



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO ACRE**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA,**  
**INOVAÇÃO E TECNOLOGIA PARA A AMAZÔNIA (CITA)**

**EFEITOS DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO DE *Acmella***  
***oleracea* (L.) R.K.Jansen SOBRE PARÂMETROS**  
**CARDIOVASCULARES DE RATOS**

**EFRAIM DOS SANTOS FERREIRA**

**RIO BRANCO**  
**2018**

**EFRAIM DOS SANTOS FERREIRA**

**EFEITOS DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO DE *Acmella oleracea* (L.) R.K.Jansen SOBRE PARÂMETROS CARDIOVASCULARES DE RATOS**

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

**Orientador:** Prof. Dr. Renildo Moura da Cunha

**Co-orientador:** Prof. Dr. Dionatas Ulises de Oliveira Meneguetti

**RIO BRANCO  
2018**

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por me guiar em cada momento, em cada decisão, me conceder saúde e sabedoria para alcançar cada degrau nesta complexa jornada.

Aos meus pais, Zacarias Alves Ferreira e Maria Amélia dos Santos Ferreira, que me instruíram sempre a andar no caminho da luz, por ensinarem que o conhecimento é a chave para o sucesso, por me ensinarem a chegar aos meus objetivos sempre nos preceitos da honestidade e amor.

À Universidade Federal do Acre pela oportunidade que me forneceu em fazer parte de um programa de pós-graduação e me especializar.

Ao professor Dr. Renildo Moura da Cunha, por me orientar na pesquisa, por me apresentar a pesquisa científica de uma forma que jamais deixaria de me dedicar, por tantas vezes em que segurou minha mão me ensinando os protocolos.

Ao professor Dr. Dionatas Ulises de Oliveira Meneguetti, parceiro e colaborador do LAPFFAR, pelas orientações e incentivos, inclusive incentivos financeiros na compra de insumos.

À professora Dra. Clarice Maia Carvalho, então coordenadora do CITA, por fazer as exigências necessárias a cada momento do mestrado, mas também por ser amiga e conselheira dos pós-graduandos.

À Biomédica Natacha, colega de mestrado e amiga pessoal, pelos auxílios no desenvolvimento desta pesquisa e companheirismo na manutenção do laboratório de fisiofarmacologia.

Ao Professor Eduardo Andrade, parceiro do LAPFFAR, por colaborar em muitas tarefas necessárias ao desenvolvimento deste trabalho.

Aos PIBICs Elionardo e Mc O'nil por terem nos momentos necessários manter os animais com alimentação e limpeza do ambiente.

À Fernanda, técnica do Laboratório de Medicina Tropical, anexo ao LAPFFAR e então mestranda do PPG em Ciências da Saúde na Amazônia Ocidental, pelas várias vezes em que me auxiliou na realização dos protocolos experimentais.

À Roberta e Ana Paula, pares do LAPFFAR, pela convivência e por toda ajuda oferecida.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) pelo apoio financeiro concedido a este trabalho a partir da concessão de bolsa de estudo.

Aos profissionais do Herbário Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Marlene Freitas da Silva (MFS), da Universidade do Estado do Pará (UEPA), pelo apoio dado na identificação botânica da planta que foi objeto de estudo deste trabalho.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ACRE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA, INOVAÇÃO E  
TECNOLOGIA PARA A AMAZÔNIA (CITA)

EFRAIM DOS SANTOS FERREIRA

EFEITOS DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO DE *Acmella*  
*oleracea* (L.) R.K.Jansen SOBRE PARÂMETROS  
CARDIOVASCULARES DE RATOS

DISSERTAÇÃO APROVADA EM: 27/03/2018

Orientador:

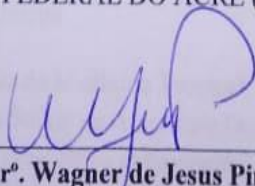


Prof. Dr. Renildo Moura da Cunha  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO ACRE

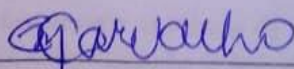
Membros da Banca:



Prof. Dr. Dionatas Ulises de Oliveira Meneguetti  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO ACRE (Coorientador)



Prof. Dr. Wagner de Jesus Pinto  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO ACRE



Prof. Dr. Clarice Maia Carvalho  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO ACRE

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da UFAC

---

- F383e Ferreira, Efraim dos Santos, 1987-  
Efeitos do extrato hidroalcoólico de *Acmella oleracea* (L.) R. K. Jansen sobre parâmetros cardiovasculares de ratos / Efraim dos Santos Ferreira. – 2018.  
114 f. : il. ; 30 cm.
- Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Acre, Programa de Pós-Graduação em Ciência, Inovação e Tecnologia para a Amazônia. Rio Branco, 2018.  
Inclui Referências bibliográficas, anexos e apêndices.  
Orientador: Prof. Dr. Ronildo Moura da Cunha.  
Co-orientador: Prof. Dr. Dionatas Ulises de Oliveira Meneguetti.
1. Ciência e Tecnologia – Amazônia. 2. *Acmella oleracea* – Planta medicinal. 3. Extrato hidroalcoólico. 4. Ratos – Sistema cardiovascular. I. Título.

CDD: 509.09811

---

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Síntese do NO e sua sinalização no relaxamento da célula muscular lisa vascular..... 29
- Figura 2:** Cascata de síntese da prostaglandina I<sub>2</sub> (prostaciclina) e sua sinalização no relaxamento da célula muscular lisa vascular..... 30
- Figura 3:** Spilanthol (C<sub>14</sub>H<sub>23</sub>NO, 221,339 g / mol) é um composto bioativo que é encontrado em muitas plantas diferentes que são usadas como remédios tradicionais em todo o mundo.....36
- Figura 4:** Sistema de aquisição de dados de pressão arterial e frequência cardíaca em ratos não anestesiados..... 43
- Figura 5:** Esquema representativo do protocolo experimental para verificação da presença (a) ou ausência (b) do endotélio vascular em anéis de artéria aorta torácica de rato pré-contraídos com 1 µM de FEN..... 46
- Figura 6:** Esquema representativo do protocolo experimental para avaliação da influência do endotélio funcional no efeito relaxante do EHAO em anéis de artéria aorta torácica isolada de ratos normotensos, pré-contraídos com 1 µM de FEN..... 47
- Figura 7:** Esquema representativo do protocolo experimental para verificação do efeito da inibição da síntese do NO por L-NAME sobre a resposta relaxante induzida por concentrações crescentes e cumulativas do EHAO em anéis de artéria aorta torácica de rato normotenso, pré-contraídos com 1 µM de FEN..... 48
- Figura 8:** Esquema representativo do protocolo experimental para avaliação do efeito relaxante induzido por concentrações crescentes e cumulativas do EHAO em anéis de artéria aorta torácica de rato normotenso, pré-contraídos com FEN (1 µM) após antagonismo muscarínico por Atropina..... 49
- Figura 9:** Esquema representativo do protocolo experimental para verificar a possível influência de fatores relaxantes derivados da cascata do ácido araquidônico no efeito do EHAO em anéis de artéria aorta de rato com endotélio intacto, pré-contraídos com FEN (1 µM)..... 50
- Figura 10:** Esquema representativo do protocolo experimental para avaliar o efeito do EHAO em anéis de aorta torácica isolados de rato, munido de endotélio, pré-contraídos com KCl 20mM (a) e KCl 80mM (b). ..... 51
- Figura 11:** Resposta de concentrações crescentes do EHAO (5, 20, 40 e 80 mg/Kg), administrado i.v, sobre a pressão arterial média (PAM) de ratos Wistar machos normotensos..... 52
- Figura 12:** Resposta de concentrações crescentes do EHAO (5, 20, 40 e 80 mg/Kg), administrado i.v, sobre a frequência cardíaca (FC) de ratos Wistar machos normotensos. .... 53
- Figura 13:** Curva concentração resposta para o EHAO em anéis de artéria aorta torácica isolada de rato, com e sem endotélio funcional, pré-contraídos com FEN (1 µM)..... 54

