



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ACRE
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E
PÓS-GRADUAÇÃO
PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA,
INOVAÇÃO E TECNOLOGIA
PARA A AMAZÔNIA - CITA



EFEITOS DO EXTRATO HIDROALCÓLICO DE
Calycophyllum spruceanum (Benth.) Hook. F. Ex K. Schum
SOBRE O SISTEMA CARDIOVASCULAR DE RATOS
NORMOTENSOS

EDUARDO ANDRADE GONÇALVES

RIO BRANCO

2016



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ACRE
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E
PÓS-GRADUAÇÃO
PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA,
INOVAÇÃO E TECNOLOGIA
PARA A AMAZÔNIA - CITA



**EFEITOS DO EXTRATO HIDROALCÓLICO DE
Calycophyllum spruceanum (Benth.) Hook. F. Ex K. Schum
SOBRE O SISTEMA CARDIOVASCULAR DE RATOS
NORMOTENSOS**

EDUARDO ANDRADE GONÇALVES

Dissertação apresentada ao Programa de Pós- Graduação em Ciência, Inovação e Tecnologia para a Amazônia, da Universidade Federal do Acre, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Ciências. Área de Concentração: Ciência e Inovação Tecnológica.

Prof. Dr. Renildo Moura da Cunha - Orientador
Universidade Federal do Acre – (UFAC)

Profª. Dra. Clarisse Maia Carvalho – co-Orientadora
Universidade Federal do Acre – (UFAC)

RIO BRANCO – ACRE
OUTUBRO - 2016

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ACRE
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA, INOVAÇÃO E TECNOLOGIA
PARA A AMAZÔNIA

EFEITOS DO EXTRATO HIDROALCÓLICO DE
Calycophyllum spruceanum (Benth.) Hook. F. Ex K. Schum
SOBRE O SISTEMA CARDIOVASCULAR DE RATOS
NORMOTENSOS

EDUARDO ANDRADE GONÇALVES

DISSERTAÇÃO APROVADA EM: ____/____/____

Prof. Dr. Renildo Moura da Cunha (Orientador)
Universidade Federal do Acre – (UFAC)

Prof. Dr. Nilberto Robson Falcão do Nascimento
(Membro da Banca – LAFCAR/UECE)

Prof. Dr. Wagner de Jesus Pinto
(Membro da Banca – CCSD/UFAC)

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a minha mãe, pela base em que me ergui como pessoa, que sempre me incentivou a estudar e me fez descobrir a magia da leitura, a minha esposa por estar sempre ao meu lado, sempre me dando suporte quando necessário, ao meu filho “zamor”, que mesmo sem entender me deu força quando mais precisei.

AGRADECIMENTOS

Concluo este trabalho com muita alegria. Posso dizer que todas as experiências vividas foram gratificantes e que cada obstáculo ultrapassado me fez crescer como pessoa e profissional. Porém, ninguém caminha sozinho e por isto registro aqui alguns sinceros agradecimentos.

Agradeço a Deus, e aos anjos, “Veyuia”, por me guiarem nesta longa e difícil jornada. Por me guiarem nas decisões difíceis, por não me deixar sair do caminho. Obrigado Senhor por me dar saúde e sabedoria para alcançar os meus objetivos.

A professora Dra. Clarice Maia Carvalho, primeira pessoa que me recebeu no mestrado e a qual se tornou co-orientadora e me apresentou e solicitou ao meu orientador que me aceitasse nessa jornada. Obrigado pelos conselhos, pelas orientações, por toda ajuda oferecida.

Ao professor Dr. Renildo Moura Cunha, meu orientador, que nos momentos de desespero soube contornar difíceis situações. Obrigado por me apresentar a “ciência”, obrigado por sua dedicação, compromisso, paciência e principalmente pela oportunidade de fazer *pesquisa*. Tenho admiração e respeito pela pessoa e profissional que és.

A Tamires, colega de mestrado, pela qual soube que havia sido aprovado na seleção deste mestrado.

A Roberta, colega de mestrado, pela convivência e por toda ajuda oferecida.

Ao Anderson, colega de mestrado que muito me ajudou e orientou nas preparações dos extratos.

A colega de trabalho Cidy e ao seu Francisco que me orientou na secagem e trituração do extrato.

Aos colegas de mestrado Natasha e Efraim, que devido ao pouco tempo de convivência comigo, não mediram esforços em ajudar. Obrigado pelas palavras de apoio, incentivo e pela convivência.

A todos os professores do Curso de Mestrado em Ciência e Inovação Tecnológica para Amazônia, pelos conhecimentos e experiências transmitidas.

Ao Professor Nilberto Robson Falcão do Nascimento pela realização de importantes experimentos *in vivo* e aos alunos do Laboratório de Fisiofarmacologia Cardiovascular- LAFCAR da UECE, especialmente Yuri, Pedro e Gustavo que me receberam com muita atenção, deixando algumas vezes seus trabalhos para me ajudarem.

Aos professores Anselmo Ruiz e Fernando Escócio por disponibilizarem o laboratório de química para elaboração de extratos.

Ao professor Dr. Ilmar Bernardo Graebner pela elaboração das frações alcaloides do extrato e ao Angêlo, bolsista PIBIC, por todo apoio neste processo.

Ao Márcio, secretário do PPG-CITA, por toda sua presteza, atenção e convivência, obrigado.

À Universidade Federal do Acre, ao PPG-CITA pela minha formação.

Agradecimento também especial a minha esposa, por se fazer presente, quando eu estava ausente, por me levantar quando quis cair, por me alegrar quando estava triste, obrigado meu Amor, pelo apoio incondicional.

Ao meu filho Kael, que não entendia muito, porque tantos momentos ausentes e por final queria apenas que eu ficasse ao lado dele, mesmo que fosse agarrado com os livros, trabalhos e artigos. Kael papai está voltando e vamos brincar muito.

“Lembre-se sempre de olhar as coisas de uma outra maneira, o mundo parecerá diferente. Se não acreditar, veja.
Quando pensar que sabe algo, olhe de outra forma,
Mesmo que pareça tolo ou errado, deve tentar.
Nunca considere só o que pensa o autor do escrito,
Considere o que você pensa.
Tente encontrar sua própria voz.
Quanto mais demorar em procurar, mais improvável será que encontre.
Não se resigne. Liberte-se.
Não fique num canto, olhe a sua volta.
Ouse ir buscar novos campos.”

Sociedade do Poetas Mortos

RESUMO

A pesquisa etnobotânica por plantas medicinais com potencial vasoativo no tratamento da hipertensão já é largamente utilizado (ANWAR al., 2016). Trata-se de plantas que são efetivas no tratamento de doenças cardíacas como a hipertensão e angina, sendo um dos principais efeitos biológicos investigados o vasorelaxamento, sendo identificadas plantas que promoveram mais de 50% de relaxamento em anéis de aorta de ratos pré-contraídos com norepinefrina (SLISH, 1998; ADARAMOYE, 2009). Contudo, não foram encontradas referências de ensaios farmacológicos quanto ao constituinte fitoquímico com potencial ação vasolexante da espécie *Calycophyllum spruceanum*. Assim, este trabalho se propõe a investigar os efeitos cardiovasculares de doses cumulativas do extrato hidroalcoólico de *Calycophyllum spruceanum* (EHCS_F), *in vivo* e *in vitro*. **Resultados:** Os efeitos farmacológicos do EHCS_F sobre o sistema cardiovascular, foram estudados em ratos normotensos usando técnicas *in vivo* (EHCS_F- 2, 4, 6, 12, 20, 40, 60 e 120 mg/Kg) e *in vitro* (EHCS_F- 2, 7, 20, 70 e 140 µg/mL). Nos experimentos *in vivo*, com animais anestesiados, verificou-se importante efeito hipotensor. A diminuição da pressão arterial média (PAM) ocorreu de forma significativa principalmente nas doses de 40 mg/Kg (45,61 ± 3,46 mmHg), 60 mg/Kg (37,16 ± 1,16 mmHg) e 120 mg/Kg (23,25 ± 3,67 mmHg) em relação ao controle (104,7 ± 5,18 mmHg) (****p<0,0001). Esta diminuição na PAM não foi acompanhada de diminuição da frequência cardíaca (FC), pois não houve diferença estatística entre as doses e o controle, nem tampouco na pressão venosa central (PVC), Débito Cardíaco (DC) e Volume do ventrículo esquerdo (VVE). Observou-se redução nas outras variáveis: RVP nas doses de 6 mg/Kg (*p<0,05) (0,23±0,02 mmHg), 40 mg/Kg (0,11±0,02 mmHg), 60 mg/Kg (0,10±0,02 mmHg) e 120 mg/kg (0,07±0,02 mmHg) (****p<0,0001), respectivamente versus o controle (0,34±0,02), PVE 48,65±5,93 mmHg, 51,05±8,85 mmHg, 64,30±8,40 mmHg e 59,48±7,05 mmHg, 26,03±2,49 mmHg nas doses de 6 e 20 mg/Kg (** p<0,01), 40 e 60 mg/Kg (*p<0,5) e 120 mg/Kg (****p<0,0001) iv; respectivamente vs. Controle; Dp/Dt : 6570±601,2 mmHg/s, 6076±562 mmHg/s e 5847±659,2 mmHg/s, nas doses de 40 mg/Kg ***p < 0,001, 60 mg/Kg ***p< 0,001 e 120 mg/Kg ***p < 0,001, respectivamente vs Controle (10754±857,5 mmHg/s). Para os experimentos *in vitro*, o EHCS_F induziu significativamente (p<0,05) efeito relaxante (55,20 ± 15,54 %, EC₅₀ = 1,10 ± 0,21 µg/mL) em anéis com endotélio. Na presença de L-name (100 µM) o efeito vasorelaxante foi abolido. Em anéis de aorta intactos, o vasorelaxamento não foi modificado pela pré-incubação com 1 µM de atropina, (57,54 ± 12,64 %, EC₅₀ = 0,99 ± 0,14 µg/mL) ou de 10 µM de indometacina (63,09 ± 13,72 %, EC₅₀ = 0,73 ± 0,38 µg/mL). A pré-incubação de KCl 80 mM (21,49 ± 7,55%, EC₅₀ = 2,40 ± 0,09 µg/mL) ou KCl 20 mM (30,38 ± 11,66%, EC₅₀ = 1,87 ± 0,10 µg/mL), um ativador dos canais de cálcio operados por voltagem (VOCCS) em anéis sem endotélio foram estatisticamente diferentes daqueles observados em anéis com endotélio (55,20 ± 15,54 %, EC₅₀ = 1,10 ± 0,21 µg/mL). **Conclusão:** O EHCS_F induziu efeito hipotensor em ratos normotensos que, diante de nenhuma modificação do DC frente ao tratamento, parece ser inteiramente devida a queda da RVP, dada pelo efeito vasorrelaxante demonstrado em anéis de artéria aorta isolada de ratos. O NO é o principal FRDE, uma vez que a inibição da enzima na sua produção aboliu o efeito vasorrelaxante, bem como, após uso de um inibidor da via das prostaciclina e receptores muscarínicos, não foi capaz de modificar a resposta ao tratamento com EHCS_F.

Palavras chaves: *Calycophyllum spruceanum*, vasorelaxamento, artéria aorta

ABSTRACT

Ethnobotanical research on medicinal plants with vasoactive potential in the treatment of hypertension is already widely used (Anwar al., 2016). These are plants that are effective in the treatment of heart diseases such as hypertension and angina. One of the main biological effects investigated is vasorelaxation. Plants were identified that promoted more than 50% relaxation in the aorta rings of pre-contracted rats with Norepinephrine (Sligh, 1998; Adaramoye, 2009). However, no references of pharmacological tests were found regarding the phytochemical constituent with potential vasolexante action of the species *Calycophyllum spruceanum*. Thus, this work proposes to investigate the cardiovascular effects of cumulative doses of the hydroalcoholic extract of *Calycophyllum spruceanum* (EHCSF), in vivo and in vitro. Results: The pharmacological effects of EHCSF on the cardiovascular system were studied in normotensive rats using in vitro (EHCSF-2, 4, 6, 12, 20, 40, 60 and 120 mg / kg) and in vitro techniques (EHCSF-2, 7, 20, 70 and 140 µg / ml). In the in vivo experiments with anesthetized animals, an important hypotensive effect was observed. The decrease in mean arterial pressure (MAP) occurred mainly at doses of 40 mg / kg (45.61 ± 3.46 mmHg), 60 mg / kg (37.16 ± 1.16 mmHg) and 120 mg / Kg (23.25 ± 3.67 mmHg) in relation to the control (104.7 ± 5.18 mmHg) (**** p < 0.0001). This decrease in MAP was not accompanied by a decrease in heart rate (HR), as there was no statistical difference between doses and control, nor in central venous pressure (CVP), cardiac output and left ventricular volume). A reduction in the other variables was observed: RVP at doses of 6 mg / kg (* p < 0.05) (0.23 ± 0.02 mmHg), 40 mg / kg (0.11 ± 0.02 mmHg), 60 mg / kg (0.10 ± 0.02 mmHg) and 120 mg / kg (0.07 ± 0.02 mmHg) (**** p < 0.0001), respectively versus the control (0.34 ± 0.02), PVE 48.65 ± 5.93 mmHg, 51.05 ± 8.85 mmHg, 64.30 ± 8.40 mmHg and 59.48 ± 7.05 mmHg, 26.03 ± 2.49 mmHg. At doses of 6 and 20 mg / kg (** p < 0.01), 40 and 60 mg / kg (* p < 0.5) and 120 mg / kg (**** p < 0.0001) iv; Respectively. Control; Dp / Dt: 6570 ± 601.2 mmHg / sec, 6076 ± 562 mmHg / s and 5847 ± 659.2 mmHg / s at the doses of 40 mg / kg *** p < 0.001, 60 mg / kg *** p < 0.001 and 120 mg / kg *** p < 0.001, respectively vs Control (10754 ± 857.5 mmHg / s). For in vitro experiments, EHCSF induced significantly (p < 0.05) a relaxing effect ($55.20 \pm 15.54\%$, EC 50 = 1.10 ± 0.21 µg / mL) on endothelial rings. In the presence of L-name (100 µM) the vasorelaxant effect was abolished. In intact aortic rings, vasorelaxation was not modified by preincubation with 1 µM atropine, ($57.54 \pm 12.64\%$, EC 50 = 0.99 ± 0.14 µg / mL) or 10 µM indomethacin ($63.09 \pm 13.72\%$, EC 50 = 0.73 ± 0.38 µg / mL). Preincubation of 80 mM KCl ($21.49 \pm 7.55\%$, EC 50 = 2.40 ± 0.09 µg / ml) or 20 mM KCl ($30.38 \pm 11.66\%$, EC 50 = $1.87 \pm$ (VOCCS) in rings without endothelium were statistically different from those observed in endothelial rings ($55.20 \pm 15.54\%$, EC 50 = $1.10 \pm 0, 21$ µg / ml). CONCLUSIONS: EHCSF induced a hypotensive effect in normotensive rats, which, in the absence of any change in CD versus treatment, seems to be entirely due to the decrease in PVR, due to the vasorelaxant effect demonstrated in aortic artery rings isolated from rats. NO is the main FRDE, since the inhibition of the enzyme in its production abolished the vasorelaxative effect and, after use of a prostacyclin and muscarinic receptor pathway inhibitor, was not able to modify the response to treatment with EHCSF.

Keywords: *Calycophyllum spruceanum*, vasorelaxation, aortic rings

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. A influência do SRAA, na gênese da hipertensão, como influência da liberação de renina pelas glândulas supra-renais que irão converter angiotensinogênico liberado pelo fígado em angiotensina I. A ECA, enzima conversora de angiotensina, liberado pelos pulmões e fígado, converte angiotensina I em angiotensina II, que atua principalmente como um importante vasoconstritor, provovando vários efeitos a nível central e periférico.....05
- Figura 2. Mecanismos de relaxamento induzido pelo NO. GCs: guanilato ciclase solúvel, PKG: proteína quinase dependente de GMPc, RS: retículo sarcoplasmático, SERCA: Ca²⁺ ATPase do retículo sarcoplasmático, MLCK: quinase da cadeia leve da miosina, IP3: inositol 1,4,5-trifosfato, CML: célula muscular lisa..... 11
- Figura 3. Ativação dos Fatores Relaxantes Derivados do Endotélio. Mediadores neurohumorais ativando receptores que aumentam os FrDE, fatores relaxantes derivados do endotélio.....12
- Figura 4. A esquerda endotélio normal de aorta de rato, demonstrando a L-arginina (L-Arg) transformada em NO pela eNOS, incluindo inibição da LDL para oxy-LDL, o produto da reação de L-citrulina (L-Cit) inibe a formação de arginase II (AaII). A direita, endotélio de aorta com a acumulação de oxy-LDL, competidor da NO sintase, que nesta condição faz a NO sintase produza ânions superóxido (O₂⁻), que em reação com LDL, irá ser convertido em arginase do tipo II. Posteriormente o aumento do oxy-LDL, facilita a dissociação de eNOS e reduz a expressão gênica do NO.....14
- Figura 5. Fórmula estrutural do ácido 5-CQA (ácido 5-cafeolquinico) e dos ácidos que compõem os CGAs (ácidos clorogênicos).....18
- Figura 6. ECG - eletrocardiograma, AoP - pressão aórtica, LVP - pressão ventricular esquerda. A Dp/Dt máxima relaciona-se com a fase de enchimento máximo do ventrículo esquerdo levando ao aumento de pressão interna. A linha tracejada mostra o instante em que a LVP excede a AoP e ocorre a Dp/Dt Máxima.....20
- Figura 7. PRELOAD - Pré-carga, END DIASTOLIC - Final da diástole. As linhas diagonais representam o quanto o músculo miocárdio se contraiu diante da pré-carga normal, com contração sendo iniciada a partir do estiramento do ventrículo. Estabelece relação direta com o volume da pré-carga.....21

Figura 8.	Representação esquemática da preparação de coração de sapo utilizada por Otto Frank, para demonstrar as relações entre a força da contração e o volume diastólico final do ventrículo. A medida que o volume diastólico aumenta tem-se um incremento na pressão.....	22
Figura 9.	Procedimento utilizado nos experimentos <i>in vivo</i>	28
Figura 10.	Procedimento de aquisição de dados.....	29
Figura 11.	Procedimento de retirada, secção e fixação de anéis de aorta torácica. A fixação de cada anel era realizada entre dois ganhos de aço inoxidável no formato de um triângulo.....	30
Figura 12.	Procedimento de fixação e aquisição de dados. Após a fixação dos anéis de aorta torácica aos ganhos triangulares. A extremidade de um dos ganhos era fixado á uma haste fixa e a outra extremidade fixa ao transdutor, para registro da tensão.....	31
Figura 13.	Representação esquemática do protocolo experimental para estudo do efeito de concentração crescente da EHCS (Extrato hidroalcolico de <i>Calycophyllum spruceanum</i>) (2, 7, 20, 70 e 140 µg/mL) em anéis com endotélio (A) e sem endotélio (B) isolados de aorta de rato pré-contraído com 0,1 µM de FEN.....	32
Figura 14.	Representação esquemática do protocolo experimental para estudo do efeito de concentração crescente do EHCS em anéis isolados de aorta de rato pré-contraído com 0,1 µM de FEN. Antes da segunda contração induzida pela FEN foi incubado, L-name.....	33
Figura 15.	Representação esquemática do protocolo experimental para estudo do efeito de concentração crescente do EHCS em anéis isolados de aorta de rato pré-contraído com 0,1 µM de FEN. Antes da segunda contração induzida pela FEN foi incubado, Atropina.....	34
Figura 16.	Representação esquemática do protocolo experimental para estudo do efeito de concentração crescente do EHCS em anéis isolados de aorta de rato pré-contraído com 0,1 µM de FEN. Antes da segunda contração induzida pela FEN foi incubado, Indometacina.....	35
Figura 17.	Representação esquemática do protocolo experimental para estudo do efeito de concentração crescente do EHCS em anéis isolados de aorta de rato pré-contraído com 0,1 µM de FEN. A segunda contração foi induzida pela incubação, KCl 80mM ou KCl 20mM, afim de investigar a via farmacológica.....	35

Figura 18.	Efeito da administração e.v. aguda de doses crescentes do EHCS _F sobre a PAM de ratos normotensos. As barras representam a média ± EPM das variações por grupo (n=6) de animais. **** p<0,0001 vs média do grupo controle.....	37
Figura 19.	Efeito da administração e.v. aguda de doses crescentes do EHCS _F sobre a FC de ratos normotensos. As barras representam a média ± EPM das variações por grupo (n=6) de animais.....	38
Figura 20.	Efeito da administração e.v. aguda de doses crescentes do EHCS _F sobre o DC de ratos normotensos. As barras representam a média ± EPM das variações por grupo (n=6) de animais.....	38
Figura 21.	Efeito da administração e.v. aguda de doses crescentes do EHCS _F sobre a RVP de ratos normotensos. As barras representam a média ± EPM das variações por grupo (n=6) de animais. *p<0,5 e **** p<0,0001 vs média do grupo controle.....	39
Figura 22.	Efeito da administração e.v. aguda de doses crescentes do EHCS _F sobre a PVE de ratos normotensos. As barras representam a média ± EPM das variações por grupo (n=6) de animais. *p<0,5, **p<0,01 e **** p<0,0001 vs média do grupo controle.....	40
Figura 23.	Efeito da administração e.v. aguda de doses crescentes do EHCS _F sobre o VVE de ratos normotensos. As barras representam a média ± EPM das variações por grupo (n=6) de animais.....	40
Figura 24.	Efeito da administração e.v. aguda de doses crescentes do EHCS _F sobre a Dp/Dt máxima de ratos normotensos. As barras representam a média ± EPM das variações por grupo (n=6) de animais.*** p<0,001 vs média do grupo controle.....	41
Figura 25.	Efeito da administração e.v. aguda de doses crescentes do EHCS _F sobre o PVC de ratos normotensos. As barras representam a média ± EPM das variações por grupo (n=6) de animais.....	42
Figura 26.	Registro original das variáveis estudadas durante as doses cumulativas do EHCS _F . A - PVC, B - PAM, C - PVE e D - VVE.....	42
Figura 27.	Curva concentração-resposta do EHCS _F (2, 7, 20, 70 e 140 µg/mL) em anéis de aorta torácica isolada de rato normotenso com e sem endotélio, pré-contraído com 0,1 µM de FEN. Os valores representados pelos pontos expressam a média ± e.p.m. ****p<0,0001 vs E – presente.....	43

- Figura 28. Curva concentração-resposta do EHCS_F (2, 7, 20, 70 e 140 µg/mL) em anéis de aorta torácica isolada de rato normotenso com endotélio presente e incubado com L-name, pré-contráido com 0,1 µM de FEN. Os valores representados pelos pontos expressam a média ± e.p.m. ****p<0,0001 vs E – presente.....44
- Figura 29. Curva concentração-resposta do EHCS_F (2, 7, 20, 70 e 140 µg/mL) em anéis de aorta torácica isolada de rato normotenso provida de endotélio funcional e pré-contráido com 0,1 µM de FEN, - após incubação da Indometacina. Os valores representados pelos pontos expressam a média ± e.p.m.....45
- Figura 30. Curva concentração-resposta do EHCS_F (2, 7, 20, 70 e 140 µg/mL) em anéis de aorta torácica isolada de rato normotenso com endotélio pré-contráido com 0,1 µM de FEN, após incubação da Atropina. Os valores representados pelos pontos expressam a média ± e.p.m..... 45
- Figura 31. Curva concentração-resposta do EHCS_F (2, 7, 20, 70 e 140 µg/mL) em anéis de aorta torácica isolada de rato normotenso com endotélio pré-contráido com KCl 20mM. Os valores representados pelos pontos expressam a média ± e.p.m. **p<0,01 vs E – presente.....46
- Figura 32. Curva concentração-resposta do EHCS_F (2, 7, 20, 70 e 140 µg/mL) em anéis de aorta torácica isolada de rato normotenso com endotélio pré-contráido com KCl 80mM. Os valores representados pelos pontos expressam a média ± e.p.m. *p<0,05 vs E – presente.....46
- Figura 33. Curva concentração-resposta do EHCS_F (2, 7, 20, 70 e 140 µg/mL) em anéis de aorta torácica isolada de rato normotenso com endotélio pré-contráido com FEN, KCl 20mM, KCl 80mM. Os valores representados pelos pontos expressam a média ± e.p.m. *p<0,5 e **p<0,01 vs FEN.....46

LISTA DE QUADRO

Quadro 1.	Nome botânico da planta, utilização e autor.....	16
Quadro 2.	Composição da solução Kreb's Henseleit.....	26
Quadro 3.	Composição da solução com KCl 20 mM.....	26
Quadro 4.	Composição da solução com KCl 80 mM.....	27

LISTA DE ABREVIATURAS

[Ca⁺²]_i – concentração de íons cálcio intracelular

ACG - ácido clorogênico

Ach – acetilcolina

AMPc - monofosfato de adenosina cíclica

AoP - pressão aórtica

c-NOS – óxido nítrico constitutiva

Ca²⁺ - íons cálcio

CaCl₂.2H₂O - Cloreto de Cálcio

COX – ciclo-oxigenase

CQA – ácido cafeolquínico

DC - débito cardíaco

DBCA - Diretriz Brasileira para o cuidado e a utilização de animais para fins científicos e didáticos

