 695 nm (PRIETO; AGUILAR, 1999).

2.6 Diabetes mellitus

O diabetes mellitus (DM) é um transtorno metabólico de etiologias heterogêneas caracterizado por níveis elevados de glicose no sangue (hiperglicemia). Os níveis aumentados de glicose no sangue no diabetes produzem ânions superóxido, que geram radicais hidroxil via reação de Haber-Weiss, resultando na peroxidação de lipídeos de membrana e glicação protéica. Isto leva a danos oxidativos das membranas celulares. Esses radicais danificam ainda outras importantes biomoléculas, incluindo carboidratos, proteínas e ácido desoxirribonucléico (DNA) (RAHATI et al., 2014; LU et al., 2017).

Esta doença é dividida em dois tipos: tipo 1 ou insulino dependente e tipo 2. O primeiro tipo é um distúrbio autoimune que leva à destruição das células β do pâncreas, levando a uma deficiência total ou parcial de insulina. O tipo 2 é o mais comum sendo caracterizado por vários graus de resistência à insulina e de uma resposta inadequada de compensação na secreção de insulina (BLAIR, 2016).

O diabetes mellitus vem aumentando sua importância pela sua crescente prevalência e habitualmente está associado à dislipidemia, à hipertensão arterial e à disfunção endotelial. Embora, o diabetes seja uma doença crônica não transmissível é considerada uma das cinco principais causas de morte no mundo. Segundo a Organização Mundial de Saúde, o DM pode matar milhões de indivíduos em todo o mundo até 2030. Os fatores de risco relacionados aos hábitos alimentares e estilo de vida da população estão associados a este incremento na carga de diabetes globalmente (ZHANG et al., 2015).

Os principais objetivos do controle do diabetes mellitus incluem a regulação dos níveis de glicose no sangue e a prevenção de complicações. Atualmente, umas das alternativas para o controle da hiperglicemia tem sido o uso de hipoglicemiantes orais, que agem como inibidores da α -glicosidase. A α -amilase e α -glicosidase intestinais são as principais enzimas envolvidas na digestão e absorção de carboidratos. Os inibidores da α -glicosidase fornecem uma opção antidiabética eficaz para indivíduos com diabetes tipo 2. No entanto, muitas dessas drogas são conhecidas por terem efeitos indesejáveis, como flatulência, diarreia e desconforto abdominal (RAMU et al., 2015).

A busca por novas alternativas para o controle do diabetes mellitus, como o uso de plantas medicinais, tem sido alvo de muitos estudos. Os produtos naturais podem inibir a enzima α -glicosidase e assim retardar a digestão dos carboidratos, reduzindo os níveis pós-prandiais de glicose no sangue. Portanto, os constituintes ativos de plantas podem ser utilizados para o desenvolvimento de novos fármacos antidiabéticos (MIAO et al., 2018).

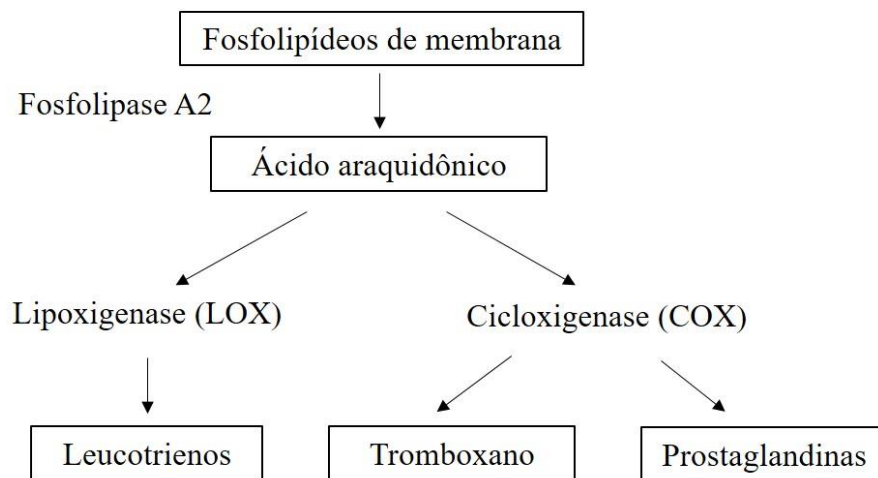
2.7 Inflamação

A inflamação é o primeiro passo para várias doenças como o diabetes mellitus. Apesar do DM ser uma condição pró-inflamatória, a inflamação também parece ter influência sobre sua etiologia (BANERJEE; SAXENA, 2012). O aumento nos níveis de citocinas, quimiocinas e interleucinas provocam uma resposta inflamatória e o aumento dos níveis e da atividade das células, principalmente dos macrófagos, provocam uma resposta imune e esses dois fatores medeiam a patogênese do diabetes (HERDER et al., 2015).

O metabolismo do ácido araquidônico está relacionado com vários processos inflamatórios em decorrência da formação dos leucotrienos pela via regulada pela lipoxigenase (LOX) e síntese de tromboxano e prostaglandinas pela via da cicloxigenase (COX). As LOXs são dioxigenases contendo em sua estrutura ferro não heme que catalisam a oxiredução de ácidos graxos poliinsaturados contendo pelo menos duas duplas ligações cis isoladas (FIGURA 3) (KUHN; BANTHIYA; VAN LEYEN, 2015).

A via regulada pela lipoxigenase inicia-se pela ativação da fosfolipase A₂. Essa fosfolipase hidrolisa os fosfolípidos da membrana liberando o ácido araquidônico. O ácido araquidônico liberado será utilizado como substrato para a via formando os leucotrienos. O ácido linoleico é um substrato para esta enzima sendo convertido pela lipoxigenase em um dieno conjugado (COLAZZO et al., 2017; HAEGGSTRÖM, 2018).

Figura 3- Metabolismo do ácido araquidônico



Os leucotrienos estão envolvidos na fisiopatologia de várias doenças inflamatórias e alérgicas, como asma, artrite reumatoide, psoríase, nefrite glomerular, doenças intestinais, como colite ulcerativa e doença de Crohn, e distúrbios circulatórios, como choque e isquemia do miocárdio. A inibição dessa enzima é considerada uma atividade antioxidante e anti-inflamatória (EL-GUENDOOUZ et al., 2016).

Os produtos naturais representam uma alternativa para o tratamento de doenças inflamatórias no desenvolvimento de novas drogas. Diferentes extratos vegetais e/ou seus constituintes ativos têm sido utilizados para o tratamento de uma ampla variedade de distúrbios inflamatórios. Estudos mostram que os flavonoides possuem atividade anti-inflamatória nas fases proliferativa e exsudativa da inflamação via inibição de várias enzimas como lipoxigenase, xantina oxidase, aldose redutase, fosfodiesterase, Ca^{+2} /ATPase e ciclooxigenase (IBRAHIM et al., 2018).

2.8 Artérias

Os vasos sanguíneos podem ser divididos anatomicamente em três camadas ou túnicas: adventícia, média e íntima. A camada adventícia é a mais externa sendo constituída de tecido conjuntivo. A camada média está localizada em posição intermediária, contendo células musculares lisas dispostas circularmente, fibras colágenas e elastina. A camada íntima é a camada mais interna, fica em contato com o sangue, composta por células endoteliais que revestem a porção interna do vaso e uma lâmina subendotelial (BERNE et al., 2004; WHITLOCK; HUNDLEY, 2015).

Nas artérias, as túnicas são separadas entre si por lâminas elásticas interna e externa. As artérias de grande calibre, como a aorta possuem paredes que se distendem facilmente devido à grande quantidade de elastina presente na túnica média (LANNON; SLOVE; JACOB, 2014). A deposição desse material elástico as torna capazes de distenderem quando recebem o volume de ejeção durante a sístole ventricular e retornarem à sua forma original durante a diástole, ou seja, essas artérias são responsáveis pela manutenção da pressão e perfusão sanguínea (SEIDELMANN; LIGHTHOUSE; GREIF, 2014).

A aorta é a artéria de maior calibre do corpo humano e desempenha várias funções sobre o sistema cardiovascular. Dentre elas, a transmissão e distribuição do sangue do coração para os vasos de menor calibre que abastecem a periferia (WHITLOCK; HUNDLEY, 2015).

2.8.1 O endotélio

O endotélio é uma monocamada de células que reveste os vasos sanguíneos e separa a corrente circulatória do músculo liso vascular. Várias substâncias encontradas no endotélio estão envolvidas no controle do tônus da musculatura lisa vascular pela produção de mediadores que podem produzir vasodilatação ou vasoconstrição. Dentre as substâncias vasodilatadoras ou fatores relaxantes derivados do endotélio (FRDE) estão o óxido nítrico (NO), o fator hiperpolarizante derivado do endotélio (FHDE) e a prostaciclina. As substâncias vasoconstritoras são endotelinas (mais potente), prostaglandina H₂ (PGH₂), a angiotensina II e tromboxano A₂ (CARVALHO et al., 2001).

2.8.2 Músculo liso vascular

O músculo liso é uma ferramenta bastante útil para a investigação de atividades biológicas de substâncias naturais ou sintéticas. Uma triagem farmacológica pode ser realizada para determinar se substâncias apresentam alguma atividade relaxante em músculos lisos estimulados com agentes contráteis (SILVA et al., 2013). O músculo liso vascular é o principal responsável pela atividade fisiológica normal do sistema circulatório.

As propriedades contráteis dos músculos lisos podem ser classificadas em fásicas ou tônicas. As contrações fásicas ocorrem, principalmente, em músculos lisos viscerais e veia porta na musculatura vascular; estas contrações se caracterizam por apresentarem rápida velocidade de contração e de relaxamento, não mantendo o tônus contrátil. As contrações tônicas se desenvolvem lentamente e mantêm o tônus efetivamente; são características dos músculos lisos vasculares, como por exemplo, o da artéria aorta (GUYTON; HALL, 2011).

A regulação do tônus vascular é fundamental para o controle adequado da pressão arterial. Alterações dessa musculatura estão ligadas a diversas doenças cardiovasculares, tais como a hipertensão arterial, infarto do miocárdio e acidentes vasculares cerebrais (BROZOVICH et al., 2016).

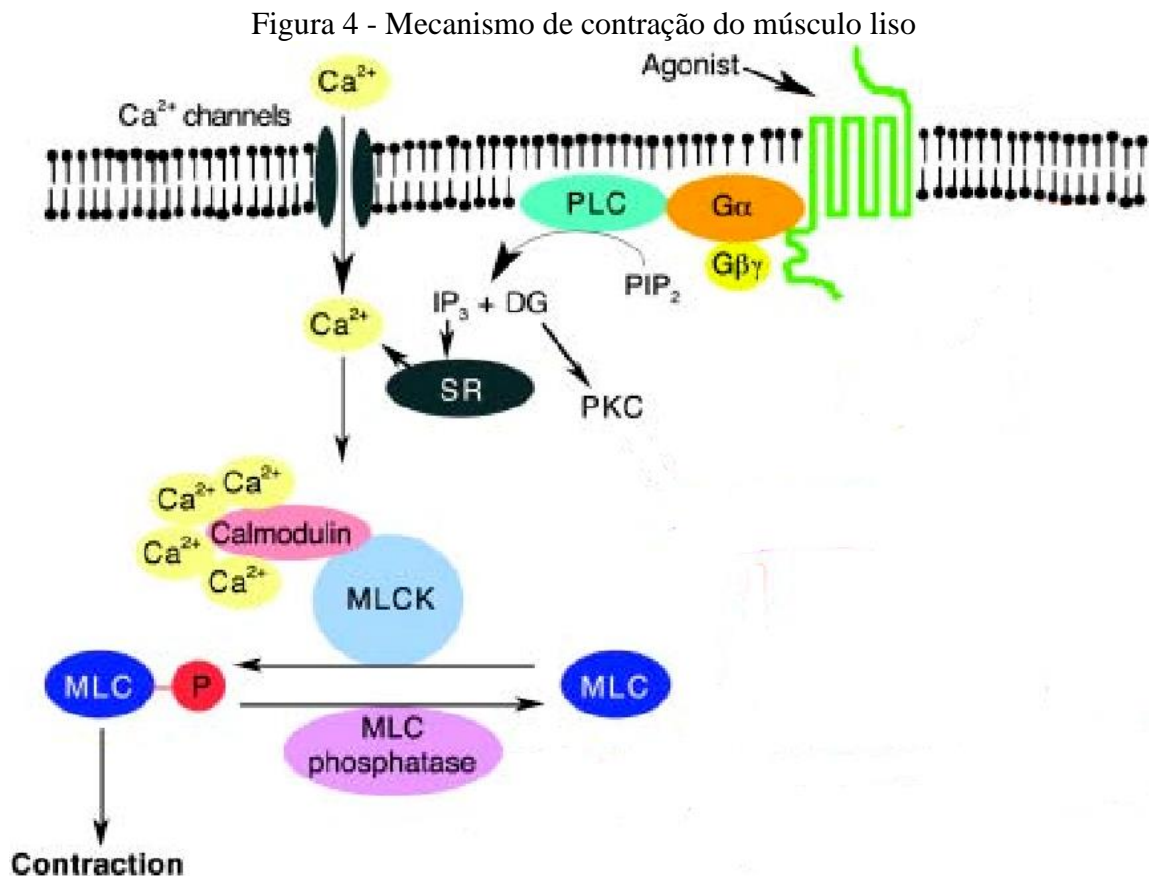
Assim como todas as células musculares, as células musculares lisas vasculares requerem um aumento na concentração de cálcio citoplasmático para deflagrar a sua contração. A contribuição relativa dos mecanismos para promover o aumento na concentração de cálcio citoplasmático depende do tipo de vaso e da natureza do estímulo contrátil (HATHAWAY et al., 1991).

Os mecanismos responsáveis pela contração do músculo liso vascular estão divididos em duas classes: acoplamento eletromecânico (despolarização da membrana das células vasculares) e farmacomecânico (contração induzida por agonistas) (SOMLYO; SOMLYO, 2003). O acoplamento eletromecânico tem início com a despolarização da membrana plasmática devido à entrada de íons como Na^+ , K^+ , alterando o gradiente eletroquímico e promovendo a abertura de canais para cálcio sensíveis à voltagem. Este evento permite a difusão de cálcio extracelular para o interior da célula, obedecendo o gradiente de concentração (GUYTON; HALL, 2011). O acoplamento farmacomecânico é independente da despolarização celular, mas envolve a interação de agonistas com os seus receptores acoplados à proteína G situada na membrana. Além disso, pode ocorrer acoplamento misto, ou seja, farmacomecânico e eletromecânico, ocorrendo via liberação do estoque de cálcio do retículo sarcoplasmático e influxo de cálcio do espaço extracelular por ativação de canais para cálcio operados por receptor e por canais para cálcio operados por voltagem (BROZOVICH et al., 2016).

2.8.2.1 Mecanismo de contração do músculo liso

O agonista α_1 -adrenérgico fenilefrina promove contração da musculatura lisa vascular por acoplamento misto. Este agonista promove a ativação do receptor específico α_1 encontrado na membrana plasmática e acoplado à proteína Gq/11, constituída por 3 subunidades: uma alfa (α), uma beta (β) e uma gama (γ). Quando o agonista α_1 -adrenérgico fenilefrina liga-se a proteína, ocorre a perda da afinidade da subunidade α pelo GDP e o aumento da afinidade por GTP, com isso ocorre uma alteração conformacional desta proteína, o que leva ao acoplamento e consequente ativação de uma enzima da membrana, a fosfolipase C (PLC). Esta enzima, por sua vez, deflagra a hidrólise de um componente fosfolipídico menor da membrana plasmática, o 4,5-bifosfato de fosfatidilinositol (PIP_2), em dois segundos mensageiros, o 1,4,5-trifosfato de

inositol (IP_3) e o diacilglicerol (DAG). Estas duas moléculas têm ações sinérgicas com as moléculas mensageiras secundárias. O IP_3 é hidrossolúvel e liga-se a receptores específicos do retículo sarcoplasmático (RS), causando a abertura dos canais iônicos e culminando em uma rápida liberação de cálcio das reservas intracelulares. Esse cálcio então irá ligar-se aos receptores rianodínicos ou receptores para a cafeína propiciando a saída de mais cálcio dos estoques intracelulares. Já o DAG tem sua distribuição limitada à membrana, onde ativa uma proteína quinase sensível a fosfolipídios e ao cálcio, denominada proteína cinase C (PKC). A PKC ativada converte ATP em ADP, propiciando a abertura dos canais para cálcio sensíveis a voltagem e assim favorecendo o influxo de cálcio para o meio intracelular. Com o aumento da concentração de cálcio intracelular livre, inicia-se a atuação de uma série de processos fisiológicos que resultam na contração do músculo liso vascular (FIGURA 4) (SOMLYO; SOMLYO, 1968; SOMLYO et al., 1985).



Fonte: Adaptado de Chiba e Misawa, 2004

Os íons cálcio oriundos dos estoques intracelulares do retículo sarcoplasmático juntamente com os íons cálcio provenientes do influxo de cálcio pelos canais para cálcio sensíveis a voltagem, ligam-se a uma proteína citoplasmática chamada calmodulina, permitindo

a formação do complexo 4-Ca^{2+} - calmodulina que é um mediador de várias ações enzimáticas. O complexo Ca^{2+} - calmodulina ativa a quinase da cadeia leve da miosina (MLCK) que converte ATP em ADP e libera o sítio ativo da actina ao ligar-se à caldesmona. A MLCK ativada fosforila a cadeia leve da miosina, que sofre alteração conformacional, sendo capaz de interagir com a actina e promover contração (HATHAWAY et al., 1991; SOMLYO; SOMLYO, 2003).

Quando a concentração de Ca^{2+} intracelular cai abaixo do requerido para deflagração destes processos ocorre a desativação do complexo Ca^{2+} - calmodulina - MLCK, promovendo o relaxamento do músculo liso vascular (SAVINEAU; MARTHAN, 1997).

Muitas pesquisas vêm sendo conduzidas envolvendo extratos vegetais e suas atividades sobre a musculatura lisa vascular. Sabendo-se que o músculo é o principal tipo que controla ou regula o funcionamento da maioria dos órgãos do corpo, apresentando assim um papel importante na maioria dos sistemas biológicos, estudos *in vitro* envolvendo a contratilidade e o relaxamento do musculo liso são de extrema importância no desenvolvimento de novos fármacos ou fitoterápicos que serão utilizados para a prevenção ou para o tratamento de doenças como a hipertensão arterial (CHEN et al., 2014; CHAVES et al., 2017; KHAN; KHAN; SHAH, 2018).

2.9 Doenças cardiovasculares

As Doenças Cardiovasculares (DCV) são, atualmente, a maior causa de mortes no mundo. A Organização Mundial de Saúde estima que em 2.030 quase 23,6 milhões de pessoas morrerão de doenças cardiovasculares (MAO et al., 2015). Dentre as DCVs, a Hipertensão Arterial Sistêmica (HAS) é uma condição clínica que compreende múltiplos fatores e é caracterizada pelo aumento sustentado da pressão arterial sistólica e diastólica acima de 140 mmHg e 90 mmHg, respectivamente (SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA, 2016; WONG et al., 2018).

Segundo a Organização Mundial de Saúde, a hipertensão arterial é uma doença que possui prevalência crescente justificada pelo crescimento populacional, envelhecimento e fatores de risco comportamentais como maus hábitos alimentares, falta de atividade física, uso abusivo de álcool, sobrepeso/obesidade e estresse.

A HAS constitui importante fator de risco para complicações tais como: doença cerebrovascular, doença arterial coronariana, insuficiência cardíaca, insuficiência renal crônica e doença vascular de extremidades. Ela apresenta custos médicos e socioeconômicos elevados (BRASIL, 2007; RADOVANOVIC et al., 2014).

Uma quase totalidade dos indivíduos portadores de hipertensão são assintomáticos. O tratamento da hipertensão arterial sistêmica visa prevenir complicações cardiovasculares, reduzir a morbidade e mortalidade. A prevenção ou o tratamento podem ser alcançados por meio de terapias farmacológicas e não farmacológicas, como redução do peso corporal, redução da ingestão de álcool, moderação do sódio dietético, aumento da atividade física e por meio de plantas medicinais (TOM et al., 2010).

As principais classes de medicamentos existentes disponíveis para o tratamento farmacológico da hipertensão arterial sistêmica são: diuréticos, inibidores adrenérgicos, β -bloqueadores, vasodilatadores diretos, antagonistas dos canais para cálcio, α -bloqueadores, inibidores da enzima conversora de angiotensina e bloqueadores do receptor AT₁ de angiotensina II. Na maioria dos casos, os médicos indicam associações de diferentes classes de medicamentos com o intuito de aumentar a eficácia anti-hipertensiva e atingir múltiplos-alvos (KOHLMANN-JÚNIOR, 2010).

No Brasil, o uso de plantas medicinais tem sido amplamente utilizado há séculos para prevenir e tratar várias doenças, incluindo as doenças cardiovasculares. O desenvolvimento de novas ferramentas farmacológicas pode ajudar a melhorar o manejo clínico desta doença, pois os produtos naturais possuem diferentes constituintes químicos tendo múltiplos alvos e sendo potenciais candidatos à terapia anti-hipertensiva (NUNES; BERNARDINO; MARTINS, 2015).

Muitos indivíduos hipertensos complementam o tratamento farmacológico tradicional com a administração de fitoterápicos ou com a utilização das plantas medicinais em forma de infusões ou decocções, tanto para a prevenção da elevação da pressão arterial, quanto na tentativa de redução dos valores pressóricos que já se encontram elevados. Na maioria das vezes, o uso é feito sem embasamento científico que comprove a sua eficácia e segurança, quando usado isoladamente ou associado a medicamentos anti-hipertensivos (OLIVEIRA; ARAÚJO, 2007).

Assim, existe a necessidade de comprovar cientificamente a possível atividade anti-hipertensiva de plantas medicinais que são amplamente utilizadas pelos povos de todo o mundo como alternativa no tratamento da hipertensão arterial sistêmica.

3 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Assim, a existência de tantas atividades biológicas somada ao crescente consumo mundial e da necessidade de comprovar a eficácia e fornecer segurança em relação ao uso, justificam o interesse nesta planta, uma vez que este estudo poderá contribuir com a farmacologia de *T. terrestris*, bem como a elucidação do mecanismo de ação das atividades biológicas avaliadas.