**Figura 14:** Influência da pré-incubação com L-NAME (100  $\mu$ M) sobre o efeito relaxante induzido por concentrações crescentes e cumulativas do EHAO em anéis de artéria aorta isolada de rato normotensos, com endotélio intacto, pré-contraídos com FEN (1  $\mu$ M)...55

**Figura 15:** Influência da pré-incubação com atropina (1  $\mu$ M) sobre o efeito relaxante induzido por concentrações crescentes e cumulativas do EHAO em anéis de artéria aorta isolada de rato, com endotélio intacto, pré-contraídos com FEN (1  $\mu$ M). ..... 56

**Figura 16:** Curva concentração resposta do EHAO em anéis de artéria aorta isolada de rato normotenso, com endotélio intacto, pré-contraídos com FEN (1  $\mu$ M), antes e após inibição da cicloxigena (COX) com incubação de Indometacina. .... 57

**Figura 17:** Curva concentração resposta do EHAO em anéis de artéria aorta isolada de rato normotenso, sem endotélio, pré-contraídos com KCl 20mM ou KCl 80mM. .... 58

## LISTA DE QUADROS

<b>Quadro 1:</b> Usos tradicionais e aplicações etnofarmacológicas de <i>A. oleracea</i> .....	35
<b>Quadro 2:</b> Algumas substâncias fitoquímicas de <i>A. oleracea</i> .....	36
<b>Quadro 3:</b> Representação esquemática do preparo dos animais para realização dos experimentos <i>in vivo</i> .....	43
<b>Quadro 4:</b> Esquema representativo da administração de doses crescentes (5, 20, 40 e 80 mg/kg) do EHAO em ratos normotensos não-anestesiados. ....	44
<b>Quadro 5:</b> Representação esquemática da obtenção, preparo e montagem de anéis de aorta isolada de rato na realização dos protocolos experimentais “ <i>in vitro</i> ”. ....	45



## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> - Substâncias e suas concentrações utilizadas para o preparo da solução nutritiva de Krebs Henseleit (KHS).....	41
---	----

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

Ach	Acetilcolina
Ca <sup>2+</sup>	Cálcio
CaCl <sub>2</sub>	Cloreto de cálcio
cAMP	Adenosina 3',5'-monofosfato cíclico
cGMP	Monofosfato cíclico de guanosina
CO <sub>2</sub>	Gás carbônico
CONCEA	Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
COX	Enzima Cicloxigenase
DAG	Diacilglicerol
DC	Débito cardíaco
EC <sub>50</sub>	Concentração de 50% do efeito
ECA	Enzima conversora de angiotensina
EHAO	Extrato Hidroalcoólico de <i>Acmella oleracea</i>
eNOS	Enzima óxido nítrico sintase
EPM	Erro padrão da média
FC	Frequência cardíaca
FEN	Fenilefrina
FHDE	Fatores hiperpolarizantes derivados do endotélio
HA	hipertensão arterial
HCl	Ácido clorídrico
i.v	intravenoso
INDO	Indometacina
IP <sub>3</sub>	Inositol trifosfato
KB	Solução de KREBS
KCl	Cloreto de potássio
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Fosfato de Potássio
L-NAME	NG-nitro-L-arginina-metil éster
MgSO <sub>4</sub>	Sulfato de magnésio
MLV	Músculo liso vascular
NaCl	Cloreto de sódio
NaHCO <sub>3</sub>	Bicarbonato de sódio
NaOH	hidróxido de sódio

NO	Óxido nítrico
NPS	Nitroprussiato de sódio
NUBEX	Núcleo de Biologia Experimental
O <sub>2</sub>	Oxigênio
OECD	Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico
OMS	Organização Mundial de Saúde
P	erro
PAM	Pressão arterial média
PGH <sub>2</sub>	Prostaglandina H <sub>2</sub>
PGI <sub>2</sub>	Prostaglandina I <sub>2</sub>
pH	Potencial hidrogeniônico
RS	Retículo sarcoplasmático
RVP	Resistência vascular periférica
SNC	Sistema nervoso central
SRAA	Renina-angiotensina-aldosterona
TFD	Teste de dose fixa
TXA <sub>2</sub>	Tromboxano A <sub>2</sub>
UFAC	Universidade Federal do Acre
v.o	via oral
VOCC's	Canais de cálcio operados por voltagem

## RESUMO

**Introdução:** *Acmella oleracea* é uma planta que tem sido utilizada frequentemente como remédio por populações locais, assim necessitando realização de estudos que comprove atividades reportadas pela etnofarmacologia. **Objetivos:** Este estudo, buscou investigar as atividades do extrato hidroalcoólico de *Acmella oleracea* (EHAO) sobre o sistema cardiovascular de ratos. **Materiais e Métodos:** Cada 200g das partes aéreas da planta foram maceradas em 1L de etanol 70%, em seguida procedia-se a filtração e rotaevaporação. Grupos distintos de ratos Wistar machos recebiam (v.o) doses de 2000 mg/kg ou 5000 mg/kg do EHAO e em seguida realizado o teste hipocrático consagrado na literatura. Após 24 horas o procedimento cirúrgico para implantação de cateteres arterial e venoso, os animais foram acoplados a um sistema de aquisição de dados de pressão arterial e frequência cardíaca, após 30 minutos em estabilização foram administradas as drogas e as variações na PAM e FC foram registradas pelo sistema. Os anéis de artéria aorta isolada de ratos normotensos eram montados em um sistema de cubas para banho de órgãos e estabilizados por 1h sob tensão de 1g, após verificado o endotélio vascular era feita uma contração induzida por 1 $\mu$ M de fenilefrina e no platô dessa era feita a administração do EHAO (100, 300, 600, 1000, 1500, 2000, 2500, 3000, 3500 e 4000  $\mu$ g/mL) nas cubas com anéis providos de endotélio bem como naquelas com anéis sem endotélio vascular. Também foi feito a mesma abordagem após inibição da produção de NO por L-name ou após antagonismo de receptores muscarínicos com atropina ou após inibição da produção da prostaciclina por Indometacina. Realizou-se ainda ensaios para verificação da resposta do extrato sobre contração induzida por KCl 20mM e por KC 180mM. Foi adotado n= 8. A análise dos dados foi feita pela aplicação da ANOVA, regressão não linear e teste “t” de *student, todos* no Graphpad Prism 6.0. **Resultados:** A administração do EHAO até a dose de 5000 mg/kg (v.o) não ocasionou a morte de nenhum animal e não produziu alterações comportamentais significativas. A administração do EHAO (5, 20, 40 e 80 mg/Kg, v.i) induziu significativo (p< 0,01) efeito hipotensor e bradicárdico em ratos. A incubação do EHAO induziu relaxamento significativo (P< 0,01) de modo concentração dependente tanto em anéis com e em anéis sem endotélio vascular, contraídos por FEN, ou pelo KCl. Em preparações contendo anéis com endotélio, o vasorelaxamento não foi modificado após inibição da via de síntese do NO, mas foi significativamente (P< 0,01) diminuído frente ao antagonismo dos receptores muscarínicos bem como frente a inibição da síntese da prostaciclina (P< 0,01). **Discussão:** Não houve expressão de efeitos tóxicos induzidos pelo EHAO. A diminuição nos parâmetros de pressão arterial e frequência cardíaca sugere que o EHAO atua como portante agente hipotensor e bradicárdico. Os receptores muscarínicos e a via da produção das prostaciclina estão significativamente envolvidos no efeito vasorelaxante do EHAO. O vasorelaxamento das contrações dadas pelo KCl180 e o relaxamento ainda maior sobre as contrações do KCl20, evidenciam que parte do efeito vasorelaxante do EHAO em aorta de rato, foi também devido ao bloqueio a canais de Ca<sup>2+</sup> e mais acentuadamente pela abertura de canais de K<sup>+</sup>. **Conclusão:** Sem apresentar efeitos tóxicos, EHAO induz hipotensão e bradicardia em rato, induz relaxamento significativo em aorta de rato. Parte do efeito relaxante envolve a participação das prostaciclina e a atividade dos receptores muscarínicos endoteliais. O efeito do EHAO está também ligado a abertura de canais de K<sup>+</sup> e ao bloqueio a canais VOCCs. É essencialmente necessária a realização de estudos com outros modelos e outras abordagens para vislumbrar maior consistência para validar subprodutos e metabólitos dessa planta.