Dp/Dt – primeira derivada da pressão pela derivada do tempo

e.p.m – erro padrão da média

ECG – eletrocardiograma

EHCS_F – extrato hidroalcolico de *Calycophyllum spruceanum* folha

eNOS - óxido nítrico sintetase endotelial

EROs - espécies reativas de oxigênio

FC – frequência cardíaca

FE - fração de ejeção

FEN – fenilefrina

GCs - guanilatociclase solúvel

GMPc - guanosinamofosfato cíclico

GTF - guanosina trifosfato

HDL-c - lipoproteínas de alta densidade do tipo c

i-NOS – óxido nítrico induzível

i.v. – intravenoso

EC₅₀ – efeito da concentração de 50%

IP3 – inositol trifosfato

KCl - Cloreto de Potássio

KH₂PO₄ - Fosfato de Potássio
L-NAME - metil ester de L-nitro-arginina
LDL-c - lipoproteínas de baixa densidade do tipo c
M₂ – receptor muscarínico cardíaco
MLCK - quinase da cadeia leve da miosina
NaCl - Cloreto de Sódio
NaHCO₃ - Bicarbonato de Sódio
NO - óxido nítrico
PAD - pressão arterial diastólica
PAM - pressão arterial média
PAS - pressão arterial sistólica
PE – polietileno
PGs – prostaglandinas
PKG - proteína cinase G
PVC - pressão venosa central
PVE - pressão do ventrículo esquerdo
ROCC's - canais de cálcio operados por receptor
RVP - resistência vascular periférica
VOCC's - canais de cálcio operados por voltagem
VS – volume sistólico
VVE - volume do ventrículo esquerdo

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	01
2. REVISÃO DA LITERATURA	04
2.1. Considerações sobre pressão arterial.....	04
2.1.1 Controle Fisiológico da Pressão Arterial.....	04
2.1.2 Controle Fisiológico da Pressão Arterial a Curto e Longo Prazo	05
2.1.3 Outras Considerações sobre a Pressão Arterial.....	06
2.1.4 Endotélio Vascular	07
2.1.4.1 Óxido Nítrico	08
2.2 Plantas medicinais com ação sobre o Sistema Cardiovascular.....	14
2.3 <i>Calycophyllum spruceanum</i> (Benth.) Hook. f. ex K. Schum	16
2.3.1 Composição química <i>Calycophyllum spruceanum</i> (Benth.) Hook. f. ex K. Schum..	17
2.3.2 Etnofarmacologia <i>Calycophyllum spruceanum</i> (Benth.) Hook. f. ex K. Schum.....	19
2.3.3 Atividades biológicas <i>Calycophyllum spruceanum</i> (Benth.) Hook. f. ex K. Schum.	19
2.4 Considerações sobre variáveis relacionadas à hemodinâmica sistêmica.....	20
2.4.1 Taxa de variação de pressão no tempo (Dp / Dt).....	20
2.4.2 Mecanismo de Frank-Starling.....	22
3. OBJETIVOS	23
3.1 Geral.....	23
3.2 Específicos	23
4. MATERIAL E MÉTODOS	24
4.1 Extrato Vegetal.....	24
4.1.2 Secagem e e trituração.....	24
4.1.3 Extração.....	24
4.2 Animais.....	25
4.3 Avaliação da toxicidade aguda oral.....	25
4.4 Soluções utilizadas.....	26
4.5 Protocolos Experimentais.....	27
4.5.1 Hemodinâmica Sistêmica.....	27
4.5.2 Avaliação do efeito vasorelaxante em anéis isolados de aorta.....	29
4.5.3 Curva concentração-resposta para a EHCS em anéis isolados de aorta de rato.....	31

4.5.4	Verificação da participação do óxido nítrico na resposta relaxante induzida pelo EHCS em anéis isolados de aorta de rato.....	33
4.5.5	Verificação da participação muscarínica na resposta relaxante induzida pelo EHCS em anéis isolados de aorta de rato.....	33
4.5.6	Verificação da participação das prostaglandinas na resposta relaxante induzida pelo EHCS em anéis isolados de aorta de rato.....	34
4.5.7	Verificação da participação dos canais de cálcio operados por voltagem (VOCC's) na resposta relaxante induzida pelo EHCS em anéis isolados de aorta de rato.....	35
4.6	Análise Estatística.....	36
5.	RESULTADOS.....	37
5.1	Efeito da administração endovenosa do EHCS _F sobre a PAM de ratos wistar normotensos.....	37
5.2	Efeito da administração endovenosa do EHCS _F sobre a FC de ratos wistar normotensos.....	37
5.3	Efeito da administração endovenosa do EHCS _F sobre o DC de ratos wistar normotensos.....	38
5.4	Efeito da administração endovenosa do EHCS _F sobre o RVP de ratos wistar normotensos.....	39
5.5	Efeito da administração endovenosa do EHCS _F na PVE de ratos wistar normotensos.....	39
5.6	Efeito da administração endovenosa do EHCS _F no VVE de ratos wistar normotensos.....	40
5.7	Efeito da administração endovenosa do EHCS _F sobre a Dp/Dt de ratos wistar normotensos.....	41
5.8	Efeito da administração endovenosa do EHCS _F sobre a PVC de ratos wistar normotensos.....	41
5.9	Variáveis Experimentais <i>in vitro</i>	43
5.9.1	Estudos com anéis de aorta torácica isolada de rato normotenso.....	43
5.9.2	Efeito relaxante do EHCS _F sobre contrações induzidas por FEN (0,1 μM) anéis de artéria aorta de ratos normotensos na presença e na ausência de endotélio funcional.....	43
5.9.2.1	Efeito relaxante da inibição da NOs sobre a resposta relaxante induzida pelo EHCS _F em anéis de artéria aorta isolada de rato normotenso provida de endotélio funcional.....	44
5.9.2.2	Efeito do antagonismo dos receptores muscarínicos e COX em anéis de artéria aorta de ratos normotensos sobre a resposta vasorelaxante induzida pelo EHCS _F	44
5.9.3	Efeito relaxante induzido pelo EHCS _F sobre contrações induzidas por KCl.....	45
6.	DISCUSSÃO.....	47
7.	CONCLUSÕES	56
8.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	57

1. INTRODUÇÃO

A tratamento de doenças através da utilização de plantas medicinais, é utilizada desde tempos mais remotos nas civilizações ocidentais e orientais, tanto no controle de pragas, quanto em mecanismos de defesa (BOLZANNI, 2006). Entende-se por plantas medicinais, qualquer planta que possa ser administrada de forma terapêutica ao homem ou animal com potencial efeito fisiológico no combate a doenças (FIRMO, 2011).

Até o século XX, o uso de plantas medicinais, mais especificamente suas propriedades biológicas eram bastante utilizadas para o tratamento de doenças (FERREIRA, 2014) e acreditava-se que tais propriedades poderiam ser reais ou ritualísticas. Isto por que ainda não havia-se explorado os mecanismos de ação de plantas medicinais (VIEGAS, 2006).

O entendimento sobre o mecanismo de ação e isolamento dos princípios ativos de plantas medicinais, já começa a ser bastante explorado pela medicina tradicional chinesa, a qual se desenvolveu com grandiosidade por vários séculos (WILLIANS et al., 2006). Um dos primeiros relatos da utilização de produtos naturais no alívio da dor foi através da ingestão de ervas e folhas (BOULZANNI et al. 2006; SOUZA et al., 2011).

Contudo, a ciência começou a avançar a partir do estudo e isolamento de constituintes químicos, em particular, a descoberta da quinina proveniente do gênero *Cinchona*, utilizado no tratamento da malária, sendo isolado em 1820, descoberto pelos cientistas franceses J.B. Avenou e J.B. Pelletier (PHILLIPSON, 2001).

A pesquisa etnobotânica de plantas medicinais com potencial vasoativo no tratamento da hipertensão já é largamente utilizado (ANWAR al., 2016). Trata-se de plantas que são efetivas no tratamento de doenças cardíacas como a hipertensão e angina, tendo sido identificadas plantas que promoveram mais de 50% de relaxamento em anéis de aorta de ratos

pré-contraídos com norepinefrina e portanto tem ação direta no sistema cardiovascular (SLISH, 1998; ADARAMOYE, 2009).

O músculo liso apresenta características fisiológicas que determinam a via farmacológica do mecanismo de ação dos constituintes presentes nas plantas medicinais. Sendo o principal efeito mediado pela via do óxido nítrico sintetase (NOS), provocando vasorelaxamento e hipotensão (SLISH et al., 2004). Vários mecanismos podem estar envolvidos, entre eles diminuição do débito cardíaco (DC) e/ou resistência vascular periférica (RVP), como por exemplo a *Sida cordifolia* Linn. (SANTOS, 2002), potente efeito bradicárdico e a *Eugenia uniflora* L. (CONSOLINI, 1999), *Orthosiphon aristatus* (MATSUBARA, 1999) e *Marrubium vulgare* (BARDAI, 2001), respectivamente com ação sobre a RVP.

O estudo da atividade biológica de diversas plantas tem contribuído para descoberta de vários mecanismos de ação farmacológica, que poderão contribuir expressivamente para o estudo da hipertensão arterial, insuficiência cardíaca, infarto agudo do miocárdio entre outras moléstias ligadas ao sistema cardiovascular, especialmente o músculo liso (ANDRADE et al., 2016).

A regulação da contração do músculo liso exerce papel fundamental na manutenção da pressão sanguínea, sendo que a hipertensão está associada a uma regulação anormal da contração do músculo liso, podendo influenciar os valores de outras variáveis fisiológicas representativas do funcionamento cardíaco, como as pressões internas do ventrículo esquerdo, e por consequência, a contração do miocárdio (SIMPLICIO et al., 2016).

Pesquisas realizadas com plantas da região nordeste identificaram potencial efeito hipotensor como *Wilbrandia verticillata*, conhecida como cabeça-de-negro e a *Sesamum indicum* conhecida como gergelim (AGRA et al., 2008). O *Calycophyllum spruceanum*, pertencente à família Rubiaceae, possui metabólitos bioativos com grande potencial farmacológico, principalmente fotoprotetor e anti-inflamatório (MARTINS, 2015).

Neste estudo, não foram encontradas referências de ensaios farmacológicos quanto ao constituinte fitoquímico com potencial ação vasoplexante da espécie *Calycophyllum spruceanum*. No entanto, MAGRINI, 2016, em seu estudo faz referência sobre os constituintes químicos derivados do ácido clorogênico, presentes também na *Calycophyllum spruceanum*, um grupo de metabólitos secundários conhecido pela sua atividade antioxidante, anti-inflamatória e também efeito hipotensor.

O presente trabalho foi desenvolvido com o objetivo de avaliar os efeitos do extrato da folha da *C. spruceanum* sobre o sistema cardiovascular e tentar elucidar os possíveis mecanismos farmacológicos envolvidos nas duas formas de abordagem: *in vivo*, através de variáveis hemodinâmicas e *in vitro*, verificando o percentual de relaxamento de anéis de aorta isolado de rato.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Considerações sobre pressão arterial

2.1.1 Controle Fisiológico da Pressão Arterial

A regulação da pressão arterial (PA), depende de fatores físicos (volume sanguíneo e a capacitância da circulação), resultando da relação direta entre débito cardíaco (DC), resistência vascular periférica (RVP) e capacitância venosa (TORTORA, 2005). É o produto do DC pela RVP. O DC = volume sistólico x frequência cardíaca (FC); e volume sistólico = volume de enchimento ventricular x força contrátil (JOHNSON, 2000; GUYTON; HALL, 2011; AIRES, 2013).

Pressão, é definida como força por unidade de área, é uma entidade física, portanto depende de fatores como volume de sangue e capacitância da circulação. Tem-se então um componente *tônico*, responsável pela manutenção e um componente *fásico* que atua momento a momento na regulação da PA. Estes componentes podem determinar ajustes apropriados na FC e contratilidade cardíacas, assim como, distribuição de fluido dentro e fora dos vasos, fundamentais para corrigir prontamente os desvios para mais e para menos dos níveis basais de pressão, em indivíduos normotensos, hipertensos ou mesmo hipotensos (YRIGOYEN et. all., 2005)

Essas variáveis fisiológicas, estão envolvidas na gênese da hipertensão. Outros fatores envolvidos como: deficiência de vasodiladores (prostaciclina e NO), peptídeo natriurético, aumento da atividade do sistema nervoso simpático, aumento inapropriado da secreção de renina que induz aumento da produção de aldosterona, angiotensina II (vasoconstritor) , que interfere diretamente nos mecanismos reflexos de controle da pressão arterial (CARVALHO et al., 2000; BATLOUNI, 2001; OPARIL et al., 2003).

2.1.2 Controle Fisiológico da Pressão Arterial a Curto e Longo Prazo

O sistema reflexo de controle da pressão arterial a curto prazo é realizado pelos baroreceptores, considerados os mais fortes receptores de controle da pressão arterial momento a momento. Possuem fibras nervosas aferentes localizados no seio carotídeo e no arco da aorta, que detectam alterações no grau de estiramento do vaso, conduzindo esta informação ao centro de integração no núcleo do trato solitário (bulbo) e parte ventro-lateral da medula espinal, onde será processado e posteriormente conduzido impulsos pela fibras nervosas eferentes que se dividem em 2 vias moduladoras de resposta: neurônios pré-ganglionares simpáticos e pré-ganglionar parassimpático (GUYTON e HALL, 2011). São influenciados diretamente pela frequência cardíaca e volume sanguíneo. É capaz de estabilizar a pressão arterial batimento a batimento, aumentando-a variavelmente. Disfunção barorreflexa tem sido reportada em severa doença cardiovascular, assim como, em experimentos envolvendo hipertensão (IRIGOYEN, 1998).

A longo prazo a regulação da pressão arterial é realizada pelo sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA). A SRAA é o resultado de uma cascata proteolítica conectada a um sistema de transdução de sinais, em que a renina é convertida em angiotensina e a partir daí uma série de eventos que podem culminar com a gênese da hipertensão, figura 1.

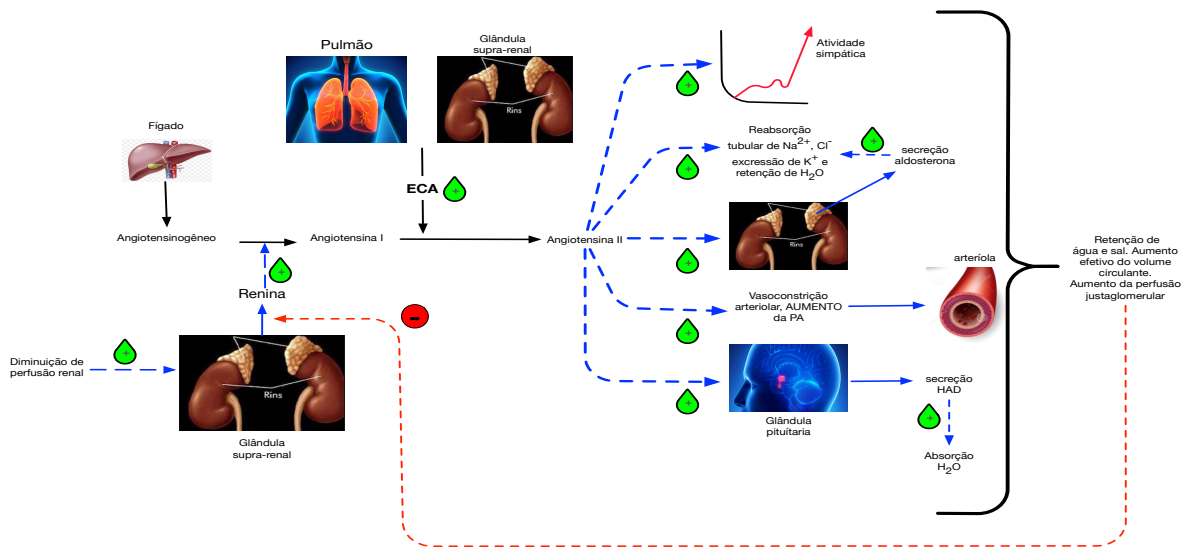


Figura 1. Sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona (SRAA)

A figura representa a influência do SRAA, na gênese da hipertensão, como influência da liberação de renina pelas glândulas supra-renais que irão converter angiotensinogênico liberado pelo fígado em angiotensina I. A ECA, enzima conversora de angiotensina, liberado pelos pulmões e fígado, converte angiotensina I em angiotensina II, que atua principalmente como um importante vasoconstritor, provovendo vários efeitos a nível central e periférico. $\color{green}\bullet$ sinal de estimulação, \ominus sinal de inibição, HAD – hormônio antidiurético. (elaborado pelo autor, 2016).

2.1.3 Outras Considerações sobre a Pressão Arterial

Os princípios que regulam a entrada e saída de sangue nos ventrículos e consequentemente sua distribuição para os vários órgãos do corpo depende do ciclo cardíaco.

Durante o período em que o músculo ventricular está relaxado, fase denominada de diástole, as pressões nas veias e nos átrios são superiores á pressão nos ventrículos, o que leva o sangue a fluir para os ventrículos, através das válvulas atrioventriculares. No entanto a pressão nas artérias periféricas diminui. Fato este que leva á caracterizar a pressão arterial diastólica, como sendo de fato baixa em relação ao sistema venoso (JOHNSON, 2003; GUYTON e HALL, 2011).

Quando a musculatura ventricular começa a se contrair, fase denominada de sístole, a pressão nos ventrículos aumenta e, no momento em que se torna superior a pressão venosa, as válvulas atrioventriculares se fecham, a pressão no lúmem ventricular excede a pressão no trajeto de saída (a aorta no caso do coração esquerdo e a artéria pulmonar no caso do coração direito), as válvulas semilunares se abrem e o sangue é ejetado. Caracterizando a pressão arterial sistólica (PAS), como alta em relação ao sistema venoso. Todavia existe uma pressão média, que ocorre entre a PAS e á PAD, e relaciona-se com o tempo que as mesmas ocorrem. (JOHNSON, 2003; GUYTON e HALL, 2011).

A pressão arterial média (PAM) é a média das pressões artérias medidas a cada milissegundo, ou seja, deve-se levar em consideração a média da pressão arterial sistólica (PAS) e pressão arterial diastólica (PAD). No entanto, a PAD determina cerca de 60% da PAM, enquanto a PAS representa 40% (GUYTON; HALL, 2011). É determinada pela seguinte equação: $PAM = PAD + [0,333 \times (PAS - PAD)]$ (TIBANA et al., 2011).

Já foi discutido anteriormente que a pressão arterial estabelece relação direta com o DC. Ou seja, se o DC diminuir isso provoca diminuição da pressão arterial e, por conseguinte diminuição da PAM. O DC é o produto da frequência cardíaca pelo volume sistólico (VS).

Variações na FC exercem surpreendentemente pequeno efeito no DC. No entanto o DC exerce influência direta sobre a PA. O mesmo ocorre com a RVP. (JOHNSON, 2000).

A resistência de um vaso está associado em parte a viscosidade do líquido, ao comprimento do tubo através do qual o líquido se desloca e por último ao raio do tubo. No final do século XVIII, um médico francês chamado Poiseuille, conseguiu agrupar todos esses fatores em constantes apropriadas e convertidas em uma fórmula, conhecida por equação de Poiseuille. Onde η é a viscosidade do líquido, l é o comprimento do tubo e r^4 é a quarta potência do raio (GUYTON; HALL, 2011).

$$R = \frac{\eta \times l \times 8}{\pi r^4}$$

2.1.4 Endotélio Vascular

O endotélio vascular é formado por uma monocamada de células achatadas, sobrepostas e com elevada taxa metabólica, que recobre a luz de todos os vasos sanguíneos, apresentando uma localização estratégica entre o sangue circulante e a camada média composta por músculo liso (NEGRÃO, 2010; GUYTON; HALL, 2011). Produz e secreta importantes compostos metabolicamente ativos que iram influenciar no desenvolvimento de várias doenças cardíacas, como a hipertensão (BATLOUNI, 2001).

Hipertensão essencial ou hipertensão de causa desconhecida representam mais de 90% dos casos de hipertensão. A doença está fortemente ligada a herança genética resultando em severas anormalidades bioquímicas. A doença é considerada poligênica e sua apresentação fenotípica dependerá do gene ou do grupo de genes envolvidos em cada caso (AMODEO e HEIMANN, 2003). O resultado pode envolver vários fatores que alteram severamente o controle da pressão sanguínea e o tempo de aparecimento da hipertensão (OPARIL, 2013).

Dentre a variedade de causas da hipertensão arterial, o endotélio surge como um dos fatores mais importantes no controle do tônus vasomotor. Pela capacidade de produzir

constituintes químicos vasoconstritores, podendo está relacionado a uma das causas da hipertensão e inibição dos vasodilatores. Controla o intercâmbio de pequenas e grandes moléculas, assim como, mantém a estrutura da parede vascular (CARVALHO, 2000).

Os primeiros autores que demonstraram a relação entre o endotélio e a vasodilatação provocada pela acetilcolina *in vivo* foi Furchtgott e Zawadisk em 1980. Demonstraram que em algumas preparações de aorta torácica isolada de coelhos, não se obtinha a vasodilatação esperada na presença da acetilcolina, ao contrário se produzia vasoconstrição. No entanto, com a preservação do endotélio vascular, obtinha-se a vasodilatação esperada, demonstrando o papel fundamental do óxido nítrico, e o efeito dependente do endotélio provocado pela acetilcolina (FURCHTGOTT et al., 1984; NEGRÃO, 2010).

A partir desta descoberta, postulou-se que o endotélio teria várias funções de grande valor científico, como modulação do tônus vascular, adesão celular, proliferação das células da musculatura lisa, resistência à formação de trombos e da inflamação da parede vascular. Estas funções estão relacionadas à capacidade de liberar e sintetizar, a partir de estímulos físicos, neurais e hormonais, várias substâncias vasoativas (óxido nítrico, prostaciclina, monóxido de carbono e fatores hiperpolarizantes), assim como, substâncias constritoras também derivadas do endotélio (endotelina-I, angiotensina-II, tromboxano, prostaglandina e espécies reativas de oxigênio) (FURCHTGOTT et al., 1999; BAHIA, et al., 2006; VANHOUTTE, 2009).

2.1.4.1 Óxido Nítrico

O óxido nítrico (NO) é um dos principais vasorelaxadores produzidos pelo endotélio, sendo sintetizado a partir a L-arginina, através da oxidação de 5 elétrons, que passa pela formação intermediária da N^G-hidroxi-L-arginina. O substrato essencial para mediar a formação de NO são ácido amino arginino, moléculas de oxigênio e nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH), principal geradora de espécies reativas nos vasos sanguíneos

(DUSSE et al., 2003; NEGRÃO, 2010). Tem importante função vasoreguladora, sobretudo, como fator de relaxamento, e vários fatores "disparam" o relaxamento provocado por substâncias produzidas pelo endotélio, sendo a tensão de cisalhamento, ou *shear stress*, e a força exercida pelo sangue como um "ativador" do óxido nítrico sintetase endotelial (eNOS) (CARDOSO et al., 1994). Esses fatores "ativadores", podem ser tanto fatores químicos quanto físicos, que ativam a eNOS, que por sua vez é responsável pela síntese do óxido nítrico, figura 2. Este por sua vez ativa a enzima guanilatociclase solúvel (GCs), que cliva guanosina trifosfato (GTF) em guanosinamono-fosfato cíclico (GMPc), a qual diminui a concentração de Ca^{+2} intracelular, acarretando vasorrelaxamento (QUEIROZ, 2010).

A formação do NO implicam em vários eventos que culminam com a diminuição do Ca^{2+} intracelular que resulta em relaxamento da musculatura lisa vascular. No entanto para este evento é necessário a ativação de ambas as proteínas, proteína cinase G (PKG) e proteína cinase A (PKA), que promovem a redução da sensibilidade dos miofilamentos contráteis ao cálcio. A PKG por sua ação sobre a miosina fosfatase acelera o processo de desfosforilação da cabeça leve de miosina (MLC) e a PKA por sua ação sobre a cinase de MLC, fosforila e diminui a afinidade ao complexo cálcio-calmodulina, figura 2 (MURAD, 1994; AKATA, 2007).

A melhor caracterização dos fatores relaxantes derivados do endotélio (FsRDE), é o óxido nítrico (NO). Várias substâncias vasoativas ativam os FsRDE, alguns mediadores neurohumorais como: ácido araquidônico, acetilcolina, histaminas, bradicininas, trombina e outras, ativam receptores específicos nas células endoteliais como M_3 , H_2 , VP_1 que ativam FsRDE e provocam relaxamento na musculatura lisa vascular, conforme demonstrado na figura 3 (VANHOUTTE et. al., 2008).

A contribuição da prostaciclina para a vasodilatação dependente do endotélio ocorre de forma reduzida, pela ação de um eicosanoide sintetizado nas células endoteliais pela ação da enzima ciclo-oxigenase com o ácido araquidônico, na via metabólica conhecida como cascata

do ácido araquidônico. Inicia-se a partir da hidrólise de um fosfolípide de membrana a fosfatidilcerina, por fosfolipase A². Assim o ácido araquidônico sob a ação da ciclooxigenase, forma as prostaglandinas (PGE² e PGI²) e tromboxanos (TBxA²). A PGE² ativa diretamente a adenilato ciclase solúvel, aumentando os níveis de AMPc (figura 2) e ativam a guanilato ciclase aumentando os níveis de GMPc. Ambos induzem relaxamento muscular e diminuição do tônus vascular (BURINI e WAIB, 1991; CARVALHO et al., 2000).