REFERÊNCIAS

- ABUDAYYAK, M.; JANNUZZI, A. T.; ÖZHAN, G.; ALPERTUNGA, B. Investigation on the toxic potential of *Tribulus terrestris* in vitro. **Pharmaceutical Biology**, v. 53, n. 4, p. 469–476, 2015.
- AGGARWAL, A.; TANDON, S.; SINGLA, S. K.; TANDON, C. Diminution of oxalate induced renal tubular epithelial cell injury and inhibition of calcium oxalate crystallization in vitro by aqueous extract of *Tribulus terrestris*. **International Brazilian Journal of Urology**, v. 36, n. 4, p. 480–488, 2010.
- ALAM, M. N.; BRISTI, N. J.; RAFIQUZZAMAN, M. Review on in vivo and in vitro methods evaluation of antioxidant activity. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 21, n. 2, p. 143–152, 2013.
- ALVES, C. Q.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P.; BAHIA, M. V.; AGUIAR, R. M. Methods for determination of in vitro antioxidant activity for extracts and organic compounds. **Química Nova**, v. 33, n. 10, p. 2202–2210, 2010.
- ANDRADE JÚNIOR, D. R. DE; SOUZA, R. B. DE; SANTOS, S. A. DOS; ANDRADE, D. R. DE. Os radicais livres de oxigênio e as doenças pulmonares. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 31, n. 1, p. 60–68, 2005.
- ANGELOVA, S.; GOSPODINOVA, Z.; KRASTEVA, M.; ANTOV, G.; LOZANOV, V.; MARKOV, T.; BOZHANOV, S.; GEORGIEVA, E.; MITEV, V. Antitumor activity of Bulgarian herb *Tribulus terrestris* L. on human breast cancer cells. **Journal of Bioscience and Biotechnology**, v. 2, n. 1, p. 25–32, 2013.
- ARASARATNAM, V.; BALAKUMAR, S.; SENTHURAN, A. A study of *Tribulus terrestris* extract on risk factors for urinary stone in normal subjects and urolithic patients. **Journal of the National Science Foundation of Sri Lanka**, v. 38, n. 3, p. 189–193, 2010.
- ARNAO, M. B. Some methodological problems in the determination of antioxidant activity using chromogen radicals: a practical case. **Trends in Food Science & Technology**, v. 11, n. 2000, p. 419–421, 2001.
- ASADMOBINI, A.; BAKHTIARI, M.; KHALEGHI, S.; ESMAEILI, F.; MOSTAFAEI, A. The effect of *Tribulus terrestris* extract on motility and viability of human sperms after cryopreservation. **Cryobiology**, v. 75, n. 1, p. 154–159, 2017.
- BALTAS, P. D. M.; BEDOS-BELVAL, F. Cinnamic acid derivatives as anticancer agents-A review. **Current Medicinal Chemistry**, v. 18, p. 1672–1703, 2011.
- BALUNAS, M. J.; KINGHORN, A. D. Drug discovery from medicinal plants. **Life Sciences**, v. 78, n. 5, p. 431–441, 2005.
- BANERJEE, M.; SAXENA, M. Interleukin-1 (IL-1) family of cytokines: Role in Type 2 Diabetes. **Clinica Chimica Acta**, v. 413, n. 15–16, p. 1163–1170, 2012.
- BARBOSA, K. B. F.; COSTA, N. M. B.; DE CÁSSIA GONÇALVES ALFENAS, R.; DE PAULA, S. O.; MINIM, V. P. R.; BRESSAN, J. Estresse oxidativo: Conceito, implicações e fatores modulatórios. **Revista de Nutrição**, v. 23, n. 4, p. 629–643, 2010.
- BERNE, R. M.; LEVY, M. N.; KOEPPEN, B. M.; STANTON, B. A. **Fisiologia**. 5^a ed. Rio

de Janeiro: Elsevier, 2004.

BHUTANI, S. P.; CHIBBER, S. S.; SESHADRI, T. R. Flavonoids of the fruits and leaves of *Tribulus terrestris*: Constitution of tribuloside. **Phytochemistry**, v. 8, n. 1, p. 299–303, 1969.

BLAIR, M. Diabetes Mellitus Review. **Urologic Nursing**, v. 36, n. 1, p. 27, 2016.

BRASIL. V Diretrizes Brasileiras de Hipertensão Arterial. **Arquivos brasileiros de cardiologia**, p. 1–48, 2007.

BROZOVICH, F. V.; NICHOLSON, C. J.; DEGEN, C. V.; GAO, Y. Z.; AGGARWAL, M.; MORGAN, K. G. Mechanisms of vascular smooth muscle contraction and the basis for pharmacologic treatment of smooth muscle disorders. **Pharmacological Reviews**, v. 68, n. 2, p. 476–532, 2016.

CARVALHO, M. H. C.; NIGRO, D.; LEMOS, V. S.; TOSTES, R. de C. A.; FORTES, Z. B. Hipertensão arterial: o endotélio e suas múltiplas funções. **Revista Brasileira de Hipertensão**, v. 8, n. 1, p. 76–88, 2001.

CASANOVA, L. M.; COSTA, S. S. Synergistic interactions in natural products: therapeutic potential and challenges. **Revista Virtual de Química**, v. 9, n. 2, p. 575–595, 2017.

CHAVES, O. S.; TELES, Y. C. F.; MONTEIRO, M. M. D. O.; MENDES JUNIOR, L. D. G.; AGRA, M. de F.; BRAGA, V. de A.; SILVA, T. M. S.; SOUZA, M. D. F. V. de. Alkaloids and phenolic compounds from *Sida rhombifolia* L. (Malvaceae) and vasorelaxant activity of two indoquinoline alkaloids. **Molecules**, v. 22, n. 1, 2017.

CHEN, H.; LI, S.; WANG, P.; YAN, S.; HU, L.; PAN, X.; YANG, C.; LEUNG, G. P. Endothelium-dependent and -independent relaxation of rat aorta induced by extract of *Schizophyllum commune*. **Phytomedicine**, v. 21, n. 11, p. 1230–1236, 2014.

CHIBA, Y.; MISAWA, M. The role of RhoA-mediated Ca²⁺ sensitization of bronchial smooth muscle contraction in airway hyperresponsiveness. *Journal of Smooth Muscle Research*, v.40, n. 4-5, p. 155-67, 2004.

CHINESE PHARMACOPOEIA COMMISSION. **Pharmacopoeia of the People's Republic of China**. Beijing: 10th, 2015.

COMBARIEU, E.; FUZZATI, N.; LOVATI, M.; MERCALLI, E. Furostanol saponins from *Tribulus terrestris*. **Fitoterapia**, v. 74, n. 6, p. 583–591, 2003.

DAKSHAYINI, P.; BASHA, P. M. *Tribulus terrestris* fruit extract improves antioxidant defense in female reproductive tract: A comprehensive study in diabetic rats. **Journal of Innovations in Pharmaceutical and Biological Sciences**, v. 5, n. 2, p. 101–107, 2018.

DE, P.; VEAU, D.; BEDOS-BELVAL, F.; CHASSAING, S.; BALTAS, M. Cinnamic derivatives in tuberculosis. In: **Understanding Tuberculosis - New Approaches to Fighting Against Drug Resistance**. France: InTech, 2012. p. 337–359.

DEEPAK, M.; DIPANKAR, G.; PRASHANTH, D.; ASHA, M.; AMIT, A.; VENKATARAMAN, B. Tribulosin and beta-sitosterol-D-glucoside, the anthelmintic principles of *Tribulus terrestris*. **Phytomedicine**, v. 9, n. 8, p. 753–756, 2002.

DEVASAGAYAM, T. P. A.; TILAK, J. C.; BOLOOR, K. K.; SANE, K. S.; GHASKADBI, S. S.; LELE, R. D. Free Radicals and Antioxidants in Human Health: Current Status and

- Future Prospects. **The Journal of the Association of Physicians of India**, v. 52, p. 794–804, out. 2004.
- DINCHEV, D.; JANDA, B.; EVSTATIEVA, L.; OLESZEK, W.; ASLANI, M. R.; KOSTOVA, I. Distribution of steroidal saponins in *Tribulus terrestris* from different geographical regions. **Phytochemistry**, v. 69, n. 1, p. 176–186, 2008.
- EL-SHAIBANY, A.; AL-HABORI, M.; AL-TAHAMI, B.; AL-MASSARANI, S. Anti-hyperglycaemic activity of *Tribulus terrestris* L. aerial part extract in glucose-loaded normal rabbits. **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, v. 14, n. 12, p. 2263–2268, 2015.
- EL-SHEIKH, T. M. Y.; AL-FIFI, Z. I. A.; ALABBOUD, M. A. Larvicidal and repellent effect of some *Tribulus terrestris* L., (Zygophyllaceae) extracts against the dengue fever mosquito, *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). **Journal of Saudi Chemical Society**, v. 20, n. 1, p. 13–19, 2016.
- EMRAN, M. Y.; EL-SAFTY, S. A.; SHENASHEN, M. A.; MINOWA, T. A well-thought-out sensory protocol for screening of oxygen reactive species released from cancer cells. **Sensors and Actuators, B: Chemical**, v. 284, n. 2018, p. 456–467, 2019.
- ERNAWATI, T.; RADJI, M.; HANAFI, M.; MUN'IM, A.; YANUAR, A. Cinnamic acid derivatives as α -glucosidase inhibitor agents. **Indonesian Journal of Chemistry**, v. 17, n. 1, p. 151–160, 2017.
- FABRICANT, D. S.; FARNSWORTH, N. R. The value of plants used in traditional medicine for drug discovery. **Environmental Health Perspectives**, v. 109, n. 1, p. 69–75, 2001.
- GANZERA, M.; BEDIR, E.; KHAN, I. A. Determination of steroidal saponins in *Tribulus terrestris* by reversed-phase high-performance liquid chromatography and evaporative light scattering detection. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 90, n. 11, p. 1752–1758, 2001.
- GAUTHAMAN, K.; GANESAN, A. P. The hormonal effects of *Tribulus terrestris* and its role in the management of male erectile dysfunction - an evaluation using primates, rabbit and rat. **Phytomedicine**, v. 15, n. 1–2, p. 44–54, 2008.
- GUYTON, A. C.; HALL, J. E. **Tratado de Fisiologia Médica**. 12^a ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2011.
- GUZMAN, J. D. Natural cinnamic acids, synthetic derivatives and hybrids with antimicrobial activity. **Molecules**, v. 19, p. 19292–19349, 2014.
- HALLIWELL, B. Free radicals and antioxidants: Updating a personal view. **Nutrition Reviews**, v. 70, n. 5, p. 257–265, 2012.
- HAMMODA, H. M.; GHAZY, N. M.; HARRAZ, F. M.; RADWAN, M. M.; ELISOHLI, M. A.; ABDALLAH, I. I. Chemical constituents from *Tribulus terrestris* and screening of their antioxidant activity. **Phytochemistry**, v. 92, p. 153, 2013.
- HATHAWAY, D. R.; MARCH, K. L.; LASH, J. A.; ADAM, L. P.; WILENSKY, R. L. Vascular smooth muscle: A review of the molecular basis of contractility. **Circulation**, v. 83, n. 2, p. 382–390, 1991.
- HEMALATHA, S.; HARI, R. Fertility enhancing effect of saponin rich butanol extracts of *Tribulus terrestris* fruits in male albino rats. **International Journal of Pharmaceutical and Clinical Research**, v. 7, n. 1, p. 36–43, 2015.

- HERDER, C.; DALMAS, E.; BÖNI-SCHNETZLER, M.; DONATH, M. Y. The IL-1 pathway in type 2 diabetes and cardiovascular complications. **Trends in Endocrinology & Metabolism**, v. 26, n. 10, p. 551–563, 2015.
- HONG, S. S.; CHOI, Y.-H.; JEONG, W.; KWON, J. G.; KIM, J. K.; SEO, C.; AHN, E.-K.; LEE, H. H.; KO, H.-J.; SEO, D.-W.; OH, J. S. Two new furostanol glycosides from the fruits of *Tribulus terrestris*. **Tetrahedron Letters**, v. 54, n. 30, p. 3967–3970, 2013.
- IBRAHIM, S. R. M.; MOHAMED, G. A.; ALSHALI, K. Z.; HAIDARI, R. A. A.; EL-KHOLY, A. A.; ZAYED, M. F. Lipoxygenase inhibitors flavonoids from *Cyperus rotundus* aerial parts. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 28, n. 3, p. 320–324, 2018.
- INDIAN PHARMACOPOEIA. **Indian Pharmacopoeia Commission**. New Delhi: Seventh Edition, 2014.
- JIANG, Y.-H.; GUO, J.-H.; WU, S.; YANG, C.-H. Vascular protective effects of aqueous extracts of *Tribulus terrestris* on hypertensive endothelial injury. **Chinese Journal of Natural Medicines**, v. 15, n. 8, p. 606–614, 2017.
- JUNIO, H. A.; SY-CORDERO, A. A.; ETTEFAGH, K. A.; BURNS, J. T.; MICKO, K. T.; GRAF, T. N.; RICHTER, S. J.; CANNON, R. E.; OBERLIES, N. H.; CECH, N. B. Synergy Directed Fractionation of Botanical Medicines: A Case Study with Goldenseal (*Hydrastis canadensis*). **Journal of Natural Products**, v. 74, n. 7, p. 1621–1629, 2011.
- KAMENOV, Z.; FILEVA, S.; KALINOV, K.; JANNINI, E. A. Evaluation of the efficacy and safety of *Tribulus terrestris* in male sexual dysfunction-A prospective, randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trial. **Maturitas**, v. 99, p. 20–26, 2017.
- KANG, L.-P.; WU, K.-L.; YU, H.-S.; PANG, X.; LIU, J.; HAN, L.-F.; ZHANG, J.; ZHAO, Y.; XIONG, C.-Q.; SONG, X.-B.; LIU, C.; CONG, Y.-W.; MA, B.-P. Steroidal saponins from *Tribulus terrestris*. **Phytochemistry**, v. 107, p. 182–189, 2014.
- KANG, S. Y.; JUNG, H. W.; NAM, J. H.; KIM, W. K.; KANG, J.-S.; KIM, Y.-H.; CHO, C.-W.; CHO, C. W.; PARK, Y.-K.; BAE, H. S. Effects of the fruit extract of *Tribulus terrestris* on skin inflammation in mice with oxazolone-induced atopic dermatitis through regulation of calcium channels, Orai-1 and TRPV3, and mast cell activation. **Evidence-based Complementary & Alternative Medicine (eCAM)**, p. 1–13, 2017.
- KHALEGHI, S.; BAKHTIARI, M.; ASADMOBINI, A.; ESMAEILI, F. *Tribulus terrestris* extract improves human sperm parameters *in vitro*. **Journal of evidence-based complementary & alternative medicine**, p. 1–6, 2016.
- KHAN, S.; KHAN, T.; SHAH, A. J. Total phenolic and flavonoid contents and antihypertensive effect of the crude extract and fractions of *Calamintha vulgaris*. **Phytomedicine**, v. 47, n. 2017, p. 174–183, 2018.
- KHATRI, S.; CHHILLAR, A. Evaluation of in vitro free radical scavenging activity of *Tribulus terrestris*. **International Journal of Basic and Applied Biology**, v. 2, n. 6, p. 444–448, 2015.
- KOHLMANN-JÚNIOR, O. Diretrizes Brasileiras De Hipertensão VI| Capítulo 6. **Jornal Brasileiro de Nefrologia**, v. 32, n. 1, p. 29–43, 2010.
- KUHN, H.; BANTHIYA, S.; VAN LEYEN, K. Mammalian lipoxygenases and their biological relevance. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of**

Lipids, v. 1851, n. 4, p. 308–330, 2015.

LANNOY, M.; SLOVE, S.; JACOB, M. P. The function of elastic fibers in the arteries: Beyond elasticity. **Pathologie Biologie**, v. 62, n. 2, p. 79–83, 2014.

LAPEYRE, C.; BEDOS-BELVAL, F.; DURAN, H.; NEGRE-SALVAYRE, A.; BALTAS, M. Design, synthesis, and evaluation of pharmacological properties of cinnamic derivatives as antiatherogenic agents. **Jornal of Medicinal Chemistry**, v. 48, n. 26, p. 8115–8124, 2005.

LEE, H. H.; AHN, E. K.; HONG, S. S.; OH, J. S. Anti-inflammatory effect of Tribulusamide D isolated from *Tribulus terrestris* in lipopolysaccharide-stimulated RAW264.7 macrophages. **Molecular Medicine Reports**, v. 16, n. 4, p. 4421–4428, 2017.

LI, J.; BAI, Y.; ZHANG, P.; HE, J.; CAO, J.; AN, M.; HU, L.-M.; GAO, X.-M.; CHANG, Y.-X. Simultaneous determination of 5 flavonoids and 7 saponins for quality control of traditional chinese medicine preparation xinnaoshutong capsule using HPLC-VWD-ELSD. **Journal of Analytical Methods in Chemistry**, p. 1–8, 2017.

LIMA, F. O.; BEZERRA, A. S. Flavonoides e radicais livres. **Disciplinarum Scientia. Série: Ciências Naturais e Tecnológicas**, v. 13, n. 1, p. 111–124, 2012.

LOKHANDE, K.; KULKARNI, C.; SHINKAR, M.; JADHAV, S. Evaluation of antioxidant potential of Indian wild leafy vegetable *Tribulus terrestris*. **International Journal of advances in pharmacy, biology and chemistry**, v. 3, n. 3, p. 703–708, 2014.

LU, Y.; LI, J. L.; JIANG, Q.; HOU, L. L.; WANG, L. L.; PANG, S. G.; GUAN, Q. B. Effect of *Scrophularia ningpoensis* extract on diabetes in rats. **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, v. 16, n. 6, p. 1331–1335, 2017.

MARTINO-ANDRADE, A. J.; SPERCOSKI, K. M.; GOLIN, M.; VECHI, M. F.; DALSENTER, P. R.; MORAIS, R. N.; LOMBARDI, N. F.; GRECA, C. S.; ROSSI, S. C. Effects of *Tribulus terrestris* on endocrine sensitive organs in male and female Wistar rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 127, n. 1, p. 165–170, 2010.

MIAO, J.; LI, X.; ZHAO, C.; GAO, X.; WANG, Y.; GAO, W. Active compounds, antioxidant activity and α -glucosidase inhibitory activity of different varieties of *Chaenomeles* fruits. **Food Chemistry**, v. 248, p. 330–339, 2018.

MIGUEL, M. da G.; DOUGHMI, O.; AAZZA, S.; ANTUNES, D.; LYOUSSI, B. Antioxidant, anti-inflammatory and acetylcholinesterase inhibitory activities of propolis from different regions of Morocco. **Food Science and Biotechnology**, v. 23, n. 1, p. 313–322, 2014.

MIN, J.; MENG-XIA, X.; DONG, Z.; YUAN, L.; XIAO-YU, L.; XING, C. Spectroscopic studies on the interaction of cinnamic acid and its hydroxyl derivatives with human serum albumin. **Journal of Molecular Structure**, v. 692, p. 71–80, 2004.

MISHRA, R.; RANA, M.; BISHT, S. S. Biochemical Analysis and Antioxidant Activity of Methanolic Leaf Extracts of *Paederia foetida* and *Tribulus terrestris*. **Journal of Chemical Engineering and Chemistry Research**, v. 3, n. 11, p. 1091–1095, 2016.

MITRA, N.; MOHAMMAD-MEHDI, D.; MOHAMMAD REZA, Z. *Tribulus terrestris* L. (Zygophyllaceae) Flavonoid Compounds. **International Journal of Modern Botany**, v. 2, n. 3, p. 35–39, 2012.

- MOHAMMED, M. S.; KHALID, H. S.; OSMAN, W. J. A.; MUDDATHIR, A. K. A Review on phytochemical profile and biological activities of three anti-inflammatory plants used in sudanese folkloric medicine. **American Journal of Pharmtech Research**, v. 4, n. 4, p. 1–14, 2014.
- MOLYNEUX, P. The use of the stable free radical diphenylpicryl-hydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. **Journal of Science and Technology**, v. 26, n. 2, p. 211–219, 2004.
- NEBIERIDZE, V.; SKHIRTLDADZE, A.; KEMERTELIDZE, E.; GANZERA, M. New flavonoid glycosides from the leaves of *Tribulus terrestris*. **Natural Product Communications**, v. 12, n. 7, p. 1057–1060, 2017.
- NEMANDO, R.; BOATWRIGHT, J. S.; MAGEE, A. R. Systematics of the genus *Tribulus* (Zygophyllaceae) in southern Africa. **South African Journal of Botany**, v. 109, p. 359, 2017.
- NEYCHEV, V.; MITEV, V. Pro-sexual and androgen enhancing effects of *Tribulus terrestris* L.: Fact or Fiction. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 179, p. 345–355, 2016.
- NUNES, M. G. S.; BERNARDINO, A.; MARTINS, R. D. Use of medicinal plants by people with hypertension. **Revista da Rede de Enfermagem do Nordeste**, v. 16, n. 6, p. 775–781, 2015.
- OLIVEIRA, C. J. de; ARAÚJO, T. L. de. Plantas medicinais: usos e crenças de idosos portadores de hipertensão arterial. **Revista Eletrônica de Enfermagem**, v. 9, n. 1, p. 93–105, 2007.
- PACANOSKI, Z.; TYR, S.; VERES, T. Puncturevine (*Tribulus terrestris* L.): noxious weed or powerful medical herb. **Journal of Central European Agriculture**, v. 15, n. 1, p. 11–23, 2014.
- PHILLIPS, O. A.; MATHEW, K. T.; ORIOWO, M. A. Antihypertensive and vasodilator effects of methanolic and aqueous extracts of *Tribulus terrestris* in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 104, n. 3, p. 351–355, 2006.
- PRIETO, M. P. P.; AGUILAR, M. Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: specific application to the determination of vitamin E. **Analytical Biochemistry**, v. 269, p. 337–341, 1999.
- RADOVANOVIC, C. A. T.; SANTOS, L. A. dos; CARVALHO, M. D. de B.; MARCON, S. S. Arterial Hypertension and other risk factors associated with cardiovascular diseases among adults. **Revista Latino-Americana de Enfermagem**, v. 22, n. 4, p. 547–553, 2014.
- RAHATI, S.; SHAHRAKI, M.; ARJOMAND, G.; SHAHRAKI, T. Food Pattern, Lifestyle and Diabetes Mellitus. **International Journal of High Risk Behaviors and Addiction**, v. 3, n. 1, p. 1–5, 2014.
- RAJENDRABHAI, V. Detection of Phytochemical and Pharmacological Properties of Crude Extracts of *Tribulus terrestris* Collected from Tribal Regions of Baglan (MS), India. **International Journal of Pharmacognosy and Phytochemical Research**, v. 9, n. 4, p. 508–511, 2017.
- RAMU, R.; SHIRAHATTI, P. S.; ZAMEER, F.; NAGENDRA PRASAD, M. N. Investigation of antihyperglycaemic activity of banana (*Musa* sp. var. Nanjangud rasa bale)

- pseudostem in normal and diabetic rats. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 95, n. 1, p. 165–173, 2015.
- RE, R.; PELLEGRINI, N.; PROTEGGENETE, 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.
- RIBEIRO, S. M. R.; QUEIROZ, J. H. de; PELÚZO, M. do C. G.; COSTA, N. M. B.; MATTA, S. L. P. da; QUEIROZ, M. E. L. R. de. A formação e os efeitos das espécies reativas de oxigênio no meio biológico. **Bioscience Journal**, v. 21, n. 3, p. 133–149, 2005.
- ROGERSON, S.; RICHES, C. J.; JENNINGS, C.; WEATHERBY, R. P.; MEIR, R. A.; MARSHALL-GRANDISNIK, S. M. The effect of five weeks of *Tribulus terrestris* supplementation on muscle strength and body composition during preseason training in elite rugby league players. v. 21, n. 2, p. 348–353, 2007.
- ROZANTSEV, E. G.; LOSHADKIN, D. V. The history and modern problems of free radical chemistry. 100 years of free radical chemistry. **Designed Monomers and Polymers**, v. 4, n. 4, p. 281–300, 2001.
- SAHU, R. K.; KAR, M.; ROUTHAY, R. DPPH free radical scavenging activity of some leafy vegetables used by tribhals of Odisha, India. **Journal of Medicinal Plants Studies**, v. 1, n. 4, p. 21–27, 2013.
- SAMANI, N. B.; JOKAR, A.; SOVEID, M.; HEYDARI, M.; MOSAVAT, S. H. Efficacy of *Tribulus terrestris* extract on the serum glucose and lipids of women with diabetes mellitus. **Iranian Journal of Medical Sciences**, v. 41, n. 3, p. 1–5, 2016.
- SÁNCHEZ-MORENO, C. Methods used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological systems. **Food Science and Technology International**, v. 8, n. 3, p. 121–137, 2002.
- SAVINEAU, J. P.; MARTHAN, R. Modulation of the calcium sensitivity of the smooth muscle contractile apparatus: Molecular mechanisms, pharmacological and pathophysiological implications. **Fundamental and Clinical Pharmacology**, v. 11, n. 4, p. 289–299, 1997.
- SEIDELMANN, S. B.; LIGHTHOUSE, J. K.; GREIF, D. M. Development and pathologies of the arterial wall. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 71, n. 11, p. 1977–1999, 2014.
- SHARIFI, A. M.; DARABI, R.; AKBARLOO, N. Study of antihypertensive mechanism of *Tribulus terrestris* in 2K1C hypertensive rats: Role of tissue ACE activity. **Life Sciences**, v. 73, n. 23, p. 2963–2971, 2003.
- SILVA, A. H. S.; SILVA, M. V. R. da; OLIVEIRA, S. L. de; TAVARES, J. F.; RIBEIRO, L. A. de A.; LIMA, J. T. de. Avaliação da atividade relaxante do extrato etanólico bruto obtido de *Erythroxylum caatingae*, *Erythroxylum subrotundum* e *Erythroxylum revolutum* (Erythroxylaceae) em traquéia isolada de cobaia. **Evolvare Scientia**, v. 1, n. 1, p. 119–133, 2013.
- SILVA, A. A. da; GONÇALVES, R. C. Espécies reativas do oxigênio e as doenças respiratórias em grandes animais. **Ciência Rural**, v. 40, n. 4, p. 994–1002, 2010.
- SKHIRTLDADZE, A.; NEBIERIDZE, V.; BENIDZE, M.; KEMERTELIDZE, E.; GANZERA, M. Furostanol Glycosides from the Roots of *Tribulus terrestris* L. **Bulletin of the Georgian**

National Academy of Sciences, v. 11, n. 1, p. 122–126, 2017.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA. 7ª Diretriz Brasileira de Hipertensão Arterial. **Arquivos brasileiros de cardiologia**, v. 107, n. 3, p. 1–83, 2016.