**Palavras-chave:** Jambu. Vasorelaxante. Aorta de rato.

## ABSTRACT

**Introduction:** *Acmella Oleracea* is a plant that has been used frequently as a remedy for local populations, thus requiring completion of studies proving that activities reported by ethnopharmacology. **Objectives:** This study aimed to investigate the activities of the hydroalcoholic extract of *Acmella Oleracea* (EHAO) on the cardiovascular system of rats. **Materials and Methods:** Each 200g of aerial parts of the plant were macerated in 1L of ethanol 70%, then proceeded to filtration and rotaevaporação. Distinct groups of male Wistar rats received (v.o) doses of 2000 mg/kg or 5000 mg/kg of EHAO and then performed the Hippocratic test enshrined in the literature. 24 hours after the surgical procedure for deployment of arterial and venous catheters, the animals were attached to a data acquisition system of blood pressure and heart rate after 30 minutes in stabilisation were administered drugs and variations in the MBP and HR were recorded by the system. The rings of the aortic artery isolated from normotensive rats were mounted on a system of vats for bathroom of organs and stabilized by 1h under tension of 1g, after verifying the vascular endothelium was made a contraction induced by 1 $\mu$ M phenylephrine and on the plateau that was the administration of EHAO (100, 300, 600, 1000, 1500, 2000, 2500, 3000, 3500 and 4000  $\mu$ g/mL) in the vats with rings fitted of endothelium as well as those with rings without endothelium. It was also made the same approach after inhibition of NO production by L-name or after antagonism of muscarinic receptors with atropine or after production of prostacyclin inhibition by indomethacin. It is also conducted tests to check the response of the extract on contraction induced by KCl 20mM and by KC 180mM. N= 8 was adopted. The data analysis was performed by applying the ANOVA, non-linear regression and test "t" test, all the Graphpad Prism 6.0. **Results:** the administration of EHAO until the dose of 5000 mg/kg (v.o) did not result in the death of no animal and produced no significant behavioral changes. The administration of EHAO (5, 20, 40 and 80 mg/Kg, V.I) induced significant (p< 0.01) Bradycardic and hypotensive effect in rats. The incubation of EHAO relaxation induced significant (P< 0.01) so concentration-dependent both in rings with and without endothelium, vascular rings contracted by FEN, or by KCl. In preparations containing rings with endothelium, the vasorelaxamento was not modified after inhibition of NO synthesis, but was significantly (P< 0.01) reduced the antagonism of muscarinic receptors as well as the inhibition of the synthesis of prostacyclin (P< 0.01). **Discussion:** There was no expression of toxic effects induced by EHAO. The decrease in blood pressure and heart rate suggests that the EHAO acts as portente Bradycardic and hypotensive agent. Muscarinic receptors and track the production of prostacyclins are significantly involved in the EHAO vasorelaxante effect. The vasorelaxamento of contractions given by KCl180 and the even greater relaxation on the contractions of KCl20, showed that part of the EHAO vasorelaxante effect in the aorta of rat, was also due to blocking the channels of Ca<sup>2+</sup> and more sharply by the opening of K<sup>+</sup> channels. **Conclusion:** without toxic effects, EHAO induces hypotension and bradycardia in rats induces significant relaxation in rat aorta. Part of the relaxing effect involves the participation of prostacyclins and the activity of the endothelial muscarinic receptors. The effect of EHAO is also linked to the opening of K<sup>+</sup> channels and the channel blocking of VOCCs. It is essentially necessary to conduct studies with other models and other approaches to glimpse greater consistency to validate products and metabolites of this plant.

**Keywords:** Jambu. Vasorelaxant. Rat Aorta.

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	16
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	20
2.1. CONSIDERAÇÕES SOBRE PLANTAS MEDICINAIS .....	20
<b>2.3.1. Mecanismos de controle da pressão arterial</b> .....	24
2.3.1.1. Controle em curto prazo da pressão arterial .....	24
2.3.1.2. Controle em longo prazo da pressão arterial .....	25
2.4. HIPERTENSÃO ARTERIAL SISTÊMICA .....	26
2.5. ENDOTÉLIO VASCULAR .....	27
<b>2.5.1. Fatores relaxantes derivados do endotélio</b> .....	28
2.5.1.1. Óxido nítrico .....	29
2.5.1.2. Prostaciclina .....	29
2.6. CANAIS DE Ca <sup>+</sup> e CANAIS DE K <sup>+</sup> .....	30
2.7. CONSIDERAÇÕES SOBRE O PROCESSO EXCITAÇÃO-CONTRAÇÃO NO MUSCULO LISO .....	32
2.8. <i>Acmella oleracea</i> .....	33
<b>2.8.1. Composição química de <i>A. oleracea</i></b> .....	35
<b>2.8.2. Atividades biológicas <i>A. oleracea</i></b> .....	37
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	38
3.1. GERAL .....	38
3.2. ESPECÍFICOS .....	38
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	39
4.1 COLETA E IDENTIFICAÇÃO BOTÂNICA .....	39
4.2 OBTENÇÃO DO EXTRATO .....	39
4.3. ESTUDO FARMACOLÓGICO .....	40
<b>4.3.1. Animais</b> .....	40
<b>4.3.2. Substâncias utilizadas</b> .....	40
<b>4.3.3. Soluções nutritivas</b> .....	40
<b>4.3.4. Ensaio toxicológico</b> .....	41
4.3.4.1 Determinação da toxicidade aguda .....	41
<b>3.3.5. Investigações farmacológicas <i>in vivo</i></b> .....	42
3.3.5.1. Registro das variações da PA e da FC em ratos não-anestesiados .....	42