O endotélio também sintetiza substâncias vasoconstritoras, derivadas de fatores contraturantes derivados do endotélio (FsCDE), incluindo as endotelinas (potente peptídeo vasoconstritor), PGH₂, tromboxano A² (eicosanóides com efeito vasoconstritor) e angiotensina II (ocorre no plasma e em vários tecidos como rins, cérebro, músculo liso vascular e células endoteliais). Todos estes com ação vasoconstritora podendo estar envolvidos na gênese da hipertensão (BATLOUNI, 2001).

As células endoteliais comportam-se de forma dinâmica, podendo provocar vasorelaxamento por diferentes mecanismos, como os fatores hiperpolarizantes derivados do endotélio (FsHDE). Estudos sugerem que os FsHDE podem ser: metabólitos do ácido araquidônico por citocromo P450 e principalmente mediado por canais de K⁺ (URAKAMI-HARASAWA, 1997). O relaxamento provocado pelo FsHDE ocorre sem elevação dos níveis intracelulares de GMPc e de monofosfato de adenosina cíclico (AMPc) e não é bloqueado pelos inibidores da ação do NO. Este fenômeno pode envolver ativação da bomba Na⁺/K⁺, ou de canais de potássio ATP-sensitivos ou ativados por Ca⁺⁺ na membrana das células musculares lisas vasculares, ou ainda mediado pela ativação de canais de K⁺ na musculatura lisa vascular e diminuindo a concentração de Ca²⁺ no interior dessa musculatura (BATLOUNI, 2001).

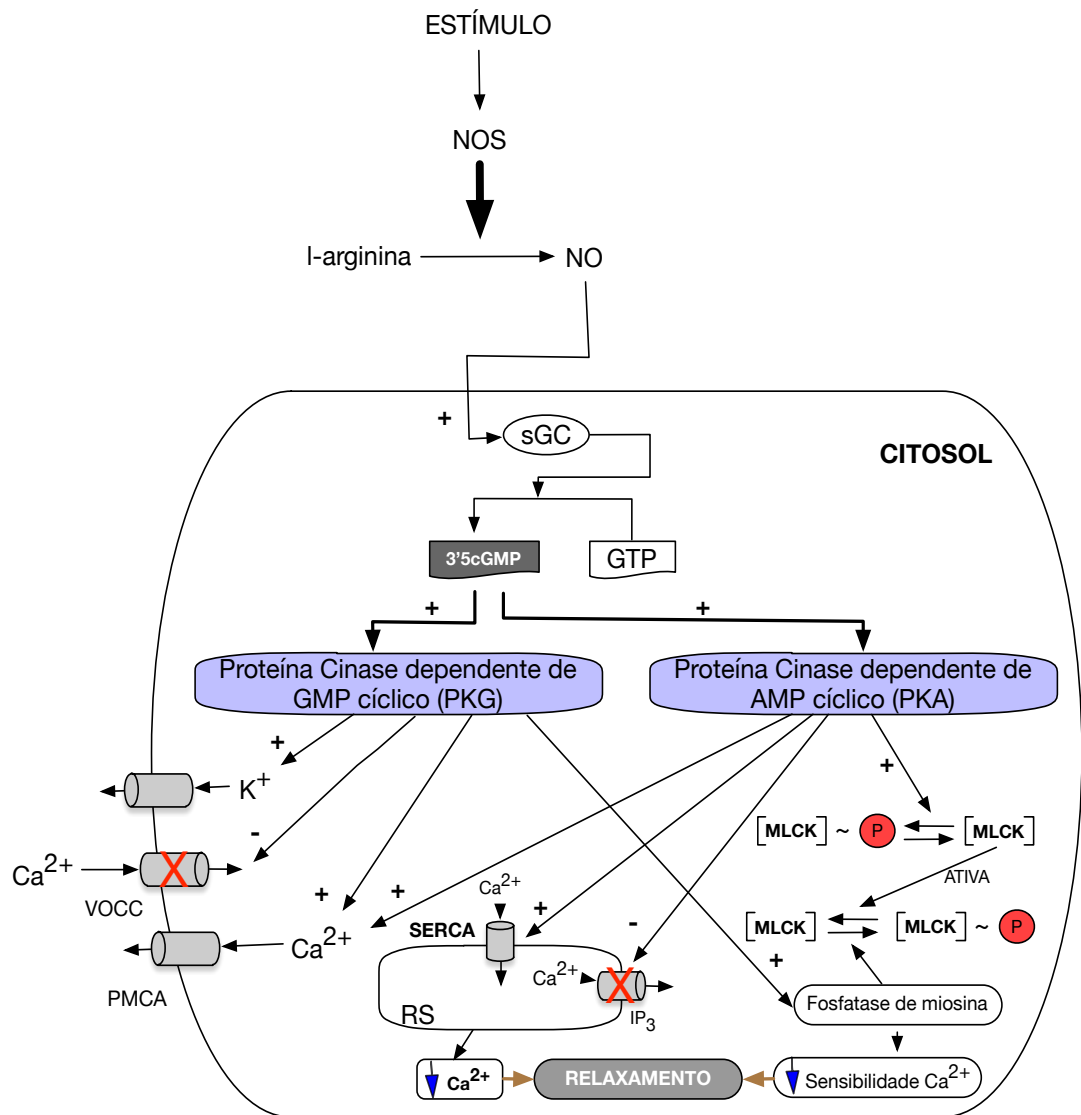


Figura 2. Mecanismo de ação do óxido nítrico

A figura representa o relaxamento da célula muscular lisa vascular como resultado da ação direta de substâncias que estimulam a inibição do mecanismo contrátil, como, por exemplo, via ativação da GC, tendo como resultado a formação dos nucleotídeos cíclicos GMPc, que consequentemente ativam as proteínas cinases PKG e PKA. Estas promovem redução da concentração intracelular de Ca²⁺, via ativação de canais de K⁺ presentes na membrana plasmática, inibição da liberação de Ca²⁺ do retículo sarcoplasmático via receptor de IP, inibição direta dos canais para cálcio operados por voltagem, ativação das Ca²⁺ ATPases presentes na membrana do retículo sarcoplasmático e na membrana plasmática e aumento da atividade da miosina fosfatase promovendo, assim, o relaxamento vascular. Sinal positivo indica estimulação; sinal negativo indica inibição; AMP, adenosina monofosfato; ATP, adenosina trifosfato; 3',5'-cAMP adenosina monofosfato cíclico; GC, guanilil ciclase; GMP, guanosina monofosfato; 3',5'-cGMP, guanosina monofosfato cíclico; IP 3 R, receptor de IP 3; MLCK, cinase de cadeia leve da miosina; 2⁺ PDE, fosfodiesterase; NO, óxido nítrico, PMCA, Ca²⁺-ATPase da membrana plasmática; SERCA, Ca²⁺-ATPase do retículo sarcoplasmático; RS, retículo sarcoplasmático; sGC, guanilil ciclase solúvel; VOCC, canal para Ca operado por voltagem; PKG, proteína cinase G; PKA, proteína cinase A; Fonte: Adaptado de Akata (2007).

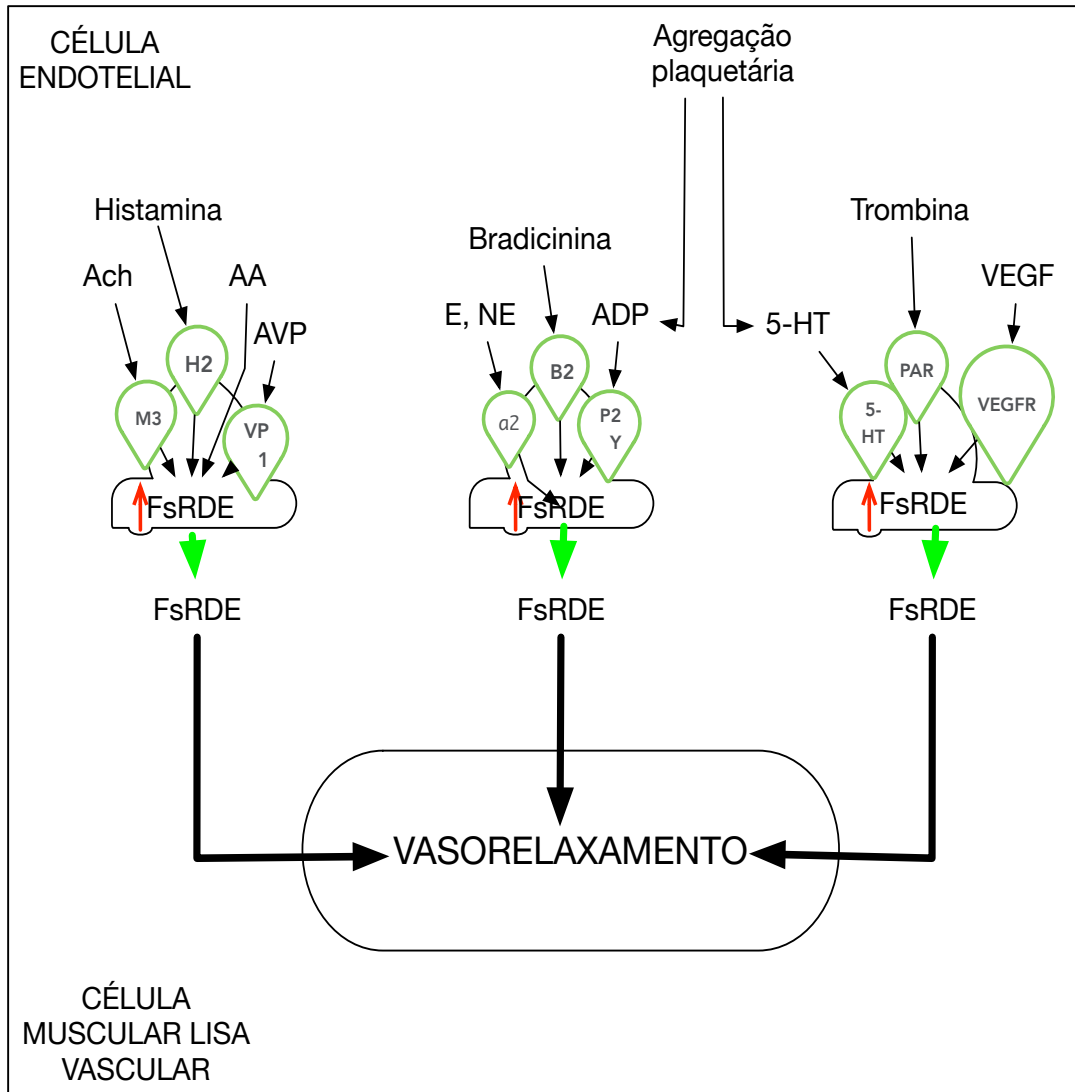


Figura 3. Ativação dos Fatores Relaxantes Derivados do Endotélio

Mediadores neurohumorais ativando receptores que aumentam os FrDE, fatores relaxantes derivados do endotélio; Ach, acetilcolina; AA, ácido araquidônico; AVP, arginina vasopressina; E, epinefrina; NE, norepinefrina; ADP, adenosina difosfato; 5-HT, serotonina (5-hidroxitriptamina), receptor serotoninérgico; M, receptor muscarínico; α , receptor adrenérgico; H, receptor histaminérgico; VP, receptor vasopressina; B, receptor quinina; P, receptor purinérgico; VEGF, fator vascular de crescimento endotelial. (Adaptado de VANHOUTTE et. all., 2008).

Em condições fisiológicas os mediadores humorais ativam receptores nas células endoteliais da musculatura lisa e favorecem o aumento dos FRDE, provocando assim, vasorrelaxamento, sendo promovido principalmente pelo óxido nítrico. A biossíntese do NO, é feito pela NO sintase endotelial (NOSe), que é ativada principalmente pelo aumento na concentração de Ca^{2+} (ALDERTON et. all., 2001).

Em condições patológicas, como na hipertensão arterial, pode haver uma atenuação dos efeitos vasodilatadores do endotélio. Essa diminuição aparente do efeito vasorelaxante é chamada de disfunção endotelial. Os mecanismos envolvidos na disfunção endotelial encontradas na hipertensão são multifatoriais, contudo os seguintes mecanismos parecem está fortemente relacionados: 1) diminuição na liberação de NO, prostaciclina e/ou FrDE; 2) diminuição da sensibilidade do músculo liso ao NO e 3) disfunção da via mediadores neurohumorais → receptores (figura 3) (CARVALHO et, all., 2001).

Outro importante fator, influenciador da disfunção endotelial, capaz de contribuir para gênese da hipertensão arterial e várias outras doenças cardíacas, seria a estimulação da arginase do tipo II, uma enzima que transforma a L-arginina em uréia e L-ornitina. Estão expressas principalmente nas mitocôndrias de células do rim, próstata, trato gastrointestinal e vasos. Competem com a eNOS, pelo mesmo substrato, a L-arginina. Acredita-se que um desbalanço entre a expressão e a atividade das arginases e da eNOS possa ser uma das causas para a disfunção endotelial, figura 4 (VANHOUTTE et. all, 2008). Diversos fatores afetam a regulação da arginase, como: fatores inflamatórios (lipopolissacarídeos, fator de necrose tumoral (TNF- α), interferon- γ , interleucinas dentre outros), subprodutos do estresse oxidativo (H_2O_2 , peroxinitrito), hipóxia, angiotensina II) (CHAGAS et. all., 2005)

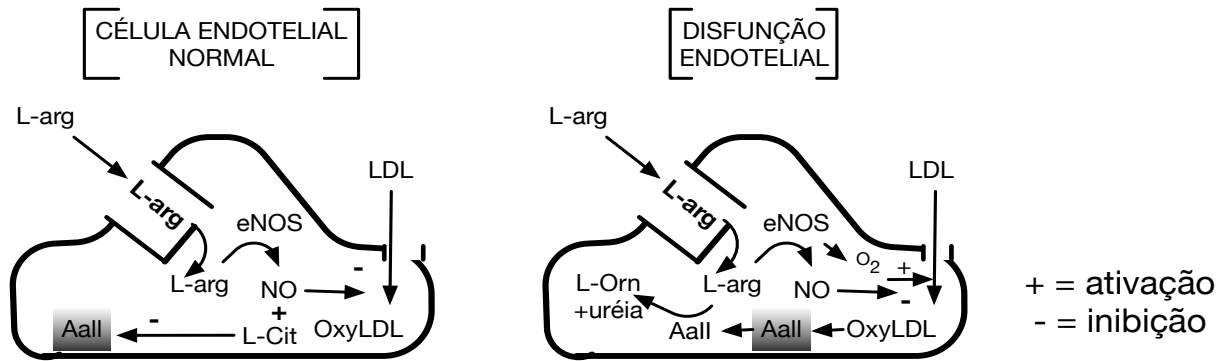


Figura 4. Modelo de disfunção endotelial

A esquerda endotélio normal de aorta de rato, demonstrando a L-arginina (L-Arg) transformada em NO pela eNOS, incluindo inibição da LDL para oxy-LDL, o produto da reação de L-citrulina (L-Cit) inibe a formação de arginase II (AaII). A direita, endotélio de aorta com a acumulação de oxy-LDL, competidor da NO sintase, que nesta condição faz a NO sintase produza ânions superóxido (O₂⁻), que em reação com LDL, irá ser convertido em arginase do tipo II. Posteriormente o aumento do oxy-LDL, facilita a dissociação de eNOS e reduz a expressão gênica do NO. (Adaptado de VANHOUTTE et. all., 2008).

2.2 Plantas medicinais com ação sobre o Sistema Cardiovascular

As plantas com compostos bioativos sobre o sistema cardiovascular, com potencial efeito biológico, em especial o efeito hipotensor, que age produzindo vasorrelaxamento ou ainda, diminuindo o efeito de contratilidade da musculatura lisa vascular, a partir de investigações dos constituintes químicos presentes nas plantas (REIS, 2015).

Várias drogas foram descobertas a partir do isolamento de constituintes químicos provenientes de produtos naturais com agente medicinal no sistema cardiovascular, como digoxina da planta *Digitalis lanata* por Claude-Adophe Nativelle, atropina (antagonista muscarínico) da planta *Atropa belladonna* descoberta por Mein em 1831, a cafeína obtida por Runge em 1820 da *Coffea arabica*, sendo espécies que tem uso clínico até os dias atuais (FIGUEIREDO et al., 2007). A medicina tradicional fez uso deste potencial biológico encontrado nas mais diversas plantas, para o tratamento de várias doenças do sistema cardiovascular (CALIXTO E SIQUEIRA JR., 2008).

A grande maioria dos estudos realizados *in vitro* busca explicação dos mecanismos de ação dos compostos químicos das plantas, utilizando anéis de aorta ou artéria mesentérica, pré-contráida com fenilefrina, vasoconstritor com mecanismo de ação conhecido, e a partir desse efeito se utiliza os compostos químicos, isolados ou não, originados a partir da planta escolhida (SLISH, 1998).

Espera-se que os constituintes químicos presentes nas plantas estejam relacionados ao controle da pressão arterial alta já instalada ou ainda na prevenção de sua elevação. Especificamente, tem-se o tratamento não-farmacológico ou ainda mudanças no estilo de vida como principal medida no tratamento da hipertensão, salvo os casos graves de hipertensão ou quando a doença compromete órgãos-alvo, é imperativo o uso de medicamentos (OLIVEIRA; ARAÚJO, 2007).

As plantas medicinais com efeito no sistema cardiovascular, não é exclusivo deste sistema. Haja vista que no extrato ou óleo essencial, tem-se a presença de vários compostos químicos com efeitos diversos em vários outros órgãos, como por exemplo a *Curcuma longa*, que além de efeito vasorelaxante, tem efeito anti-microbiano, hepatoprotetor, hipoglicemiante, neuroprotetor e anti-hemolítico (ADARAMOYE et al., 2009). Outra planta com efeito no sistema cardiovascular, o gênero *Passiflora* está presente em vários países como Índia, México, América do Sul, Itália e Argentina, em especial *Passiflora nepalensis*, bastante utilizado na medicina folclórica para hipertensão e inflamação (PATEL et al., 2010). Neste contexto, algumas plantas da Bolívia, como *Bactaris genistelloides* (carqueja) também é utilizada no combate a hipertensão e diabetes (MACÍA et al., 2005).

São muitas as plantas com atividade no sistema cardiovascular, estas contem metabólitos secundários que promovem relaxamento vascular e outros efeitos orgânicos. O efeito vasorelaxante foi significativo quando comparado com aquele provocado pela acetilcolina (vasodilatação endotélio-dependente). A fim de avaliar o efeito vasorelaxante de

plantas medicinais, Slis (1998) e Ibarra-Alvarado (2010) realizaram ampla pesquisa através de ensaios *in vitro* e identificaram várias espécies com esta atividade (Quadro 1).

Quadro 1. Nome botânico da planta, utilização e autor.

Planta	Utilização	Autor
<i>Dalberbia glabra</i> <i>Trichiliahavanensis</i> <i>Phytolaccarivinoides</i> <i>Burserasimaruba</i> <i>Cupania belinesis</i> <i>Chamguava gentlei</i> <i>Alseis yucantanesis</i>	vasorelaxante	Slis (1998)
<i>Agastache mexicana</i> <i>Chenopodiummurale</i> <i>Chirantodendronpentadactylon</i> <i>Dracocephalummoldavica</i> <i>Psittacanthuscalyculatus</i> <i>Prunusserotina</i> <i>Psittacanthuscalyculatus</i> <i>Sechiumedule</i> <i>Solanumrostratum</i>	doenças cardíacas anti-hipertensiva e antidiarréica doenças cardíacas e nervosas doenças cardíacas anti-hipertensivo antiarrítmico anti-hipertensivo anti-hipertensivo anti-hipertensiva e antidiarréica	Ibarra-Alvarado (2010)

Diversos relatos são encontrados na literatura sobre plantas com ação sobre o sistema cardiovascular, entretanto, com *Calycophyllum spruceanum*, não foi encontrado estudos que avaliasse o efeito vasorelaxante desta planta sobre o sistema cardiovascular. No entanto a *Alseis yucatanensis* pertencente a mesma família e subfamília de *Calycophyllum spruceanum*, foi realizado um trabalho com anéis de aorta de ratos e verificou-se alta capacidade de relaxamento, indicando que esta planta pode apresentar também esta atividade (SLISH, 2004).

2.3 *Calycophyllum spruceanum* (Benth.) Hook. f. ex K. Schum

Calycophyllum spruceanum pertence a família das Rubiaceae, sendo mais concentrada na região dos trópicos. É uma espécie natural da região amazônica, conhecida no Brasil como

pau-mulato, pau-mulato-de-várzea, escorrega-macaco e pau-marfim. No Peru, é conhecida como capirona, caprina de bajo ou capirona negra (SANTOS, 2016).

A família Rubiaceae esta dividida em quatro subfamílias: Rubioideae, Cinchonoideae, Antirheoideae e Ixoroideae. No entanto, mais recentes estudos sugerem que podem ser divididas em três subfamílias: Rubioideae, Cinchonoideae e Ixoroideae. A espécie *Calycophyllum spruceanum* é pertencente a subfamília Ixoroideae, ao gênero Condamineae (MARTINS, 2015).

É uma espécie natural da região amazônica e também encontrada na Bolívia, Colômbia, Equador e Peru. No Estado do Acre é encontrado em zonas de capoeiras altas ou inundáveis, campos de pastagens e áreas degradadas (ALMEIDA, 2003). É uma árvore densa ($0,78 \text{ g/cm}^3$), atinge entre 20 e 35 m de altura, 0,7 á 1,8 m de altura do peito, diâmetro da copa entre 4 e 5 m, com tronco retilíneo, casca fina de coloração esverdeada a qual se torna marrom ou castanho-maduro quando madura (SANTOS, 2016).

2.3.1 Composição química da *Calycophyllum spruceanum*

Esta ampla família é composta de classes de metabólitos secundários com alto potencial farmacológico. Estão presentes iridóides, antraquinonas, triterpenos e alcalóides indole. Outros constituintes como os flavonóides também estão presentes, além de derivados fenólicos e terpenóides. Especificamente na *Calycophyllum spruceanum* foram isolados, de casca e galhos, os seguintes constituintes químicos α -felandreno, acetato de hexila, ρ -cimeno; limoneno; β -ocimeno; cis-óxido de linalol (furanóide); trans-óxido de linalol (furanóide); linalol; nonanal; hexanoato de butila, α -terpineol, 2-metilburanoato de hexila; ρ -anisalaldeído; safrol; hexanoato de hexila; β -cariofileno, (E,E)- α -farneseno; dilapiol (ZULETA et al., 2003; ARAÚJO et al., 2007).

Dentre os compostos fenólicos, em especial o ácido clorogênico, tem indicado ter potencial atividade biológica antioxidante e efeito hipotensor (MAGRINI, 2016).

Os compostos fenólicos produzem os derivados do ácido clorogênico, que abrangem compostos a partir da esterificação do ácido quinico. Constituindo um grupo de cinco principais compostos fenólicos (ácido cafeoilquínico, ácido cafeoilferuloilquínico, ácidos *p*-cumaroilquínico, ácidos feruoilquínico e ácidos dicafeoilquínico) que tem ação hipotensora no sistema cardiovascular, figura 5 (GARABONE; ROSA, 2000; SUZUKI et al., 2006; MAGRINI, 2016).

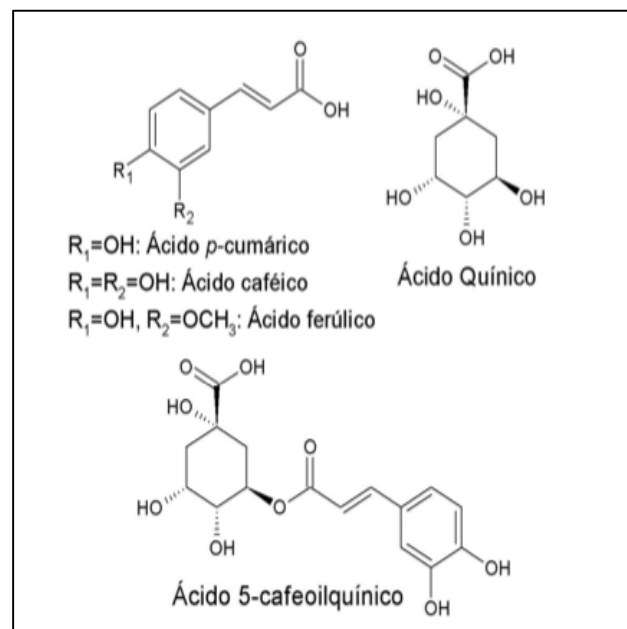


Figura 5. Fórmula estrutural do ácido 5-CQA (ácido 5-cafeolquínico) e dos ácidos que compõem os CGAs (ácidos clorogênicos) (OLIVEIRA e BASTOS, 2011).