SOMLYO, A. P.; SOMLYO, A. V. Ca²⁺ Sensitivity of Smooth Muscle and Nonmuscle Myosin II: Modulated by G Proteins, Kinases, and Myosin Phosphatase. **Physiological Reviews**, v. 83, n. 4, p. 1325–1358, 2003.

SOMLYO, A. P.; SOMLYO, A. V. Vascular smooth muscle. **Pharmacological Reviews**, v. 20, n. 4, p. 197–272, 1968.

SOMLYO, A. V.; BOND, M.; SOMLYO, A. P.; SCARPAT, A. Inositol trisphosphate-induced calcium release and contraction in vascular smooth muscle. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 82, p. 5231–5235, 1985.

SONG, Y. H.; KIM, D. W.; CURTIS-LONG, M. J.; PARK, C.; SON, M.; KIM, J. Y.; YUK, H. J.; LEE, K. W.; PARK, K. H. Cinnamic acid amides from *Tribulus terrestris* displaying uncompetitive α -glucosidase inhibition. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 114, p. 201–208, 2016.

SONG, Y. H.; KIM, D. W.; CURTIS-LONG, M. J.; YUK, H. J.; WANG, Y.; ZHUANG, N.; LEE, K. H.; JEON, K. S.; PARK, K. H. Papain-Like Protease (PLpro) Inhibitory Effects of Cinnamic Amides from *Tribulus terrestris* Fruits. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 37, n. 6, p. 1021–1028, 2014.

SOUSA, C. M. D. M.; SILVA, H. R. E.; VIEIRA, G. M.; AYRES, M. C. C.; DA COSTA, C. L. S.; ARAÚJO, D. S.; CAVALCANTE, L. C. D.; BARROS, E. D. S.; ARAÚJO, P. B. D. M.; BRANDÃO, M. S.; CHAVES, M. H. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 351–355, 2007.

SOVA, M. Antioxidant and antimicrobial activities of cinnamic acid derivatives. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 12, p. 749–767, 2012.

TAKAO, K.; TODA, K.; SAITO, T.; SUGITA, Y. Synthesis of amide and ester derivatives of cinnamic acid and its analogs: Evaluation of their free radical scavenging and monoamine oxidase and cholinesterase inhibitory activities. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 65, n. 11, p. 1020–1027, 2017.

TAWATA, S.; TAIRA, S.; KOBAMOTO, N.; ZHU, J.; ISHIHARA, M.; TOYAMA, S. Synthesis and antifungal activity of cinnamic acid esters. **Bioscience Biotechnology Biochemistry**, v. 60, n. 5, p. 909–910, 1996.

TOM, E. N. L.; GIRARD, C.; DIMO, T.; MBAFOR, J. T.; BERTHELOT, A.; DEMOUGEOT, C. Vasorelaxant effects of extracts of the stem bark of *Terminalia superba* Engler & Diels (Combretaceae). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 127, n. 2, p. 335–340, 2010.

TUNCER, M. A.; YAYMACI, B.; SATI, L.; CAYLI, S.; ACAR, G.; ALTUG, T.; DEMIR, R. Influence of *Tribulus terrestris* extract on lipid profile and endothelial structure in developing atherosclerotic lesions in the aorta of rabbits on a high-cholesterol diet. **Acta Histochemica**, v. 111, n. 6, p. 488–500, 2009.

URREA-VICTORIA, V.; PIRES, J.; TORRES, P. B.; SANTOS, D. Y. A. C. dos; CHOW, F. Ensaio antioxidante em microplaca do poder de redução do ferro (FRAP) para extratos de

algas. **Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo**, p. 1–6, 2016.

WAGNER, H. Synergy research: Approaching a new generation of phytopharmaceuticals. **Fitoterapia**, v. 82, n. 1, p. 34–37, 2011.

WANG, Y.; XIANG, L.; YI, X.; HE, X. Potential anti-inflammatory steroidal saponins from the berries of *Solanum nigrum* L. (European Black Nightshade). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 65, n. 21, p. 4262–4272, 2017.

WHITLOCK, M. C.; HUNDLEY, W. G. Noninvasive imaging of flow and vascular function in disease of the aorta. **JACC: Cardiovascular Imaging**, v. 8, n. 9, p. 1094–1106, 2015.

WIESNER, J.; MITSCH, A.; WISSNER, P.; KRAMER, O.; JOMAA, H.; SCHLITZER, M. Structure - Activity relationships of novel anti-malarial agents. Part 4: N-(3-Benzoyl-4-tolylacetylaminophenyl)-3-(5-aryl-2-furyl) acrylic acid amides. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 12, p. 2681–2683, 2002.

WONG, D.; TSAI, P. N. W.; IP, K. Y.; IRWIN, M. G. New antihypertensive medications and clinical implications. **Best Practice and Research: Clinical Anaesthesiology**, v. 32, p. 223–235, 2018.

WU, T. S.; SHI, L. S.; KUO, S. C. Alkaloids and other constituents from *Tribulus terrestris*. **Phytochemistry**, v. 50, n. 8, p. 1411–1415, 1999.

YEKTA, M. M.; ALAVI, S. H. R.; HADJIAGHAEI, R.; YOUSEF, A. Flavonoid glycosides from *Tribulus terrestris* L. orientalis. **Iranian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 4, n. 3, p. 231–236, 2008.

ZAHRA, K. Protective Effects of *Tribulus terrestris* Hydroalcoholic Extract Against Cisplatin-Induced Germ Cell Apoptosis in Male Mice. **International Journal of Morphology**, v. 36, n. 1, p. 140–145, 2018.

ZHANG, H.; WANG, G.; BETA, T.; DONG, J. Inhibitory properties of aqueous ethanol extracts of propolis on alpha-glucosidase. **Evidence-based Complementary & Alternative Medicine**, p. 1–7, 2015.

ZHANG, S.; LI, H.; YANG, S. J. Tribulosin protects rat hearts from ischemia/reperfusion injury. **Acta Pharmacologica Sinica**, v. 31, n. 6, p. 671–678, 2010.

ZHELEVA-DIMITROVA, D.; OBRESHKOVA, D.; NEDIALKOV, P. Antioxidant activity of *Tribulus terrestris*-a natural product in infertility therapy. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 4, n. 4, p. 508–511, 2012.

ZHU, W.; DU, Y.; MENG, H.; DONG, Y.; LI, L. A review of traditional pharmacological uses, phytochemistry, and pharmacological activities of *Tribulus terrestris*. **Chemistry Central Journal**, v. 11, n. 60, p. 1–16, 2017.

SECOND PART - ARTICLES

ARTICLE 1 - ANTIOXIDANT, LIPOXYGENASE, AND α -GLUCOSIDASE INHIBITORY ACTIVITIES OF *Tribulus terrestris* FRUIT

ABSTRACT

Tribulus terrestris fruit has been used as a traditional and popular medicine for prevention and treatment of several diseases including sexual dysfunctions, atherosclerosis, and hypertension. Previous reports pointed out that the extracts contain saponins, alkaloids, phenolic compounds, flavonoids, and tannins. The aim of this research was to evaluate phenolic compounds, antioxidant, lipoxygenase, and α -glucosidase inhibitory activities of *T. terrestris* crude ethanolic extract and its fractions. The quantification of total phenols was performed using Folin-Ciocalteu reagent. The capacity of samples for scavenging free radicals, chelating metal ions, reducing power, inhibiting lipoxygenase, and α -glucosidase activities was investigated. The total antioxidant activity was estimated using phosphomolybdenum method. The HPLC-DAD was used for the analysis of profiles. The dichloromethane fraction was the more complex chemical profile. The ethyl acetate and butanolic fractions revealed the best effect for extracting phenolic compounds and flavonoids from *T. terrestris* than the hexanic and methanol/water soluble fraction. On the other hand, the hexanic fraction showed the best metal chelating power and lipoxygenase inhibitory activity. Concerning antioxidant activity, the ethyl acetate fraction presented better capacity for scavenging DPPH, ABTS and hydroxyl radical, reductive power, total antioxidant capacity (TAC), and α -glucosidase inhibitory activity than others extract and fractions. These results correlated closely with the levels of phenolic compounds and flavonoids. Thus, the *in vitro* antioxidant, lipoxygenase, and α -glucosidase inhibitory activities of the *T. terrestris* was confirmed.

Keywords: Zygophyllaceae. Herbal extracts. Total phenolic contents. HPLC fingerprints.

1 INTRODUCTION

Tribulus terrestris L. (abrolos) (Zygophyllaceae) is native to India and it is already found in various regions around the world as it fits very well into warm regions (KHAIRWAL; KUMAR, 2013; GHANBARI et al., 2016). Fruits have been used in traditional medicine in China and India (Ayurveda) for hundreds of years in the treatment of infertility, impotence, erectile dysfunction, and low libido. In western countries such as Brazil, the use of this species began around the 1970's. However, in recent years, *T. terrestris* has aroused an even greater interest among athletes and physical exercise practitioners. This was largely due to their tonic, and aphrodisiac actions, plus a possible increase in levels of male sex hormones such as testosterone (DAKSHAYINI; BASHA, 2018).

The effects of *Tribulus terrestris* on health are associated with the presence of biologically active compounds such as phenolic compounds (DWIVEDI; SENGAR, 2018), flavonoids (BHUTANI; CHIBBER; SESHADRI, 1969), saponins (GANZERA; BEDIR; KHAN, 2001), alkaloids (WU; SHI; KUO, 1999), tannins, and others. However, steroidal saponins and flavonoids are considered to be the most important metabolites with various bioactivities. Protodioscin is the most abundant saponin (DAS; VASUDEVA; SHARMA, 2017).

Several studies demonstrated that phenolics and flavonoids compounds have antioxidant properties, which can decrease the incidence of oxidative stress promoted by free radicals. They can cause oxidative damage that is a major part in the development of many chronic and degenerative illnesses as inflammation, age-related disorders, cancer, atherosclerosis, neurodegenerative diseases as Alzheimer's, and Parkinson's diseases. Besides that, oxidative damage in pancreas islet tissues would cause diabetes. Consumption of antioxidants, through diet and supplements, is expected to remove free radicals from the living system and provide health benefits (SARMA; MALLICK; GHOSH, 2010; ALTEMIMI et al., 2017; EGNELL et al., 2017).

The search for new alternatives for inflammation treatment and diabetes mellitus control, such as the use of medicinal plants, has been the subject of many studies. Natural products can inhibit the α -glucosidase and lipoxygenase enzyme. Thus, natural compounds can be used to the development of new antidiabetic and anti-inflammatory drugs. *Tribulus terrestris* have been reported as enzyme inhibitors and with antioxidant properties. However, there is little information in literature (ZHANG et al., 2015; CHUKWUJEKWU et al., 2016; MIAO et al., 2018).

Therefore, the aim of this study was to quantify total phenols, flavonoids, and to evaluate the antioxidant, lipoxygenase, and α -glucosidase inhibitory activities of the fruit of *Tribulus terrestris* in preparations using solvents with different polarities.

2 MATERIAL AND METHODS

2.1 Chemicals and equipments

The chemicals used in this study were ethanol 92° INPM; hexane; dichloromethane; ethyl acetate; *n*-butanolic; methanol; Folin-Ciocalteu's solution; sodium carbonate (Na₂CO₃); gallic acid (C₇H₆O₅); aluminum chloride (AlCl₃); quercetin; 2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl

(DPPH); 2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid (ABTS); potassium persulfate ($K_2S_2O_8$); ascorbic acid ($C_6H_8O_6$); sulfuric acid (H_2SO_4); monosodium phosphate (NaH_2PO_4); disodium phosphate (Na_2HPO_4); ammonium molybdate ($(NH_4)_6Mo_7O_{24}$); butylated hydroxytoluene (BHT); ferrous sulfate ($FeSO_4$); ferrozine ($C_{20}H_{13}N_4NaO_6S_2$); ethylene diamine tetraacetic acid (EDTA); potassium ferri-cyanide ($K_3Fe(CN)_6$); trichloroacetic acid (TCA); ferric chloride ($FeCl_3$); 2-deoxyribose; thiobarbituric acid (TBA); hydrogen peroxide (H_2O_2), salicylic acid ($C_7H_6O_3$), α -glucosidase of *Bacillus stearothermophilus* EC 232-604-7, *p*-nitrophenyl- β -D-glucopyranoside (PNPG), potassium phosphate monobasic (KH_2PO_4), potassium phosphate dibasic (K_2HPO_4), lipoxygenase from *Glycine max* (soybean) EC 232-853-1, linoleic acid, boric acid, sodium hydroxide (NaOH), tween 80, eugenol, acarbose, and protodioscin. The chemicals were purchased from Sigma Aldrich. Except for the lipoxygenase inhibition assay, the microplate reader TECAN Infinity M200 PRO operated by I-control software version 3.37 was used to measure absorbances.

2.2 Extract and fractions preparation

Dried fruits of *Tribulus terrestris* L. were purchased from the Pharmaceutical Industry Catedral, Vespasiano, Minas Gerais, Brazil. The extracts and fractions were prepared according to Oliveira et al. (2015). In this work, it used the crude ethanolic extract and hexanic (Hex), dichloromethane (DCM), ethyl acetate (EtOAc), *n*-butanolic (BuOH) and methanol/water soluble (AQSol) fractions.

2.3 Determination of total phenolic content (TPC)

The total phenolic content (TPC) of *Tribulus terrestris* extract and fractions were determined applying Folin-Ciocalteu's colourimetric assay as described by Singleton and Rossi-Jr. (1965) with modifications. Twenty microliters of sample were added to 100 μ L solution of Folin-Ciocalteu (10%) and 125 μ L of Na_2CO_3 solution (7%). Absorbance measurements were read at 760 nm on a microplate reader, after 120 min of incubation time at room temperature ($24 \pm 2^\circ C$). The results were expressed as milligram of gallic acid equivalents (GAE) per gram of crude extract (mg GAE/g). The analyzes were performed in triplicate.

2.4 Flavonoids content

The quantification of flavonoids was determined by the method of Chang et al. (2002) with modifications. Briefly, to 100 μ L of *Tribulus terrestris* extract or fraction was added 100 μ L

of 10% AlCl₃-ethanol solution. After 40 min at room temperature (24 ± 2°C), the absorbance was measured at 420 nm on a microplate reader. The results were expressed as milligram of quercetin equivalents (QE) per gram of crude extract (mg QE/g). The analyzes were performed in triplicate.

2.5 DPPH (2,2-diphenyl-2-picrylhydrazyl) radical scavenging assay

The scavenging activity of DPPH (2,2-diphenyl-2-picrylhydrazyl) was determined by the method proposed by Brand-Williams, Cuvelier, and Berset (1995) with modifications. Fifty microliters of different concentrations of *Tribulus terrestris* extract and fractions (0.625-20 mg/mL) were added to solution of DPPH (250µL). The absorbance measurements were read at 517 nm, after 60 min of incubation time at room temperature (24 ± 2°C). (A₁) Absorption of a blank sample containing the same amount of ethanol and DPPH solution acted as the negative control (A₀). The percentage inhibition $[(A_0 - A_1/A_0) \times 100]$ was plotted against sample or standard content and IC₅₀ was determined (concentration of extract and fractions able to scavenger 50% of DPPH free radical). The analyzes were performed in triplicate.

2.6 Capacity for scavenging 2,2-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS)

ABTS radical cation decolorization assay was carried out using the method described by Re et al. (1999) with modifications. The ABTS radical was prepared by reaction of the ABTS aqueous solution (7mM) with K₂S₂O₈ (2.45mM). This solution remained in the dark for 16 h at room temperature (24 ± 2°C). *Tribulus terrestris* extract or fractions (30µL) were added to 270µL of ABTS solution and the absorbance at 734 nm was read after 6 min on a microplate reader. Several extract concentrations were prepared and the percentage inhibition that was calculated from the formula: $[(A_0 - A_1/A_0) * 100]$ was plotted against the extract concentration, and IC₅₀ values were determined (concentration of extract able to scavenger 50% of the ABTS free radical). A₀ is the absorbance of a negative control (blank sample containing the same amount of solvent and ABTS solution) and A₁ is the absorbance of the sample. Butylated hydroxytoluene (BHT) was used as a positive control. The analyzes were performed in triplicate.

2.7 Hydroxyl radical scavenging assay

The effect of *Tribulus terrestris* extract or fraction on hydroxyl radicals was determined by using the deoxyribose method as Kunchandy and Rao (1990) with modifications. The

reaction mixture contained 1375 μ L of sodium phosphate buffer (0.1 M; pH 7.4), 200 μ L of 2-deoxyribose (10 mM), 200 μ L of FeSO₄ + EDTA (10 mM), 200 μ L of H₂O₂ (10 mM), and 25 μ L of different concentration of *Tribulus terrestris* extract or fractions (0.625-20 mg/mL). The reaction was started by the addition of H₂O₂, and incubated at 37°C for 4 h followed by the addition of 1 mL of TCA (2.8%), and 1 mL of TBA (1%). The resulting solution was boiled in a water bath for 10 minutes, and then cooled to room temperature (24 \pm 2°C). The absorbance was measured at 532 nm on a microplate reader. The analyzes were performed in triplicate.

2.8 Total antioxidant capacity (TAC)

The total antioxidant capacity (TAC) was determined as described by Prieto and Aguilar (1999) with modifications. The method of reduction of ammonium molybdate was measured with 20 μ L of *Tribulus terrestris* extract and fractions, and they were mixed with 1500 μ L of the reagent solution (0.6 M sulfuric acid, 28 mM monosodium phosphate, and 4mM ammonium molybdate) during 90 minutes at 95°C. The absorbance was measured at 695nm. The results were expressed in milligram of ascorbic acid equivalent per gram of crude extract (AAE mg/g). The analyzes were performed in triplicate.

2.9 Chelating Metal Ions

The capacity of chelating of metal ions by *Tribulus terrestris* extract and fractions were evaluated by the method described by Wang, Lien, and Yu (2004) with modifications. An aliquot of 50 μ L of samples were incubated with 40 μ L of FeSO₄ (2 mM) and 80 μ L of ferrozine (5mM) during 10 minutes. The absorbance was measured at 572 nm. EDTA was used as positive control. The percentage of chelating ability was determined according to the following formula: $(A_0 - A_1) / A_0 * 100$, in which A₀ is the absorbance of the control, and A₁ the absorbance of *T. terrestris* extract or fractions. The analyzes were performed in triplicate.

2.10 Reductive Potential

The reductive potential of the samples was determined according to the method of Oyaizu (1986) with small modifications and described by Aazza, Lyoussi, and Miguel (2011). Fifty microliters of different concentrations of *Tribulus terrestris* extract or fraction were mixed with 500 μ L of phosphate buffer (200mM, pH 6.0), and 500 μ L of potassium ferricyanide [K₃Fe(CN)₆] (1%). The mixture was incubated at 50 °C for 20 minutes. An aliquot of 500 μ L of trichloroacetic acid (10%) was added to the mixture, which was then centrifuged for 10

minutes at 3.000 rpm. The upper layer of solution (500 μ L) was mixed with 500 μ L of distilled water and 100 μ L of FeCl₃ (0.1%). The absorbance was measured at 700 nm. The analyzes were performed in triplicate.

2.11 Capacity to inhibit lipoxygenase

The capacity of *Tribulus terrestris* to inhibit lipoxygenase was determined according to the method of Frum and Viljoen (2006), with small modifications. It was evaluated by reaction of 10 μ L of lipoxygenase solution (0.054 g in 1 mL of 0.005% borate buffer, Tween 80 0.1 M, pH 9) to 450 μ L of borate buffer, 10 μ L of samples, and 25 μ L of linoleic acid (0.001 M). Eugenol was used as standard. The absorbance was taken at 234 nm every 20s for 5 min on a Spectrophotometer (U-5100 HITACHI). The percentage inhibition of the enzyme was calculated, and the IC₅₀ values were compared. The analyzes were performed in triplicate.

2.12 Inhibition of α -glucosidase activity

α -Glucosidase inhibition was based on El-Guendouz et al. (2016), with some modifications. Initially, a mixture of 25 μ L of *Tribulus terrestris* extract or fractions, 50 μ L of α -glucosidase, and 200 μ L of phosphate buffer (100mM, pH 6.8) was incubated at room temperature for 10 min. After pre-incubation, 150 μ L of p-nitrophenyl- β -D-glucopyranoside (PNPG) (0.5 mM) solution in phosphate buffer was added to each well. The reaction mixtures were incubated at 37 °C for 20 minutes, and then of sodium carbonate solution (0.4 mM) was added to stop the reaction. The control had 25 μ L of 92% ethanol or methanol instead of test samples. Acarbose was used as a standard. The absorbance was measured at 405 nm on a microplate reader. The inhibition percentage of the enzyme was calculated, and the IC₅₀ values were compared. The analyses were performed in triplicates.

2.13 HPLC fingerprints

HPLC-DAD profiles were performed in HPLC Agilent 1200 series (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany) equipped with a quaternary pump (G1311A) with degasser system (G1322A), ALS autosampler (G1322A) and TCC heater assembly (G1316A). A variable-wavelength ultraviolet detector (G1315D) was used to obtain chromatograms at 210 nm. The equipment was controlled by the OpenLAB software version A07.04, build 04.07.28. For sample preparation, an aliquot of 10 mg of CE, 5 mg of HEX, DCM, EtOAc, BuOH, AQSol fractions, and 1mg of protodioscin were dissolved with 1.0 mL MeOH, at room temperature, in

an ultrasound bath for 20min. After centrifugation at 8400 rpm for 10 min, the supernatant (10 μ L) were automatically injected onto the HPLC system. Separations were performed on a reversed-phase analytical column C18 (Eclipse XDB-C18, Agilent Technologies, USA) with a silica-based packing (5 μ m \times 150 mm \times 4.6 mm I.D.). A Security Guard Cartridge (Zorbax ODS 4-Pack, Agilent Technologies, USA) was used as pre-column (5 μ m \times 12.5 mm \times 4.6 mm I.D.) at a temperature of 40°C. Water (A) and acetonitrile (B) were used as eluents, both containing 0.01% (v/v) of phosphoric acid, using a linear gradient at a flow rate of 1.0 mL/min as follow: 0 min 95% A, 5% B; 60 min 5% A, 95% B, followed by 5 min isocratic elution and then returned to initial conditions in 5min.