3.3.5.2. Avaliação das variações da PA e da FC induzidas pela administração do EHAO em ratos não- anestesiados .....	44
<b>4.3.6. Investigações farmacológicas <i>in vitro</i></b> .....	44
4.3.6.1 Obtenção e preparo dos anéis de aorta de rato .....	44
4.3.6.2. Protocolos experimentais para os estudos <i>in vitro</i> .....	45
4.3.6.2.1. Verificação da presença ou ausência do endotélio.....	45
4.3.6.2.2. Curva concentração resposta para o EHAO em aorta .....	46
4.3.6.2.3. Avaliação da influência do endotélio funcional no efeito relaxante do EHAO em artéria aorta.....	46
4.3.6.2.4. Avaliação do efeito da inibição da síntese do NO (L-NAME) sobre a resposta relaxante induzida pelo EHAO em aorta torácica de rato.....	48
4.3.6.2.5. Avaliação do efeito do bloqueio muscarínico (atropina) sobre a resposta relaxante induzida pelo EHAO em artéria aorta de rato .....	48
4.3.6.2.6. Avaliação do efeito da inibição da COX (indometacina) sobre a resposta relaxante induzida por EHAO em aorta de rato .....	49
4.3.6.2.7. Avaliação da atividade do EHAO sobre contrações induzidas por KCl em aorta de rato .....	50
4.4. <b>Análise Estatística</b> .....	51
<b>5. RESULTADOS</b> .....	52
5.1 TOXICIDADE.....	52
5.2. ESTUDO <i>IN VIVO</i> DAS ATIVIDADES CARDIOVASCULARES DO EHAO EM RATOS NORMOTENSOS NÃO ANESTESIADOS .....	52
<b>5.2.1. Efeito do EHAO sobre a pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC) em ratos normotensos não-anestesiados</b> .....	52
5.3 ESTUDO FARMACOLÓGICO <i>IN VITRO</i> EM ARTÉRIA AORTA ISOLADA DE RATOS .....	54
<b>5.3.1 Efeito relaxante do EHAO sobre contrações induzidas por fenilefrina (1 µM) em artéria aorta isolada de ratos normotensos com e sem endotélio</b> .....	54
<b>5.3.2. Efeito do EHAO em artéria aorta isolada de ratos normotensos após a inibição da via de produção do óxido nítrico</b> .....	55
<b>5.3.3. Efeito do EHAO frente ao antagonismo dos receptores muscarínicos pela Atropina em artéria aorta isolada de rato normotenso</b> .....	56
<b>5.3.4. Efeito do EHAO em artéria aorta de rato normotenso após inibição da COX por Indometacina.</b> .....	57

<b>5.3.5 Efeito relaxante do EHAO em artéria aorta de rato sobre contrações induzidas por KCl</b> .....	58
<b>6. DISCUSSÃO</b> .....	59
<b>7. CONCLUSÃO</b> .....	66
<b>8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	67
<b>9. ANEXOS</b> .....	84
<b>10. APÊNDICE</b> .....	114



## 1. INTRODUÇÃO

O uso de plantas com a finalidade de prevenir, aliviar ou curar processos patológicos é uma cultura difundida desde as primeiras civilizações até os dias atuais. Essa tradição continua sendo empregada por grande parcela da população mundial, devido ao fácil acesso da população às plantas em relação aos medicamentos alopáticos (BETTEGA et al., 2011; CALIXTO; SIQUEIRA, 2008).

No Brasil, em decorrência de sua riqueza de espécies vegetais, a prática medicinal baseada no uso de plantas é muito frequente (FERREIRA; PINTO, 2010; PIRIZ et al., 2014), visto que o país é detentor da maior variedade de espécies de plantas do planeta, com cerca de 55 mil espécies já catalogadas, além de um rico conhecimento etnofarmacológico no uso das plantas medicinais, esse que é transmitido entre as gerações (FONSECA, 2012; MARTINS et al., 2013).

A biodiversidade da floresta amazônica, apresenta aproximadamente 30 mil espécies vegetais catalogadas, o que corresponde a cerca de 10% de toda floresta existente no mundo, dispondo de um vasto número de espécies com propriedades terapêuticas que ainda não foram exploradas pela comunidade científica (FOGLIO et al., 2006; MARTINS et al., 2013). O conhecimento etnofarmacológico das populações locais pode propiciar importantes descobertas de substâncias farmacologicamente ativas (OLIVEIRA et al., 2011; PIRIZ et al., 2014).

Entre as espécies de plantas ocorrentes na região amazônica, as da família Asteraceae tem despertado interesse entre os pesquisadores, em virtude de esta compreender aproximadamente 25.000 espécies pertencentes a 1.600 gêneros e isso a tornar uma das mais importantes fontes de espécies utilizadas com fins terapêuticos (RIBEIRO et al., 2010; SILVA; MOURA, 2011). Alguns dos principais gêneros desta família são: *Achillea*, *Baccharis*, *Bidens*, *Elephantopus*, *Gochnatia*, *Helianthus*, *Matricaria*, *Mikania*, *Vernonia*, *Acmella* (STANSKI et al., 2016; SILVA; MOURA, 2011), com destaque ao gênero *Acmella*, gênero composto por mais de 60 espécies que são amplamente distribuídas por regiões tropicais e subtropicais do mundo (SAHU et al., 2011; TIWARI et al., 2011) tendo a espécie *Acmella oleracea* como a principal representante no uso etnofarmacológico (GILBERT; FAVORETO, 2010).

A espécie *A. oleracea* (*Spilanthes acmella*; *Spilanthes oleracea*; *Pyrethrum spilanthus*) é uma planta pertencente à família Asteraceae, que apresenta características semiereta ou quase rasteira, medindo aproximadamente 40 a 60 centímetros de altura

(BOONEN et al., 2010). Na região norte do Brasil, a espécie é popularmente conhecida como jambu, agrião-do-Pará, abecedária, agrião-bravo, agrião-do-norte, botão-de-ouro e planta dor de dente (NASCIMENTO et al., 2013; TANIA et al., 2015).

No estado do Acre-Brasil, *A. oleracea* é cultivada durante todo o ano como planta ornamental, comensal ou medicinal, sendo componente de pratos típicos da culinária local e principalmente da medicina tradicional para a cura de muitas doenças (GILBERT; FAVORETO, 2010; ROMÃO et al., 2015; SIVIERO et al., 2012). Todas as partes da planta são utilizadas em diversas práticas terapêuticas, com destaque para as flores e folhas, que apresentam sabor picante e quando mastigadas produzem uma sensação de formigamento e dormência (BARBOSA et al., 2016; CHENG et al., 2015; FERREIRA et al., 2014; LENG et al., 2011).

É relatado o uso de *S. acmella* como remédio para hipertensão (DUBEY et al., 2013; ROMÃO et al., 2015), contudo o conhecimento popular atribui o efeito hipotensivo à ação diurética apresentada quando se ingere o chá da planta, efeito já relatado também pela literatura (MOREIRA, 2010; RATNASOORIYA, 2004), todavia, estudo com extratos de *S. acmella* demonstrou potente ação vasorelaxante e antioxidante, sugerindo que a hipotensão produzida pelo uso da planta, relatada pela medicina popular, pode, também, estar associada ao efeito vasorelaxante apresentado pelos extratos da planta (WO.NGSAWATKUL, 2008).