A implicação do ácido clorogênico na prevenção de doenças cardiovasculares ainda não está bem esclarecido, sendo verificado que este reduziu a pressão arterial em ratos hipertensos geneticamente, sendo esta ação dependente do endotélio. Os mecanismos envolvidos ainda não foram totalmente elucidados, contudo, parece estar envolvido com o aumento da bioviabilidade do óxido nítrico, um potente vasodilatador. Acredita-se que tenha uma ação protetora sobre óxido

nítrico sintetase endotelial (eNOS), já que o efeito hipotensor em animais geneticamente hipertensos foi inibido quando tratados com inibidores da NOS (SUZUKI, 2006).

2.3.2 Etnofarmacologia da *Calycophyllum spruceanum*

Calycophyllum spruceanum é tradicionalmente utilizada para o tratamento de diversas doenças da pele entre outras, incluindo micoses, influenza, diversas infecções, câncer e outras doenças típicas da “Amazônia legal”, incluindo Brasil, Peru, Bolívia e Colômbia (ZULETA et al., 2003). No Brasil, também é utilizada para o tratamento de doenças estomacais, tumores e inflamações do útero (SANTOS et al., 2016).

Quanto ao efeito fotoprotetor, acredita-se que este deve-se a presença de flavonoides e taninos presente nesta espécie, responsável por altas taxas de absorvidade, resultando em fator de proteção solar mais efetivo (MELO, 2015).

Muito se tem estudado sobre o efeito antioxidante desta espécie e verificou-se que as espécies reativas de oxigênio podem causar danos oxidativos em reações com quase todas as moléculas. Participando da patogênese de várias doenças como câncer, aterosclerose e hipertensão. Em geral a presença de polifenóis, presente na *Calycophyllum spruceanum* parece esta relacionada ao potencial antioxidante (VARGAS et al., 2016)

2.3.3 Atividades biológicas da *Calycophyllum spruceanum*

A principal ação biológica conferida aos constituintes químicos mais estudados da *Calycophyllum spruceanum* que são os metabólitos, tanino e fenóis, estão relacionados ao retardo do envelhecimento celular e fotoproteção por ação antioxidante (SANTOS et al., 2016).

Em outro estudo, foi isolado o constituinte químico (3-(4,5-dimetiliazol-2ul)-2,5-difenil bromide de tetrazoline), e verificado atividade contra a leishmania. Também avaliado atividade antimalarial *in vivo*, o que determinou a supressão em 4 dias, e antibacteriana contra

Mycobacterium tuberculosis mostra-se como promissor para o tratamento (MOREIRA et al., 2015).

2.4 Considerações sobre variáveis relacionadas à hemodinâmica sistêmica

2.4.1 Taxa de variação de pressão no tempo (Dp / Dt)

A Dp/Dt, também intitulado de primeira derivada temporal da pressão ventricular, é um dos parâmetros mais utilizados para avaliação da função ventricular esquerda (BARGIGLIA, 1989; OKOSHI, 1995). Reflete o recrutamento máximo de miofibrilas na fase de contração isovolumétrica ventricular, ou seja, quando ambas as válvulas mitral e aórtica encontram-se fechadas (CASTILLO;HERSZKOWICZ, 2011).

A fase de contração isovolumétrica é fase em que os ventrículos estão se contraindo, mas ainda não ocorreu o esvaziamento, portanto está submetido a altas pressões, haja vista, que imediatamente antes de ocorrer a contração isovolumétrica, os ventrículos estavam submetidos a baixas pressões (GUYTON; HALL, 2011). O gradiente criado entre o período que antecede a fase contração isovolumétrica e a contração propriamente dita, pelo tempo gasto é denominado de Dp/Dt (CASTILLO;HERSZKOWICZ, 2011). A Dp/Dt máxima ocorre devido as mudanças de pressão na câmara interna do ventrículo esquerdo, influenciadas diretamente pelo volume de sangue e abertura ou fechamento da válvula aórtica, conforme demonstrado na Figura 6.

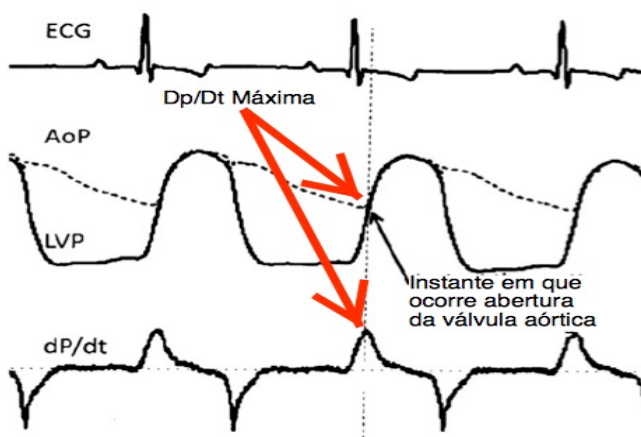


Figura 6. ECG - eletrocardiograma, AoP - pressão aórtica, LVP - pressão ventricular esquerda. A Dp/Dt máxima relaciona-se com a fase de enchimento máximo do ventrículo esquerdo levando ao aumento de pressão interna. A linha tracejada mostra o instante em que a LVP excede a AoP e ocorre a Dp/Dt Máxima. (Adaptado de HAMLIN; RIO, 2012).

Na década de 60 e 70, este índice foi largamente utilizado para avaliar a capacidade inotrópica do coração, contudo está variável parece ter aplicação prática limitada (OKOSHI et al., 1999). O inotropismo representa a força de contração exercida pelo coração em relação aos valores previstos. Assim, quando o coração interage com as mais diversas drogas o seu desempenho pode alcançar valores além ou aquém do previsto. Diz-se que o inotropismo foi positivo ou negativo quando o desempenho aumenta ou diminui, respectivamente, em relação aos parâmetros previstos (TORTORA, 2002; SANTOS et al., 2008).

Existem alguns fatores que podem influenciar a Dp/Dt , como a pré-carga, pós-carga e hipertrofia miocárdica (FIORETO, 1996). Contudo, experimentos tem demonstrado a influência de outro fator como o mecanismo de Frank-Starling, haja vista, que não existe interdependência entre o mecanismo de Frank-Starling e a contratilidade miocárdica, e portanto as variações da Dp/Dt podem estar associadas a modificações da pré-carga. (BRAGAGNOLLO et al., 1992). Pré-carga é considerada como sendo a pressão diastólica final, que por sua vez estabelece relação direta com o retorno venoso. O músculo inicia a contração a partir do estiramento provocado pela quantidade de sangue que retornou ao lado direito do coração, ou seja, determinado pela pré-carga, de acordo com a Figura 7 (ROSS, 1983; GUYTON; HALL, 2011; SOLARO, 2011; AIRES et al., 2013).

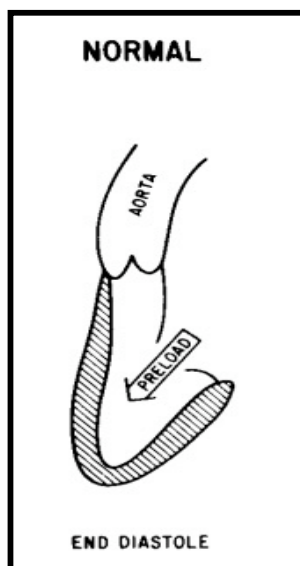


Figura 7. PRELOAD - Pré-carga, END DIASTOLIC - Final da diástole. As linhas diagonais representam o quanto o músculo miocárdio se contraiu diante da pré-carga normal, com contração sendo iniciada a partir do estiramento do ventrículo. Estabelece relação direta com o volume da pré-carga (Adaptado de ROSS, 1983).

Em estudo realizado por Rodrigues,2008, observaram uma relação positiva entre Dp/Dt e fração de ejeção (FE). Avaliaram que quanto maior a contratilidade do ventrículo esquerdo, maior era a FE e conseqüentemente aumentava a Dp/Dt . Com isso, teoricamente, pôde-se inferir que maior contratilidade pode estar relacionado positivamente com aumento do volume ventricular esquerdo, que gerou aumento da FE. Nesse estudo não foi mencionado sobre possíveis influências relacionado ao mecanismo de Frank-Starling.

2.4.2 Mecanismo de Frank-Starling

O mecanismo de Frank-Starling conhecido como mecanismo cardíaco de Frank-Starling afirma que quanto mais o miocárdio se distender durante a fase de enchimento maior será a força contração. Ou seja, quanto maior for o volume ventricular, maior será quantidade de sangue bombeado para aorta (GUYTON; HALL, 2011). Ou seja, o coração é capaz de alterar seu estado contrátil dentro de uma larga escala, e variar sua capacidade de encurtar e desenvolver tensão, em função de seu comprimento de repouso (AIRES et al., 2013).

Teoricamente, aumentos de volume ventricular provocam aumentos de pressão intraventricular e, portanto maior quantidade de sangue bombeado. A Figura 8, expressa este evento, demonstrando o gradiente de pressão gerado entre a diástole e a sístole (JOHNSON, 2000).

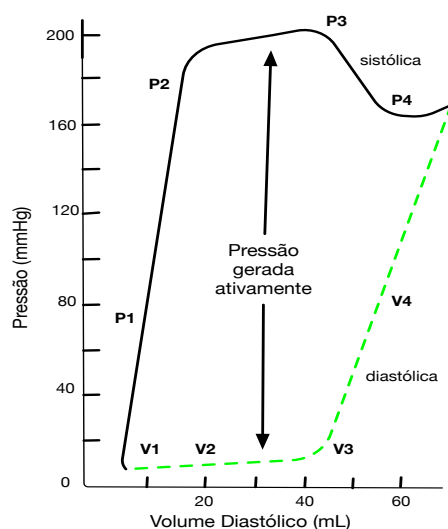


Figura 8. Representação esquemática da preparação de coração de sapo utilizada por Otto Frank, para demonstrar as relações entre a força da contração e o volume diastólico final do ventrículo. A medida que o volume diastólico aumenta tem-se um incremento na pressão (Adaptado de JOHNSON, 2000).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar os efeitos do extrato hidroalcoólico de *C. spruceanum* (EHCSF) sobre o sistema cardiovascular de ratos normotensos.

3.2 Objetivos Específicos

3.2.1 Avaliar por meio de abordagens experimentais, *in vivo*, os efeitos do extrato hidroalcoólico da espécie *Calycophyllum spruceanum*, na pressão arterial, frequência cardíaca, pressão do ventrículo esquerdo, volume do ventrículo esquerdo, pressão venosa central e Dp/Dt em ratos normotensos;

3.2.2 Analisar *in vitro* os efeitos do extrato hidroalcoólico da espécie *Calycophyllum spruceanum* sobre a contratilidade de preparações de aorta isolada de ratos normotensos;

3.2.3 Analisar *in vitro* as possíveis vias farmacológicas de redução do percentual de contração do extrato hidroalcoólico da espécie *Calycophyllum spruceanum*.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Extrato Vegetal

Foi utilizado extrato hidroalcolico de folhas da espécie *Calycophyllum spruceanum* com excicata depositada Herbário da Universidade Federal do Acre com número 20307, cedido pelo laboratório de Fisiofarmacologia da Universidade Federal do Acre - UFAC.

4.1.2 Secagem e Trituração

O material vegetal fresco (folhas) foi seco em estufa a 45 °C e posteriormente triturado em moinho tipo lâmina, no Laboratório da Unidade de Tecnologia de Alimentos (UTAL) da Universidade Federal do Acre. Foi realizada a pesagem do material antes e após cada procedimento precedente à extração. Também foi feita a pesagem do extrato após liofilizado.

4.1.3 Extração

Os extratos hidroalcolicos de *Calycophyllum spruceanum*, folha (EHCS), foram elaborados através do método de percolação, onde o material foi imerso em solvente extrator hidroalcolico a 70% (setenta por cento), com volume suficiente para cobrir o material vegetal, em recipiente fechado por 72 (setenta e duas) horas à temperatura ambiente, sendo que a cada 24 horas realizou-se a filtragem do extrato e novamente acrescido solvente ao material vegetal. Ao fim das 72 horas o filtrado foi concentrado em evaporador rotativo a 45°C. Ao final da evaporação o material foi liofilizado e mantido sob refrigeração (RODRIGUES et. al, 2011).

4.2 Animais

Foram utilizados em todos os experimentos ratos Wistar machos, de 2 a 3 meses de idade, pesando entre 200 e 350 g, proveniente do biotério da Universidade de Fortaleza (UNIFOR) e Universidade Federal do Ceará (UECE), manipulados de acordo com os padrões estabelecidos pelo Comitê de Ética no Uso de animais da Universidade Federal do Acre, experimentos *in vitro* com Registro nº78/2015, e Comitê de ética para uso de animais da Universidade Estadual do Ceará, experimentos *in vivo*, sob processo de número 23107.015630/2015-81. Os animais foram mantidos sob condições constantes de temperatura ($21 \pm 1^\circ\text{C}$) em um ciclo claro-escuro de 12 horas (6:00 às 18:00 hs), e com livre acesso à comida e água. Todos os procedimentos usados no presente estudo foram conduzidos de acordo com as orientações éticas do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal – CONCEA, seguindo a Diretriz Brasileira para o cuidado e a utilização de animais para fins científicos e didáticos - DBCA dos princípios éticos de experimentação animal, a fim de minimizar o sofrimento dos animais e usar somente o número necessário de animais para obter-se resultados confiáveis. Todos os sais e reagentes a serem utilizados são de pureza analítica e foram obtidos da Sigma-aldrich (Saint-Louis, MO, USA).

4.3 Avaliação da toxicidade aguda oral

A avaliação da toxicidade aguda oral foi realizada de acordo como previamente descrito (VALADARES, 2006; OECD, 2001) com a finalidade de avaliar o efeito dos extratos da folha de *Calycophyllum spruceanum* sobre os parâmetros fisiológicos comportamentais. Foi administrada a dose de 2000 mg/kg e na ausência de letalidade ou toxicidade, foi administrada a dose de 5000 mg/kg. O grupo controle recebeu solução salina 0,9% (v.o.). Os animais foram observados durante os primeiros 180 minutos. Após as três horas de observação, os animais voltaram a receber ração e água e foram observados a cada 12 h durante 3 dias. Os parâmetros

comportamentais observados foram: atenção, alerta, analgesia, atividade motora espontânea, locomoção, sedação, micção, diarreia, convulsão, coma e morte, descritos por Almeida et al (1999). No final dos experimentos, os animais foram eutanasiados com dose tóxica de anestésico.

4.4 Soluções utilizadas

Todas as soluções foram aeradas com uma mistura carbogênica contendo concentrações de 95 % de O₂ e 5 % de CO₂ e mantidas à 37 °C (pH = 7,4). No preparo do KCl (80 mM) e KCl (20 mM), manteve-se a mesma composição do restante da solução. As concentrações abaixo são para pregações de 1 litro.

QUADRO 2. COMPOSIÇÃO DA SOLUÇÃO KREB'S HENSELEIT. GUEDES ET AL., 2004.

Substância	Nome	Concentração (mM)
NaCl	Cloreto de Sódio	114
NaHCO ₃	Bicarbonato de Sódio	25,0
KH ₂ PO ₄	Fosfato de Potássio	1,2
CaCl ₂ .2H ₂ O	Cloreto de Cálcio	2,7
KCl	Cloreto de Potássio	4,9
MgSO ₄ .7H ₂ O	Sulfato de Magnésio	0,58
Glicose		11,1

QUADRO 3. Composição da solução KCl 20 mM. Adaptado de Tanaka et al., 1999.

Substância	Nome	Concentração (mM)
NaCl	Cloreto de Sódio	114,64
NaHCO ₃	Bicarbonato de Sódio	25,0
KH ₂ PO ₄	Fosfato de Potássio	1,2
CaCl ₂ .2H ₂ O	Cloreto de Cálcio	2,7
KCl	Cloreto de Potássio	20
MgSO ₄ .7H ₂ O	Sulfato de Magnésio	0,58
Glicose		11,1

Quadro 4. Composição da solução de KCl 80 mM. Adaptado de Tanaka et al., 1999.

Substância	Nome	Concentração (mM)
NaCl	Cloreto de Sódio	114,64
NaHCO ₃	Bicarbonato de Sódio	25,0
KH ₂ PO ₄	Fosfato de Potássio	1,2
CaCl ₂ .2H ₂ O	Cloreto de Cálcio	2,7
KCl	Cloreto de Potássio	80
MgSO ₄ .7H ₂ O	Sulfato de Magnésio	0,58
Glicose		11,1

As soluções estoques (cloridrato de l-fenilefrina, cloridrato de acetilcolina, L-NG-metil-nitroarginina, heparina sódica, atropina e pentobarbital) foram dissolvidas em água destilada, com exceção da Indometacina que foi dissolvida em Bicarbonato de Sódio à 5%.

O extrato hidroalcoólico da *Calycophyllum spruceanum* foi dissolvido em água destilada.

4.5 Protocolos Experimentais

4.5.1 Hemodinâmica Sistêmica

Para os experimentos *in vivo* foram monitoradas as seguintes variáveis fisiológicas: pressão arterial (PA), pressão arterial média (PAM), pressão venosa central (PVC), frequência cardíaca (FC), pressão do ventrículo esquerdo (PVE), volume ventricular esquerdo (VVE) e débito cardíaco (DC). O único valor calculado foi a resistência vascular periférica (RVP), obtido por meio da divisão da PAM pelo DC.

Antes do procedimento experimental, os animais foram anestesiados com pentobarbital (50 mg/Kg) por via intraperitoneal e quetamina (20 mg/Kg) por via intramuscular

(SCHANAIDER e SILVA, 2004). Após avaliada a profundidade anestésica, as regiões cervical ventral e abdominal dos animais foram tricotomizadas para o procedimento cirúrgico.

A traquéia foi exposta por meio de uma incisão sagital mediana na região cervical ventral e realizada uma traqueostomia com um tubo de polietileno (PE-240) para controle da ventilação e sucção de secreções respiratórias. A veia jugular interna esquerda, depois de localizada, é devidamente cateterizada com um tubo de polietileno (PE-10). Ao ser identificado o feixe vâsculo-nervoso, a artéria carótida e o nervo vago comum são cuidadosamente separados evitando qualquer tipo de injúria, em seguida a artéria carótida é cateterizada com um transdutor de pressão sanguínea (SP844, MEMSCAP) acoplado a um sistema de aquisição de dados (Powerlab, ADInstruments, Sidney, Austrália) para monitorização contínua da PAM, FC, PVC, PVE e VVE. Todo procedimento acima descrito está esquematizado na figura 9.

Para o procedimento de cateterização dos vasos (veia femural), foram confeccionados cânulas de polietileno (PE-10) de tamanho aproximado de 3,5 cm, inserida em uma cânula de maior calibre (PE-50) de 12 cm de comprimento, afim de infundir o composto estudado.

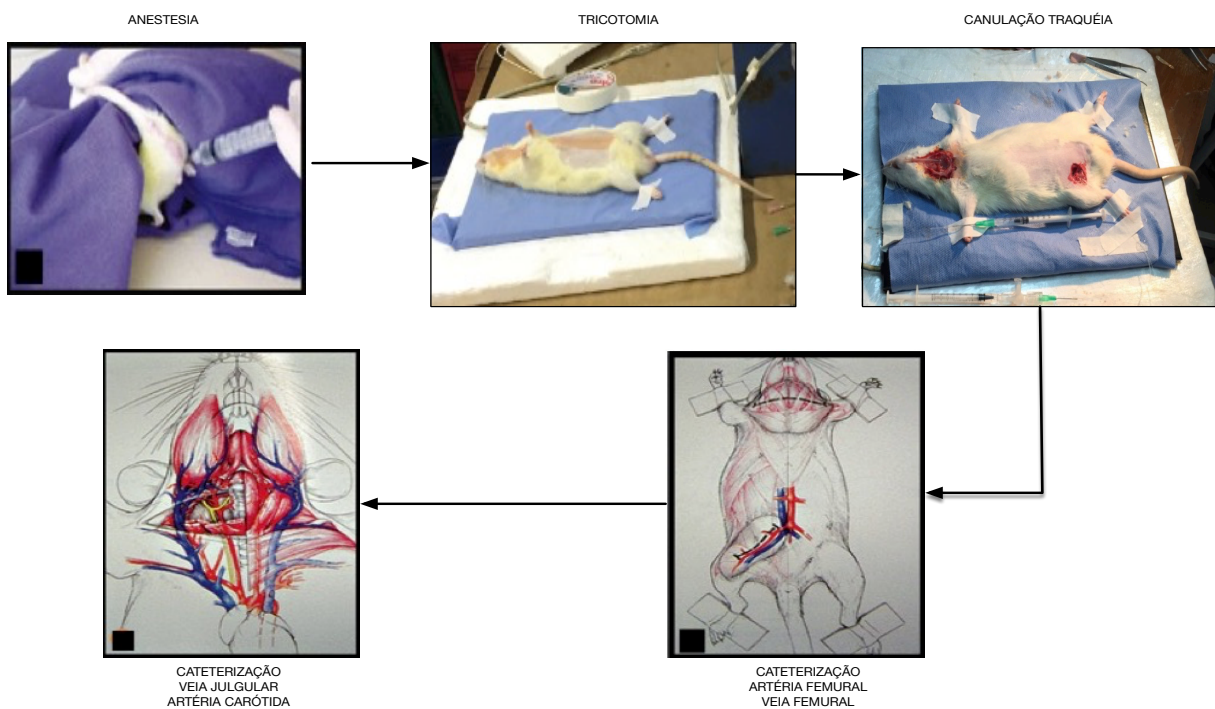


Figura 9 – Procedimento utilizado nos experimentos *in vivo*.

Após a cateterização de artérias e veias, conforme descrito na figura 10, aguardava-se a estabilização do animal por 5 á 10 min e iniciava-se a administração das doses crescentes do EHCSF (2, 4, 6, 12, 20, 40, 60 e 120 mg/Kg) através da veia femural. A cada dose era monitorizado as variáveis hemodinâmicas: PA, PAM, PVC, FC, PVE e VVE. A monitorização era realizado através de transdutores acoplados a artéria carótida, artéria femural e veia jugular, conectados a um computador com software Powerlab, ADInstruments.

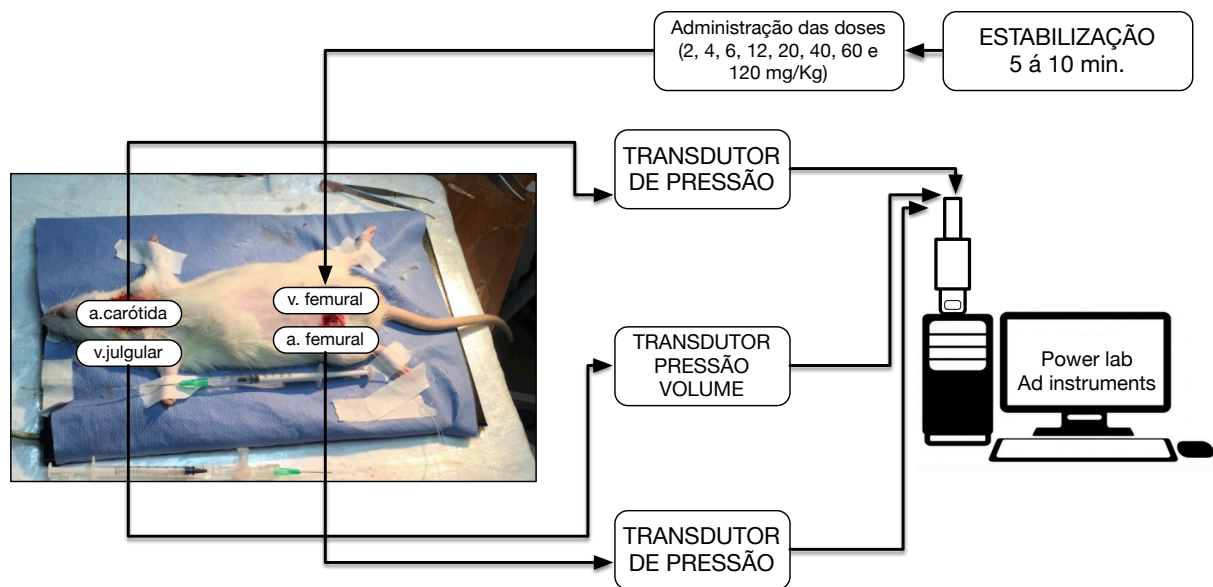


Figura 10 – Procedimento de aquisição de dados.

4.5.2 Avaliação do efeito vasorrelaxante em anéis isolados de aorta

Ratos Wistar machos (200-350g) foram sacrificados em câmara de CO₂, logo em seguida exsanguinado e realizado a retirada da aorta torácica, através de incisão mediastinal. Imediatamente foi imerso em solução Krebs- Henseleit (mM): NaCl (114) ; KCl (4,9) ; CaCl₂ (2,7); MgSO₄.7H₂O (0,58); NaHCO₃ (25), KH₂PO₄ (1,2), Glicose (11) e mistura carbogênica (5% CO₂ , 95% O₂), para limpeza e retirada de tecido conectivo e posteriormente segmentada em anéis de 4 á 5 mm, fixados em ganchos de aço inoxidável, figura 11. Após este procedimento os ganhos eram submersos em banho de órgãos de 5 mL contendo solução Krebs- Henseleit;

previamente aquecido (37 °C) em mistura carbogênica conectada a um transdutor de força (Panlab TRIP 202P, Barcelona, Espanha) sob a tensão de 1g, registrada através de um sistema de aquisição de dados (PowerLab 8/30, AD Instruments), figura 12. Foram utilizados como agente contraturante: fenilefrina (FEN, 0,1 μ M). Para retirar o endotélio, a camada íntima foi atritada através de um fio de aço de 3 mm e posteriormente, verificado através da adição de acetilcolina (Ach, 0,1 μ M) no platô da contração induzida por FEN.