2.14 Statistical analysis

The results were expressed as the means \pm SD. The evaluation of statistical significance of observed differences was performed by analysis of variance (ANOVA). The differences between means were determined using Tukey's multiple comparison test, and the statistical significance was set at $p < 0.05$. Principal component analysis (PCA) was used to identify the relationships between extract and fractions of *Tribulus terrestris* and phenol contents, antioxidant and enzyme inhibitory activities. All experiments were performed in triplicates and using R software 3.5.2 (Vienna, Austria).

3 RESULTS AND DISCUSSION

3.1. Total phenolic content (TPC)

The total phenolic content (TPC) of extract and fractions measured by the Folin-Ciocalteu method was shown in Table 1. There were significant differences ($p < 0.05$) between the total content of phenolic compounds in the extract and fractions. As shown in Table 1, the ethyl acetate (45.44 ± 0.00 mg GAE/g of dry extract) and butanolic fraction (31.88 ± 0.15 mg GAE/g of dry extract) were the highest. The hexanic (8.01 ± 0.43 mg GAE/g of dry extract) and methanol/water soluble fraction (9.82 ± 0.15 mg GAE/g of dry extract) were the lowest total phenolic content.

Similar results were obtained by Borran et al. (2017) with crude ethanolic extract of *Tribulus terrestris* fruits from Iran. The dried powder was extracted with ethanol: water (70:30) using the maceration method and they quantified 52.9 ± 2.3 mg GAE/g of dry extract for total

Table 1 - Phenol contents, antioxidant and enzyme inhibitory activities of *Tribulus terrestris* fruit.

Extract/Fraction	Total phenols mg GAE/g of dry extract*	Flavonoids mg QE/g of dry extract ⁺	DPPH ¹	ABTS ¹	Hydroxyl radical scavenging activity ¹	TAC mg AAE/g of dry extract ^o	Chelating metal ions ¹	Inhibition of lipoxygenase ¹	Inhibition of α - glucosidase ¹
EtOH	17.04±0.14 ^c	16.09±0.47 ^c	0.57±0.03 ^c	0.11±0.02 ^c	0.25±0.13 ^a	61.46 ±1.06 ^{bc}	-	0.119 ± 0.001 ^b	-
Hex	8.01±0.43 ^e	6.70±0.81 ^d	10.73±0.18 ^d	1.02±0.003 ^d	-	44.10±2.62 ^c	1.81±1.02 ^b	0.083 ± 0.013 ^c	-
DCM	16.28±0.40 ^c	15.01±0.68 ^c	0.59±0.01 ^a	0.15±0.02 ^c	-	77.78±5.72 ^{bc}	-	0.106 ± 0.013 ^{bc}	-
EtOAc	45.44±0.00 ^a	25.82±0.69 ^b	0.08±0.00 ^b	0.04±0.01 ^b	0.017±0.003 ^b	120.78±13.53 ^a	-	0.130 ± 0.011 ^b	0.044±0.0012 ^a
BuOH	31.88±0.15 ^b	29.18±0.00 ^a	0.48±0.03 ^a	0.12±0.01 ^c	-	80.16±2.71 ^{ab}	-	0.199 ± 0.012 ^a	0.966±0.25 ^b
AQSol	9.82±0.15 ^d	7.75±0.35 ^d	-	0.72±0.01 ^a	-	72.70±0.87 ^{bc}	-	-	-
EDTA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	0.033±0.001 ^a	NA	NA

¹The values are presented as IC₅₀=mg/mL, The values are presented as concentration (mg/g, dry extract). *For phenol content as gallic acid equivalent (GAE); ⁺For flavonoid as quercetin equivalent (QE); ^oFor total antioxidant capacity as ascorbic acid equivalent (AAE); -: without activity or very poor activity. The same letter are not significant different (p < 0.05) by Tukey's test; NA = not available; EtOH: Ethanolic crude extract; HEX: Hexanic fraction; DCM: Dichloromethane fraction; EtOAc: Ethyl acetate fraction; BuOH: Butanolic fraction; AQSol: Methanol/water soluble fraction; DPPH: 2,2-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical; ABTS: 2,2-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) radical; TAC: Total antioxidant capacity.

phenolic contents. So, the abundant phenolic compounds in *T. terrestris* indicates that this herb is beneficial to health.

3.2 Total flavonoids content (TFC)

Total amounts of flavonoids content (TFC) (TABLE 1) ranged from 6.70 ± 0.81 mg QE/g of dry extract of hexanic fraction to 29.18 ± 0.00 mg QE/g of dry extract of butanolic fraction. Based on figure 1A, it is possible to observe that the PCA was efficient in reducing the dimensionality of the original data in a smaller number of variables. There was retention of more than 75% of the original variation in the first two components. Therefore, by an initial set of 8 variables, most of the variance could be explained with only two principal components. So, according to figure 1B, the total content of phenolic compounds and flavonoids of ethyl acetate fraction are positively correlated. The values of phenols and flavonoids in the crude ethanolic extract and fractions were within the range found for other samples of *Tribulus terrestris* from Bulgaria (ZHELEVA-DIMITROVA; OBRESHKOVA; NEDIALKOV, 2012) and India (MISHRA; RANA; BISHT, 2016; RAJENDRABHAI, 2017; DWIVEDI; SENGAR, 2018). The flavonoids of *T. terrestris* are mainly derivatives of heterosides of quercetin, kaempferol, and isorhamnetin (ZHU et al., 2017).

3.3 Antioxidant activity

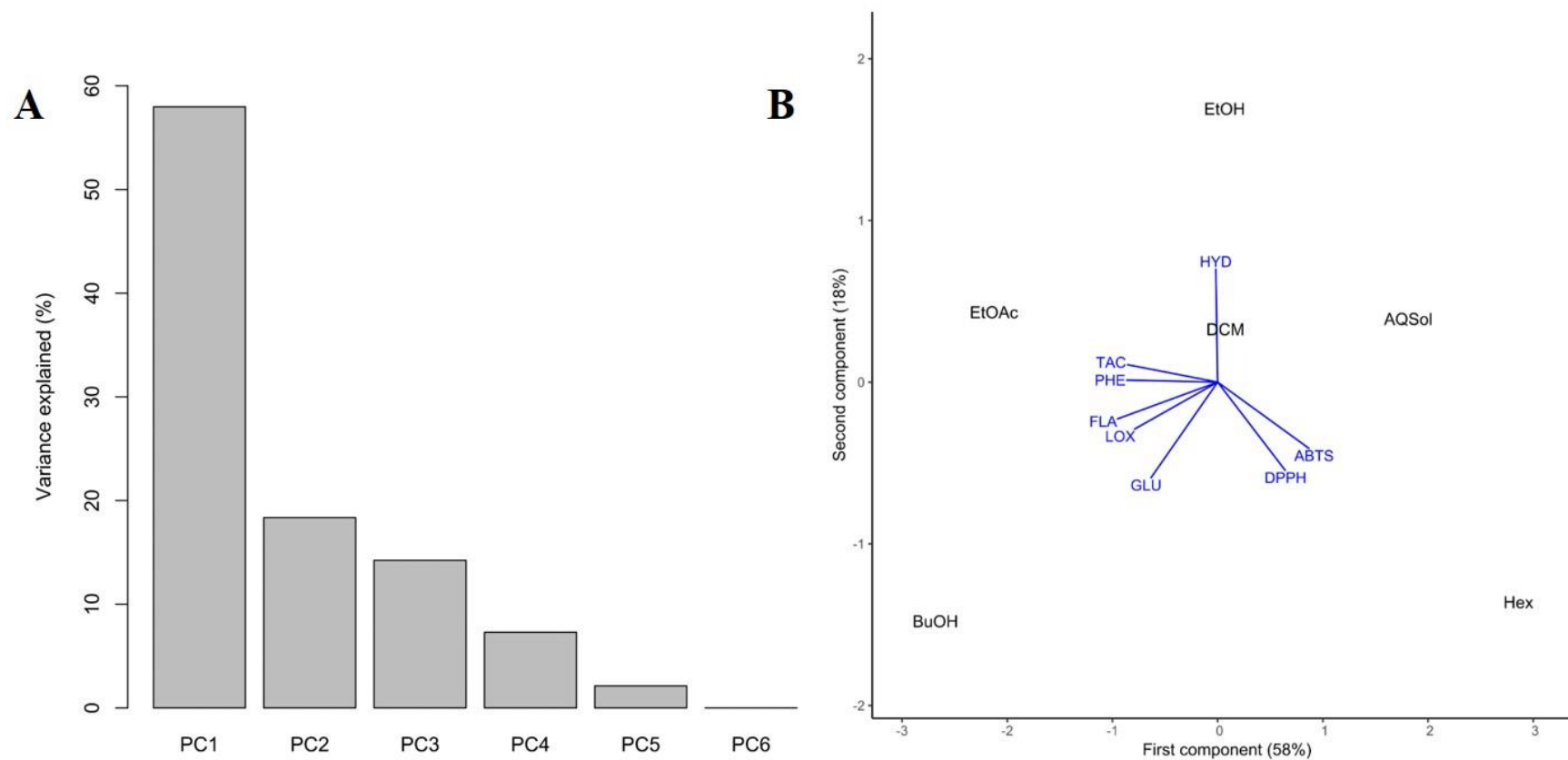
The antioxidant activities of *Tribulus terrestris* fruit were measured using different assays: the capacity for scavenging free radicals (DPPH, ABTS, and hydroxyl), the capacity for chelating metal ions, the capacity of samples for reducing Fe (III) to Fe (II), in the test known as reductive potential, and the total antioxidant capacity.

3.3.1 DPPH (2,2-Diphenyl-2-picryl-hydrazyl) radical scavenging assay

The 2,2-diphenyl-2-picryl-hydrazyl (DPPH) assay is one of the most well established methods for determining antioxidant activity of natural products. It accepts an electron or hydrogen radical to become a stable molecule. Antioxidant on interaction with DPPH, either transfers electron or hydrogen atom to DPPH or neutralizes its free radical character (CHOI; EOM; KIM, 2016).

The capacity for scavenging free radicals was evaluated in 6 extract/fractions obtained from different solvents. The IC_{50} values for all of these samples are shown in Table 1. The best antioxidant activity was obtained in ethyl acetate fraction ($IC_{50}=0.08 \pm 0.00$ mg/mL). The worst antioxidant activity was found in hexanic fraction ($IC_{50}=10.73 \pm 0.18$ mg/mL) (TABLE 1). The

Figura 1- Principal component analysis based on data of response of extract and fractions of *Tribulus terrestris* and phenol contents, antioxidant and enzyme inhibitory activities



Legend: A: Scree plot of explained variance of each principal component. The x-axis represents each of the principal components (PC) and the y-axis represents the percentage of variance explained by each of these components; B: Scatterplot of extract and fractions of *T. terrestris* and measured parameters on the plane defined by the two first components of principal component analysis; EtOH = Ethanolic crude extract; Hex = Hexanic fraction; DCM = Dichloromethane fraction; EtOAc = Ethyl acetate fraction; BuOH = Butanolic fraction; AQSol = Methanol/water soluble fraction; PHE = Phenols content; FLA = Flavonoids content; DPPH = DPPH free radicals; ABTS = ABTS radical scavenging; HYD = Hydroxyl radical scavenging activity; TAC = Total Antioxidant Capacity; LOX = lipoxygenase inhibitory activity; GLU = α -glucosidase inhibitory activity.

capacity for scavenging DPPH radical appears to be better in fruits than in fresh leaves from India as studied by Khatri and Chhillar (2015).

3.3.2 ABTS (2,2-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)) radical scavenging assay

According to table 1, the best capacity for scavenging ABTS free radicals was obtained in ethyl acetate fraction ($IC_{50} = 0.04 \pm 0.01$ mg/mL). The sample with the best capacity was too the most effective for scavenging DPPH free radicals. So, there is a positive correlation between ABTS and DPPH radical (FIGURE 1A). Besides that, the radical scavenging activity increased with the increase of phenolic compound content. The capacity for scavenging ABTS free radicals by fruit from China was superior to samples from Bulgaria (ZHELEVA-DIMITROVA; OBRESHKOVA; NEDIALKOV, 2012).

3.3.3 Hydroxyl radical scavenging assay

Hydroxyl radical is one of the potent reactive oxygen species in the biological system that reacts with polyunsaturated fatty acid moieties of cell membrane phospholipids and causes many degenerative diseases, cancer, and aging (ALAM; BRISTI; RAFIQUZZAMAN, 2013; ASIKIN et al., 2016). In the hydroxyl radical scavenging assay, hydroxyl radicals are generated by the Fenton reaction and the inhibition of deoxyribose degradation could be attributed to the inhibition of radicals (SANNIGRAHI et al., 2010).

The results for ethanolic extract and ethyl acetate fraction were $IC_{50}=0.25\pm 0.13$ mg/mL and $IC_{50}=0.017\pm 0.003$ mg/mL, respectively. The hydroxyl radical scavenging assay of *T. terrestris* can be attributed to its flavonoidal content. Flavonoids act as scavengers of various oxidizing species, super oxide anion ($O_2^{\bullet-}$), hydroxyl radical or peroxy radicals, they also act as quenchers of singlet oxygen (KESHTMAND et al., 2015).

So, the results presented in this study are in agreement with the fact that the total phenolics and flavonoid contents are major contributors to the antioxidant activity of *Tribulus terrestris*, which is in accordance with the literature (HAMMODA et al., 2013; LOKHANDE et al., 2014).

3.3.4 Total antioxidant capacity (TAC)

Total antioxidant activity determination by phosphomolybdenum method is a quantitative method as antioxidant activity is expressed in terms of number of equivalents of

ascorbic acid per gram of dry extract. The total antioxidant capacity (TAC) of extract and fractions of *Tribulus terrestris* was expressed in Table 1. There were significant differences ($p < 0.05$) between the total antioxidant capacity of the crude ethanolic extract and fractions. Ethyl acetate (120.78 ± 13.53 mg AAE/g of dry extract) and butanolic fraction (80.16 ± 2.71 mg AAE/g of dry extract) were the highest TAC. On the other hand, the hexanic (44.10 ± 2.62 mg AAE/g of dry extract) fraction was the lowest total antioxidant capacity. The results showed that ethyl acetate and butanolic fractions of fruit of *T. terrestris* are a rich source of polyphenols which led to the conclusion that phenolics compounds exhibit high antioxidant activity. As reported by Mishra et al. (2016), the methanolic leaves extracts of *T. terrestris* also presents strong total antioxidant activity. On the other hand, the values are smaller than those of the fruit.

According to principal component analysis (PCA), there is a positive correlation between the total phenolic compounds, flavonoids, and total antioxidant capacity (FIGURE 1B).

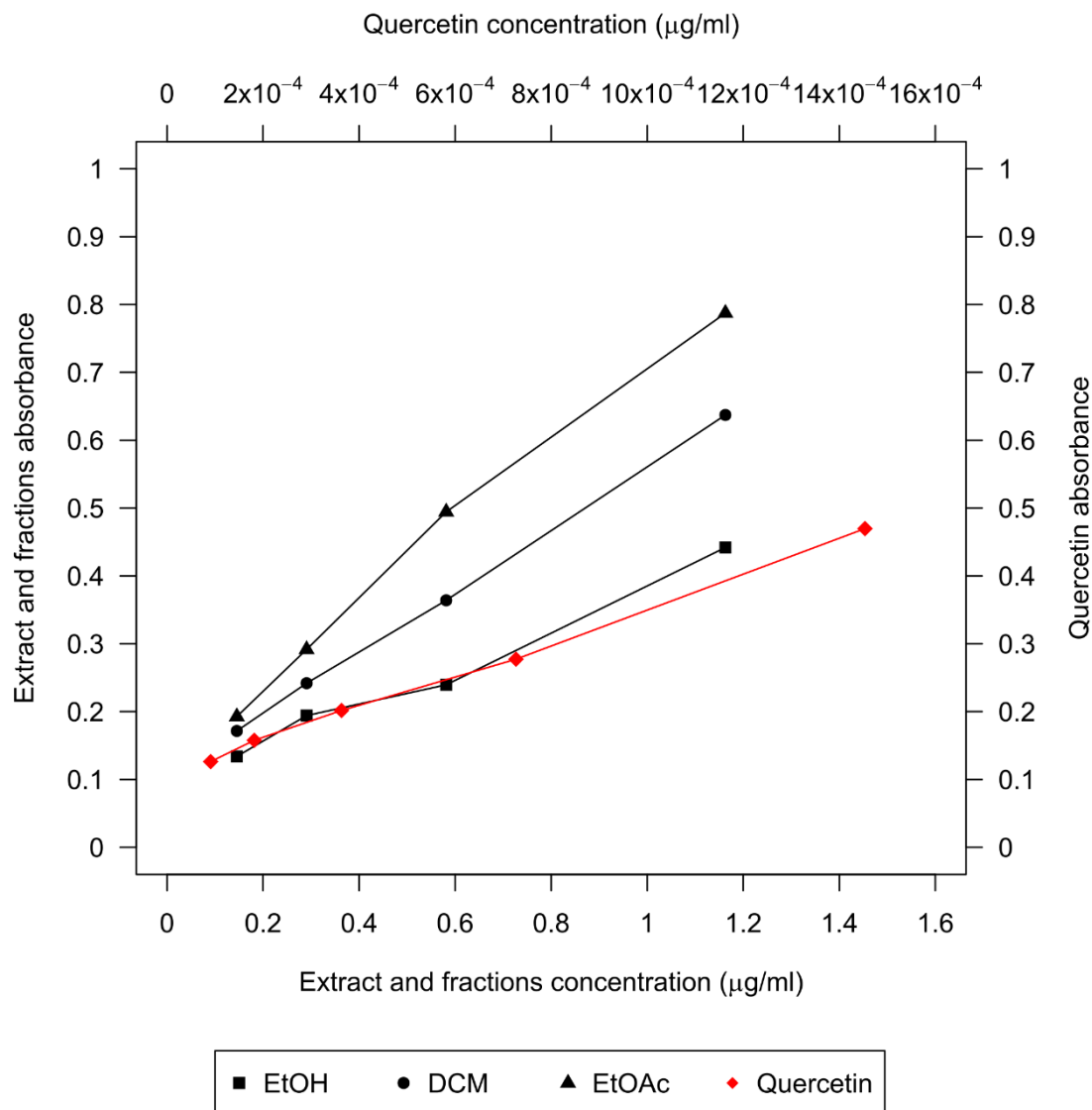
3.3.5 Chelating Metal Ions

The capacity for chelating metal ions is a method, usually, used because such metals can catalyze free radical reaction and stimulate lipid peroxidation. In this study, hexanic fraction had the highest metal chelating activity (TABLE 1). According to Markovska et al. (2013), besides being radical scavengers, flavonoids are also able to function as chelators for metals. However, in this study, other secondary metabolites must also be involved in metal chelating activity.

3.3.6 Reductive Potential

Reducing power of extract and fractions were also checked, and differences were observed. The results were showed in Figure 2. In this study, only ethanolic extract, ethyl acetate, and dichloromethane fraction presented the capacity for reducing power. The ethyl acetate fraction of *Tribulus terrestris* presented the high absorbance and concentration. So, this is the best reducing power and a significant indicator of their potential antioxidant activity. This result can be related to the total content of phenolic.

Figura 2 - Reductive potential of extract and fractions of *Tribulus terrestris* fruit at 700 nm.



Legend: EtOH: Ethanolic crude extract; DCM: Dichloromethane fraction; EtOAc: Ethyl acetate fraction; Standard quercetin.

3.4 Capacity to inhibit lipoxygenase

The species *Tribulus terrestris* presented the ability to inhibit lipoxygenase. The best anti-inflammatory activity corresponding to the lowest IC_{50} value were obtained for hexanic fraction ($\text{IC}_{50} = 0.083 \pm 0.013 \text{ mg/mL}$) and the worst anti-inflammatory activity was found in butanolic fraction ($\text{IC}_{50} = 0.199 \pm 0.012 \text{ mg/mL}$) (Table 1). The metanol/water soluble fraction did not inhibit the enzyme. Thus, the inhibition of lipoxygenase increase with decreasing polarity of preparations.

In this study, it was used lipoxygenase from *Glycine max* (soybean). Soy lipoxygenase exhibits structural homology to human lipoxygenase. However, in plants, lipoxygenase metabolises linoleic and linolenic acid and, in animals, lipoxygenase metabolises arachidonic acid (GARDNER, 1995). All of lipoxygenases contain a single non-heme iron per molecule of enzyme. Although iron is intimately involved in the dioxygenation reaction of polyunsaturated fatty acids, yielding hydroperoxides (NELSON; SEITZ, 1994).

The hexanic fraction presented the best capacity for chelating metal ions too. So, this result is correlating with the ability to inhibit lipoxygenase due to the presence of iron at lipoxygenase structure.

This plant present promising action as lipoxygenase inhibitor and it can be considered as an anti-inflammatory agent and a potential new drug for combating inflammation. Others authors confirm the anti-inflammatory activity (KANG et al., 2017; LEE et al., 2017).

3.5 Inhibition of the α -glucosidase activity

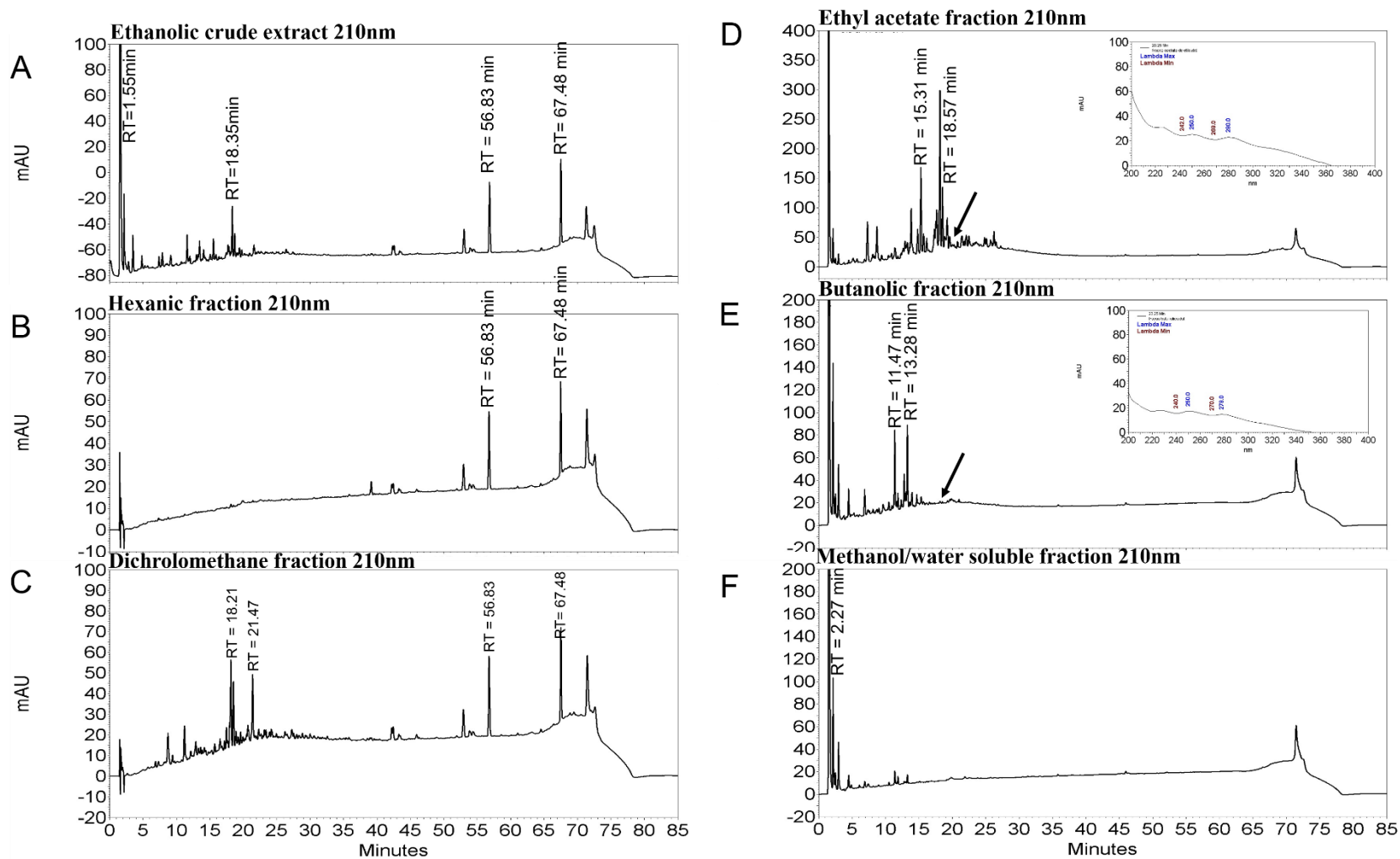
The inhibition of the α -glucosidase activity of *Tribulus terrestris* seems to be particularly associated with the presence of phenolic compounds and flavonoids. As can be seen from results of Table 1, the IC₅₀ value for ethyl acetate fraction was 0.044 ± 0.0012 mg/mL and 0.966 ± 0.25 mg/mL for buthanolic fraction. Similar studies of India (LAMBA et al., 2011), Turkey (ERCAN; EL, 2016) and Korea (SONG et al., 2016) have been reported *T. terrestris* α -glucosidase inhibitory activity. This species present promising action as α -glucosidase inhibitors and have a beneficial effect on diabetes mellitus control.