*A. oleracea*, dispõe de um grupo diversificado de recurso altamente valioso e prontamente disponível de metabólitos secundários, por exemplo: alcalóides, taninos, óleos essenciais e flavonoides (BOONEN et al., 2010; JAGAN et al., 2012). O spilantol, uma alcanida olefínica, é o principal constituinte bioativo presente na planta (YASUDA et al., 1980), além de dispor de vários outros compostos com ações biológicas (HARALD et al., 1985; ANSARI et al., 1988; NAKATANI; NAGASHIMA, 1992; RAMSEWAK et al., 1999; PRACHAYASITTIKUL et al., 2009; DUBEY et al., 2013; ROMÃO et al., 2015).

A literatura tem descrito diversas atividades biológicas para *A. oleracea*, tais como: ação anti-inflamatória, analgésica, antifúngica, antimalárica, antiviral, antisséptica, cicatrizante e efeito anestésico local (RANI; MURTY, 2006; WU et al., 2008; CHAKRABORTY et al., 2010; SPELMAN et al., 2011). Atua ainda com atividade imunomoduladora, antinociceptiva, antioxidante, inseticida, inibidora da lipase pancreática (JONDIKO, 1986; WU et al., 2008; HOSSAIN et al., 2012), entre outras

ações biológicas (EKANEM et al., 2007; NYASSE et al., 2006; PERES et al., 1997; SHARMA et al., 2011; WONGSAWATKUL et al., 2008).

A HAS é a doença cardiovascular (DCV) mais frequente na população mundial e que está diretamente associada ao risco de desenvolvimento de DCVs fatais, insuficiência renal e outras complicações que acarretam principalmente ao sistema circulatório (ANDRADE et al., 2014; MALTA et al., 2017; MENDES et al., 2015). A organização mundial de saúde (WHO) estima que atualmente existem, no mundo, cerca de 600 milhões de pessoas afetadas pela HAS com 7,1 milhões de mortes anuais em decorrência da doença. Estudos avaliam que em 2025 a prevalência da (HAS) na população mundial será de aproximadamente 29% (MENDES et al., 2015; RADOVANOVIC et al., 2014; SOUSA; PASSARELLI JÚNIOR, 2014).

Dados do Ministério da Saúde brasileiro revelam que mais de 30 milhões de brasileiros sofrem de Hipertensão arterial (GOVERNO BRASILEIRO, 2016). No Brasil, estudos apontam que a estimativa de prevalência de hipertensão arterial na população urbana varia de 21,4% a 24,1% (RADOVANOVIC et al., 2014; ANDRADE et al., 2015; MALTA et al., 2017). Na região amazônica a prevalência da HAS na população é de 22,3%, sendo mais frequente na população idosa e mais comumente em homens, estando associada à idade avançada e obesidade. Estudo de caso no Estado do Acre revelou prevalência de 20,4% na população local e associação da doença à idade avançada, obesidade, hipercolesterolemia e diabetes mellitus, já o inquérito telefônico Vigitel/2016 do Ministério da Saúde apontou que 23% da população de Rio Branco apresenta diagnóstico de hipertensão arterial (CHELOTTI, 2009; GOVERNO BRASILEIRO, 2016).

Neste sentido, a hipertensão arterial tem se tornado um problema de saúde pública de proporções mundiais, o que demanda esforços econômicos e científicos no sentido de encontrar soluções para combater a doença e minimizar seus efeitos deletérios ao organismo humano. O difundido emprego de *A. oleracea* pela medicina tradicional na cura da hipertensão arterial (WONGSAWATKUL et al., 2008; LENG et al., 2011; ROMÃO et al., 2015) tem despertado o interesse científico no sentido de comprovar as informações reportadas sobre os efeitos farmacológicos em HAS.

Com base neste conjunto de informações o presente estudo tem como objetivo principal investigar o potencial vasorelaxante da espécie *Acmella oleracea* em artéria aorta de rato, além da investigação de efeitos tóxicos destinado a possibilitar maior segurança ao uso da espécie nas abordagens experimentais.

A hipótese desse estudo é que *Acmella oleracea* que ocorre no Acre possui composição bastante similar à que ocorre sobre outras condições climáticas e de solo de outras partes do Brasil e do mundo e que se expressará ativamente sobre parâmetros cardiovasculares sem efeitos tóxicos que inviabilizem seu uso como remédio.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. CONSIDERAÇÕES SOBRE PLANTAS MEDICINAIS

No Egito, berço da medicina, perfumaria e farmácia, há mais de seis mil anos acreditava-se na cura pelo cheiro das plantas. Acreditava-se que certos aromas afugentavam os espíritos causadores de enfermidades (CALIXTO; SIQUEIRA Jr, 2008). Os egípcios, adiantados na arte de curar, usavam, além de substâncias aromáticas, muitas outras cujos efeitos conheciam muito bem, como a papoula (*Papaver sonniferum*), maconha (*Cannabis sativa*) e babosa (*Aloe vera*) (PIRIZ et al., 2014). A canela (*Cinnamomum zeylanicum* Ness), o espicanardo (*Lavandula angustifolia* L.), o coentro (*Coriandrum sativum* L.), o gengibre (*Zinziber officinale* Roscoe) e a mirra (*Commiphora myrrha* (Nees) Baillon) (CALIXTO; SIQUEIRA Jr, 2008).

O uso de plantas medicinais é uma das alternativas que vem evoluindo sensivelmente dentro do contexto do uso efetivo da fitoterapia no mundo (CARNEIRO et al., 2014). É sabido que as plantas medicinais são utilizadas por grande parte da população mundial, como um recurso medicinal alternativo para o tratamento de diversas enfermidades, uma vez que em muitas comunidades, representam um recurso mais acessível em relação aos medicamentos alopáticos (BEVILACQUA, 2010).

A Organização Mundial da Saúde (OMS), considerando as plantas medicinais como importantes instrumentos da assistência farmacêutica, por meio de vários comunicados e resoluções, expressa sua posição a respeito da necessidade de valorizar a sua utilização no âmbito sanitário ao observar que 70% a 90% da população nos países em vias de desenvolvimento depende delas no que se refere a Atenção Primária a Saúde (WHO, 2011). Em alguns países industrializados, o uso de produtos da medicina tradicional é igualmente significativo, como o Canadá, França, Alemanha e Itália, onde 70% a 90% de sua população tem usado esses recursos da medicina tradicional sobre a denominação de complementar, alternativa ou não convencional (BRASIL, 2011).

Estima-se que no mundo existem em torno de 500.000 espécies de plantas, todavia menos de 5 a 10% das mesmas foram investigadas no que se refere às suas atividades biológicas ou constituição química, apesar do maior uso ainda ser o empírico, várias delas já estão sob perigo de extinção no próximo século (CARNEIRO et al., 2014). Até mesmo a coleção com propósito medicinal, muitas vezes feita indevidamente, tem sido apontada como uma das causas principais dessa ameaça (BARREIRO; BOLZANI, 2009).