Foram considerados com endotélio (E+), os anéis com relaxamento superior a 30% sobre a pré-contração com FEN. Já os anéis com relaxamento inferior a 10% foram considerados sem endotélio (E-) (FURCHGOTT; ZAWADZKI, 1980). Anéis com relaxamento entre 10 e 30% foram descartados.

Após o período de estabilização por 1 hora, com lavagens a cada 15 minutos, os anéis foram contraídos e no platô da contração induzidos por PHE, foram obtidas curvas de relaxamento concentração-resposta nas doses de 2, 7, 20, 70 e 140 μ g/mL para o extrato hidroalcolico de *Calycophyllum spruceanum* (EHCS) na presença e ausência dos bloqueadores L-NAME (metil ester de L-nitro-arginina), atropina, indometacina, KCl 80 mM e KCl 20 mM.

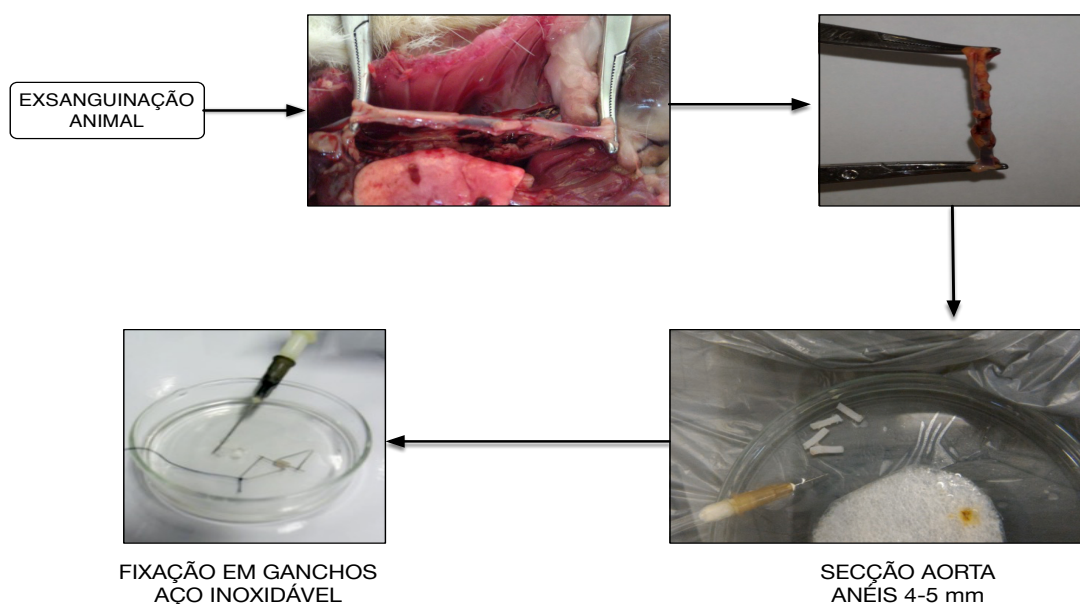


Figura 11 – Procedimento de retirada, secção e fixação de anéis de aorta torácica. A fixação de cada anel era realizada entre dois ganhos de aço inoxidável no formato de um triângulo.

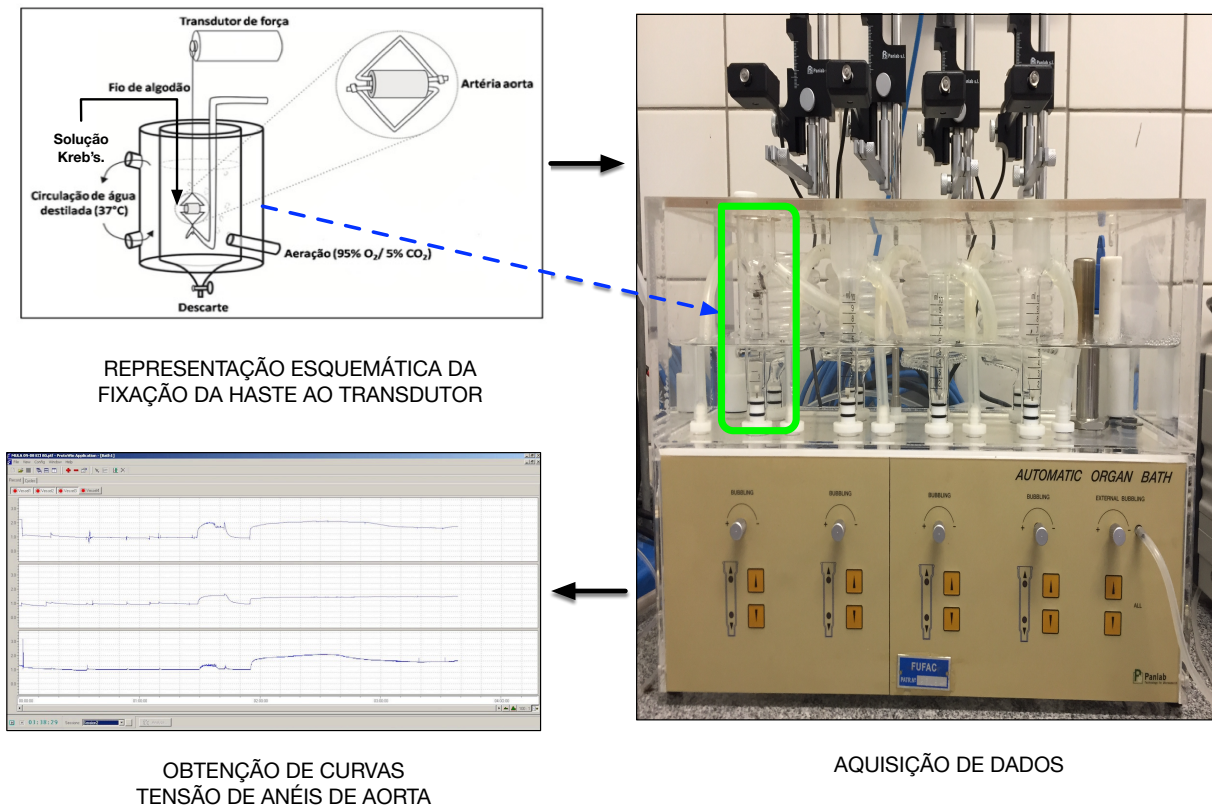


Figura 12 – Procedimento de fixação e aquisição de dados. Após a fixação dos anéis de aorta torácica aos ganhos triangulares. A extremidade de um dos ganhos era fixado á uma haste fixa e a outra extremidade fixa ao transdutor, para registro da tensão.

4.5.3 Curva concentração-resposta para a EHCS_F em anéis isolados de aorta de rato

Após um período de estabilização de 60 min, foram induzidas duas contrações similares com $0,1 \mu\text{M}$ de Fenilefrina (FEN) e após a estabilização da segunda contração (5 á 10 min.), concentrações crescentes do EHCS (2, 7, 20, 70 e $140 \mu\text{g/mL}$) foram adicionadas a cuba (5 mL) de maneira cumulativa na fase tônica, tanto em anéis com E+ quanto E- (Figura 13). O valor da concentração inibitória de 50% do efeito (EC_{50}) foi obtido como descrito na análise estatística.

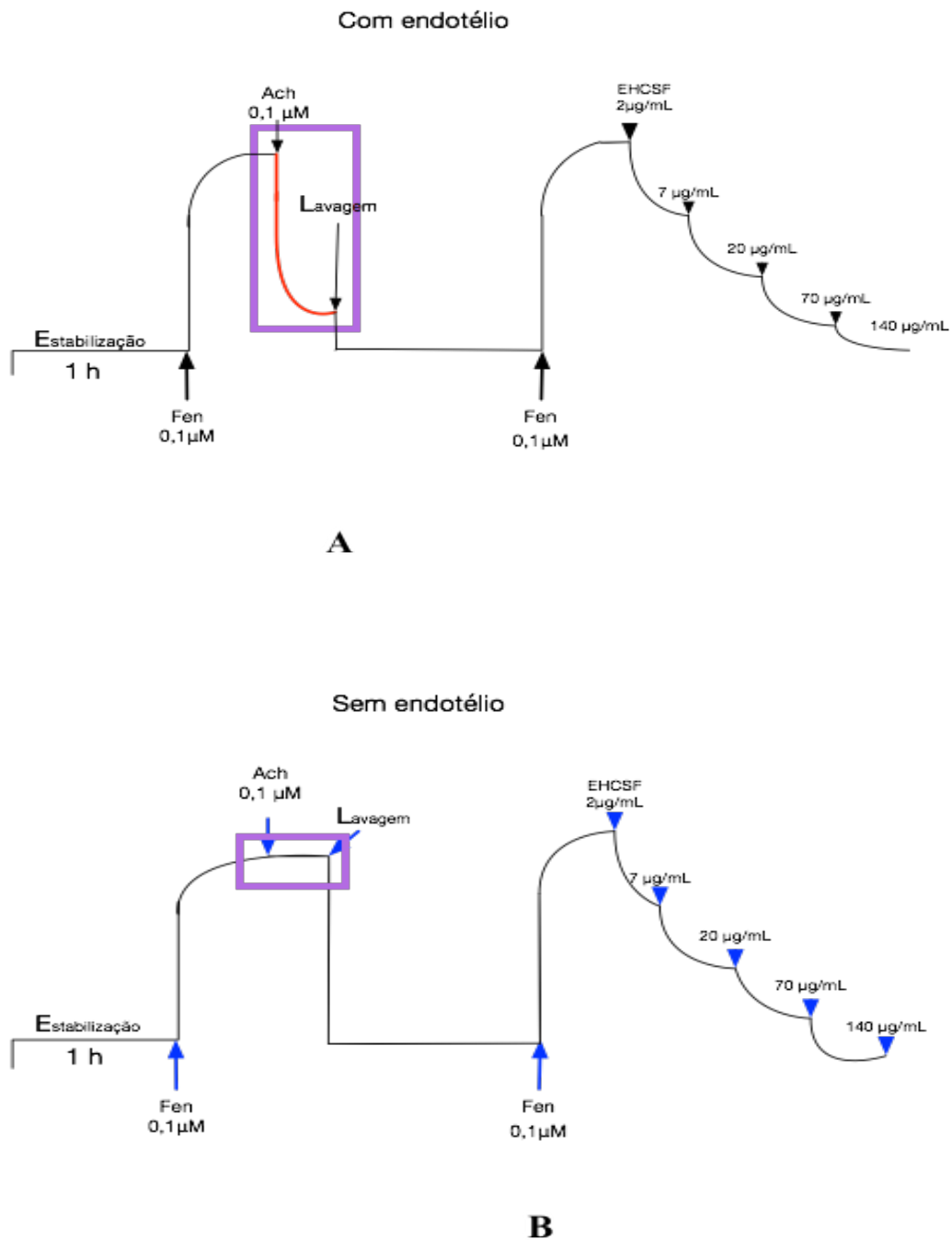


Figura 13. Representação esquemática do protocolo experimental para estudo do efeito de concentração crescente da EHCS (Extrato hidroalcoólico da *Calycophyllum spruceanum*) (2, 7, 20, 70 e 140 $\mu\text{g/mL}$) em anéis com endotélio (A) e sem endotélio (B) isolados de aorta de rato pré-contráido com 0,1 μM de FEN. (L= lavagem)

4.5.4 Verificação da participação do óxido nítrico na resposta relaxante induzida pelo EHCS em anéis isolados de aorta de rato

Após a verificação da integridade do endotélio, como descrito no tem 4.5.2, as preparações foram incubadas com L-name (100 μ M), um inibidor do Óxido nítrico sintase (MONCADA, 2006). Já está bem reportado na literatura modelos de indução a hipertensão realizados com tratamento com N-nitro-L-arginina-metil-ester (L-name), devido a sua ação como potente inibidor da NOS (MONCADA et al., 1988; RAMOS et al., 2006). Após 30 min, foi induzida uma nova contração tônica com FEN (0,1 μ M) e em seguida, realizado a curva concentração-resposta para EHCS, conforme representado na Figura 14. A resposta obtida após a adição de L-name em anéis com E+, foi comparada com a resposta na ausência do inibidor.

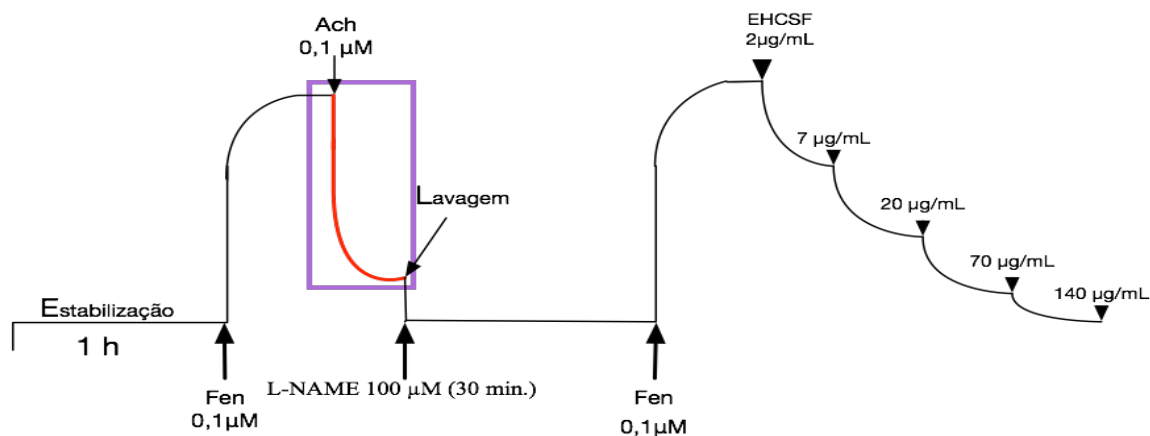


Figura 14. Representação esquemática do protocolo experimental para estudo do efeito de concentração crescente do EHCS em anéis isolados de aorta de rato pré-contraído com 0,1 μ M de FEN. Antes da segunda contração induzida pela FEN foi incubado, L-name.

4.5.5 Verificação da participação muscarínica na resposta relaxante induzida pelo EHCS em anéis isolados de aorta de rato

Após a verificação da integridade do endotélio, como descrito no tem 4.5.2, as preparações foram incubadas com atropina (1 μ M), que tem ação antagonista de receptores muscarínicos não seletivos (MOREIRA, 2010). Para verificar a participação desses receptores

no relaxamento induzido pelo EHCS_F foi utilizado atropina, que quando ativados produzem vasorrelaxamento dependente de endotélio, induzindo aumento na $[\text{Ca}^{2+}]_i$, promovendo a formação e liberação de fatores relaxantes derivados do endotélio (FRDE) (MONCADA et al., 1991; MONTEIRO, 2009). Após 15 min., foi induzida uma nova contração tônica com FEN ($0,1\mu\text{M}$) e em seguida, realizado a curva concentração-resposta para EHCS, conforme representado na Figura 14. A resposta obtida após a adição de atropina em anéis com E^+ , foi comparada com a resposta na ausência do inibidor.

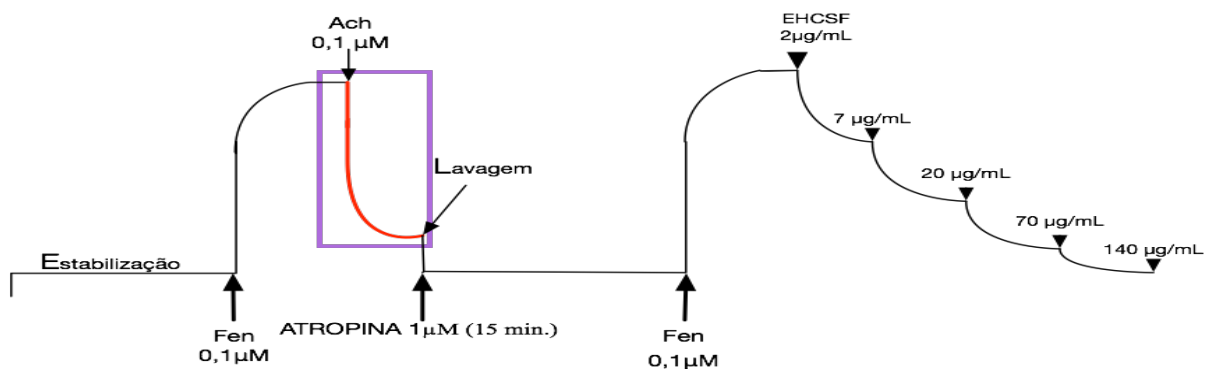


Figura 15. Representação esquemática do protocolo experimental para estudo do efeito de concentração crescente do EHCS em anéis isolados de aorta de rato pré-contraído com $0,1\mu\text{M}$ de FEN. Antes da segunda contração induzida pela FEN foi incubado, Atropina.

4.5.6 Verificação da participação das prostaglandinas na resposta relaxante induzida pelo EHCS em anéis isolados de aorta de rato

Após a verificação da integridade do endotélio, como descrito no tem 4.5.2, as preparações foram incubadas com indometacina ($10\mu\text{M}$), um inibidor não seletivo da cicloxigenase que resulta no processo final de inibição da contratilidade do músculo liso vascular (BATLOUNI, 2001; LÓPEZ et al., 2001). Após 30 min., foi induzida uma nova contração tônica com FEN ($0,1\mu\text{M}$) e em seguida, realizado a curva concentração-resposta para EHCS, conforme representado na Figura 16. A resposta obtida após a adição de indometacina em anéis com E^+ , foi comparada com a resposta na ausência do inibidor.

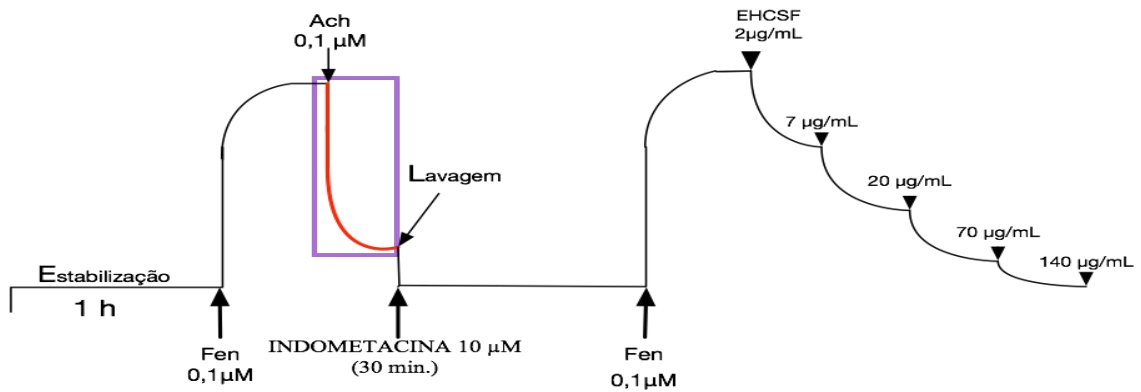


Figura 16. Representação esquemática do protocolo experimental para estudo do efeito de concentração crescente do EHCS em anéis isolados de aorta de rato pré-contráido com 0,1 μM de FEN. Antes da segunda contração induzida pela FEN foi incubado, Indometacina.

4.5.7 Verificação da participação dos canais de cálcio operados por voltagem (VOCC's) na resposta relaxante induzida pelo EHCS em anéis isolados de aorta de rato

Após a verificação da integridade do endotélio, como descrito no tem 4.5.2, as preparações foram incubadas com solução de Krebs com KCl 80 mM ou KCl 20 mM, um ativador da contratilidade do músculo liso vascular (BATLOUNI, 2001). A utilização de solução com alta concentração de KCl (20 mM ou 80 mM) impede parcialmente o efluxo de K^+ e bloqueia relaxamentos mediados por abertura de canais de K^+ (CLARCK e FUCHS, 1997). Assim como, podem provocar vasorrelaxamento por abertura de canais de K^+ , que inibem VOCC's. Após 30 min., foi realizada a curva concentração-resposta para EHCS, conforme representado na Figura 17. A resposta obtida após a adição do KCl em anéis com endotélio.

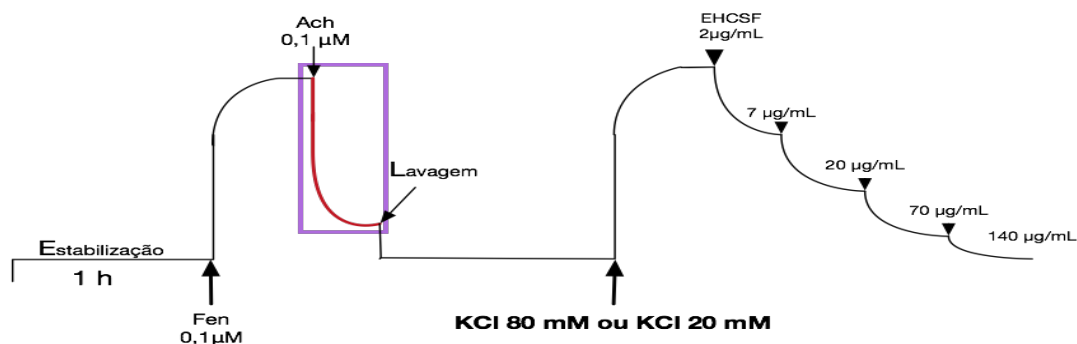


Figura 17. Representação esquemática do protocolo experimental para estudo do efeito de concentração crescente do EHCS em anéis isolados de aorta de rato pré-contráido com 0,1 μM de FEN. A segunda contração foi induzida pela incubação, KCl 80mM ou KCl 20mM, afim de investigar a via farmacológica.

4.6 Análise Estatística

Os valores são expressos em média \pm erro padrão da média. Para confecção dos gráficos e análise estatística, foi utilizado o software GraphPad Prism 6.0. As diferenças estatísticas entre os grupos foram analisadas pela ANOVA One-way, análise de variância, e para comparação entre dois grupos individuais foi aplicado o teste estatístico t Student não pareado, considerando significativo ao nível de 5% ($p < 0,05$). Os valores de EC₅₀ foram obtidos através de regressões não-lineares das curvas traçadas a partir da média percentual das respostas obtidas com EHCS para cada experimento *in vitro*.

5 RESULTADOS

5.1 Efeito da administração endovenosa do EHCS_F sobre a PAM de ratos wistar

normotensos

O EHCS_F, reduziu a PAM para: 45,61±3,46 mmHg, 37,16±1,16 mmHg e 23,25±3,67 mmHg nas doses de 40mg/Kg, 60 mg/Kg e 120 mg/Kg ****p<0,0001, respectivamente versus o controle (104,7±5,18) (Figura 18). Indicando possível influência do DC e/ou RVP. Foi utilizado análise de variância (Anova - one-way), com “n” fixado em 6. Para cada tratamento comparado com o controle foi utilizado nível de significância de p<0,05. Registro original (Figura 26).

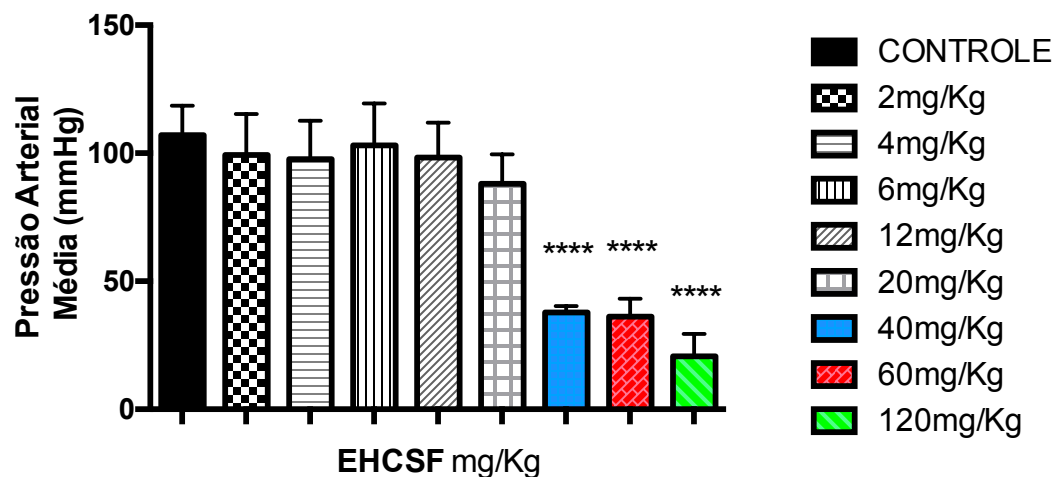


Figura 18. Efeito da administração e.v. aguda de doses crescentes do EHCS_F sobre a PAM de ratos normotensos. As barras representam a média ± EPM das variações por grupo (n=6) de animais. **** p<0,0001 vs média do grupo controle.