3.6 HPLC fingerprints

The liquid-liquid fractionation process of the crude ethanolic extract yielded five chemically different fractions. The HPLC fingerprints allowed to distinguish the chemical profile of the ethanolic crude extract and fractions (FIGURE 3). The dichloromethane fraction was the more complex chemical profile. However this fraction presented a similar chemical profile like the ethanolic crude extract.

The hexanic fraction that showed the highest activity for inhibition of lipoxygenase showed two major peaks with retention times in 56.83 and 67.48 min. This is characteristic of low polarity compounds. Anti-inflammatory activity can be attributed to saponins.

Figura 3 - HPLC Fingerprint of extract and fractions of *Tribulus terrestris* fruit at 210nm



The saponins of *Tribulus terrestris* are glucopyranosyl, galactopyrans, ruscogin, hecogenin, gitogenin, titogenin, protodioscin, prototribestin, diosgenin, yamogenin, dioscin, tribestin, and tribulosin (DINCHEV et al., 2008; HEMALATHA; HARI, 2013). However, Lee et al. (2017) demonstrated that the tribulusamide D exerts anti-inflammatory activity by altering the expression of inflammatory mediators and cytokines. So tribulusamide D could be developed as a potential therapeutic agent for the treatment of inflammatory disorders.

The ethyl acetate and butanolic fractions, responsible for the higher antioxidant and inhibitory activities of α -glycosidase, presented a complex profile in the region of high polarity compounds (0-20 min). According with Asadmobini et al. (2017), Das, Vasudeva and Sharma (2017), Keshtmand (2018), protodioscin is the most abundant saponin, and consider a chemical marker of *Tribulus terrestris*. In order to investigate, the presence of protodioscin in the fractions of greater polarity, the retention time of HPLC fingerprints registered at 210 nm for the ethyl acetate and butanolic fractions were compared with those individually and co-injection of reference protodioscin (Sigma-Aldrich, Brazil). Protodioscin was detected in the fractions and characterized by low-intensity peaks at 20.25 min.

4 CONCLUSIONS

Among all *Tribulus terrestris* preparations, the ethyl acetate fraction showed the highest free radical scavenging activity in all the tested models comparing to ethanolic extract and others fractions. The highest scavenging activities, reducing power, total antioxidant capacity, and the inhibition of α -glucosidase of the ethyl acetate fraction can be ascribed to its phenolic compounds and flavonoids. The capacity for scavenging DPPH, ABTS, and hydroxyl radicals represents the fraction direct radical scavenging activity. The hexanic fraction showed the best metal chelating power and lipoxygenase inhibitory activity. The inhibition of lipoxygenase increase with decreasing polarity of solvents. Thus, the *in vitro* antioxidant, lipoxygenase, and α -glucosidase inhibitory activities of *T. terrestris* was confirmed.

Acknowledgments

This research is dedicated to Prof. PhD Raimundo Vicente de Sousa. The authors would like to thank to FAPEMIG, CAPES, and CNPq for the financial support to develop this research.

Conflicts of Interest

The authors declare no conflict of interest.

REFERENCES

- AAZZA, S.; LYOUSSI, B.; MIGUEL, M. G. Antioxidant and antiacetylcholinesterase activities of some commercial essential oils and their major compounds. **Molecules**, v. 16, n. 9, p. 7672–7690, 2011.
- ALAM, M. N.; BRISTI, N. J.; RAFIQUZZAMAN, M. Review on *in vivo* and *in vitro* methods evaluation of antioxidant activity. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 21, n. 2, p. 143–152, 2013.
- ALTEMIMI, A.; LAKHSSASSI, N.; BAHARLOUEI, A.; WATSON, D.; LIGHTFOOT, D. Phytochemicals: Extraction, isolation, and identification of bioactive compounds from plant extracts. **Plants**, v. 6, n. 4, p. 42, 2017.
- ASADMOBINI, A.; BAKHTIARI, M.; KHALEGHI, S.; ESMAEILI, F.; MOSTAFAEI, A. The effect of *Tribulus terrestris* extract on motility and viability of human sperms after cryopreservation. **Cryobiology**, v. 75, p. 154–159, 2017.
- ASIKIN, Y.; TAKAHASHI, M.; MIZU, M.; TAKARA, K.; OKU, H.; WADA, K. DNA damage protection against free radicals of two antioxidant neolignan glucosides from sugarcane molasses. **Journal of Science Food and Agriculture**, v. 96, p. 1209–1215, 2016.
- BHUTANI, S. P.; CHIBBER, S. S.; SESHADRI, T. R. Flavonoids of the fruits and leaves of *Tribulus terrestris*: Constitution of tribuloside. **Phytochemistry**, v. 8, n. 1, p. 299–303, 1969.
- BORRAN, M.; MINAIYAN, M.; ZOLFAGHARI, B.; MAHZOUNI, P. Protective effect of *Tribulus terrestris* fruit extract on cerulein-induced acute pancreatitis in mice. **Avicenna Journal of Phytomedicine**, v. 7, n. 3, p. 250–260, 2017.
- BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **LWT - Food Science and Technology**, v. 28, n. 1, p. 25–30, 1995.
- BURDA, N. Y.; DABABNEH, M. F.; KLIVNIAK, B. M.; ZHURAVEL, I. A.; ROZHKOVSKEY, Y. V. The element composition study of thick extract from *Tribulus terrestris* L. Herb. **Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences**, v. 7, n. 6, p. 2200–2202, 2016.
- CHANG, C.-C.; YANG, M.-H.; WEN, H.-M.; JIING-CHUAN CHERN. Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colometric methods. **Journal of Food and Drug Analysis**, v. 10, n. 3, p. 178–182, 2002.
- CHOI, C.-I.; EOM, H. J.; KIM, K. H. Antioxidant and α -glucosidase inhibitory phenolic constituents of *Lactuca indica* L. **Russian Journal of Bioorganic Chemistry**, v. 42, n. 3, p. 310–315, 2016.

CHUKWUJEKWU, J. C.; RENGASAMY, K. R. R.; DE KOCK, C. A.; SMITH, P. J.; SLAVĚTÍNSKÁ, L. P.; VAN STADEN, J. Alpha-glucosidase inhibitory and antiplasmodial properties of terpenoids from the leaves of *Buddleja saligna* Willd. **Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry**, v. 31, n. 1, p. 63–66, 2016.

DAKSHAYINI, P.; BASHA, P. M. *Tribulus terrestris* fruit extract improves antioxidant defense in female reproductive tract: A comprehensive study in diabetic rats. **Journal of Innovations in Pharmaceutical and Biological Sciences**, v. 5, n. 2, p. 101–107, 2018.

DAS, S.; VASUDEVA, N.; SHARMA, S. Pharmacognostical evaluation of *Tribulus terrestris* L. **International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research**, v. 8, n. 3, p. 1393–1400, 2017.

DINCHEV, D.; JANDA, B.; EVSTATIEVA, L.; OLESZEK, W.; ASLANI, M. R.; KOSTOVA, I. Distribution of steroidal saponins in *Tribulus terrestris* from different geographical regions. **Phytochemistry**, v. 69, n. 1, p. 176–186, 2008.

DWIVEDI, D.; SENGAR, N. Investigation of phytochemical constituents from *Tribulus terrestris* roots, leaves and fruits. **Journal of Chemistry and Chemical Sciences**, v. 8, n. 1, p. 55–58, 2018.

EGNELL, M.; FASSIER, P.; LÉCUYER, L.; GONZALEZ, R.; ZELEK, L.; VASSON, M. P.; HERCBERG, S.; LATINO-MARTEL, P.; GALAN, P.; DRUESNE-PECOLLO, N.; DESCHASAUX, M.; TOUVIER, M. Antioxidant intake from diet and supplements and risk of digestive cancers in middle-aged adults: results from the prospective NutriNet-Santé cohort. **British Journal of Nutrition**, v. 118, n. 2017, p. 541–549, 2017.

EL-GUENDOUIZ, S.; AAZZA, S.; LYOUSSI, B.; ANTUNES, M. D.; FALEIRO, M. L.; MIGUEL, M. G. Anti-acetylcholinesterase, antidiabetic, anti-inflammatory, antityrosinase and antixanthine oxidase activities of Moroccan propolis. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 51, n. 8, p. 1762–1773, 2016.

ERCAN, P.; EL, S. N. Inhibitory effects of chickpea and *Tribulus terrestris* on lipase, α -amylase and α -glucosidase. **Food Chemistry**, v. 205, p. 163–169, 2016.

FRUM, Y.; VILJOEN, A. M. In vitro 5-lipoxygenase and anti-oxidant activities of South African medicinal plants commonly used topically for skin diseases. **Skin Pharmacology and Physiology**, v. 19, n. 6, p. 329–335, 2006.

GANZERA, M.; BEDIR, E.; KHAN, I. A. Determination of steroidal saponins in *Tribulus terrestris* by reversed-phase high-performance liquid chromatography and evaporative light scattering detection. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 90, n. 11, p. 1752–1758, 2001.

GARDNER, H. W. Biological roles and biochemistry of the lipoxygenase pathway. **Hortscience**, v. 30, n. 2, p. 197–205, 1995.

GHANBARI, A.; MORADI, M.; RAOOFI, A.; FALAHI, M.; SEYDI, S. *Tribulus terrestris* hydroalcoholic extract administration effects on reproductive parameters and serum level of glucose in diabetic male rats. **International Journal of Morphology**, v. 34, n. 2, p. 796–803,

2016.

HAMMODA, H. M.; GHAZY, N. M.; HARRAZ, F. M.; RADWAN, M. M.; ELSOHLI, M. A.; ABDALLAH, I. I. Chemical constituents from *Tribulus terrestris* and screening of their antioxidant activity. **Phytochemistry**, v. 92, p. 153, 2013.

HEMALATHA, S.; HARI, R. Comparative antioxidant activities of crude ethanolic and saponin rich butanol extracts of *Tribulus terrestris* fruits. **International Journal of Pharma and Bio Sciences**, v. 4, n. 4, p. 784–793, 2013.

KANG, S. Y.; JUNG, H. W.; NAM, J. H.; KIM, W. K.; KANG, J.-S.; KIM, Y.-H.; CHO, C.-W.; CHO, C. W.; PARK, Y.-K.; BAE, H. S. Effects of the fruit extract of *Tribulus terrestris* on skin inflammation in mice with oxazolone-induced atopic dermatitis through regulation of calcium channels, Orai-1 and TRPV3, and mast cell activation. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2017, 2017.

KESHTMAND, Z. Protective effects of *Tribulus terrestris* hydroalcoholic extract against cisplatin-induced germ cell apoptosis in male mice. **International Journal of Morphology**, v. 36, n. 1, p. 140–144, 2018.

KESHTMAND, Z.; GHANBARI, A.; KHAZAEI, M.; RABZIA, A. Protective effect of *Tribulus terrestris* hydroalcoholic extract against cisplatin-induced apoptosis on testis in mice. **International Journal of Morphology**, v. 33, n. 1, p. 279–284, 2015.

KHAIRWAL, V.; KUMAR, M. Lead acetate induced oxidative stress and its possible reversal by *Tribulus terrestris* root extract in testes of Swiss albino mice. **Journal of Environmental Science, Toxicology And Food Technology**, v. 6, n. 3, p. 79–85, 2013.

KHATRI, S.; CHHILLAR, A. K. Evaluation of in vitro free radical scavenging activity of *Tribulus terrestris*. **International Journal of Basic and Applied Biology**, v. 2, n. 6, p. 444–448, 2015.

KUNCHANDY, E.; RAO, M. N. A. Oxygen radical scavenging activity of curcumin. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 58, n. 3, p. 237–240, 1990.

LAMBA, H.; BHARGAVA, C.; THAKUR, M.; BHARGAVA, S. α -glucosidase and Aldose reductase inhibitory activity *in vitro* and anti-diabetic activity *in vivo* of *Tribulus terrestris* L.(Dunal). **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical**, v. 3, n. 3, p. 270–272, 2011.

LEE, H. H.; AHN, E.-K.; HONG, S.-S.; OH, J. S. Anti-inflammatory effect of Tribulusamide D isolated from *Tribulus terrestris* in lipopolysaccharide-stimulated RAW264.7 macrophages. **Molecular Medicine Reports**, v. 16, n. 4, p. 4421–4428, 2017.

LOKHANDE, K.; KULKARNI, C.; SHINKAR, M.; JADHAV, S. Evaluation of antioxidant potential of Indian wild leafy vegetable *Tribulus terrestris*. **International Journal of advances in pharmacy, biology and chemistry**, v. 3, n. 3, p. 703–708, 2014.

MARKOVSKA, Y. .; GENEVA, M. .; PETROV, P. .; BOYCHINOVA, M. .; LAZAROVA,

- I. .; TODOROV, I. .; STANCHEVA, I. . EDTA reduces heavy metal impacts on *Tribulus terrestris* photosynthesis and antioxidants. **Russian Journal of Plant Physiology**, v. 60, n. 5, p. 623–632, 2013.
- MIAO, J.; LI, X.; ZHAO, C.; GAO, X.; WANG, Y.; GAO, W. Active compounds, antioxidant activity and α -glucosidase inhibitory activity of different varieties of *Chaenomeles* fruits. **Food Chemistry**, v. 248, p. 330–339, 2018.
- MISHRA, R.; RANA, M.; BISHT, S. S. Biochemical analysis and antioxidant activity of methanolic leaf extracts of *Paederia foetida* and *Tribulus terrestris*. **Journal of Chemical Engineering and Chemistry Research**, v. 3, n. 11, p. 1091–1095, 2016.
- NELSON, M. J.; SEITZ, S. P. The structure and function of lipoxygenase. **Current Opinion in Structural Biology**, v. 4, p. 878–884, 1994.
- NESSA; KHAN. Evaluation of free radical scavenging activity and toxic heavy metal contents of commercially available fruits of *Tribulus terrestris* Linn. **European Journal of Medicinal Plants**, v. 9, n. 3, p. 1–14, 2015.
- OLIVEIRA, N. N. P. M.; FÉLIX, M. A. R.; PEREIRA, T. C. S.; ROCHA, L. G. P.; MIRANDA, J. R.; ZANGERONIMO, M. G.; PINTO, J. E. B. P.; BERTOLUCCI, S. K. V.; DE SOUSA, R. V. Sperm quality and testicular histomorphometry of wistar rats supplemented with extract and fractions of fruit of *Tribulus terrestris* L. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 58, n. 6, p. 891–897, 2015.
- OYAIZU, M. Studies on products of browning reaction. Antioxidative activities of products of browning reaction prepared from glucosamine. **The Japanese Journal of Nutrition and Dietetics**, v. 44, n. 6, p. 307–315, 1986.
- PRIETO, M. P. P.; AGUILAR, M. Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: specific application to the determination of vitamin E. **Analytical Biochemistry**, v. 269, p. 337–341, 1999.
- RAJENDRABHAI, V. Detection of phytochemical and pharmacological properties of crude extracts of *Tribulus terrestris* collected from tribal regions of Baglan (MS), India. **International Journal of Pharmacognosy and Phytochemical Research**, v. 9, n. 4, p. 508–511, 2017.
- RE, R.; PELLEGRINI, N.; PROTEGGENETE, 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.
- SANNIGRAHI, S.; MAZUDER, U. K.; PAL, D. K.; PARIDA, S.; JAIN, S. Antioxidant potential of crude extract and different fractions of *Enhydra fluctuans* Lour. **Iranian Journal of Pharmaceutical Research**, v. 9, n. 1, p. 75–82, 2010.
- SARMA, A. Das; MALLICK, A. R.; GHOSH, A. K. Free radicals and their role in different clinical conditions : An overview. **International Journal of Pharma Sciences and Research**, v. 1, n. 3, p. 185–192, 2010.

SINGLETON, V. L.; ROSSI-JR., J. A. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 16, p. 144–158, 1965.

SONG, Y. H.; KIM, D. W.; CURTIS-LONG, M. J.; PARK, C.; SON, M.; KIM, J. Y.; YUK, H. J.; LEE, K. W.; PARK, K. H. Cinnamic acid amides from *Tribulus terrestris* displaying uncompetitive α -glucosidase inhibition. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 114, p. 201–208, 2016.

WANG, B.-J.; LIEN, Y.-H.; YU, Z.-R. Supercritical fluid extractive fractionation - study of the antioxidant activities of propolis. **Food Chemistry**, v. 86, n. 2, p. 237–243, 2004.

WU, T. S.; SHI, L. S.; KUO, S. C. Alkaloids and other constituents from *Tribulus terrestris*. **Phytochemistry**, v. 50, n. 8, p. 1411–1415, 1999.

ZHANG, H.; WANG, G.; BETA, T.; DONG, J. Inhibitory properties of aqueous ethanol extracts of propolis on alpha-glucosidase. **Evidence-based Complementary & Alternative Medicine**, p. 1–7, 2015.

ZHELEVA-DIMITROVA, D.; OBRESHKOVA, D.; NEDIALKOV, P. Antioxidant activity of *Tribulus terrestris*-a natural product in infertility therapy. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 4, n. 4, p. 508–511, 2012.

ZHU, W.; DU, Y.; MENG, H.; DONG, Y.; LI, L. A review of traditional pharmacological uses, phytochemistry, and pharmacological activities of *Tribulus terrestris*. **Chemistry Central Journal**, v. 11, n. 1, p. 1–16, 2017.

ARTICLE 2 - VASORELAXANT ACTIVITY OF THE EXTRACT AND FRACTIONS OF *Tribulus terrestris* IN ISOLATED RAT AORTA

ABSTRACT

In traditional medicine, *Tribulus terrestris* (abrolhos) (Zygophyllaceae) has been used as tonic, aphrodisiac and diuretic, as well as for the treatment of cardiovascular diseases. The aim of this work was to characterize the vasorelaxant effect produced by *Tribulus terrestris* crude ethanolic extract (EtOH) and HEX, DCM, EtOAc, BuOH and AQSol fractions in isolated rat aorta. The cumulative addition of EtOH and fractions (0.1-1.000 $\mu\text{g/mL}$) on a phenylephrine-induced pre-contraction (10^{-7} M) promoted a vasorelaxant effect in a concentration-dependent manner and independent of vascular endothelium. The EtOAc presented the best vasorelaxant activity. In endothelium-denuded rings, EtOAc was able to inhibit phenylephrine-induced contractions (10^{-9} to 10^{-4} M) at the concentration 1000 $\mu\text{g/mL}$. Likewise, in a nominally Ca^{2+} -free depolarizing solution, EtOAc inhibited CaCl_2 (10^{-6} - 3×10^{-2} M)-induced contractions at the concentration 1000 $\mu\text{g/mL}$. There was not significant difference between the vasorelaxant activity on KCl 25 mM-induced contraction and PHE-induced contraction, in presence and absence of tetraethylammonium (3 mM), glibenclamide (3×10^{-6} M) and 4-aminopyridine (3 mM). Thus, the vasorelaxant effect of EtOAc can probably be attributed by a reduction in calcium influx through Ca_vL channels. UPLC-ESI-MS analyses indicated that the EtOAc was rich in cinnamic acid amide.

Keywords: Zygophyllaceae. Calcium channels. UPLC-ESI-MS. Cinnamic acid amide.

1 INTRODUCTION

Hypertension is the most common cardiovascular disease and contributes to morbidity and mortality worldwide. Low blood pressure reduces the risk of developing coronary artery disease, heart failure, stroke, and kidney damage. It represents a significant public health problem because of its high prevalence, its underdiagnosis, poor adherence of treatment by patients and the high percentage of patients who do not reach blood pressure goals (TOM et al., 2010; SALMA; KHAN; SHAH, 2018).

The drugs have been used to control of blood pressure, such as nifedipine, verapamil and diltiazem, act as calcium channel blockers inducing vasodilation and lowering blood pressure. Often in the treatment of hypertension, more than one class of antihypertensive drugs are indicated to reach multiple targets. The use of a lot of medicines generates high medical and socioeconomic costs (KOHLMANN-JÚNIOR, 2010; ANDRADE et al., 2016).

To validate the use of natural products as an alternative for the treatment of hypertension with minimal undesirable effects, studies have been conducted in worldwide. Besides that, the

medicinal herbs such as *Tribulus terrestris* have multiple therapeutic targets (MAO et al., 2015; ZADEH; PANAHI, 2017).

In traditional Chinese and Indian medicine, *Tribulus terrestris* (abrolhos) (Zygophyllaceae family) has been used in the form of infusion (leaves) or decoction (fruits) such as tonic, aphrodisiac and diuretic, as well as for the treatment of cardiovascular diseases. (HAMMODA et al., 2013; ZHU et al., 2017).

Phytochemical studies have demonstrated the presence of flavonoids (BHUTANI; CHIBBER; SESHADRI, 1969), saponins (GANZERA; BEDIR; KHAN, 2001; SU et al., 2009), and cinnamic acid amides (SONG et al., 2016) in *Tribulus terrestris*. These secondary metabolites are widely known for effects on the cardiovascular system. Considering the traditional use of *T. terrestris* in the treatment of hypertension, its action on the cardiovascular system has been poorly studied. Thus, the present study aims to evaluate the effect of crude ethanolic extract and fractions obtained from the *T. terrestris* fruit in isolated rat aorta .

2 MATERIAL AND METHODS

2.1 Extract and fractions preparation

Dried fruits of *Tribulus terrestris* L. were purchased from the Pharmaceutical Industry Cathedral, Vespasiano, Minas Gerais, Brazil. The extracts and fractions of *T. terrestris* were prepared according to Oliveira *et al.*, 2015. In this work, it used the crude ethanolic extract (EtOH), hexanic (Hex), dichloromethane (DCM), ethyl acetate (EtOAc), *n*-butanolic (BuOH), and methanol/water soluble (AQSol) fractions.

2.2 Animals

The present study worked on adult male Wistar rats and the mean age of 60 days weighting 250-300 g that were obtained from “Centro de Bioterismo” of Federal University of Minas Gerais (UFMG). They were kept in the “Biotério Central Multiusuário” of Federal University of Lavras (UFLA) at temperature 22 ± 2 °C and light and dark cycles of 12 and 12 h respectively for three weeks before and during the experiments. Animals were provided with standard rodent diet and the water was *ad libitum*. All experiments were conducted in accordance with the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals and were approved by the Ethics Committee on the Use of Animals of the Federal University of Lavras (nº 068/2018 CEUA-UFLA) (Attachment 1).