O Brasil possui uma biodiversidade rica, com uma infinidade de espécies de plantas com aplicações fitoterápicas. Suas populações tradicionais, detêm um grande e valioso conhecimento associado ao uso de plantas medicinais, tal conhecimento junto à grande variedade de espécies vegetais existentes na região faz com que as pesquisas e o próprio desenvolvimento de medicamentos fitoterápicos possam ocorrer com destaque no cenário científico mundial (FERREIRA; PINTO, 2010).

O país tem experimentado avanços significativos, através de investimentos no estudo de plantas medicinais, com descoberta de grande importância econômica e terapêutica. As pesquisas para descoberta de protótipos de fármacos e/ou fitofármacos, além de propiciarem o avanço da pesquisa básica multidisciplinar, podem contribuir também para o desenvolvimento tecnológico nacional, levando em conta que a diversidade da flora nacional e dos inúmeros biomas brasileiros é ainda muito pouco explorada como uma fonte de substâncias de interesse farmacológico (BARREIRO; BOLZANI, 2009).

A floresta amazônica com suas 60.000 espécies vegetais, o que corresponde à cerca de 10% de toda flora existente no mundo, tem propiciado para humanidade a descoberta de importantes substâncias farmacologicamente ativas, como é o caso do 4-nerolidilcatecol (4-NC), substância promissora para o futuro tratamento da malária, extraído da *Piper peltatum*, uma planta medicinal popularmente conhecida como caapeba-do-norte ou pariparoba pelas comunidades locais (PIREZ et al., 2012).

Os produtos medicinais oriundos da floresta amazônica se destacam por representarem uma parcela significativa no mercado de medicamentos não alopáticos, as indústrias farmacêuticas nacionais e internacionais, vêm buscando nas plantas da Amazônia, ou domesticadas na região, produtos e formulações para a produção de medicamentos, vacinas e outras formas de terapias (CARNEIRO et al., 2014).

No estado do Acre, apesar da região estar no meio da floresta amazônica, as pesquisas direcionadas à descoberta de substâncias de plantas com atividades farmacológicas ainda se restringem basicamente aos programas de pós-graduação oferecidos pela Universidade Federal do Acre, sendo ainda escassos os estudos especificamente na área farmacológica (MARTINS et al., 2013). Na região, os produtos originados da floresta assumem significativa importância na manutenção das condições básicas de saúde da população local, sendo possível encontrar nos espaços mercantis, normalmente, a comercialização de produtos fitoterápicos como preparações padronizadas na forma de sólido (extrato em pó), líquido ou preparações viscosas

(SIVIERO et al., 2012). Diante desse contexto, se faz necessário o suporte científico, a partir de estudos com técnicas modernas, ao uso consciente e seguro de produtos vegetais.

É bem conhecido que as plantas produzem uma enorme variedade de moléculas químicas e apresentam um grande espectro de atividades biológicas. Técnicas modernas de farmacologia utilizam ensaios para ligação de compostos a alvos biológicos selecionados (por exemplo, receptores ou enzimas), esses ensaios têm sido utilizados para orientar o fracionamento da complexa mistura de agentes químicos presentes nos extratos de plantas (ANDRICOPULO et al., 2009). O rápido crescimento da informática e uma combinação de técnicas químicas, biológicas e moleculares podem ser usadas para o isolamento e produção de drogas a partir de plantas medicinais (FERREIRA; PINTO, 2010). Esses estudos oferecem um caminho lógico para a descoberta de novas drogas e para a identificação de moléculas modelo e desenvolvimento de análogos (GUIDO et al., 2010).

## 2.2. PLANTAS MEDICINAIS COM AÇÃO SOBRE O SISTEMA CARDIOVASCULAR

A prática da utilização de plantas com fins terapêuticos vem desde os primórdios da humanidade, o que ainda se mante com utilização ampla por grande parte da população mundial (BEVILACQUA, 2010). A literatura da conta de que muitas são as plantas utilizadas e algumas já até estudados seus efeitos que atuam sobre o sistema cardiovascular, estas plantas apresentam em sua constituição química metabólitos secundários capazes, principalmente de promoverem atividade relaxante sobre a musculatura lisa vascular, além de efeitos orgânicos secundário como o efeito hipotensor ligados a outros mecanismos (ADARAMOYE et al., 2009; BEVILACQUA, 2010).

Já se tem conhecimento de muitas substâncias que são empregadas no tratamento de doenças cardiovasculares ou até mesmo como ferramenta farmacológica, para o estudo do sistema cardiovascular, que foram isoladas de plantas, como exemplo podemos citar: digoxina, um medicamento indicado para o tratamento da insuficiência cardíaca congestiva, isolada da planta *Digitalis lanata*; atropina, um antagonista de receptores muscarínicos, isolada da planta *Atropa beladona*; cafeína, ferramenta farmacológica muito utilizada para o estudo do sistema cardiovascular, isolada da planta *Coffea arábica* (USTULIN et al., 2009; CALIXTO E SIQUEIRA JR., 2008).

Especificamente com relação à elevação da pressão arterial, o tratamento não alopático ou ações de mudança no estilo de vida devem ser as primeiras medidas adotadas

por portadores de hipertensão arterial, excetuando-se os casos de hipertensão grave e na presença de comprometimento de órgãos-alvo (MOREIRA et al., 2010).

Estudo de Lopes et al., (2010) mostra que portadores de hipertensão, que voluntariamente, optaram em fazer o tratamento da doença utilizando as plantas *Eugenia uniflora* L (pitanga), *Bixa orellana* L (urucum), *Cimbopogon citratus* Stapf (erva cidreira), *Matricaria chamomilla* (camomila) obtiveram importante redução da pressão arterial sistêmica. Outros estudos comprovam a ação de plantas sobre o sistema cardiovascular: Felippi, (2005), em estudo in vitro, identificou potente ação vasorelaxante e antioxidante promovido pela *Ilex paraguariensis* em leito arterial mesentérico de rato; Campos et al., (2005) demonstrou significativa ação hipotensora do óleo essencial de *Salvia sclarea* em ratos hipertensos.

São muitas as plantas utilizadas na manutenção das condições básicas de saúde do sistema cardiovascular (ADARAMOYE et al., 2009). *Curcuma longa* é uma espécie bastante utilizada pela cultura popular para o tratamento da hipertensão arterial (ADARAMOYE et al., 2009).

Vale ressaltar que em decorrência da variedade de compostos químicos presente nas plantas, estas não exercem funções especificamente sobre um único órgão ou sistema, como exemplo a *Acmella oleracea*, que além de ação vasorelaxante e antioxidante (WONGSAWATKUL et al., 2008), ainda exerce efeito bactericida (PERES et al., 1997); anestésico local (CHAKRABORTY et al., 2010); atividade anti-inflamatória e analgésica (CHAKRABORTY et al., 2010); antifúngica (RANI; MURTY, 2006); diurética (RATNASOORIYA et al., 2004); antimalárica (SPELMAN et al., 2011), entre outras que serão relatadas na revisão específica sobre a planta.

Assim, podemos perceber que as espécies vegetais têm representado uma importante fonte de recursos medicinais para o tratamento de diversas doenças que afetam a humanidade, entre essas doenças podemos destacar as relacionadas ao sistema cardiovascular, em especial a hipertensão arterial sistêmica.