5.2 Efeito da administração endovenosa do EHCS_F sobre a FC de ratos wistar

normotensos

A administração do EHCS_F, não provocou redução significativa da FC nas doses estudadas quando comparado ao controle (420,8±8,34 bpm) (Figura 19). Foi utilizado análise de variância (Anova - one-way), com “n” fixado em 6. Para cada tratamento comparado com o controle foi utilizado nível de significância de p<0,05. Registro original (Figura 26).

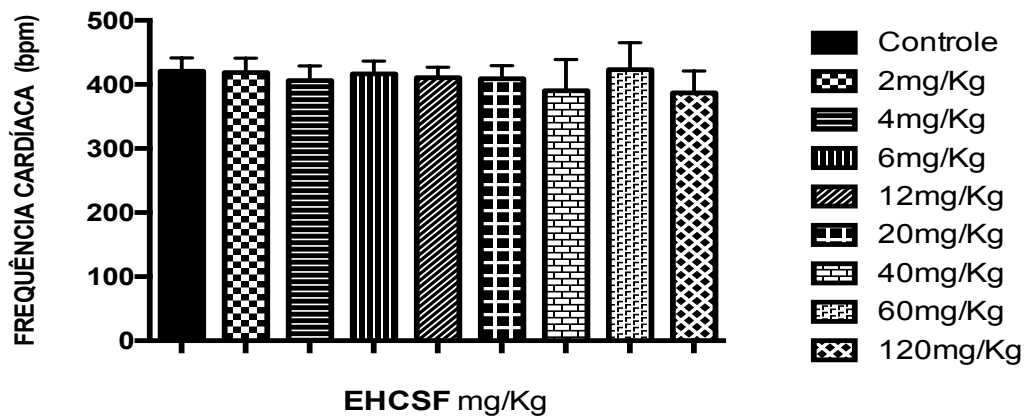


Figura 19. Efeito da administração e.v. aguda de doses crescentes do EHCS_F sobre a FC de ratos normotensos. As barras representam a média \pm EPM das variações por grupo (n=6) de animais.

5.3 Efeito da administração endovenosa do EHCS_F sobre o DC de ratos wistar normotensos

A administração do EHCS_F, não provocou reduções significativas no DC quando comparado com o controle ($3878 \pm 519,5$ uL/min) (Figura 20). Foi utilizado análise de variância (Anova - one-way), com “n” fixado em 6. Para cada tratamento comparado com o controle foi utilizado nível de significância de $p < 0,05$.

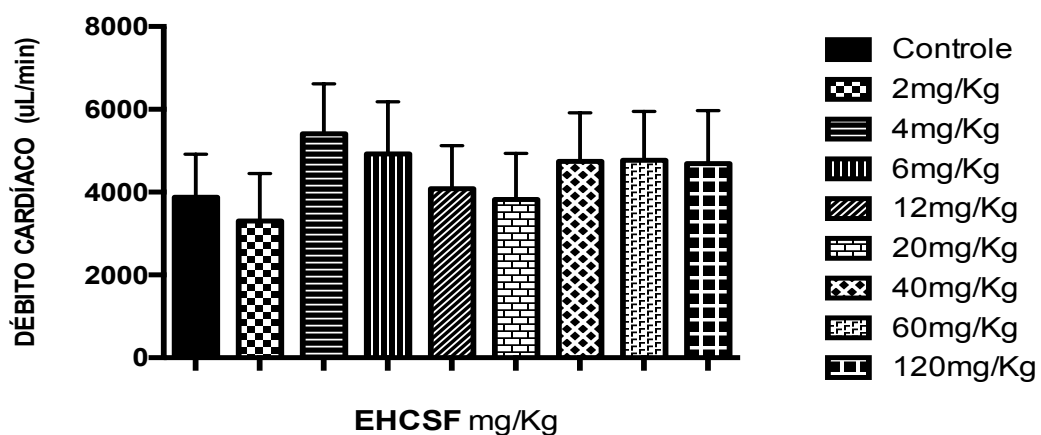


Figura 20. Efeito da administração e.v. aguda de doses crescentes do EHCS_F sobre o DC de ratos normotensos. As barras representam a média \pm EPM das variações por grupo (n=6) de animais.

5.4 Efeito da administração endovenosa do EHCS_F sobre a RVP de ratos wistar normotensos

O EHCS_F, reduziu a RVP para: $0,23 \pm 0,02$ mmHg, $0,11 \pm 0,02$ mmHg, $0,10 \pm 0,02$ mmHg e $0,07 \pm 0,02$ mmHg nas doses de 6 mg/Kg (* $p < 0,05$), 40 mg/Kg, 60 mg/Kg e 120 mg/Kg (**** $p < 0,0001$), respectivamente versus o controle ($0,34 \pm 0,02$) (Figura 21). Foi utilizado análise de variância (Anova - one-way), com “n” fixado em 6. Para cada tratamento comparado com o controle foi utilizado nível de significância de $p < 0,05$.

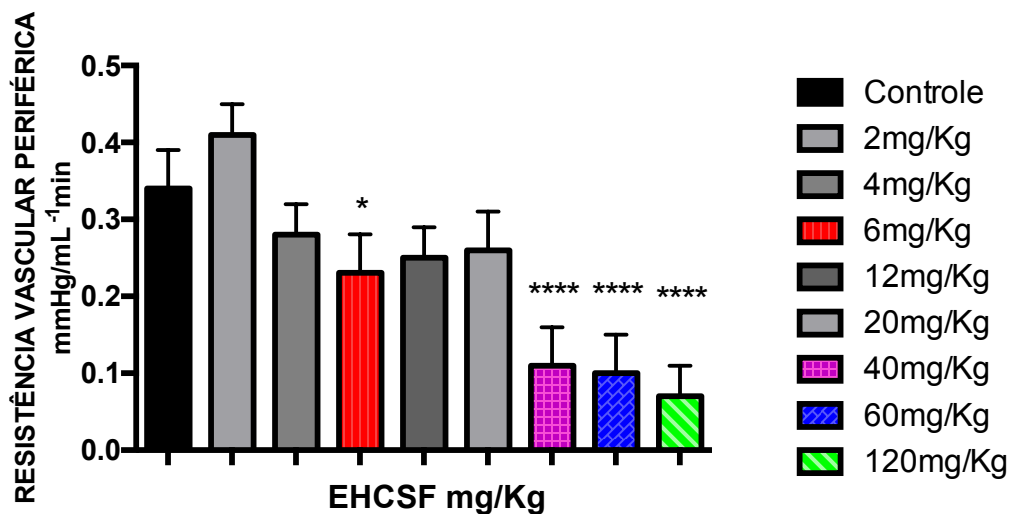


Figura 21. Efeito da administração e.v. aguda de doses crescentes do EHCS_F sobre a RVP de ratos normotensos. As barras representam a média ± EPM das variações por grupo (n=6) de animais. * $p < 0,5$ e **** $p < 0,0001$ vs média do grupo controle.

5.5 Efeito da administração endovenosa do EHCS_F na PVE de ratos wistar normotensos

O EHCS_F reduziu a PVE para: $48,65 \pm 5,93$ mmHg, $51,05 \pm 8,85$ mmHg, $64,30 \pm 8,40$ mmHg e $59,48 \pm 7,05$ mmHg, $26,03 \pm 2,49$ mmHg nas doses de 6 mg/Kg (** $p < 0,01$), 20 mg/Kg (** $p < 0,01$), 40 mg/Kg (* $p < 0,5$), 60 mg/Kg (* $p < 0,5$) e 120 mg/Kg (**** $p < 0,0001$) (i.v.) respectivamente vs. controle ($98,53 \pm 5,39$ mmHg) (Figura 22). Registro original (Figura 26). Foi utilizado análise de variância (Anova - one-way), com “n” fixado em 6. Para cada tratamento comparado com o controle foi utilizado nível de significância de $p < 0,05$.

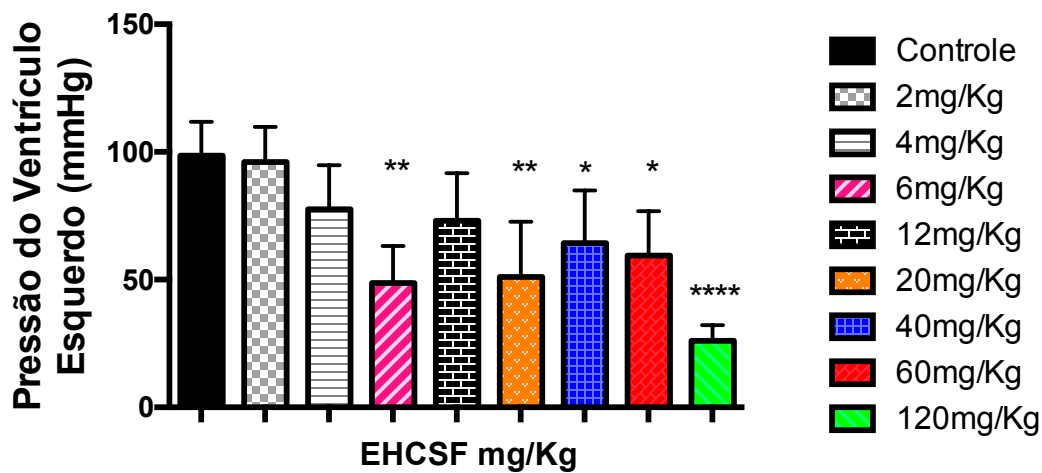


Figura 22. Efeito da administração e.v. aguda de doses crescentes do EHCS_F sobre a PVE de ratos normotensos. As barras representam a média ± EPM das variações por grupo (n=6) de animais. *p<0,5, **p<0,01 e **** p<0,0001 vs média do grupo controle.

5.6 Efeito da administração endovenosa do EHCS_F no VVE de ratos wistar normotensos

A administração do EHCS_F, não provocou reduções significativas no VVE quando comparado com o controle (133,1±2,94 uL) (Figura 23). Registro original (Figura 26). Foi utilizado análise de variância (Anova - one-way), com “n” fixado em 6. Para cada tratamento comparado com o controle foi utilizado nível de significância de p<0,05.

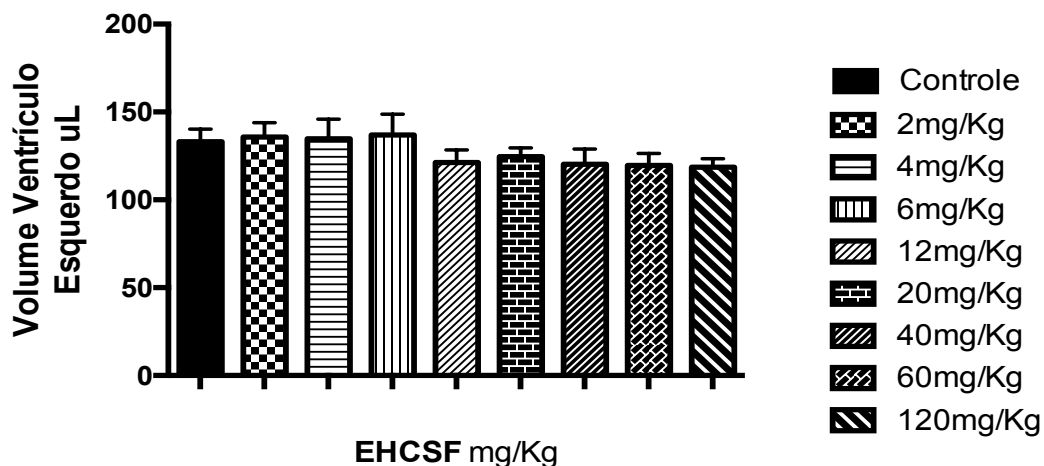


Figura 23. Efeito da administração e.v. aguda de doses crescentes do EHCS_F sobre o VVE de ratos normotensos. As barras representam a média ± EPM das variações por grupo (n=6) de animais.

5.7 Efeito da administração endovenosa do EHCS_r sobre a Dp/Dt de ratos wistar normotensos

Observou-se redução da Dp/Dt máxima para: $6570 \pm 601,2$ mmHg/s, 6076 ± 562 mmHg/s e $5847 \pm 659,2$ mmHg/s, nas doses de 40 mg/Kg $***p < 0,001$, 60 mg/Kg $***p < 0,001$ e 120 mg/Kg $***p < 0,001$, respectivamente vs Controle ($10754 \pm 857,5$ mmHg/s) (Figura 24). Registro original (Figura 13). Foi utilizado análise de variância (Anova - one-way), com “n” fixado em 6. Para cada tratamento comparado com o controle foi utilizado nível de significância de $p < 0,05$.

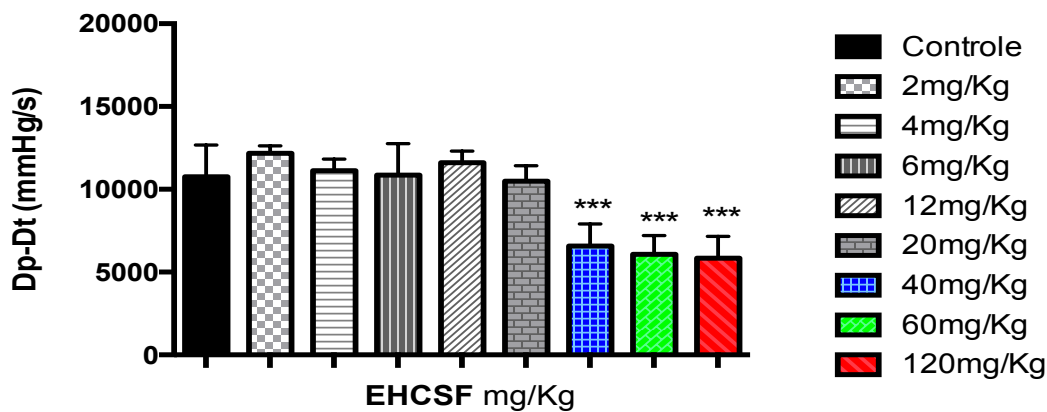


Figura 24. Efeito da administração e.v. aguda de doses crescentes do EHCS_r sobre a Dp/Dt máxima de ratos normotensos. As barras representam a média ± EPM das variações por grupo (n=6) de animais. *** $p < 0,001$ vs média do grupo controle.

5.8 Efeito da administração endovenosa do EHCS_r sobre a PVC de ratos wistar normotensos

Não se observou reduções significativas na PVC nas doses utilizadas em relação ao controle ($4,120 \pm 1,05$ mmHg) (Figura 25). Registro original (Figura 26). Foi utilizado análise de variância (Anova - one-way), com “n” fixado em 6. Para cada tratamento comparado com o controle foi utilizado nível de significância de $p < 0,05$.

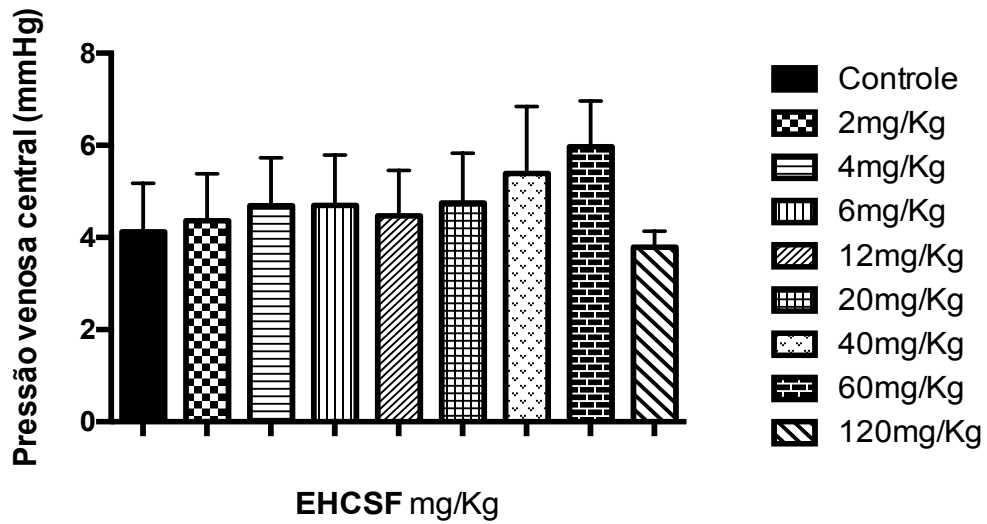


Figura 25. Efeito da administração e.v. aguda de doses crescentes do EHCSF sobre o PVC de ratos normotensos. As barras representam a média \pm EPM das variações por grupo (n=6) de animais.

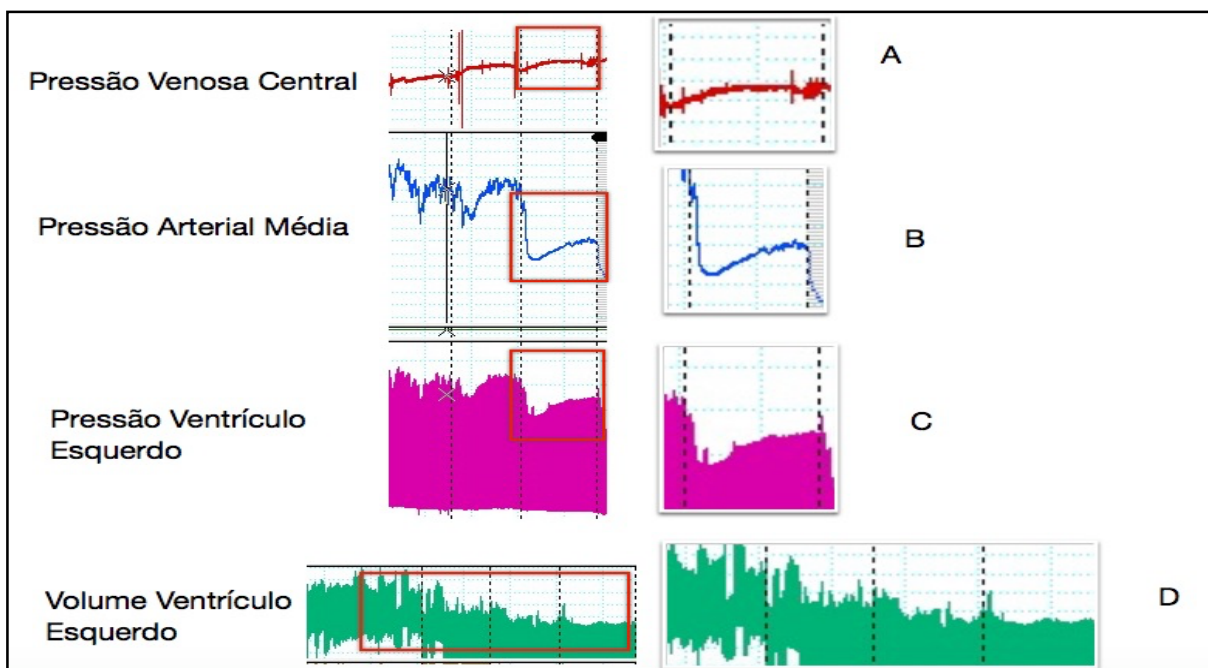


Figura 26. Registro original das variáveis estudadas durante as doses cumulativas do EHCSF. A - PVC, B - PAM, C - PVE e D - VVE.

5.9 Variáveis Experimentais *in vitro*

5.9.1 Estudos com anéis de artéria aorta torácica isolada de rato normotenso

O perfil do efeito vasorrelaxante do EHCS_F em anéis de aorta isolada de rato está apresentado nas Figuras 27, 28, 29, 30, 31, 32 e 33. Na obtenção da curva concentração-resposta para a adição cumulativa do EHCS_F (2, 7, 20, 70 e 140 µg/mL, n = 6), iniciavam seus efeitos em cerca de 4 á 6 min. e continuavam relaxando, em média, por mais 8 min. O final do relaxamento promovido por cada uma das concentrações, cumulativamente adicionadas, era marcado por uma estagnação descrita graficamente por um segmento de reta em um mesmo nível por em média, 3 minutos.

5.9.2 Efeito relaxante do EHCS_F sobre contrações induzidas por FEN (0,1 µM) anéis de artéria aorta de ratos normotensos na presença e na ausência de endotélio funcional

Em anéis de aorta com endotélio intacto (controle) pré-contraídos com FEN (0,1 µM), EHCS_F (2, 7, 20, 70 e 140 µg/mL, n = 6) induziu efeito significativo (p<0,05) com efeito relaxante e EC₅₀ = 1,10±0,21 µg/mL, em anéis com endotélio. Os efeitos vasorrelaxantes ocorreram de maneira dependente do endotélio (Figuras 27). Foi utilizado análise de variância (Anova - one-way), com “n” fixado em 6. Para cada tratamento foi utilizado nível de significância de p<0,05.

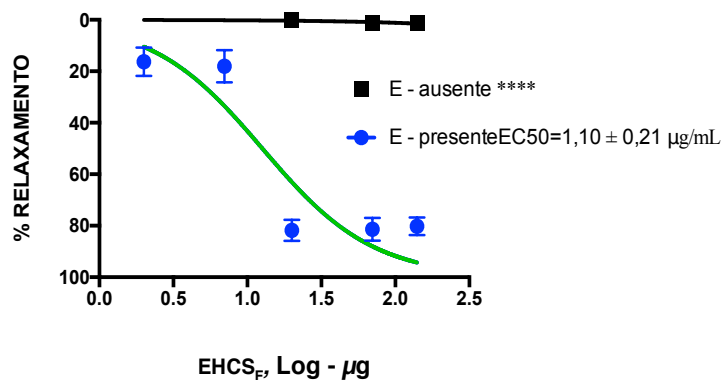


Figura 27. Curva concentração-resposta do EHCS_F (2, 7, 20, 70 e 140 µg/mL) em anéis de aorta torácica isolada de rato normotenso com e sem endotélio, pré-contraído com 0,1 µM de FEN. Os valores representados pelos pontos expressam a média ± e.p.m. ****p<0,0001 vs E – presente.

5.9.2.1 Efeito relaxante da inibição da NOs sobre a resposta relaxante induzida pelo EHCS_F em anéis de artéria aorta isolada de rato normotenso provida de endotéliofuncional

Na presença de L-name (100 μ M), um inibidor competitivo da sintaxe do NO, a resposta relaxante induzida pelo EHCS_F (2, 7, 20, 70 e 140 μ g/mL, n = 6) em anéis de aorta com endotélio intacto pré-contraídos com FEN (0,1 μ M), foi abolido. O resultado foi estatisticamente diferente daquele observado em anéis com endotélio ($EC_{50} = 1,10 \pm 0,21$ μ g/mL) (Figura 28). Foi utilizado análise de variância (Anova - one-way), com “n” fixado em 6. Para cada tratamento foi utilizado nível de significância de $p < 0,05$.

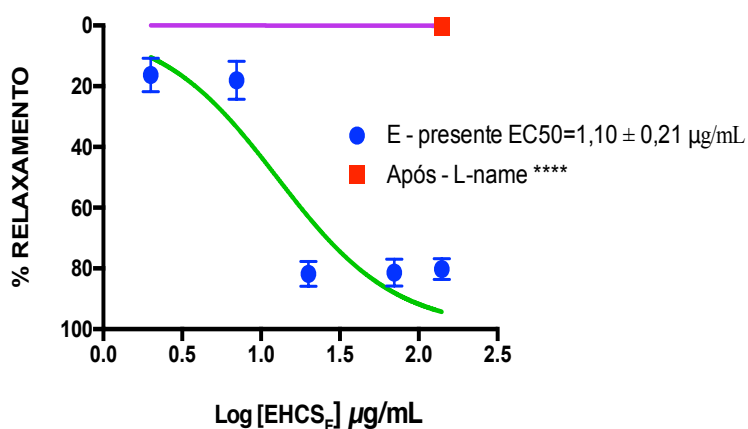


Figura 28. Curva concentração-resposta do EHCS_F (2, 7, 20, 70 e 140 μ g/mL) em anéis de aorta torácica isolada de rato normotenso com endotélio presente e incubado com L-name, pré-contraído com 0,1 μ M de FEN. Os valores representados pelos pontos expressam a média \pm e.p.m. **** $p < 0,0001$ vs E - presente.

5.9.2.2 Efeito do antagonismo dos receptores muscarínicos e COX em anéis de artéria aorta de ratos normotensos sobre a resposta vasorelaxante induzida pelo EHCS_F

Efeito vasorrelaxante induzido pelo EHCS_F (2, 7, 20, 70 e 140 μ g/mL, n = 6) em anéis de aorta intactos não foi modificado pela pré-incubação com 10 μ M de indometacina (Figura 29), um inibidor não seletivo da ciclo-oxigenase (COX) ($EC_{50} = 0,73 \pm 0,38$ μ g/mL), ou com 1 μ M de atropina (Figura 30), um antagonista muscarínico não seletivo ($EC_{50} = 0,99 \pm 0,14$ μ g/mL). Foi utilizado análise de variância (Anova - one-way), com “n” fixado em 6. Para cada tratamento foi utilizado nível de significância de $p < 0,05$.