2.3 Chemicals

The following drugs were used in the study: L-Phenylephrine hydrochloride (PHE), Acetylcholine chloride (ACh), 4-aminopyridine (4-AP), glibenclamide (GLIB) and tetraethylammonium (TEA) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). For the preparation of stock solutions, GLIB was dissolved with sodium bicarbonate in distilled water and the remaining drugs were dissolved only in distilled water. All solutions were stored at 0 °C.

2.4 Solutions

The following salts were added to distilled water to prepare Krebs Henseleit solution: sodium chloride (NaCl), potassium chloride (KCl), magnesium sulfate heptahydrate ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), glucose ($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$), sodium bicarbonate (NaHCO_3), potassium phosphate dihydrate (KH_2PO_4) and calcium chloride dihydrate ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$). In the preparation of Krebs Henseleit depolarizing solutions with 25 mM potassium chloride, the Na^+ concentration was isosmotically altered. In the calcium-free solutions, only CaCl_2 was omitted. The pH of the nutritive solutions was adjusted to 7.4 as needed.

2.5 Vascular reactivity

2.5.1 Preparation of isolated rat thoracic aorta rings

After anaesthesia with thiopental (80 mg/kg, ip), the thoracic aorta was excised, cleaned of connective tissue and cut into rings of approximately 4-5mm in length. Rings were suspended in organ baths containing Krebs Henseleit solution (NaCl 118.0 mM, KCl 4.7 mM, MgSO_4 1.2mM, NaHCO_3 25.0 mM, $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$ 11.1 mM; KH_2PO_4 1.2 mM, $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 2.5mM, pH 7.4), maintained at 37 °C and continuously aerated with 95% O_2 and 5% CO_2 , for isometric tension recording. (AECAD 04F, AQCAD 2.5.0., AVS Projetos, SP) (Attachment 1). After a 60 min of an equilibration period under a resting tension of 1g, the presence of functional endothelium was verified by the ability of acetylcholine (ACh, 10^{-6} M) to induce more than 80% relaxation in rings precontracted with phenylephrine (PHE) 10^{-7} M. When the relaxation of ACh was less than 10%, the rings were considered without functional endothelium. During the stabilization, the nutritive solution was changed every 15 minutes to prevent interference of metabolites (FURCHGOTT; ZAWADZKI, 1980).

2.5.2 Experimental protocols

2.5.2.1 Effects of the crude ethanolic extract and fractions of *Tribulus terrestris* fruit on aortic contraction induced by PHE or KCl

After a 60-min stabilization period a contraction of aortic rings was achieved by PHE (10^{-7} M). When the contraction reached a plateau, the EtOH and Hex, DCM, EtOAc, BuOH, and AQSol fractions of *Tribulus terrestris* were added cumulatively (0.1-1.000 $\mu\text{g/mL}$) to rings in the presence and absence of endothelium. The relaxation effect was calculated as the percentage of the contraction in response to PHE (Attachment 1). After the concentration-effect curves, in order to verify if the vasorelaxant effect would be reversible, the preparations were washed every 15 minutes with Krebs-Henseleit solution and again contracted with PHE 10^{-7} M every 30 minutes during 2 hours. Only the extract/fraction (EtOAc) that presented the best vasorelaxant activity continued to be studied (BASRI et al., 2018).

In another set of experiments, the effect of EtOAc added cumulatively (0.1-1.000 $\mu\text{g/mL}$) on attenuating KCl (25 mM)-induced tonic contraction in endothelium-denuded rings was examined.

2.5.2.2 Investigation of EtOAc effect on Phe-induced concentration-response curves in endothelium-denuded preparations

After stabilization period, the effect of EtOAc on Phe-induced contractions in endothelium-denuded rings was assessed. Cumulative concentration-response curves for Phe (10^{-9} to 10^{-4} M) were obtained before and after pre-incubation separately with EtOAc (100, 250, and 1000 $\mu\text{g/L}$) for 30 min. The results were expressed as percentages of the maximal response for Phe-induced response response and curves were statistically compared.

2.5.2.3 Investigation of EtOAc effect on CaCl_2 -induced contractions

After the stabilization period, the effect of EtOAc on CaCl_2 -induced contractions in endothelium-denuded rings was assessed. Cumulative concentration-response curves for CaCl_2 (10^{-6} - 3×10^{-2} M) were obtained in endothelium-denuded rings exposed to nominally without Ca^{2+} solution with KCl 25 mM before and after pre-incubation with EtOAc (100, 250, and 1000 $\mu\text{g/mL}$) for 30 min. The results were expressed as percentages of the maximal response for only CaCl_2 -induced response and curves were statistically compared.

2.5.2.4 Evaluation of K⁺ channels involvement in EtOAc-induced vasorelaxant response

In endothelium-denuded preparations, some pharmacological tools were incubated 30 min. before, aiming to investigate the participation of different types of K⁺ channels, as follows: TEA (3 mM), a non-selective K⁺-channels blocker; 4-AP (3 mM), a selective K_v-channels blocker; and Glib (3x10⁻⁶ M), a selective K_{ATP}-channel blocker. After stabilization of the tonic contraction induced by Phe (10⁻⁷ M), cumulative concentrations of EtOAc (0.1-1.000 µg/mL) were added to the rings.

2.6 UPLC-ESI-MS analysis

UPLC-ESI-MS analysis were performed on a Waters ACQUITY UPLC system (Waters, Milford, Massachusetts, USA), composed of binary pump, autosampler, in-line degasser and photodiode array detector (Waters, Milford, Massachusetts, USA). A mass spectrometer Xeco™ Triple Quadrupole MS (Waters Corp., Milford, Massachusetts, USA) equipped with an electrospray ionization (ESI) source. Data were processed using MassLynx4.1 (Waters, Milford, Massachusetts, USA). Separation was achieved on an Acquity UPLC BEH HILIC (150×2.1mm i.d.; 1.7 µm; Waters, Milford, Massachusetts, USA) in combination with an Acquity UPLC BEH HILIC guard column (5×2.1 mm; 1.7 µm; Waters, Milford, Massachusetts, USA). The mobile phase consisted by a gradient elution of water (A) and acetonitrile (B), both acidified with 0.1% v/v formic acid in the following elution/re-equilibration conditions: 0-10 min, 5% → 95% B; 10-11 min, 95% B; 11-13 min, 95% → 5% B, at a flow rate of 0.3 mL/min, at 40 °C. The injection volume was set at 5.0 µL. For the ESI source, in the negative and positive full-scan modes ($m/z = 90$ to 1300), the following conditions were used: capillary voltage of 3.50 kV; 30 V cone voltage; source temperature of 120 °C; desolvation temperature 350 °C, with desolvation gas flow of 550 L h⁻¹.

2.7 Statistical analysis

All the data were expressed as the mean ± S.E.M. and n refers to the number of animals used in each protocol. The EC₅₀ values (half-maximal effective concentration) were calculated through nonlinear regression of the concentration-response curves of crude ethanolic extract and fractions of *Tribulus terrestris* in each protocol. The E_{max} value refers to a maximal effect induced by a substance in percentage, being equal to 0% in maximum contraction tension elicited by phenylephrine and 100% when initial preload tension level was reached (baseline)

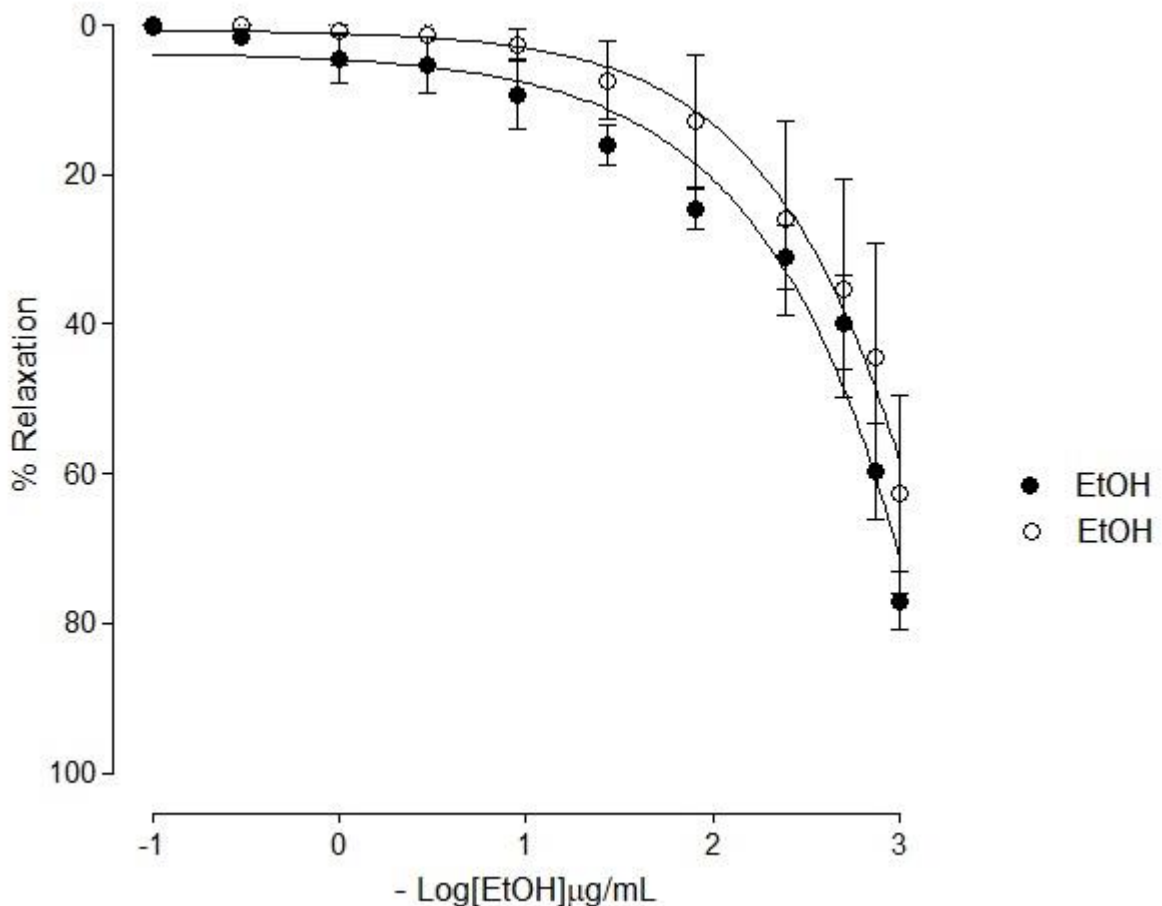
(KENAKIN; KENAKIN, 1997). Differences between the means were statistically compared using nonpaired Student's t-test, and one-way ANOVA followed by Newman-Keul's test, which such differences were considered significant when $p < 0.05$. All analyses were performed using the software Graph-Pad Prism 5.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, USA).

3 RESULTS AND DISCUSSION

3.1 Effect of the EtOH of *Tribulus terrestris* on Phe induced pre-contractions

Based on the results obtained in Figure 1, it was observed that there were no significant differences ($p > 0.05$) in vasorelaxant activity promoted by PHE 10^{-7} M in rat aortic artery rings in the presence ($EC_{50} = 542.4 \pm 154.30 \mu\text{g/mL}$) and in the absence of vascular endothelium ($EC_{50} = 599.95 \pm 221.09 \mu\text{g/mL}$), suggesting an endothelium-independent effect.

Figure 1 - Effect of EtOH of *Tribulus terrestris* on Phe 10^{-7} M induced pre-contractions in isolated rat thoracic aorta artery rings



Legend: Vasorelaxant effect induced by EtOH of *Tribulus terrestris* on Phe 10^{-7} M pre-contracted endothelium-intact (●) (n=6) or endothelium-denuded (○) (n=6) rat aortic rings. Values expressed as mean \pm S.E.M.; $p > 0.05$ vs. endothelium-intact.

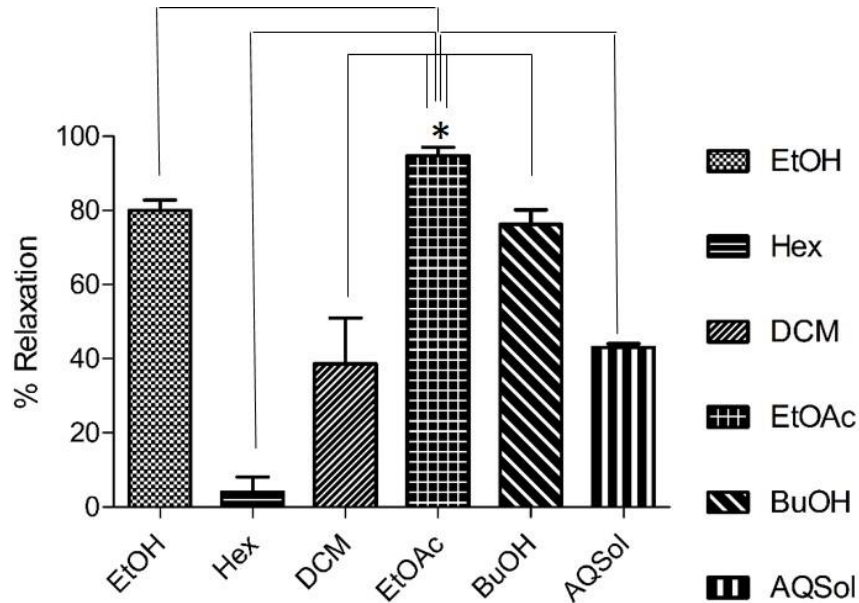
The EtOH vasorelaxation effect occurred in a concentration-dependent manner in isolated rat aorta (FIGURE 1) and its effect in PHE-induced contraction was reversed after 2 hours of removal of the EtOH from the rings. This result showed the viability of isolated rat aorta even after the use of *Tribulus terrestris* (data not shown).

The α_1 adrenergic receptor agonist, phenylephrine, promotes contraction of isolated rat aorta by mixed coupling, i.e., pharmacomechanical and electromechanical mechanisms. The first mechanism involves Ca^{2+} mobilization of sarcoplasmic reticulum via G-protein-coupled receptors as well as Ca^{2+} entry by Ca_v calcium channels. The second mechanism involves change in membrane potential and activation of Ca_v channels, with a subsequent Ca^{2+} influx from extracellular medium and increase in its intracellular levels (CHIBA & MISAWA, 2004).

Based on results shown in Figure 1, the EtOH induce the vasorelaxation by a direct action on vascular smooth muscle, and not through the endothelium-derived relaxing factors, such as nitric oxide and prostacyclin. However, according to Phillips, Mathew e Oriowo (2006), who performed a study with the entire plant collected from Kuwait, the vasorelaxation promoted by *Tribulus terrestris* in mesenteric rings occurs in an endothelium-dependent manner, possibly involving the release of nitric oxide and hyperpolarization of the membrane. It is common to find in the literature presenting different mechanisms of action in the isolated rat aorta and mesenteric artery because of the differences in terms of wall elasticity (aorta) and peripheral resistance (mesenteric).

After checking the vasorelaxant activity of the EtOH (Figure 1), its fractions had been investigated. According to Figure 2, HEX, DCM, BuOH and AQSol fractions showed very low percentages of vasorelaxant activity on isolated rat aorta. Therefore, these fractions will not be evaluated for the mechanism of action. The EtOAc fraction showed better effect than EtOH and other fractions (FIGURE 2). Thus, the EtOAc fraction presented the highest percentage of vasorelaxation against contraction with PHE 10^{-7} M. Based on this result, the EtOAc fraction was chosen to be better studied.

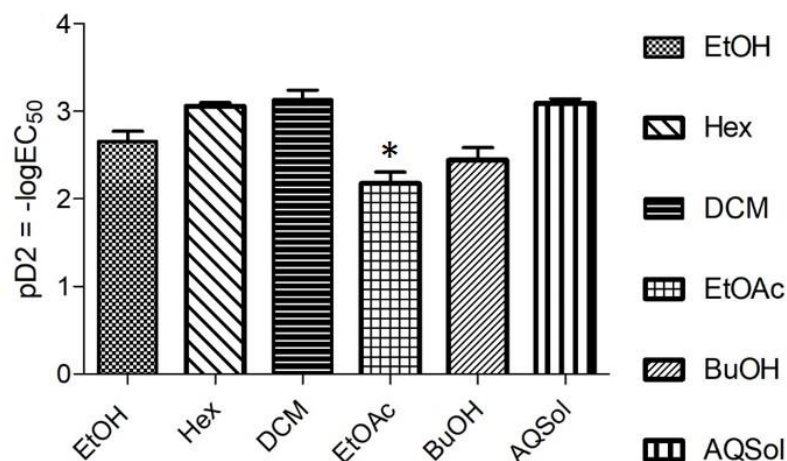
Figure 2 – Maximum relaxant effect (E_{max}) of *Tribulus terrestris* EtOH and its fractions on Phe 10^{-7} M induced pre-contractions in isolated rat aorta.



Legend: Values expressed as mean \pm S.E.M.; * $p < 0.05$ using one way ANOVA followed by Newman-Keul's test; $n=5-7$; EtOH: Crude ethanolic extract; Hex: Hexanic fraction; DCM: Dichloromethane fraction; EtOAc: Ethyl acetate fraction; BuOH: Butanolic fraction; AQSol: methanol/water soluble fraction.

The EtOAc fraction also showed more potent than EtOH and other fractions ($p < 0.05$) (FIGURE 3), as lower values in EC_{50} represent better vasorelaxant activity.

Figure 3 - The potency of the EtOH and its fractions of *Tribulus terrestris* fruits on phenylephrine-induced contraction on isolated rat aorta



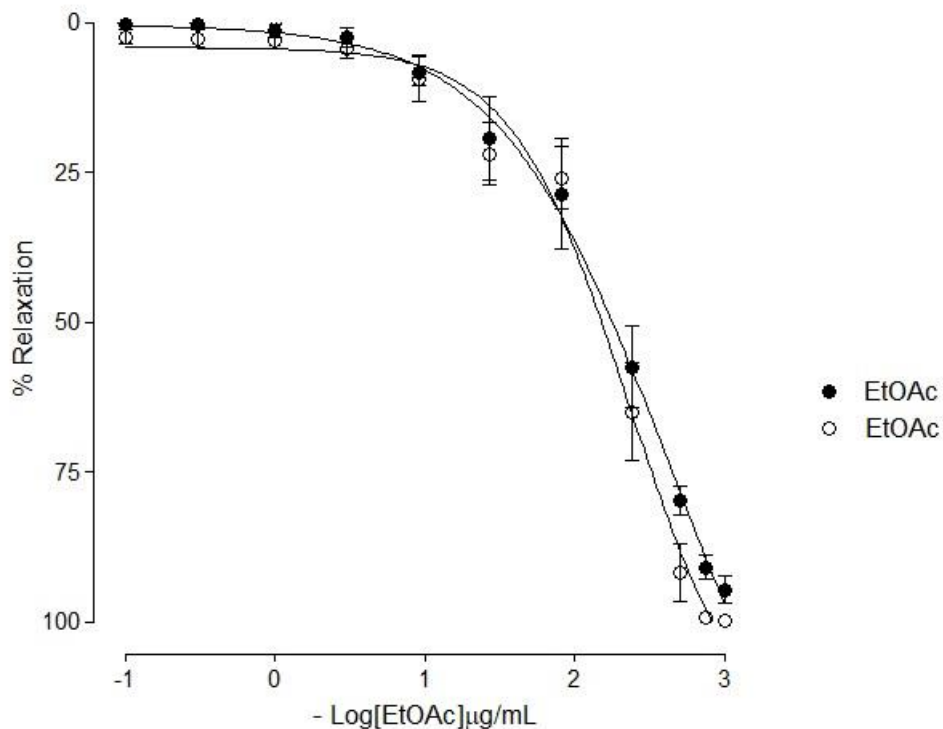
Legend: Values expressed as mean \pm S.E.M.; * $p < 0.05$ using one way ANOVA followed by Newman-Keul's test; $n=5-7$; EtOH: Crude ethanolic extract; Hex: Hexanic fraction; DCM: Dichloromethane fraction; EtOAc: Ethyl acetate fraction; BuOH: Butanolic fraction; AQSol: methanol/water soluble fraction.

3.2 Effect of EtOAc fraction on Phe induced pre-contractions

The EtOAc fraction did not present significant differences on vasorelaxant response in the presence ($EC_{50} = 423.7 \pm 146.6 \mu\text{g/mL}$) and in the absence ($EC_{50} = 227.7 \pm 122.4 \mu\text{g/mL}$) of functional endothelium ($P > 0.05$) (FIGURES 4 and 5). Thus, it can be inferred that vasorelaxant activity is independent of functional endothelium and occurs in a concentration-dependent manner.

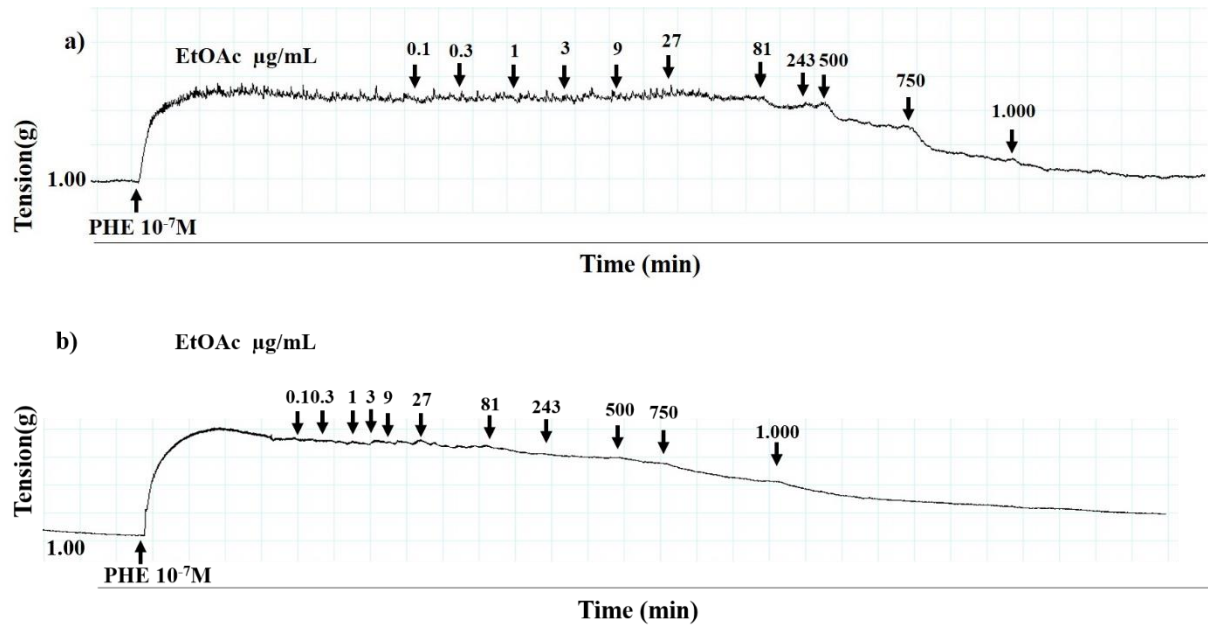
There are many possible mechanisms involved in endothelium-independent vasorelaxant activity on vascular smooth muscle: Ca^{2+} influx decrease by cell membrane calcium channels blockade, Ca^{2+} release inhibition from intracellular stores, K^+ efflux increase by potassium channels opening, and inhibition of contractile apparatus.