### 2.3. PRESSÃO ARTERIAL (PA)

A pressão arterial (PA) é definida como a pressão que o sangue exerce sobre os vasos sanguíneos, é o produto da resistência vascular periférica (RVP) pelo débito cardíaco (DC), a RVP é está relacionada com os mecanismos vasoconstritores, vasodilatadores, sistema nervoso simpático e sistema renina-angiotensina-aldosterona,



enquanto que o DC está relacionado com a frequência cardíaca e relaxamento do miocárdio (volume ejetado X frequência cardíaca), assim, variações nesses fatores produzem alterações significativas sobre a pressão arterial (BORTOLOTTO, 2008; LATERZA et al., 2008; TORRES et al., 2012; MARTELLI, 2014; SBC, 2016). Abaixo, equação que defina a pressão arterial sistêmica.

$$\text{Equação da PA: } PA = DC \times RVP$$

### **2.3.1. Mecanismos de controle da pressão arterial**

A pressão arterial não é controlada por um simples e único mecanismo, mas sim por uma complexa inter-relação de sistemas onde cada um realiza funções específicas, conduzindo a manutenção dos níveis normais da PA, condição necessária para a perfusão sanguínea adequada (NASCIMENTO-NETO et al., 2006; SBC, 2016). Esses mecanismos podem ser divididos em dois grupos: os que respondem em curto prazo: mecanismos de feedback dos barorreceptores, mecanismo isquêmico do sistema nervoso central e o mecanismo quimiorreceptor e; os que respondem em longo prazo: o mecanismo vasoconstritor do sistema renina-angiotensina, também chamado de controle hormonal, o relaxamento por estresse da vasculatura e o extravasamento de líquidos através das paredes capilares para dentro ou para fora da circulação (GUYTON; HALL, 2011; BECKETT et al., 2008; WRIGHT et al., 2015).

#### **2.3.1.1. Controle em curto prazo da pressão arterial**

Os quimiorreceptores são células especializadas que detectam a redução da tensão de O<sub>2</sub>, o excesso de dióxido de carbono e de íons de hidrogênio, emitindo sinais que excitam o centro vasomotor, elevando a pressão arterial de volta a níveis normais (GUYTON; HALL, 2011; COSTANZO, 2014).c De outro modo, quando ocorre redução da quantidade de sangue que chega ao tronco encefálico inferior os neurônios vasoconstritores e cardioaceleradores no centro vasomotor ficam excitados e conseqüentemente elevam a pressão arterial (COSTANZO, 2014). No entanto, apesar da intensidade da resposta exercida pelos quimiorreceptores e pelo controle isquêmico do SNC sobre a pressão arterial eles não são controladores potentes da PA, uma vez que os quimiorreceptores somente são efetivos quando a pressão cai para níveis abaixo de 80 mmHg, da mesma maneira o controle isquêmico somente é significativo quando a pressão

cai para valores abaixo de 60 mmHg (GUYTON; HALL, 2011; WRIGHT et al., 2015). Portanto, não são controladores normais da pressão arterial no controle a curto prazo, mas apenas atuam como sistemas de emergência.

Já o sistema barorreflexo ou sistema de feedback dos barorreceptores é o mais importante e efetivo sistema de controle em curto prazo da pressão arterial (BEVILACQUA, 2010). São receptores de estiramento que estão localizados no cossó da aorta e nos sulcos carotídeos, detectam variações da pressão arterial e desencadeiam reflexos rápidos, visando manter a PA constante por meio de estímulos enviados ao sistema nervoso simpático por meio do nervo glossofaríngeo, quando responde a diminuições da PA e ao parassimpático por meio do nervo vago, quando responde a aumentos da PA (SILVERTHORN, 2017; GUYTON; HALL, 2011).

No sistema barorreflexo as informações que são enviadas via nervo vago ou via nervo glossofaríngeo são integradas no núcleo do trato solitário (NTS), este, por sua vez, comanda as alterações nos centros vasomotores, que a partir do recebimento do estímulo irão ativar fibras nervosas, que envia respostas a depender do tipo de alteração necessária à manutenção da constância na pressão arterial (SILVERTHORN, 2017; GUYTON; HALL, 2011). As fibras nervosas responsáveis por enviar sinais simpáticos ou parassimpáticos irão terminar no nodo sinoatrial e seus comandos parassimpáticos irão causar bradicardia (diminuição da frequência cardíaca) com conseqüente redução da pressão arterial, suas respostas simpáticas são: aumentar a frequência cardíaca, além disso, também atuam no músculo cardíaco, aumentando a força de contração e o débito cardíaco; causa vasoconstrição nas arteríolas e nos leitos venosos, todos estes efeitos simpáticos levam ao aumento da pressão arterial (SILVERTHORN, 2017; COSTANZO, 2014; GUYTON; HALL, 2011).

#### 2.3.1.2. Controle em longo prazo da pressão arterial

Basicamente o controle em longo prazo da pressão arterial é exercido pelos sistemas Rin-líquidos corporais e o controle hormonal que envolve o sistema renina-angiotensina-aldosterona.

O sistema Rin-líquidos corporais atua lenta, mas poderosamente, objetivando retornar a PA ao ponto de equilíbrio (WRIGHT et al., 2015). Quando a pressão arterial aumenta a diurese se eleva de 6 a 8 vezes maior que o normal, reduzindo o DC e conseqüentemente a PA (GUYTON; HALL, 2011). O aumento do volume de líquidos pode aumentar a pressão arterial por aumento do DC (efeito direto) ou por aumento da

RPT (efeito indireto – autorregulação tecidual), quando um excesso de sangue flui pelo tecido a vasculatura tecidual local se contrai normalizando o fluxo sanguíneo, quando o aumento do volume sanguíneo eleva o DC o fluxo sanguíneo se eleva em todos os tecidos do corpo, de modo que esse mecanismo de autorregulação contrai os vasos em todo o corpo, o que eleva a RPT e por conseguinte a PA (GUYTON; HALL, 2011).

O cloreto de sódio (NaCl) também exerce importante papel na elevação da pressão arterial, esse processo envolve dois mecanismos: o excesso de sódio no líquido extracelular aumenta a osmolaridade do sangue, o que estimula o centro da sede no hipotálamo, isso estimula a ingestão de água para regular a osmolaridade, aumentando o volume de líquido na corrente sanguínea com consequente aumento da PA; o aumento da osmolaridade estimula a secreção de hormônio antidiurético (ADH) pela hipófise posterior, o que faz aumentar a reabsorção de água nos túbulos renais, aumentando assim o volume sanguíneo (SILVERTHORN, 2017; COSTANZO, 2014).

O sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona é o mais importante e efetivo controle da pressão arterial em longo prazo, age de várias formas para elevar a pressão arterial (GUYTON; HALL, 2011). Quando a PA diminui mecanorreceptores presentes nas arteríolas eferentes renais detectam a variação e enviam sinais às células justaglomerulares que secretam renina, a renina ao cair na corrente sanguínea catalisa a transformação do angiotensinogênio em angiotensina 1, a angiotensina 1 ao chegar nos rins e nos pulmões é convertida pela ECA em angiotensina 2, esta, por sua vez, apresenta várias funções importantes para regulação da PA (SILVERTHORN, 2017; COSTANZO, 2014). Assim como o sistema nervoso simpático, a angiotensina 2 atua causando vasoconstrição nas arteríolas; também atua no córtex renal estimulando a secreção de aldosterona, o que amplifica a própria função da angiotensina 2; aumenta a retenção de  $\text{Na}^+$  e  $\text{H}_2\text{O}$ , aumentando o volume sanguíneo; atua no hipotálamo estimulando a sede e ingestão de água; estimula o trocador  $\text{Na}^+/\text{H}_2\text{O}$  aumentando a reabsorção de  $\text{Na}^+$  e bicarbonato (LIMA et al., 2007; SANJULIANE et al., 2011).