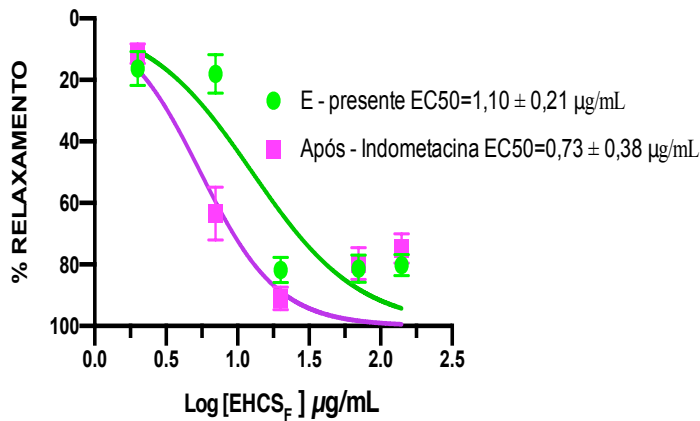


Figura 29. Curva concentração-resposta do EHCS_F (2, 7, 20, 70 e 140 μg/mL) em anéis de aorta torácica isolada de rato normotenso provida de endotélio funcional e pré-contraindo com 0,1 μM de FEN, - após incubação da Indometacina. Os valores representados pelos pontos expressam a média ± e.p.m.

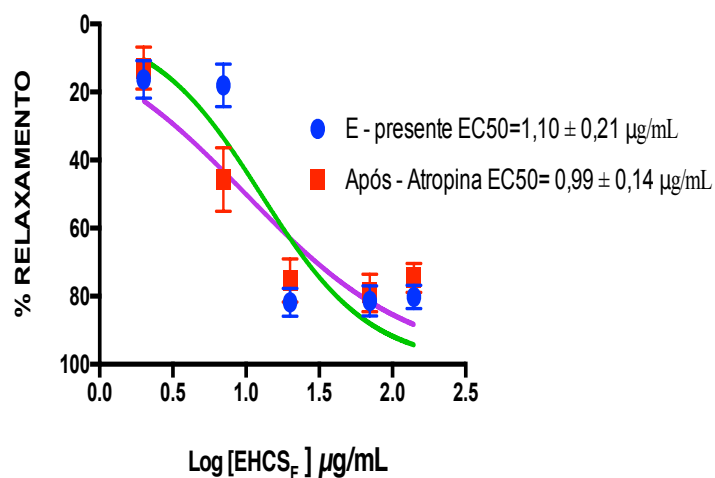


Figura 30. Curva concentração-resposta do EHCS_F (2, 7, 20, 70 e 140 μg/mL) em anéis de aorta torácica isolada de rato normotenso com endotélio pré-contraindo com 0,1 μM de FEN, após incubação da Atropina. Os valores representados pelos pontos expressam a média ± e.p.m.

5.9.3 Efeito relaxante induzido pelo EHCS_F sobre contrações induzidas por KCl

Efeito vasorrelaxante induzido pelo EHCS_F (2, 7, 20, 70 e 140 μg/mL, n = 6) em anéis de aorta torácica pré-incubados com KCl 80 mM ou KCl 20 mM, um ativador dos canais de cálcio voltagem dependente (VOCCS). As preparações de KCl 80 (EC₅₀ = 2,40±0,09μg/mL) e KCl 20 (EC₅₀=1,87±0,10 μg/mL) em anéis com endotélio foram estatisticamente diferentes daqueles observados em anéis com endotélio (EC₅₀ = 1,10±0,15 μg/mL) (Figura 31 e 32). Na presença de KCl 20 mM o efeito vasolexante foi significativamente maior do que o KCl 80 mM (p<0,01) (Figura 33). Foi utilizado análise de variância (Anova - one-way), com “n” fixado em 6. Para cada tratamento foi utilizado nível de significância de p<0,05.

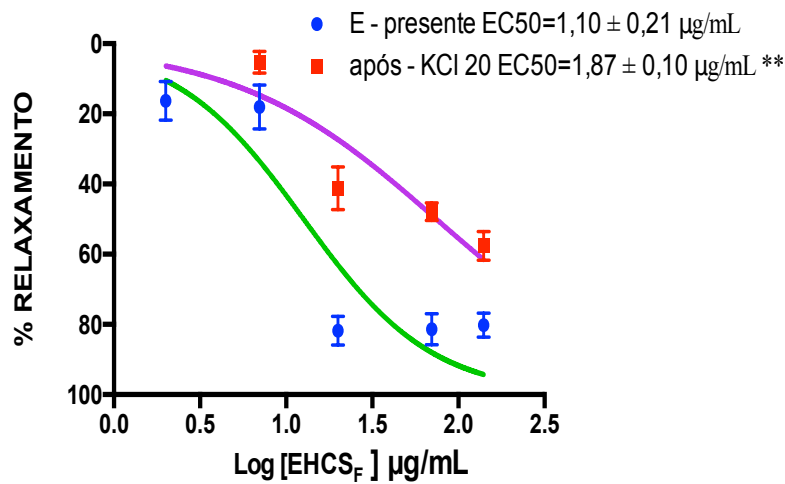


Figura 31. Curva concentração-resposta do $EHCS_F$ (2, 7, 20, 70 e 140 $\mu\text{g/mL}$) em anéis de aorta torácica isolada de rato normotenso com endotélio pré-contraído com KCl 20mM. Os valores representados pelos pontos expressam a média \pm e.p.m. $^{**}p<0,01$ vs E – presente.

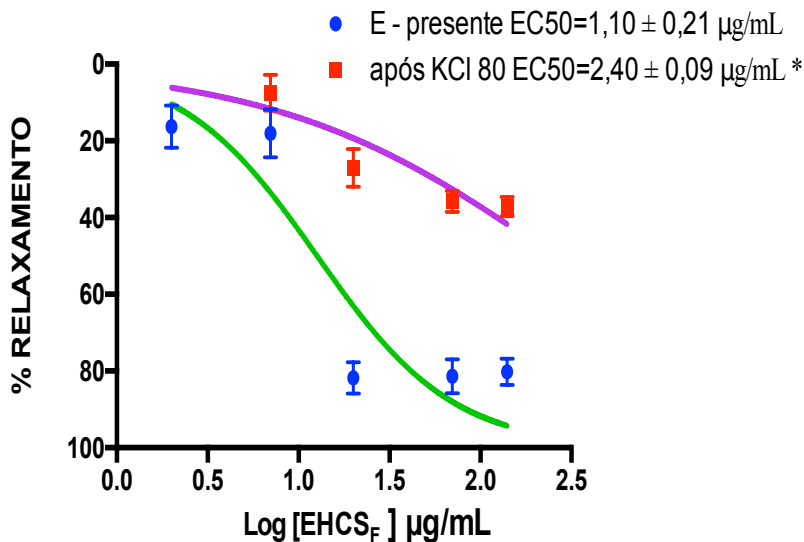


Figura 32. Curva concentração-resposta do $EHCS_F$ (2, 7, 20, 70 e 140 $\mu\text{g/mL}$) em anéis de aorta torácica isolada de rato normotenso com endotélio pré-contraído com KCl 80mM. Os valores representados pelos pontos expressam a média \pm e.p.m. $^*p<0,05$ vs E – presente.

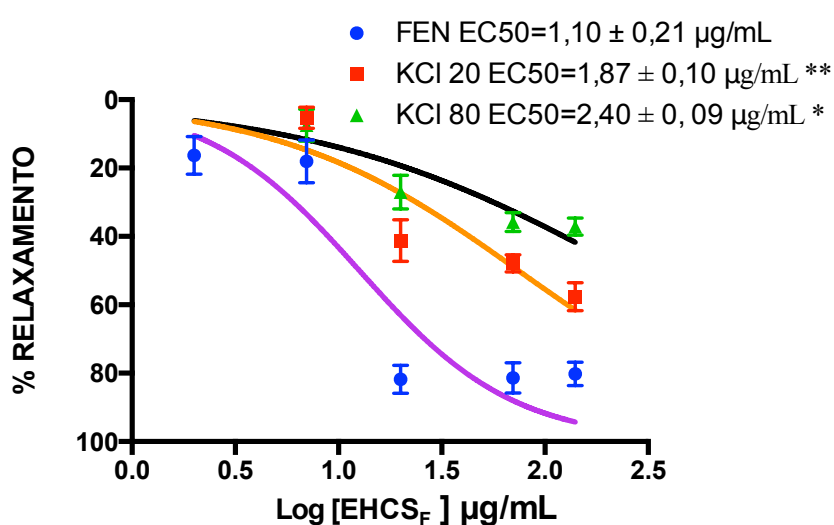


Figura 33. Curva concentração-resposta do $EHCS_F$ (2, 7, 20, 70 e 140 $\mu\text{g/mL}$) em anéis de aorta torácica isolada de rato normotenso com endotélio pré-contraído com FEN, KCl 20mM, KCl 80mM. Os valores representados pelos pontos expressam a média \pm e.p.m. $^*p<0,5$ e $^{**}p<0,01$ vs FEN.

6 DISCUSSÃO

Sabendo da existência de estudos farmacológicos relatando ação dos constituintes químicos da referida espécie sobre o sistema cardiovascular (efeito vasorelaxante investigado na espécie *Alseis yucatanensis* da família Rubiaceae, SLISH et al., 2004), iniciamos nossos estudos com ensaios farmacológicos *in vivo*, afim de caracterizarmos as respostas ao EHCS_F.

Nos experimentos *in vivo*, com animais anestesiados, verificou-se importante efeito hipotensor. A diminuição da PAM ocorreu de forma significativa em relação ao controle. Esta diminuição na PAM não foi acompanhada de diminuição da FC, VVE e PVC. Não havendo portanto diferença significativa entre os grupos tratados com EHCS_F e o controle.

Variações no DC podem alterar de forma direta a PA e conseqüentemente a PAM. Já é bem reportado na literatura que a FC e o VS, são grandes influenciadores do DC, entretanto, neste estudo, pode-se inferir que a diminuição da PAM não foi influenciada pela FC, haja vista que não houve modificação desta variável nos animais testados (Figura 7). A não variação da FC mediante tratamento com EHCS_F comprova que neste estudo a diminuição observada nos níveis pressóricos parece não ser devido a influência direta desta variável.

No que diz respeito a FC, já é bem conhecido que o pentobarbital sódico pode aumentar os batimentos cardíacos através de mecanismos ainda não totalmente esclarecidos. Linegar *et al.*, 1936 e PAGE e McCublin, 1965, atribue este efeito a ação bloqueadora parassimpática periférica. Barlowe e Knott, 1964, pensaram em ação simpatomimética. Priano *et al.*, 1969, somam as duas teorias anteriores, à de origem reflexa. Vale ressaltar que a FC, apesar da elevação dentro dos limiares fisiológicos, além de assim se manter durante todo tempo das abordagens de todos os experimentos, não sofreu modificações em função dos tratamentos com o EHCS_F. Desta forma a FC não influenciou a diminuição da PAM. Diminuições na FC são

melhores observadas em modelos onde se tem hipovolemia, fato este não estudado neste trabalho.

Já é bem reportado na literatura que o DC tem influência direta sobre a PA. Sabe-se que o DC é determinado pelo produto da FC pelo VS (GUYTON; HALL, 2011; AIRES, 2013). Já foi constatado que não houve variação da FC. O VS é determinado pela diferença entre o volume diastólico final e o volume sistólico final (KATZ, 2010). Neste trabalho essas variáveis não foram determinadas. No entanto o VVE, representa o volume diastólico e sistólico, que, nos experimentos realizados não sofreram alterações significativas. Em concordância com achados na literatura que correlacionam alterações nesses volumes diante de alterações estruturais na parede dos ventrículos, como, hipertensão, insuficiência cardíaca e outras (CESARETTI, 2010; TEIXEIRA et al., 2011). Ou ainda, mecanismos que alteram a pré-carga ou pós-carga (KATZ, 2010). Eventos esses não constatados neste trabalho, em função dos tratamentos com EHCS_F.

O DC foi mantido, compensado pela não variação do RV que garantiu PVC e pressão atrial direita (PAD) sem alteração, assim como, FC, também manteve-se inalterada.

É importante ressaltar que, os mecanismos fisiológicos de compensação, podem desencadear respostas reflexas diante do aumento de volumes sanguíneos, não foram ativados, haja vista que somente são acionados diante de situações especiais como distensão das veias pulmonares ou ainda da parede atrial esquerda, através de receptores subendocárdicos, o que levaria a maior estimulação de nervos simpáticos (ramos do gânglio estrelado direito) (LINDEN et al., 1982), aumentando assim, o inotropismo e o cronotropismo (FURNIVAL, 1971).

Pode-se ainda ter respostas reflexas relacionadas a perda de volume, como em casos de hemorragia e choque, ou seja, qualquer condição que leve a hipovolemia. Em estudos realizados com cães anestesiados, induzidos a hipovolemia observou-se redução acentuada do RV e da PVC com posterior diminuição do DC e da PAM (CLARK, 1992). No entanto essa redução

ocorreu principalmente imediatamente a indução da hipovolemia, perdurando até cerca de 3 minutos, sendo observado nos minutos subsequentes aumento das médias dessas variáveis, que justificam-se devido ao importante efeito vasoconstritor ocasionado pelo efeito compensatório à perda de volemia, especificamente provocado pela vasoconstrição periférica por estímulo simpático, principalmente da vasculatura esplênica e músculo-esquelética, além de taquicardia e aumento da contratilidade do miocárdio (NISHIMORI et al., 2006). Nos experimentos desenvolvidos, neste trabalho, não houve episódios relacionados a este fato, uma vez que eram ratos onde estava preservado o volume intravascular, justificando assim o não aumento da FC e da PVC, que não tiveram variações significativas durante a fase experimental, e por assim ser, o DC não reduziu.

A Dp/Dt máxima ou a taxa de variação da pressão pela taxa de variação do tempo, usualmente utilizado para avaliação da função do ventrículo esquerdo, sendo importante determinante da contratilidade do miocárdio (OKOSHI e TUCCI, 1995; HALIN e RIO, 2012), é influenciada pela pré-carga, pós-carga e hipertrofia miocárdica (OKOSHI, 1995). Considerando-se que o miocárdio não sofre alterações em animais normotensos (MILL e VASSALLO, 2003), e considerando-se que a pré-carga, está relacionada ao RV e a PVC e está não teve modificações significativas, provavelmente as alterações observadas na Dp/Dt no protocolo *in vivo* não foi devido a estes fatores.

Considerando-se que a PVE diminuiu não devido a uma dilatação da câmara cardíaca, já que os animais eram normotensos e não possuíam alterações estruturais no coração, mas, devido a diminuição na RVP (figura 21) nas doses já citadas.

Outro fato que apoia os achados de pressão e volume neste trabalho, diz respeito a lei da física em que pressão é a razão da força pela área. A partir dessa relação entre pressão e força, podemos determinar condições de equilíbrio mecânico para sistemas envolvendo fluidos (MOURA e AGUIAR, 2016), neste caso o sistema cardiovascular. Uma vez que a área

manteve-se inalterada pois os animais do experimento eram normotensos e portanto não possuíam alterações estruturais na parede ventricular. Tais alterações estruturais na prática estão mais relacionadas a sobrecarga hemodinâmica imposta por hipertensão arterial ou aumento de volume (MATSUBARA et al., 2006). Portanto a PVE diminuiu e isto repercutiu na força de contração e consequentemente á Dp/Dt .

A Dp/Dt máxima ocorreria durante a sístole isovolumétrica, período do ciclo cardíaco, onde as modificações das dimensões do ventrículo esquerdo são pequenas e insuficientes para influenciar os resultados de pressão e volume. Esta circunstância cria uma proporcionalidade direta entre as dimensões do ventrículo esquerdo (VE) e a pressão ventricular: $F=aP$, onde F é a força, a diz respeito a área e P é a pressão (OKOSHI e TUCCI, 1995). Se considerarmos que as dimensões do VE neste trabalho foram preservadas, a PVE diminuiu considerando que a RVP caiu, levando a uma menor força motriz ao vencer a resistência imposta ao fluxo sanguíneo e ainda a FC se manteve sem alterações significativas (Figura 19) pode-se dizer que estas variáveis apoiam a diminuição da Dp/Dt .

Estas alterações podem estar de acordo com pressupostos de fisiologia cardíaca relacionados a Lei de Frank-Starling. Contudo, deve-se ter precaução ao estabelecer tal relação. Tucci, 1982, fez algumas considerações sobre este importante mecanismo, onde verificou-se que aumentos na pressão diastólica acompanhadas de dilatação ventricular provocaria um prolongamento da contração, ou seja, os mecanismos contráteis permaneceram ativados por mais tempo. Nesta condição a Dp/Dt aumentaria. Em situação onde não ocorre tal dilatação ventricular, como a estudada neste trabalho, pode ter ocorrido o mecanismo inverso, ou seja, manutenção do diâmetro ventricular associado a diminuição da RVP e diminuição de pressão ventricular, levaria a diminuição da Dp/Dt .

In vitro, foi encontrado importante efeito vasorelaxante dependente do endotélio. Quando aplicado doses crescentes do EHCS_F em anéis com endotélio funcional (Figura 27),

pré-contraído com 0,1 μM de FEN, induziu vasorrelaxamento em anéis de aorta, com $\text{EC}_{50} = 1,10 \pm 0,15 \mu\text{g/mL}$. Sugerindo que este efeito causado pelo EHCS_F é concentração-dependente.

Tal efeito foi abolido após a remoção do endotélio e quando utilizou-se L-name (inibidor da NOS), sugerindo que a manutenção do endotélio intacto é essencial para a expressão deste efeito e que parte dele é dependente da NOS.

Afim de verificar se o EHCS_F estaria promovendo vasorrelaxamento via liberação de prostaciclina (PGI_2), que são potentes vasodilatadores, formados em células endoteliais a partir da sequência de reações enzimáticas iniciadas pela COX. O mecanismo envolve eventos que levam a diminuição do $[\text{Ca}^{2+}]_i$ e subsequentemente ativam a NOS e promovem o vasorrelaxamento (BATLOUNI, 2001). Para avaliar esta via farmacológica foi utilizado a indometacina, que não inibiu o vasorrelaxamento. Não sendo estatisticamente diferente dos anéis com endotélio (Figura 29). Estes achados ainda não desabilitam a possibilidade de que outros mecanismos vasorelaxantes dependentes de endotélio estejam envolvidos na resposta produzida pelo EHCS_F .

No que diz respeito a participação dos receptores muscarínicos, os achados desse mecanismo farmacológico demonstrou que não houve diminuição significativa do efeito vasorelaxante nos anéis com atropina ($\text{EC}_{50} = 0,99 \pm 0,20 \mu\text{g/mL}$) quando comparados com anéis com endotélio ($\text{EC}_{50} = 1,10 \pm 0,15 \mu\text{g/mL}$). Isso nos leva a inferir que o efeito vasorelaxante do EHCS_F não ocorre por esta via, nem ocorre de forma independente da NOS.

Estes dados estão de acordo com os achados de Monteiro, 2009, que utilizou os mesmos bloqueadores (atropina e indometacina), para avaliar os efeitos do vasorrelaxamento em anéis de aorta, ao testar a *Solanum paludosum* Moric.

Outros estudos, encontraram respostas similares no relaxamento do músculo liso em artérias quanto à via dependente do endotélio, como por exemplo, *Persea americana* Mill (MUSABAYANE, 2007) e *Albizia inopinata* (PIRES et al., 2000). Estes de forma semelhante

ao EHCS_F, tem apresentado efeito vasorelaxante em anéis de aorta dependente da liberação do NO endotelial.

Estes resultados corroboram com a idéia de que o efeito vasorelaxante induzido por EHCS_F, observado *in vitro*, poderia ser responsável por parte do efeito hipotensor observado nos experimentos *in vivo*.

Contudo, o efeito vasorelaxante observado no experimento *in vitro*, persistiu mesmo com bloqueio do L-name, atropina e indometacina. Isto levou a sugerir que outro mecanismo, dependente de endotélio, poderia estar implicado nestes efeitos.

O Ca²⁺ está envolvido com vários processos de sinalização celular, entre eles, participa também na regulação das concentrações de K⁺. Canais de K⁺ abertos por canais de cálcio, são altamente sensíveis as concentrações intracelulares de Ca²⁺ e mudanças de voltagem na membrana celular. O NO atua sobre esses canais mediando o efeito de vasorrelaxamento. (GHATA et al., 2006).

Drogas que bloqueiem os VOCC's podem inibir o acoplamento eletromecânico, produzindo assim vasodilatação e diminuição da pressão arterial (McFADZEAN e GIBSON, 2002).

Sob a hipótese de que o efeito vasorelaxante do EHCS_F, pudesse está relacionado ao bloqueio dos canais de Ca²⁺ ou a abertura dos canais de K⁺, foram realizados experimentos usando KCl, como agente despolarizante. Isto, porque KCl induz a despolarização por ativação de VOCC's promovendo influxo de Ca²⁺ e subsequente liberação de Ca²⁺ do retículo sarcoplasmático (GURNEY, 1994; NASA et al., 1992; YOSHIHISA et al., 1992), ou seja, mediada por acoplamento eletromecânico (McFADZEAN e GIBSON, 2002). Enquanto a despolarização induzida por FEN, acoplamento farmacomecânico, é devida a estimulação dos receptores α adrenérgicos acoplados a proteína-G com conseqüente aumento dos níveis de IP₃

e liberação de Ca^{2+} dos estoques intracelulares (PÉREZ-VÍSCAÍNO et al., 1998; PAIVA e FARIAS, 2005).

Por conseguinte, foram utilizados soluções com KCl 80 mM e KCl 20 mM, em anéis com endotélio, onde observou-se diferenças significativas quando comparados com contrações induzidas pela FEN. Esses resultados levam a inferir que o efeito vasorelaxante induzido pelo EHCS_F, pode ter a participação dos VOCC's, assim como, outros tipos de canais de K^+ , como canal K_{ATP} , canal K_{V} , canal K_{CA} e canal K_{IR} (CORTES et al., 2001) que não foram investigados neste estudo. Contudo majoritariamente ocorre pela via da NOS.

O vasorrelaxamento induzidos por várias outras plantas, pode ocorrer através do bloqueio de VOCC's, como, óleo essencial da *Ocotea duckei* Vattimo (CUNHA, 2000) e *Lippia alba* (MAYNARD, 2011), assim como, através de canais de K^+ , como a *Curcuma Longa* L. (ADARAMOYE et al, 2009), esses estudos indicam que o bloqueador de VOCC's ou ativador de canais de K^+ , reforçam a hipótese da resposta vasodilatadora ser por inibição do influxo Ca^{2+} ou por hiperpolarização do músculo liso vascular. Este mecanismo de ação farmacológico não foi verificado nos experimentos com o EHCS_F. Contudo em estudo realizado por Shish, 2004, com *Alseis yucatanesis*, pertencente a mesma família da *Calycophyllum spruceanum*, Rubiaceae, foi verificado ação vasorelaxante mediada pelo VOCC. O extrato foi mais potente em inibir FEN (mediado por ROCC) do que em contrações induzidas por KCl (mediado por VOCC), com ED₅₀ de 0,12 e 1,73 mg/mL, respectivamente. Resultado semelhante foram encontrados em estudo com outras espécies da Amazônia, como a *Pradosia huberi* e *Attalea excelsa*, que obtiveram resultados significativamente reduzidos, efeito vasorelaxante, quando investigaram a via por VOCC, obtendo redução do efeito máximo com KCl 80 mM ($E_{\text{max}} = 8,1 \pm 4,8\%$, n=6) quando comparado a curva obtida em anéis pré-contraídos com 10 μM de FEN ($E_{\text{max}} = 87,4 \pm 2,9 \%$, n=8) (MEDEIROS, 2008). Os dados referentes ao efeito

significativamente maior mediado pelo ROCC, vão de encontro com os achados deste estudo, onde verificou-se efeito majoritário através de ROCC.

Assim, em conjunto, considerando que na ausência do endotélio vascular o efeito de vasorrelaxamento foi abolido e que na investigação de outras vias farmacológicas não dependente do endotélio como VOCC e COX, não houve diferenças significativas quando comparadas com anéis sem os bloqueadores, os resultados sugerem o envolvimento majoritário da via NO/GMPc no relaxamento vascular em aorta de rato induzida pelo EHCS_F. Além disso observa-se que nas doses maiores o efeito vasorelaxante foi mais potente, revelando um possível efeito dose-dependente, confirmado em outros estudos, como: CUNHA, 2000; ADARAMOYE et al, 2009 e MAYNARD, 2011. Vale ressaltar que vários outros estudos com extratos de plantas, confirmaram os achados desse trabalho, onde a via farmacológica principal responsável pelo efeito vasorelaxante é evidenciado pela via do NO (Fitzpatrick et al., 1995; Odigie et al., 2003). Com base no exposto, é hipotetizado que constituintes químicos presentes no extrato estimulem a via NOS.

Dentre os constituintes químicos presentes no EHCS_F, descritos na literatura, destacam-se os compostos fenólicos e seus derivados, principalmente o ácido clorogênico (ACG) ou ácido cafeolquínico (CQA), cujo efeito hipotensor e vasorelaxante, já foi verificado no estudos de GUARABONE e ROSA, 2007 e MAGRINI, 2016.

O ácido clorogênico está presente em frutas e vegetais, como tomates, maçã, grãos de café, peras ocidentais, beringelas. As ações fisiológicas *do ácido clorogênico* incluem atividade carcinostática, antioxidante, e anti-hipertensivo em humanos (MARINOVA, 2009).