Figure 4 - Effect of EtOAc fraction of *Tribulus terrestris* on Phe 10^{-7} M induced pre-contractions in isolated rat thoracic aorta rings



Legend: Vasorelaxant effect induced by EtOAc on Phe 10^{-7} M pre-contracted endothelium-intact (●) ($n=7$) or endothelium-denuded (○) ($n=4$) rat aortic rings. Values expressed as mean \pm S.E.M.; $p>0.05$ vs. endothelium-intact.

Figure 5 - Representative original record of the effect of fraction of *Tribulus terrestris* on the isolated rat aortic rings contracted by phenylephrine 10^{-7} M

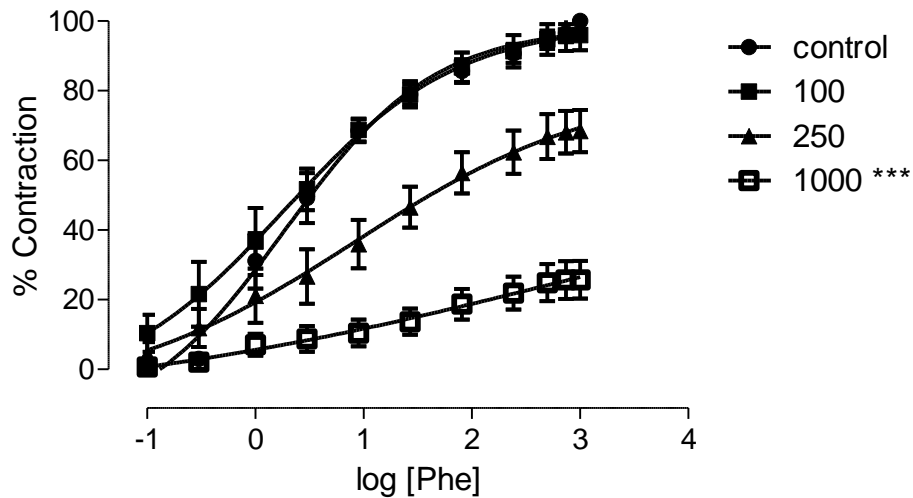


Legend: The arrows represent the time-course of the fraction administration (0.1 to 1,000 $\mu\text{g/mL}$); a) with endothelium; b) without endothelium.

3.3 Effect of EtOAc fraction on Phe-induced concentration-response curves in endothelium-denuded preparations

Based on figure 6, after EtOAc pretreatment, Phe-induced vasoconstriction was inhibited at the concentration 1000 $\mu\text{g/L}$. There was not a significant differences between the control, 100 $\mu\text{g/L}$, and 250 $\mu\text{g/L}$.

Figure 6 - Effect of EtOAc fraction of *Tribulus terrestris* on Phe-induced concentration-response curves in endothelium-denuded preparations



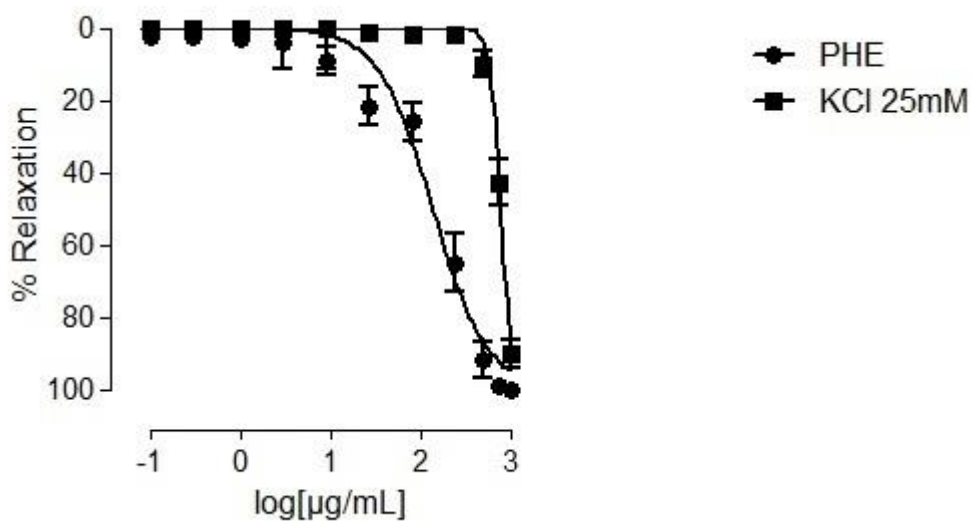
Legend: Concentration-response curves induced by Phe (10^{-9} to 10^{-4} M) on endothelium-denuded rat aortic rings (n=7) in the presence of EtOAc 100 (■), 250 (▲) or 1000 (□) $\mu\text{g/L}$ for 30 min. The values are \pm S.E.M.; *** $p < 0.001$ vs. E_{max} control (●) using Student t test.

The EtOAc fraction was able to inhibit contractions induced by the cumulative addition of phenylephrine in endothelium-denuded preparations, suggesting that this fraction could probably act in some stage of the vascular smooth muscle contractile machinery stimulated by α_1 -adrenergic receptors activation.

3.4 Effect of EtOAc fraction on KCl 25mM induced pre-contractions

Based on Figure 7, KCl 25 mM-induced contraction ($EC_{50} = 906.3 \pm 147.6 \mu\text{g/mL}$) was not significantly different when compared with Phe 10^{-7} M pre-contracted endothelium-denuded ($EC_{50} = 227.7 \pm 122.4 \mu\text{g/mL}$) ($p > 0.05$) and the Phe 10^{-7} M pre-contracted endothelium-denuded showed the same amplitude observed in KCl 25 mM-induced contraction. There was difference in potency, but there was not difference in E_{max} .

Figure 7 - Vasorelaxant effect induced by EtOAc fraction of *Tribulus terrestris* on Phe 10^{-7} M or KCl 25 mM pre-contracted endothelium-denuded rat aortic rings



Legend: Vasorelaxant effect induced by EtOAc on Phe 10^{-7} M (●) ($n=4$) or KCl 25 mM (■) ($n=6$) pre-contracted endothelium-denuded on rat aortic rings. Values expressed as mean \pm S.E.M.; $p > 0.05$ vs. endothelium-denuded.

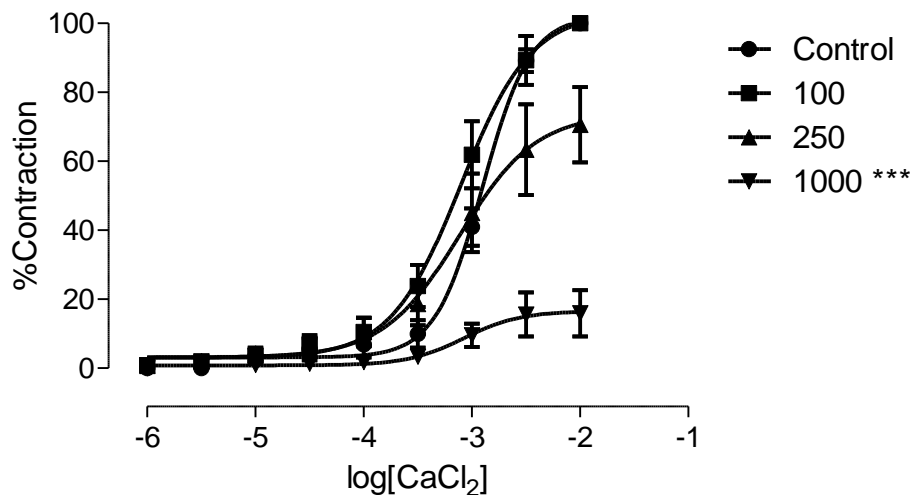
When the Krebs Henseleit solution was exchanged for the KCl 25 mM depolarizing solution, the concentration of the K^+ ions in the extracellular medium increases causing an imbalance in the electrolyte homeostasis and then the K^+ ion efflux from the intracellular medium to the extracellular medium was prevented. The K^+ external concentration increase by the depolarizing solution induced a membrane depolarization and triggers a contractile response because of Ca^{2+} influx increase through voltage-operated calcium channels (Ca_v).

$\text{Ca}_v1.2$ is the main type of voltage-opened calcium channel present in smooth muscle. This channel is important for the development and maintenance of contraction in smooth muscle. So, the opening and closing of $\text{Ca}_v1.2$ are closely related to variations in membrane potential (SILVA et al., 2015) and smooth muscle tension development/generation.

3.5 Effect of EtOAc fraction on CaCl₂-induced contractions

The CaCl₂-induced concentration-response curves before and after the EtOAc addition was obtained in a nominally without Ca²⁺ depolarizing Krebs Henseleit solution (KCl 25 mM). The EtOAc fraction is able to inhibit the contractions induced cumulatively by CaCl₂ at concentration 1000 µg/L ($E_{max} = 15.76 \pm 4.01 \%^{***}$) (FIGURE 8). There was not a significant differences between the control ($E_{max} = 100 \pm 4.21 \%$), concentration of 100 µg/L ($E_{max} = 100 \pm 7.01 \%$), and 250 µg/L ($E_{max} = 70.68 \pm 11.55 \%$). These data suggest that the EtOAc fraction induced a inhibition of CaCl₂-induced contractions on rat thoracic aorta rings by Cav channels blockade.

Figure 8 - Effect of EtOAc fraction of *Tribulus terrestris* on CaCl₂-induced contractions in isolated rat thoracic aorta rings



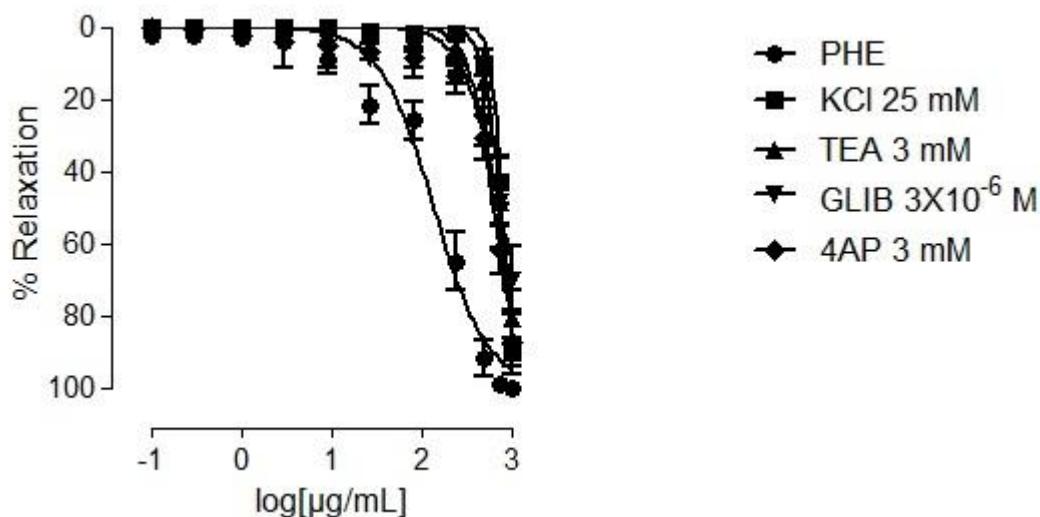
Legend: Concentration-response curves induced by CaCl₂ (10^{-6} - 3×10^{-2} M) on endothelium-denuded rat aortic rings (n=6) in the presence of EtOAc 100 (■), 250 (▲) or 1000 (▼) µg/L for 30 min. The values are mean \pm S.E.M.; *** $p < 0.001$ vs. E_{max} control (●) using Student t test.

3.6 Effect of EtOAc fraction on potassium channels

The involvement of potassium channels in the EtOAc fraction induced vasorelaxant response was assessed by experimental protocols in the presence of tetraethylammonium (TEA) 3 mM, a non-selective blocker of potassium channels, 4-AP (3 mM), a selective K_v-channels blocker; and Glib (3×10^{-6} M), a selective K_{ATP}-channel blocker (FIGURE 9). Accordingly to the Figure 9, there was not significant difference between the vasorelaxant activity on KCl 25mM-induced contraction, PHE-induced contraction and in the pretreatment with

tetraethylammonium (3 mM), glibenclamide (3×10^{-6} M) and 4-aminopyridine (3 mM). So, its possible that there are no potassium channels involved in the EtOAc vasorelaxant effect.

Figure 9 - Effect of EtOAc fraction of *Tribulus terrestris* on potassium channels



Legend: Vasorelaxant effect induced by EtOAc on Phe 10^{-7} M (●) or KCl 25 mM (■) pre-contracted endothelium-denuded (n=6) in the presence of TEA (▲), GLIB (3×10^{-6} M) (▼) or 4AP (◆) on rat aortic rings. Values expressed as mean \pm S.E.M.

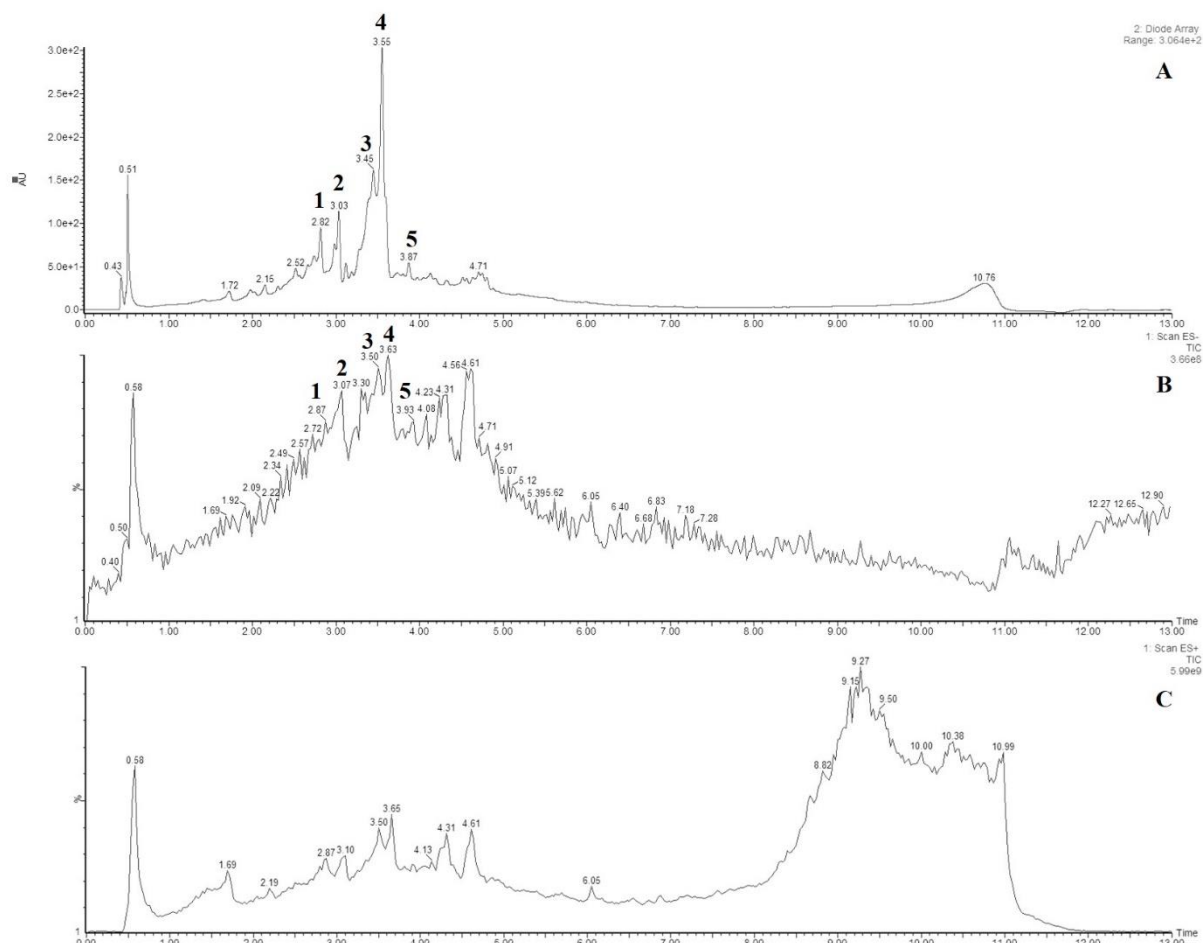
3.7 UPLC-ESI-MS analysis

To characterize the chemical composition of the most active fraction (EtOAc), an analysis was performed by UPLC-ESI-MS, whose chromatographic profiles are represented in Figure 10. Partition of the crude extract with the EtOAc resulted in a fraction enriched in amides of the cinnamic acid, according to the chemical structures presented in Figure 11. The characterization attempts by UPLC-ESI-MS were carried out by comparing the results obtained with literature data for phenolic amides isolated from fruits of *Tribulus terrestris* or spectroscopic data complementary to literature (WU; SHI; KUO, 1999; HONG et al., 2013; SONG et al., 2016; WANG et al., 2016).

The negative ESI-MS spectrum of the peaks at 2.87 min and 3.07 min were characterized by the deprotonated molecular ion of m/z 328.27 Da $[M-H]^-$ m/z 298.26 Da $[M-H]^-$, respectively, (Attachment 2A and B). $M(H)^-$ fragments with even molar masses suggest the presence of an odd number of N atoms in the molecule (SILVERSTEIN; BASSLER; MORRIL, 1991). For the peaks at 2.87 min and 3.07 min, a molecular mass of 329.24 and 299.62 Da was suggested with predicted molecular formulas of $C_{18}H_{19}NO_5$ and $C_{17}H_{17}NO_4$.

This is suggesting the presence of *N-trans*-feruloyloctopamine (1), *N-trans*-caffeoyltyramine (2), based on data from Song et al. (2016) (Figure 10B and 11). For constituent (2), the peak in m/z 597.45 is indicative of the dimeric adduct $[2M-H]^-$.

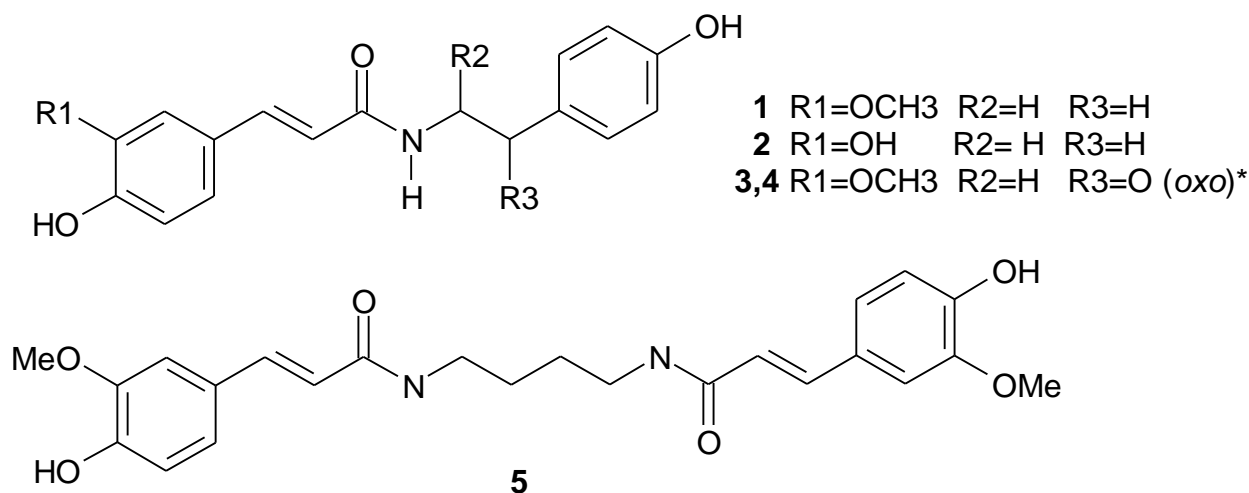
Figure 10 - Chromatographic profiles obtained by UPLC with DAD (A) and ESI-MS detector with negative (B) and positive (C) mode ionization for the ethyl acetate fraction of *Tribulus terrestris*.



Legend: Attempts to characterize the peaks: (1) *N-trans*-feruloyloctopamine, (2) *N-trans*-caffeoyltyramine, (3,4) terrestriamide (cis and trans isomers), and (5) terretribisamide.

According to Hong et al. (2013), the negative ESI-MS spectrum for the peak at 3.50 min, m/z 326.4 Da $[M-H]^-$ and 653 $[2M-H]^-$ (attachment 2C and D) is compatible with the quasi-molecular and the dimeric adduct of terrestriamide (3,4). The similarity of the negative ESI-MS spectra of the peaks of 3.50 min and 3.63 min suggests to be cis isomers and trans. Besides, the UV absorption at 221, 292 and 318 nm corroborate that of terrestriamide (3,4), being characteristic of 3,4-dioxygenated cinnamic acid derivatives (WU et al, 1999).

Figure 11 - Chemical structures of constituents 1-5



Source: Song et al. (2016)

The constituent eluted at 3.87 min (Figure 10A) provided a peak with quasi-molecular ion in m/z 439.40 $[M-H]^-$ (attachment 2 E) compatible with the assignment to terretribisamide (5) proposed by Wu et al. (1999) and Hong et al. (2013). The fragmentation $[M-H]^-$ of compound 5 provided an odd mass fragment suggesting that the molecule may contain a pair or no N atom (SILVERSTEIN; BASSLER; MORRIL, 1991). According to Wu et al. (1999), the molecular formula of terretribisamide is $C_{24}H_{28}N_2O_6$, whose molecular ion peak has m/z 440.31 $[M]^+$, confirming the presence of 2 N atoms in the molecule. The UV absorptions of the peak with $RT = 3.87$ (UV λ_{max} nm: 317, 287, 228 and 222) are also compatible with those reported by WU; SHI; KUO, 1999.

Many studies have been conducted in the world focusing on biological activities of cinnamic-related molecules, for example on anticancer (BALTAS; BEDOS-BELVAL, 2011), antituberculosis (DE et al., 2005), antimalarial (TAKAO et al., 2017), antifungal (TAWATA et al., 1996), antimicrobial (GUZMAN, 2014), antiatherogenic (LAPEYRE et al., 2005) and antioxidant (SOVA, 2012) activities. A cinnamic acid derivated showed antispasmodic effects against carbachol-induced contractions (LIMA et al., 2014).

4 CONCLUSIONS

The antihypertensive effect of *Tribulus terrestris* probably involve a vascular relaxation effect. The EtOH and fractions promoted a vasorelaxant effect in a concentration-dependent manner and independent of vascular endothelium. The EtOAc fraction presented the best vasorelaxant activity Thus, the vasorelaxant effect of EtOAc can probably be attributed to a

reduction in calcium influx through CavL channels. These effects were attributed to cinnamic acid amides.

Acknowledgments

This research is dedicated to Prof. PhD Raimundo Vicente de Sousa. The authors would like to thank to FAPEMIG, CAPES, and CNPq for the financial support to develop this research.

Conflicts of interest

The authors declare no conflict of interest.