Verificou-se através de experimento in vitro que a administração de ACG (300 á 600 mg/Kg) reduziu a pressão arterial em ratos hipertensos geneticamente. O relaxamento foi dependente do endotélio e foi maior no grupo que recebeu dieta a base de ácido clorogênico (ácido 5-cafeolquínico), comparado com o grupo controle. Os mecanismos envolvidos nesta ação ainda não foram totalmente elucidados (SUZUKI, 2006). Acredita-se que ocorra uma ação

seqüestradora de espécies reativas de oxigênio ou ainda aumento da bioviabilidade do óxido nítrico, um potente vasodilator. Acredita-se que tenha uma ação protetora sobre óxido nítrico sintase endotelial (eNOS), já que o efeito hipotensor em animais geneticamente hipertensos foi inibida quando tratados com inibidores da NOS (TOUYZ, 2004).

Independente de quais sejam os compostos constituintes do EHCS_F, ou seus metabólitos, responsáveis pelo efeito na reatividade vascular, os presentes resultados demonstraram, pela primeira vez, que o extrato de *Calycophyllum spruceanum* apresentou atividade vasorelaxante. Foi possível elucidar que o efeito foi quase que totalmente dependente de endotélio. Por meio de abordagens experimentais *in vitro* com aorta de ratos normotensos e que, o efeito hipotensor verificado em experimentos *in vivo* com ratos normotensos neste estudo foi devido a queda na RVP dada por vasorrelaxamento, uma vez que, apesar de testar outras variações em parâmetros cardíacos, isso não foi capaz de promover modificações no VS e FC.

7 CONCLUSÕES

O principal achado deste trabalho foi que a administração aguda de EHCS_F produziu efeito hipotensor e vasorelaxante, em consequência de uma diminuição da resistência vascular periférica em função da influência majoritária do NO, nas abordagens *in vivo* e *in vitro*, respectivamente.

Os dados apresentados sugerem que o EHCS_F:

- Apresenta baixa toxicidade ;
- Nas doses utilizadas não induz qualquer tipo de incoordenação motora, excluindo efeitos depressores do SNC ;
- O EHCS_F induziu efeito hipotensor em ratos normotensos que, diante de nenhuma modificação do DC frente ao tratamento, parece ser inteiramente devida a queda da RVP, dada pelo efeito vasorrelaxante demonstrado em anéis de artéria aorta isolada de ratos ;
- O vasorrelaxamento parece ser dependente do endotélio vascular, uma vez que em anéis desprovidos do endotélio, o efeito vasorrelaxante desaparece integralmente;
- O NO é o principal FRDE, uma vez que a inibição da enzima na sua produção aboliu o efeito vasorrelaxante, bem como, após uso de um inibidor da via das prostaciclina e receptores muscarínicos, não foi capaz de modificar a resposta ao tratamento com EHCS_F ;
- Adicionalmente foi demonstrado o envolvimento de canais iônicos voltagem dependente, principalmente dos canais de K⁺, e com menor expressão canais de Cálcio. Por tais investigações é possível inferir que o EHCS_F opera abertura de canais de K⁺ e em menor grau promove bloqueio de VOCC, mas também contribuídas para o efeito vasorrelaxante e hipotensor.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADARAMOYE, O. A. et al. Hypotensive and endothelium-independent vasorelaxant effects of methanolic extract from *Curcuma longa* L. in rats. **Journal of ethnopharmacology**, v. 124, n. 3, p. 457-462, 2009.
- AIRES, M. D. M. **Fisiologia**. 4.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2013.
- ANDRADE, S. S. D. A. et al. Prevalência de hipertensão arterial autorreferida na população brasileira: análise da Pesquisa Nacional de Saúde, 2013. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 24, p. 297-304, 2015.
- ANWAR, M. A.; AL DISI, S. S.; EID, A. H. Anti-Hypertensive Herbs and Their Mechanisms of Action: Part II. **Frontiers in Pharmacology**, v. 7, n. 50, 2016.
- BAHIA, L. et al. O endotélio na síndrome metabólica. **Arq. bras. endocrinol. metab**, v. 50, n. 2, p. 291-303, 2006.
- BARDAI, Sanae El et al. Pharmacological evidence of hypotensive activity of *Marrubium vulgare* and *Foeniculum vulgare* in spontaneously hypertensive rat. **Clinical and experimental hypertension**, v. 23, n. 4, p. 329-343, 2001.
- BARGIGGIA, G. S. et al. A new method for estimating left ventricular dP/dt by continuous wave Doppler-echocardiography. **Circulation**, v. 80, n. 5, p. 1287-1292, 1989.
- BARLOW, G.; KNOTT, D. H. Hemodynamic alterations after 30 minutes of pentobarbital sodium anesthesia in dogs. **American Journal of Physiology**, v. 207, n. 4, p. 764-766, 1964.
- BATLOUNI, M. Endotélio e hipertensão arterial. **Rev. Bras. Hipertens**, v. 8, n. 3, p. 328-338, 2001. 52
- BEŁTOWSKI, J.; JAMROZ-WISŃIEWSKA, A. Hydrogen sulfide and endothelium-dependent vasorelaxation. **Molecules**, v. 19, n. 12, p. 21183-21199, 2014.
- CARVALHO, M. H. C. et al. Hipertensão arterial: o endotélio e suas múltiplas funções. **Rev Bras Hipertens**, v. 8, n. 1, p. 76-88, 2001.
- CERQUEIRA, N. F.; YOSHIDA, W. B. Óxido nítrico: revisão. **Acta Cirúrgica Brasileira**, p. 417-423, 2002.
- CESARETTI, Mário Luís Ribeiro et al. Hemodinâmica sistêmica e função ventricular esquerda de ratos hipertensos tornados diabéticos. **Arq Bras Endocrinol Metab**, São Paulo, v. 54, n. 9, p. 842-851, Dec. 2010.
- CHAGAS, ANTÔNIO C. P. et al. **Endotélio e doenças cardiovasculares**. 1ª ed. São Paulo, Atheneu, 2005.

COHEN, Richard A.; VANHOUTTE, Paul M. Endothelium-dependent hyperpolarization beyond nitric oxide and cyclic GMP. **Circulation**, v. 92, n. 11, p. 3337-3349, 1995.

CONSOLINI, Alicia E.; BALDINI, Osvaldo AN; AMAT, Aníbal G. Pharmacological basis for the empirical use of *Eugenia uniflora* L.(Myrtaceae) as antihypertensive. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 66, n. 1, p. 33-39, 1999.
APA

CHOR, D.; MENEZES, P. R. Saúde no Brasil 4 Doenças crônicas não transmissíveis no Brasil: carga e desafios atuais. **Veja**, v. 6736, n. 11, p. 60135-9, 2011.

CLARK, Shawn G.; FUCHS, Leslie C. Role of nitric oxide and Ca⁺⁺-dependent K⁺ channels in mediating heterogeneous microvascular responses to acetylcholine in different vascular beds. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 282, n. 3, p. 1473-1479, 1997.

CORNWELL, T. L. et al. Regulation of sarcoplasmic reticulum protein phosphorylation by localized cyclic GMP-dependent protein kinase in vascular smooth muscle cells. **Molecular pharmacology**, v. 40, n. 6, p. 923-931, 1991.

CÔRTEZ, Steyner F. et al. Pharmacological evidence for the activation of potassium channels as the mechanism involved in the hypotensive and vasorelaxant effect of dioclein in rat small resistance arteries. **British journal of pharmacology**, v. 133, n. 6, p. 849-858, 2001.

COSTA, L. C.; THULER, L. C. S. Fatores associados ao risco para doenças não transmissíveis em adultos brasileiros: estudo transversal de base populacional. **Rev Bras Est Pop**, v. 29, n. 1, p. 133-145, 2012.

CUNHA, R. M. D. et al. Efeitos cardiovasculares induzidos pelo óleo essencial de *Ocotea Duckei* Vattimo em ratos. **Rev. bras. ciênc. saúde**, v. 9, n. 1, p. 69-78, 2000.

DE AGUIAR, E. S. V.; BOPP, A. L. D. S.; SAVASSI, G. L. Mensuração de pressão venosa central por meio de cateteres venosos central e periférico: comparação entre os valores obtidos em cães e elaboração de índice de correção. **Ciência Rural**, v. 34, n. 6, p. 1827-1831, 2004.

DE ANDRADE CARDOSO, F. et al. Endotélio vascular: Parte I: função e propriedade. **Revista de Ciências Médicas**, v. 3, n. 3, 2012.

DE ARAÚJO, V. F. et al. Plantas da Amazônia para Produção Cosmética, Projeto ITTO PD 31/99 Rev.3 (I). Brasília. 2007

DE SOUSA, F. C. et al. Uso de plantas medicinais (fitoterápicos) por mulheres da cidade de Icó-CE. **BIOFAR rev de biol e farm**, v. 05, n. 1, p. 161-170, 2011.

DE VARGAS, F. S. et al. Antioxidant activity and peroxidase inhibition of Amazonian plants extracts traditionally used as anti-inflammatory. **BMC complementary and alternative medicine**, v. 16, n. 1, p. 1, 2016.

DEL CASTILLO, J. M.; HERSZKOWICZ, N. **Ecocardiografia na prática clínica: problemas e soluções**. São Paulo. Atheneu, 2011.

DRÖGE, W. Free radicals in the physiological control of cell function. **Physiological reviews**, v. 82, n. 1, p. 47-95, 2002.

DUSSE, L.; VIEIRA, L. M.; CARVALHO, M. D. G. Revisão sobre óxido nítrico. **J Bras Patol Med Lab**, v. 39, n. 4, p. 435-50, 2003.

EGLIN, R.; WHITING, R. Determination of the muscarinic receptor subtype mediating vasodilatation. **British journal of pharmacology**, v. 84, n. 1, p. 3, 1985. 54

FELIPPI, R. Efeito do extrato aquoso de erva-mate (*Ilex paraguariensis*) na reatividade vascular: enfoque na aterosclerose experimental. 2005.

FERREIRA, T. et al. Phytotherapy: an introduction to its history, use and application. **Rev Bras de Plan Med**, v. 16, n. 2, p. 290-298, 2014.

FIORETTO, J. R. Influência da elevação sustentada da pressão arterial sobre a dp/dt do ventrículo esquerdo mantendo-se constante a pressão diastólica do ventrículo esquerdo. **Arq Bras de Card**, p. 159-164, 1996.

FIRMO, W. D. C. A. et al. Contexto histórico, uso popular e concepção científica sobre plantas medicinais. **Cadernos de Pesquisa**, v. 18, 2012.

FITZPATRICK, D. F. et al. Endothelium-dependent vasorelaxation caused by various plant extracts. **Journal of cardiovascular pharmacology**, v. 26, n. 1, p. 90-95, 1995.

FURCHGOTT, R. et al. Endothelial cells as mediators of vasodilation of arteries. **Journal of cardiovascular pharmacology**, v. 6, p. S336-S343, 1984.

FURCHGOTT, R. F. Endothelium-derived relaxing factor: discovery, early studies, and identification as nitric oxide. **Bioscience reports**, v. 19, n. 4, p. 235-251, 1999.

FURNIVAL, C.; LINDEN, R.; SNOW, H. Inotropic changes in the left ventricle: the effect of changes in heart rate, aortic pressure and end-diastolic pressure. **The Journal of physiology**, v. 211, n. 2, p. 359-387, 1970. 55

GARAMBONE, Edna; ROSA, Glorimar. Possíveis benefícios do ácido clorogênico à saúde. **Alimentos e Nutrição Araraquara**, v. 18, n. 2, p. 229-235, 2008.

GUEDES, D. N. et al. Calcium antagonism and the vasorelaxation of the rat aorta induced by rotundifolone. **Brazilian journal of medical and biological research**, v. 37, n. 12, p. 1881-1887, 2004.

GUYTON, A.C.; HALL, J.E. **Tratado de Fisiologia Médica**. 11^a ed. Rio de Janeiro, Elsevier Ed., 2011.

GHATTA, S. et al. Large-conductance, calcium-activated potassium channels: structural and functional implications. **Pharmacology & therapeutics**, v. 110, n. 1, p. 103-116, 2006.

GOVERS, R.; RABELINK, T. J. Cellular regulation of endothelial nitric oxide synthase. **American Journal of Physiology-Renal Physiology**, v. 280, n. 2, p. 193-206, 2001.

HAMLIN, R. L.; DEL RIO, C. dP/dt max—a measure of ‘baroinometry’. **Journal of pharmacological and toxicological methods**, v. 66, n. 2, p. 63-65, 2012.

IRIGOYEN, M. C. C.; KRIEGER, E. M. Baroreflex control of sympathetic activity in experimental hypertension. **Brazilian journal of medical and biological research**, v. 31, n. 9, p. 1213-1220, 1998.

JR. VIEGAS, C., BOLZANI, VANDERLAN DA SILVA. Os produtos naturais e a química medicinal moderna. **Quim. Nova**, v. 29, p. 11, 2006.

JOHNSON, L. R. **Fundamentos de Fisiologia Médica**, 2ª ed., Ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro. 2003.

KAPPAGODA, C.; LINDEN, R.; SAUNDERS, D. The effect on heart rate of distending the atrial appendages in the dog. **The Journal of physiology**, v. 225, n. 3, p. 705, 1972. 56

KAPPAGODA, C. et al. Atrial receptors and heart rate: the efferent pathway. **The Journal of physiology**, v. 249, n. 3, p. 581, 1975.

KATZ, A. M. **Physiology of the heart**, 5ª ed., Ed. Lippincott, USA. 2010.

LINDEN, R.; MARY, D.; WEATHERILL, D. The nature of the atrial receptors responsible for a reflex increase in activity in efferent cardiac sympathetic nerves. **Quarterly Journal of Experimental Physiology**, v. 67, n. 1, p. 143-149, 1982.

LINEGAR, C. R.; DILLE, J. M.; KOPPANYI, T. Studies on barbiturates XVIII. Analysis of a peripheral action of barbiturates. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 58, n. 2, p. 128-134, 1936.

MAGRINI, V. Estudo fitoquímico dos extratos de folhas, galhos e cascas do caule de *Calycophyllum spruceanum* Benth para testes de potencial de cosmético funcional. 2016.

MATSUBARA, Toshiyuki et al. Antihypertensive actions of methylripariochromene A from *Orthosiphon aristatus*, an Indonesian traditional medicinal plant. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 22, n. 10, p. 1083-1088, 1999.

MARTINS, D.; NUNEZ, C. Secondary Metabolites from Rubiaceae Species. **Molecules**, v. 20, n. 7, p. 13422, 2015.

MARTINS, D.; NUNEZ, C. V. Secondary metabolites from Rubiaceae species. **Molecules**, v. 20, n. 7, p. 13422-13495, 2015.

MAYNARD, L. G. Efeitos cardiovasculares do óleo essencial de *lippia alba* (mill) ne brown.(erva cidreira brasileira) em ratos. 2011.

- MCFADZEAN, I.; GIBSON, A. The developing relationship between receptor-operated and store-operated calcium channels in smooth muscle. **British journal of pharmacology**, v. 135, n. 1, p. 1-13, 2002. 57
- MEDEIROS, A. A. N. D. Estudo da atividade das espécies amazônicas: *Pradosia huberi* Ducke. e *Attalea excelsa* Mart. sobre o sistema cardiovascular em ratos. 2008.
- MELO, NAYARA COSTA. Avaliação da atividade protetora solar *in vitro* das espécies pauculato (*Calycophyllum spruceanum* (Benth.) Hook. f. ex K. Schum) e IPÊ- AMARELO (*Tabebuia aurea* (Silva Manso) Benth. & Hook. f. ex S. Moore) 2015.
- MENDES, R. T. et al. Selective inhibition of cyclooxygenase-2: risks and benefits. **Revista brasileira de reumatologia**, v. 52, n. 5, p. 774-782, 2012.
- MILL, J. G.; VASSALLO, D. V. Hipertrofia cardíaca. **Rev Bras Hipertens**, v. 8, n. 1, p. 18-29, 2001.
- MINISTÉRIO DA CIÊNCIA, T. E. I.; CONCEA, C. N. D. C. D. E. A. **Diretrizes da Prática de Eutanásia do CONCEA**. BRASÍLIA: 54 p. 2013.
- MONTEIRO, E. C. A. et al. Os antiinflamatórios não esteroidais (AINEs). **Temas de reumatologia clínica**, v. 9, n. 2, p. 53-63, 2008.
- MOREIRA, Vinicius F.; VIEIRA, Ivo JC; BRAZ-FILHO, Raimundo. Chemistry and Biological Activity of Condamineae Tribe: A Chemotaxonomic Contribution of Rubiaceae Family. **American Journal of Plant Sciences**, v. 6, n. 16, p. 2612, 2015.
- MOURA, M. Entropia e a Segunda Lei da Termodinâmica III. Entropia e Pressão. Universidade Federal do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro, 2016.
- MUSABAYANE, C. T. et al. Cardiovascular effects of *Persea americana* Mill (Lauraceae)(avocado) aqueous leaf extract in experimental animals: cardiovascular topic. **Cardiovascular Journal of South Africa**, v. 18, n. 2, p. 69-76, 2007.
- NEGRÃO, C. E.; RONDON, M. Exercício físico, hipertensão e controle barorreflexo da pressão arterial. **Rev Bras Hipertens**, v. 8, n. 1, p. 89-95, 2001.
- NORONHA, C. E. Ação de drogas agonistas e antagonistas dos sistemas colinérgico e dopaminérgico: estudo comportamental e neuroquímico em corpo estriado de rato. 2005
- NISHIMORI, C. T. et al. Alterações hemodinâmicas e intracranianas em cães com hemorragia aguda, anestesiados com isoflurano. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, p. 1048-1056, 2006.
- OKOSHI, K. et al. Influence of the elevation of the left ventricular diastolic pressure on the values of the first temporal derivative of the ventricular pressure (dP/dt). **Arq bras card**, v. 73, n. 1, p. 42-46, 1999.

OLATUNJI, L. A. et al. Chronic Administration of Aqueous Extract of Hibiscus sabdariffa. Enhances Na⁺-K⁺-ATPase and Ca²⁺-Mg²⁺-ATPase Activities of Rat Heart. **Pharmaceutical biology**, v. 44, n. 3, p. 213-216, 2006.

OLFERT, ERNEST D., BRENDA M. CROSS, AND A. ANN MCWILLIAM. **Guide to the care and use of experimental animals**. Vol. 1. No. 2. Ottawa: Canadian Council on Animal Care, 1993.

OLIVEIRA FILHO, A. A. D. Participação da via do óxido nítrico e do cálcio no vasorrelaxamento induzido pelo flavonoide 5, 7, 4 trimetoxiflavona (TMF) em artéria mesentérica superior de rato. 2012.

OPARIL, S.; ZAMAN, M. A.; CALHOUN, D. A. Pathogenesis of hypertension. **Annals of internal medicine**, v. 139, n. 9, p. 761-776, 2003. 59

PAGE, I.; MCCUBBIN, J. Autonomic regulation of arterial pressure responses. **Archives internationales de pharmacodynamie et de thérapie**, v. 157, n. 1, p. 152, 1965.

PAIVA, T. B.; FARIAS, N. C. Mecanismos da contração do músculo liso vascular. **Rev bras hipertens**, v. 12, n. 2, p. 89-92, 2005.

PALMER, R.; ASHTON, D.; MONCADA, S. Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. **Nature**, v. 333, n. 6174, p. 664-666, 1988.

PHILLIPSON, J. D. Phytochemistry and medicinal plants. **Phytochemistry**, v. 56, p. 237-243, 2001.

PIRES, SL de S. et al. Endothelium-derived nitric oxide is involved in the hypotensive and vasorelaxant responses induced by the aqueous fraction of the ethanolic extract of the leaves of *Albizia inopinata* (Harms) GP Lewis in rats. **Phytomedicine**, v. 7, n. 2, p. 91-98, 2000.

PRIANO, L.; TRABER, D.; WILSON, R. Barbiturate anesthesia: an abnormal physiologic situation. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 165, n. 1, p. 126-135, 1969.

QUEIROZ, D. B. D. Alterações vasculares em ratos expostos ao diabetes materno: Contribuição das prostaglandinas derivadas da COX-2 e sua repercussão em diferentes idades. 2010.

RAWAT, P.; SINGH, P. K.; KUMAR, V. Anti-hypertensive Medicinal Plants and their Mode of Action. **Journal of Herbal Medicine**, 2016.

ROSS, J. Cardiac function and myocardial contractility: a perspective. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 1, n. 1, p. 52-62, 1983. 60

SANTOS, A. B.; RIBEIRO-OLIVEIRA, J. P.; CARVALHO, C. M. Sobre a botânica, a etnofarmacologia e a química de *Calycophyllum spruceanum* (Benth.) Hook. f. ex K. Schum. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 18, p. 383-389, 2016.

SANTOS, J. E. D.; GUIMARÃES, A. C.; DIAMENT, J. Consenso Brasileiro Sobre Dislipidemias Detecção, Avaliação e Tratamento. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia**, v. 43, p. 287-305, 1999.

SCHANAIDER, A.; SILVA, P. C. Uso de animais em cirurgia experimental. **Acta Cir Bras**, v. 19, n. 4, p. 441-7, 2004.

SILVA, A. P. A. B. Estudo farmacológico de atividade antinociceptiva e anti-inflamatória dos extratos hidroalcoólicos da *Calycophyllum spruceanum* (Benth.) Hook. f. ex K. Schum. 2015.

SIMPLICIO, J. A. et al. O Labdano Ácido Ent-3-Acetóxi-Labda-8 (17), 13-Dieno-15-Óico Reduz Pressão Arterial Em Ratos Hipertensos. **Arq Bras Cardiol**, v. 106, n. 6, p. 481-490, 2016.

SLISH, D. F.; ARVIGO, R.; BALICK, M. J. Alseis yucatanensis: a natural product from Belize that exhibits multiple mechanisms of vasorelaxation. **Journal of ethnopharmacology**, v. 92, n. 2, p. 297-302, 2004.

SLISH, D. F. et al. Ethnobotany in the search for vasoactive herbal medicines. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 66, n. 2, p. 159-165, 1999.

SNYDERS, D. J. Structure and function of cardiac potassium channels. **Cardiovascular Research**, v. 42, n. 2, p. 377-390, 1999. 61

SOLARO, R. J. Integration of Sarcomere Mechanics with Cardiac Function Clarifies the Meaning of Preload, Afterload, and Contractility. San Rafael (CA): **Morgan & Claypool Life Sciences**, 2011.

SUZUKI, A. et al. Chlorogenic acid attenuates hypertension and improves endothelial function in spontaneously hypertensive rats. **Journal of hypertension**, v. 24, n. 6, p. 1065-1073, 2006.

TAMARGO, J. et al. Pharmacology of cardiac potassium channels. **Cardiovascular Research**, v. 62, n. 1, p. 9-33, 2004.

TANAKA, Yoshio et al. Significant role of neuronal non-N-type calcium channels in the sympathetic neurogenic contraction of rat mesenteric artery. **British journal of pharmacology**, v. 128, n. 7, p. 1602-1608, 1999.

TEIXEIRA, K. Plantas medicinais que podem causar alteração na pressão arterial e interação com anti-hipertensivos. 2012.

TEIXEIRA, Rogério et al. Pressão diastólica final do ventrículo esquerdo e síndromes coronarianas agudas. **Arq. Bras. Cardiol.**, São Paulo , v. 97, n. 2, p. 100-110, Aug. 2011

TIBANA, R. A.; BALSAMO, S.; PRESTES, J. Associação entre força muscular relativa e pressão arterial de repouso em mulheres sedentárias. **Rev Bras Cardiol**, v. 24, n. 3, p. 163- 8, 2011.

TORTORA, Gerard J.; DERRICKSON, Bryan. **Corpo humano: fundamentos de anatomia e fisiologia**. 8. ed. Porto Alegre: Artmed, 2012.

TOUYZ, R. M. Reactive oxygen species, vascular oxidative stress, and redox signaling in hypertension what is the clinical significance? **Hypertension**, v. 44, n. 3, p. 248-252, 2004. 62

URAKAMI-HARASAWA, Lemmy et al. Importance of endothelium-derived hyperpolarizing factor in human arteries. **Journal of Clinical Investigation**, v. 100, n. 11, p. 2793, 1997.

VANHOUTTE, P. M. et al. Endothelial dysfunction and vascular disease. **Acta physiologica**, v. 196, n. 2, p. 193-222, 2009.

VIEGAS JR, C.; BOLZANI, V. D. S.; BARREIRO, E. J. Os produtos naturais e a química medicinal moderna. **Química Nova**, v. 29, n. 2, p. 326-337, 2006.

WAIB, Paulo Henrique; BURINI, Roberto Carlos. Fundamentos bioquímicos da modulação do tono vascular. **Arq. bras. Cardiol**, v. 56, p. 401-6, 1991.

WALTERS, G.; MARY, D. The effect on the efferent vagal nerves to the heart of stimulating atrial receptors in the dog. **Quarterly Journal of Experimental Physiology**, v. 71, n. 4, p. 549-557, 1986.

WEBB, R. C. Smooth muscle contraction and relaxation. **Advances in physiology education**, v. 27, n. 4, p. 201-206, 2003.

WILLIAMS, L. A. D. Ethnomedicine. **West Indian Medical Journal**, v. 55, n. 4, p. 215-216, 2006.