REFERENCES

- ANDRADE, D. M. L. de; BORGES, L. L.; TORRES, I. M. S.; CONCEIÇÃO, E. C. da; ROCHA, M. L. Jabuticaba-induced endothelium-independent vasodilating effect on isolated arteries. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, p. 223–229, 2016.
- BALTAS, P. D. M.; BEDOS-BELVAL, F. Cinnamic acid derivatives as anticancer agents-A review. **Current Medicinal Chemistry**, v. 18, p. 1672–1703, 2011.
- BASRI, D. F.; RAMAN, N. S. A.; ALI, S. S.; ZAINALABIDIN, S. The vasorelaxant effect of *Canarium odontophyllum* Miq. (Dabai) extract in rat thoracic aorta. **Egyptian Journal of Basic and Applied Sciences**, v. 5, n. 1, p. 75–79, 2018.
- BHUTANI, S. P.; CHIBBER, S. S.; SESHADRI, T. R. Flavonoids of the fruits and leaves of *Tribulus terrestris*: Constitution of tribuloside. **Phytochemistry**, v. 8, n. 1, p. 299–303, 1969.
- CHIBA, Y.; MISAWA, M. The role of RhoA-mediated Ca²⁺ sensitization of bronchial smooth muscle contraction in airway hyperresponsiveness. **Journal of Smooth Muscle Research**, v.40, n. 4-5, p. 155-67, 2004.
- DE, P.; VEAU, D.; BEDOS-BELVAL, F.; CHASSAING, S.; BALTAS, M. Cinnamic derivatives in tuberculosis. 2005.
- 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. 373–376, 1980.
- GANZERA, M.; BEDIR, E.; KHAN, I. A. Determination of steroidal saponins in *Tribulus terrestris* by reversed-phase high-performance liquid chromatography and evaporative light scattering detection. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 90, n. 11, p. 1752–1758, 2001.
- GUZMAN, J. D. Natural cinnamic acids, synthetic derivatives and hybrids with antimicrobial activity. **Molecules**, v. 19, p. 19292–19349, 2014.
- HAMMODA, H. M.; GHAZY, N. M.; HARRAZ, F. M.; RADWAN, M. M.; ELSOHLY, M. A.; ABDALLAH, I. I. Chemical constituents from *Tribulus terrestris* and screening of their antioxidant activity. **Phytochemistry**, v. 92, n. C, p. 153–159, 2013.
- HONG, S. S.; CHOI, Y.-H.; JEONG, W.; KWON, J. G.; KIM, J. K.; SEO, C.; AHN, E.-K.; LEE, H. H.; KO, H.-J.; SEO, D.-W.; OH, J. S. Two new furostanol glycosides from the fruits of *Tribulus terrestris*. **Tetrahedron Letters**, v. 54, p. 3967–3970, 2013.
- KENAKIN, T.; KENAKIN, T. P. **Pharmacologic Analysis of Drug-receptor Interaction**. Philadelphia: Lippincott-Raven, 1997.
- KOHLMANN-JÚNIOR, O. Diretrizes Brasileiras De Hipertensão VI| Capítulo 6. **Jornal Brasileiro de Nefrologia**, v. 32, n. 1, p. 29–43, 2010.
- LAPEYRE, C.; BEDOS-BELVAL, F.; DURAN, H.; NEGRE-SALVAYRE, A.; BALTAS, M. Design, synthesis, and evaluation of pharmacological properties of cinnamic derivatives as

Antiatherogenic Agents. **Jornal of Medicinal Chemistry**, v. 48, n. 26, p. 8115–8124, 2005.

LIMA, F. J. B.; COSKER, F.; BRITO, T. S.; RIBEIRO-FILHO, H. V.; SILVA, C. M. S.; ARAGÃO, K. S.; LAHLOU, S.; SOUZA, M. H. L. P.; SANTOS, A. A.; MAGALHÃES, P. J. C. Antispasmodic and myorelaxant effects of the flavoring agent methyl cinnamate in gut: Potential inhibition of tyrosine kinase. **European Journal of Pharmacology**, v. 740, p. 192–199, 2014.

MAO, L.; QI, X.; HAO, J.; LIU, H.; XU, Q.; BU, P. *In vitro*, *ex vivo* and *in vivo* anti-hypertensive activity of *Chrysophyllum cainito* L. extract. **International Journal of Clinical and Experimental Medicine**, v. 8, n. 10, p. 17912–17921, 2015.

OLIVEIRA, N. N. P. M.; FÉLIX, M. A. R.; PEREIRA, T. C. S.; ROCHA, L. G. P.; MIRANDA, J. R.; ZANGERONIMO, M. G.; PINTO, J. E. B. P.; BERTOLUCCI, S. K. V.; DE SOUSA, R. V. Sperm quality and testicular histomorphometry of wistar rats supplemented with extract and fractions of fruit of *Tribulus terrestris* L. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 58, n. 6, p. 891–897, 2015.

PHILLIPS, O. A.; MATHEW, K. T.; ORIOWO, M. A. Antihypertensive and vasodilator effects of methanolic and aqueous extracts of *Tribulus terrestris* in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 104, n. 3, p. 351–355, 2006.

SALMA, U.; KHAN, T.; SHAH, A. J. Antihypertensive effect of the methanolic extract from *Eruca sativa* Mill., (Brassicaceae) in rats: Muscarinic receptor-linked vasorelaxant and cardiogenic effects. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 224, n. June, p. 409–420, 2018.

SILVA, M. T. M.; RIBEIRO, F. P. R. A.; MEDEIROS, M. A. M. B.; SAMPAIO, P. A.; SILVA, Y. M. S.; SILVA, M. T. A.; QUINTANS, J. S. S.; QUINTANS-JÚNIOR, L. J.; RIBEIRO, L. A. A. The vasorelaxant effect of p-cymene in rat aorta involves potassium channels. **Scientific World Journal**, p. 6–11, 2015.

SILVERSTEIN, R. M.; BASSLER, G. C. ; MORRIL, T. C. **Spectrometric identification of organic compounds**. 7^a ed. New York: John Wiley & Sons, 1991.

SONG, Y. H.; KIM, D. W.; CURTIS-LONG, M. J.; PARK, C.; SON, M.; KIM, J. Y.; YUK, H. J.; LEE, K. W.; PARK, K. H. Cinnamic acid amides from *Tribulus terrestris* displaying uncompetitive α -glucosidase inhibition. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 114, p. 201–208, 2016.

SOVA, M. Antioxidant and antimicrobial activities of cinnamic acid derivatives. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 12, p. 749–767, 2012.

SU, L.; CHEN, G.; FENG, S.-G.; WANG, W.; LI, Z.-F.; CHEN, H.; LIU, Y.-X.; PEI, Y.-H. Steroidal saponins from *Tribulus terrestris*. **Steroids**, v. 74, p. 399–403, 2009.

TAKAO, K.; TODA, K.; SAITO, T.; SUGITA, Y. Synthesis of amide and ester derivatives of cinnamic acid and its analogs: Evaluation of their free radical scavenging and monoamine oxidase and cholinesterase inhibitory activities. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 65, n. 11, p. 1020–1027, 2017.

TAWATA, S.; TAIRA, S.; KOBAMOTO, N.; ZHU, J.; ISHIHARA, M.; TOYAMA, S. Synthesis and antifungal activity of cinnamic acid esters. **Bioscience Biotechnology Biochemistry**, v. 60, n. 5, p. 909–910, 1996.

TOM, E. N. L.; GIRARD, C.; DIMO, T.; MBAFOR, J. T.; BERTHELOT, A.; DEMOUGEOT, C. Vasorelaxant effects of extracts of the stem bark of *Terminalia superba* Engler & Diels (Combretaceae). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 127, n. 2, p. 335–340, 2010.

WANG, Z. F.; WANG, B. B.; ZHAO, Y.; WANG, F. X.; SUN, Y.; GUO, R. J.; SONG, X. B.; XIN, H. L.; SUN, X. G. Furostanol and spirostanol saponins from *Tribulus terrestris*. **Molecules**, v. 21, n. 4, p. 3–16, 2016.

WU, T. S.; SHI, L. S.; KUO, S. C. Alkaloids and other constituents from *Tribulus terrestris*. **Phytochemistry**, v. 50, n. 8, p. 1411–1415, 1999.

ZADEH, G. S.; PANAHI, N. Endothelium-independent vasorelaxant activity of *Trachyspermum ammi* essential oil on rat aorta. **Clinical and Experimental Hypertension**, v. 39, n. 2, p. 133–138, 2017.

ZHU, W.; DU, Y.; MENG, H.; DONG, Y.; LI, L. A review of traditional pharmacological uses, phytochemistry, and pharmacological activities of *Tribulus terrestris*. **Chemistry Central Journal**, v. 11, n. 1, 2017.

CONCLUSÃO

A fração acetato de etila do fruto de *Tribulus terrestris* apresentou a maior atividade sequestradora dos radicais DPPH, ABTS e hidroxil, inibitória da α -glicosidase, bem como maior capacidade antioxidante total e de poder redutor em comparação ao extrato etanólico e outras frações. Estes resultados foram atribuídos à grande quantidade de substâncias fenólicas presente na fração EtOAc. Já a fração hexânica apresentou o melhor poder quelante de metais e a maior atividade inibitória da lipoxigenase. Em relação a atividade anti-hipertensiva, o EtOH e suas frações promoveram atividade vasorrelaxante independente da presença de endotélio funcional e de maneira dependente de concentração em anéis de artéria aorta isolada de rato sendo a fração EtOAc a que apresentou a melhor atividade. O efeito vasorrelaxante da fração EtOAc provavelmente pode ser atribuído ao bloqueio dos canais para cálcio impedindo o influxo de Ca^{2+} . O efeito vasorrelaxante foi associado à presença de amidas derivadas do ácido cinâmico.

Attachment 1

Figure 12 - Isolated rat aorta in Krebs Henseleit solution aerated with carbogenic mixture.

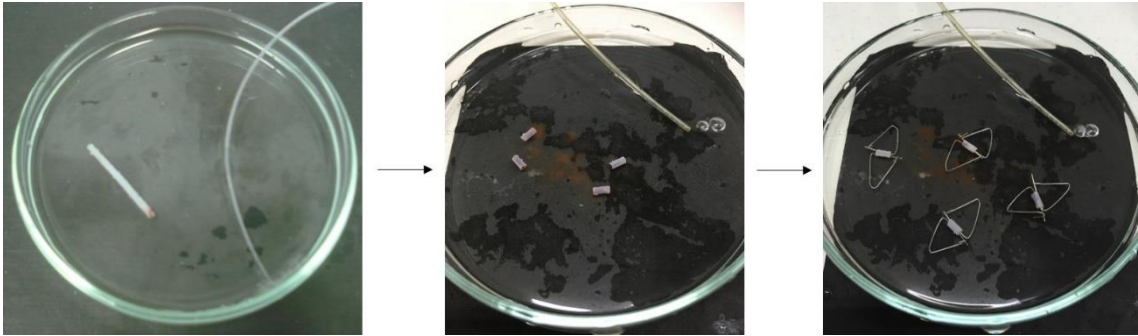


Figure 13 - Data acquisition system (AECAD 04F, AQCAD 2.5.0., AVS Projetos, SP)

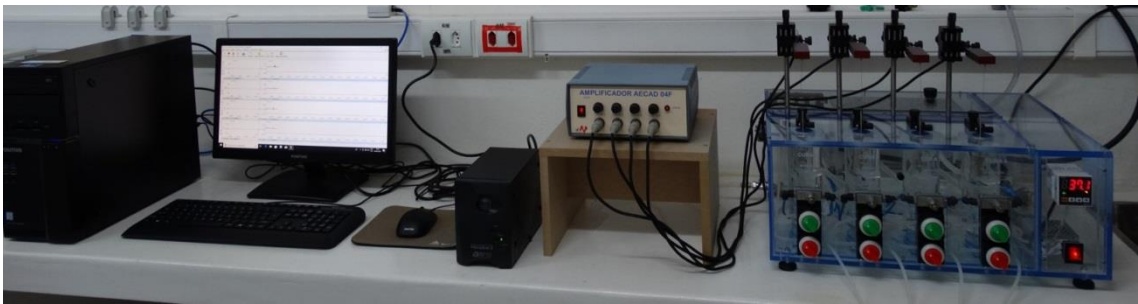


Figure 14 - Organ bath - AVS Projetos, SP

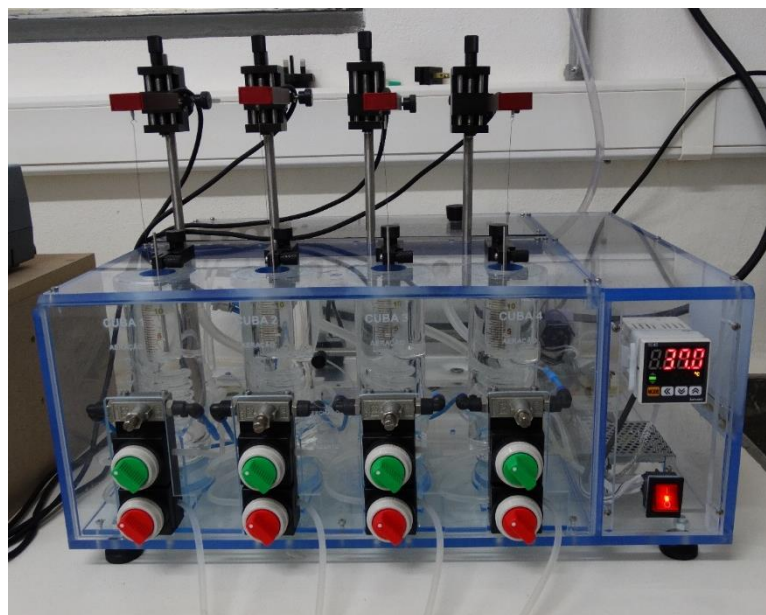
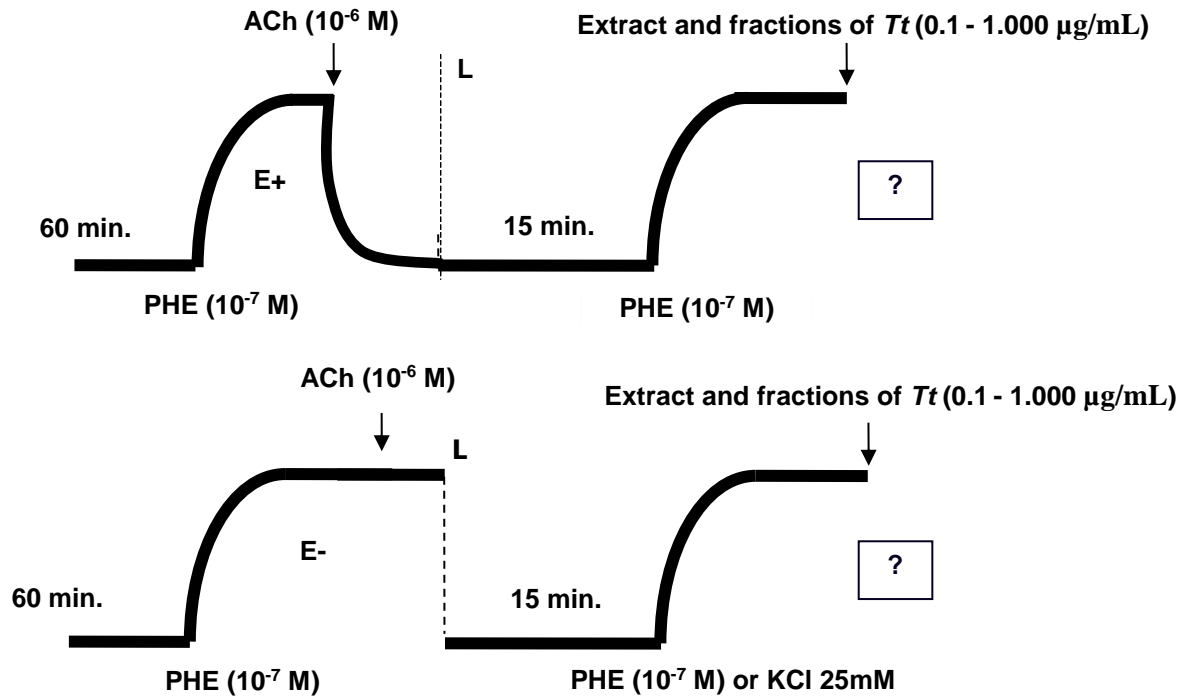


Figure 15 - Experimental protocols on Phe (10^{-7} M) or KCl 25mM induced pre-contractions on isolated rat aorta



CEUA UFLA nº 068/2018

UNIVERSIDADE FEDERAL DE LAVRAS
 PRÓ-REITORIA DE PESQUISA
 COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS
 Cx.P.3037 - Lavras - MG - 37200-000 - (35) 3829-5182 cba@nintec.ufla.br

ATESTADO DE APROVAÇÃO PROVISÓRIO

(o certificado definitivo será concedido após o cumprimento de todos os critérios exigidos pela Orientação Técnica nº 5, de 27 de abril de 2015, do CONCEA/MCTI)

Atestamos que a proposta intitulada "Avaliação do efeito vasorelaxante do extrato e frações de *Tribulus terrestris* L. em artéria aorta isolada de rato", protocolo nº 068/18, sob a responsabilidade de Suzan Kelly Vilela Bertolucci, Aline Carvalho Pereira, Nelma Neylaine Pinho Muniz Oliveira e Samantha Mesquita Favoretto, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto homem), para fins de ensino e/ou pesquisa científica, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas edificadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), do Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação (MCTI), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) da Pró-Reitoria de Pesquisa/UFLA, em reunião de 23/08/2018, podendo ser iniciada a realização da sua parte experimental.

Vigência da autorização: de 01/09/2018 a 31/07/2019
 Finalidade: () Ensino (x) Pesquisa Científica
 Espécie/linhagem/raça: Rato heterogênico / Wistar
 Número de animais aprovados: 56
 Peso/idade: 180 g / 42 dias
 Sexo: macho
 Origem dos animais: aguardando documentação

Lavras, 23 de agosto de 2018.




Prof. Juliano Vargas Petrolato
 Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais CEUA

Universidade Federal de Lavras
 Pró-Reitoria de Pesquisa / Comissão Permanente
 Campus Universitário -
 Caixa Postal 3037 / CEP 37200-000 - Lavras, MG - Brasil
 Tel.: +55 (35) 3829 5182
 cba@nintec.ufla.br - www.prp.ufla.br

LAUDO DO FRUTO DE *Tribulus terrestris*

SPSPharma® - SPSoft Informática Ltda - 55(31) 3292-4848

 CATEDRAL <small>CIÊNCIA E CONSCIÊNCIA</small>	INDUSTRIA FARMACEUTICA CATEDRAL LTDA CERTIFICADO DE ANÁLISE	Página: 1 / 1
---	--	---------------

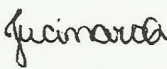
Dados			
Nome Comum		Nome Científico	
TRIBULUS (TRIBULUS TERRESTRIS)		TRIBULUS TERRESTRIS	
Família Botânica		Parte Utilizada	
		FRUTO	
Forma Farmacêutica		Data de Fabricação	Data de Validade
		03/2014	12/2017
Lote	País de Origem	Relação Droga/Extrato	Irradiação
00677/14	CHINA, REPUBLICA POPULAR		


Análise	Especificação	Resultado
FÍSICO-QUÍMICO		
(1) COR	Castanho	Castanho
(1) ODOR	Aromático	Aromático
(2) ALCALOIDES	Positivo	Positivo
(2) POLIFENÓIS	Positivo	Positivo
(2) SAPONINAS	Positivo	Positivo
(16) UMIDADE	Maximo 15,0%	8,33%
(16) CINZAS TOTAIS	Entre 2,0 e 9,0%	8,20%
(16) ELEMENTOS ESTRANHOS	Maximo 2,0%	Ausentes
(1) MACRO/MICROSCOPIA	Conforme descrição para a especie	De acordo

Referência Bibliográfica	
(1) - Metodologia Interna (2) - Cecilia Ballvé Alice [et al.]. Plantas Medicinais de Uso Popular: Atlas Farmacognóstico - Canoas: Ed. Da ULBRA, 1995. (16) - FARMACOPÉIA BRASILEIRA 5ª ED. V. 1, BRASÍLIA: ANVISA, 2010.	

Observações:

RESULTADO: APROVADO
DATA DE APROVAÇÃO: 03/04/2014

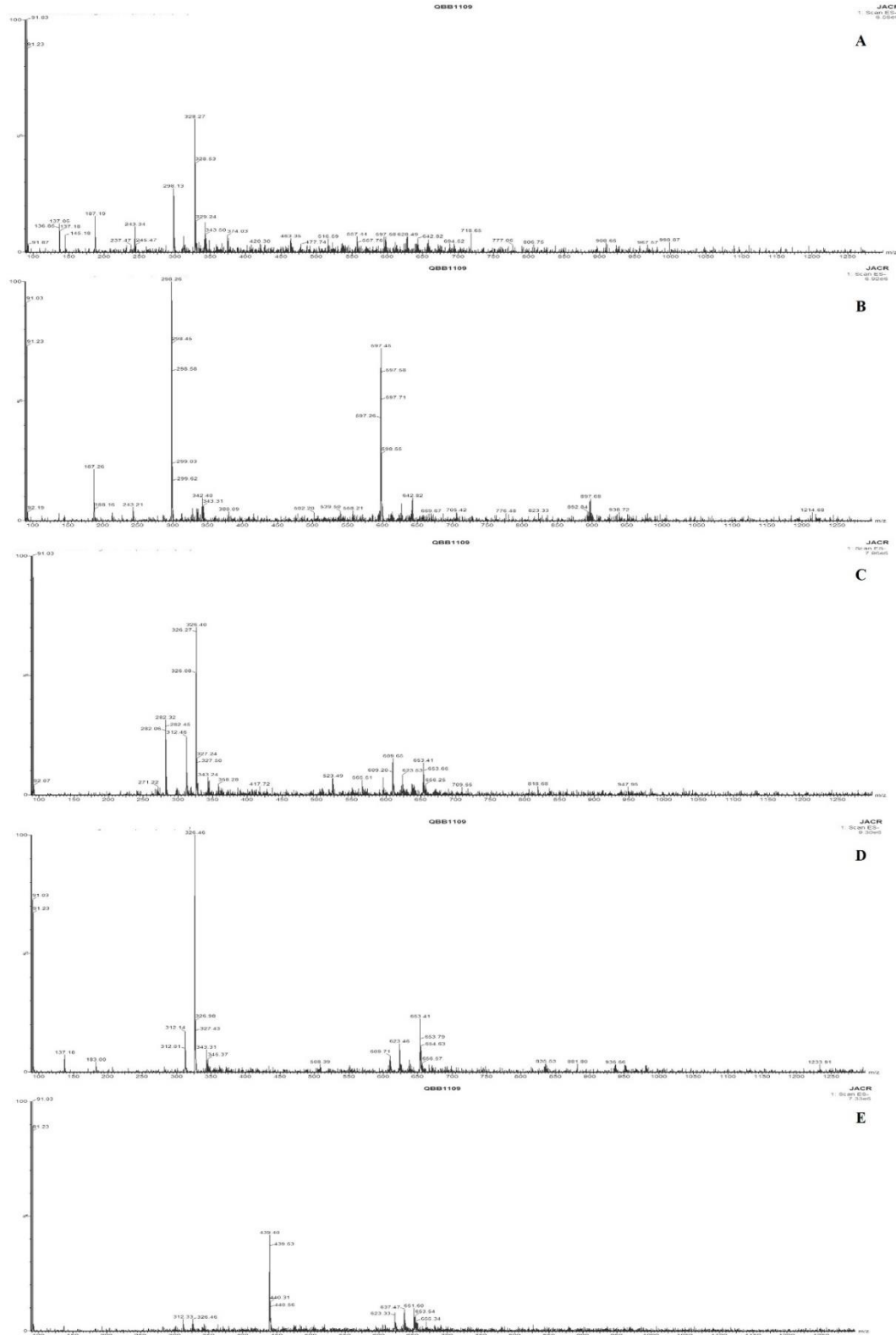

 JUCIMARA QUEIROGA JUNIA PEREIRA


 Tarciana Batista Teixeira
 Controle de Qualidade

RUA HUM - Nº: 288, B: NOVA PAMPULHA
 VESPASIANO, MG - CEP: 33200-000 - TEL: 31 3629 2000 EMAIL: CATEDRAL@GOLD.COM.BR

Attachment 2

Figure 16 - Spectra obtained by UPLC-ESI-MS, in the negative mode, for the ethyl acetate fraction of fruits of *Tribulus terrestris* enriched in cinnamic acid amides



Legend:(A) N-trans-feruloyloctopamine, (B) N-caffeoyltyramine, (C, D) terrestriamide (cis and trans isomers), and (E) terrestribisamide.