Em síntese, o controle da pressão arterial é feito por mecanismos diversos, de natureza neural ou hormonal.

#### 2.4. HIPERTENSÃO ARTERIAL SISTÊMICA

A hipertensão arterial sistêmica (HAS) é fator de risco para várias doenças crônicas não transmissíveis, é uma doença caracterizada pela elevação sustentada dos níveis pressóricos acima de limites predefinidos, que se apresentam como normais

quando nos níveis menor ou igual a 120 e 80 mmHg, para pressão sistólica e diastólica, respectivamente (SBC, 2016). A hipertensão arterial é uma disfunção dos mecanismos controladores da pressão arterial, que pode culminar com a falência do organismo (SBC, 2016).

A HAS demanda enormes custos sociais e econômicos em decorrências de suas complicações resultantes, principalmente aos órgãos coração, cérebro, rins e olho, (insuficiência cardíaca, complicações cerebrovasculares, desordens arterial coronariano, insuficiência renal crônica e doença vascular periférica) (CHOR et al., 2015; ANDRADE et al., 2015). Alguns fatores de riscos para a elevação da pressão arterial, são: a idade avançada, sexo, etnia, fatores socioeconômicos, consumo indiscriminado de cloreto de sódio, obesidade, tabagismo, estresse, diabetes, uso de álcool e o sedentarismo (SCALA, 2015; ZHAO et al., 2011; SBC, 2016; NASCIMENTO-NETO et al., 2006).

No Brasil, a mortalidade em decorrência de doenças cardiovasculares atinge 1,2 milhão de mortes por ano, com 17 milhões de hipertensos no país. A principal causa de morte em todas as regiões do Brasil é o acidente vascular cerebral. Entre os fares de risco para a mortalidade a hipertensão representa 40% das mortes por acidente vascular cerebral e 25% das mortes por doenças coronárias. A hipertensão e suas comorbidades são responsáveis por elevada frequência de internações hospitalares, sendo a insuficiência cardíaca a principal causa de hospitalização entre as doenças cardiovasculares (SBC, 2016).

A medicina tradicional emprega dezenas de plantas diferentes, subsidiada no conhecimento popular, para o tratamento da hipertensão e problemas relacionados ao sistema cardiovascular. Contudo, para que o indivíduo não tenha sua saúde exposta a riscos, a indicação de plantas no combate à hipertensão deve ser apoiada em evidências científicas, a partir de estudos que comprovem a eficácia de determinada planta na cura da doença empregada, além de verificar seus efeitos tóxicos, genotóxicos e diversos outras alterações fisiopatológicas que este determinado vegetal possa está causando no organismo humano (LOPES et al., 2010).

## 2.5. ENDOTÉLIO VASCULAR

Por muitos anos a camada de células endoteliais foi tratada como mero separador de superfícies, contudo o conhecimento atual sobre o endotélio está muito avançado. É a camada monocelular que reveste o interior de todos os vasos sanguíneos se constituindo em uma interface ativa entre a circulação do sangue e a parede vascular (BAHIA et al.,

2006). Células endoteliais tem período de vida esperado de cerca de 30 anos, após esse período são naturalmente substituídas (SANDOO et al., 2010).

A força de cisalhamento do fluxo sanguíneo (shear stress), atua diretamente sobre as células endoteliais gerando uma cascata de eventos que conduzem à síntese e liberação de várias substâncias que atuam na manutenção do tônus vascular (BATLOUNI et al., 2001). O endotélio intacto controla a permeabilidade vascular, regula o tráfego de moléculas e células, modula vasomotricidade. Em condições fisiológicas a camada endotelial é essencial à regulação do tônus vascular, do fluxo sanguíneo, da perfusão tissular, do controle da proliferação e migração celular, modulação da resposta inflamatória, entre outras (CARVALHO et al., 2001). O endotélio regenerado parece não possuir a mesma habilidade para liberação dos fatores que inibem a contração, e sua resposta a estímulos torna-se diminuída (BAHIA et al., 2006).

O endotélio é capaz de produzir e liberar diversas substâncias benéficas, tais como: fatores antioxidantes, substâncias antiinflamatórias, prostaciclina e peptídeos natriurético. Entre as várias funções do endotélio, as relacionadas à vasomotricidade incluem: síntese de substâncias vasodilatadoras e antiplaquetárias (fator relaxante derivado do endotélio – EDRF, fator hiperpolarizante dependente do endotélio – EDHF, prostaciclina – PGI<sub>2</sub>); síntese de substâncias vasoconstritoras e ativadoras de agregação plaquetária ou fatores de contração derivados do endotélio (EDCF): endotelina, endoperóxido (prostaglandina H<sub>2</sub> e tromboxanas A<sub>2</sub>), leucotrienos, angiotensina II e espécies reativas de oxigênio; receptor-modulador de acetilcolina, serotonina, trombina, vasopressina e ácido araquidônico (BATLOUNI et al., 2001; SANDOO et al., 2010).

### **2.5.1. Fatores relaxantes derivados do endotélio**

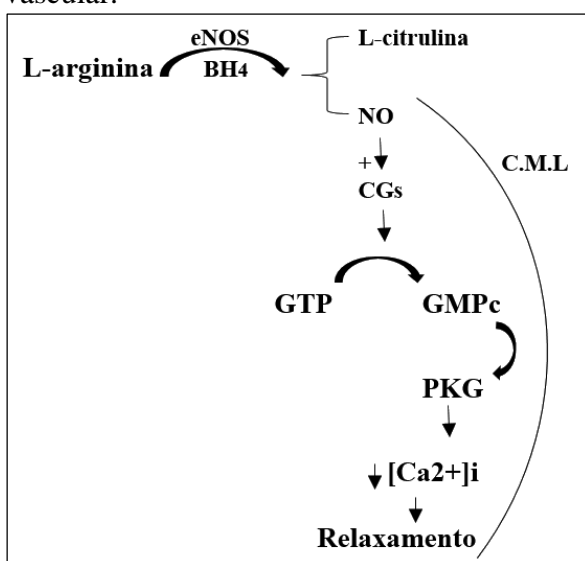
Em condições fisiológicas o endotélio, por vários estímulos, libera localmente e controladamente diversos compostos que interferem diretamente no tônus vascular. Entre esses compostos estão os fatores relaxantes derivados do endotélio. Principalmente óxido nítrico (NO), fator de hiperpolarização derivado do endotélio (EDHF), prostaciclina e PGE<sub>2</sub>. Em condições fisiológicas estes fatores são expressos com predomínio sobre outras substâncias, ao passo que em condições patológicas, como na hipertensão arterial, o equilíbrio entre a liberação desses fatores é alterado (LIANG et al., 2010).

### 2.5.1.1. Óxido nítrico

O óxido nítrico (NO) é a principal substância vasorelaxante derivado do endotélio e a primeira a se expressar em condições fisiológicas, foi identificado pela primeira vez por Furchgott e Zawadzki em 1980 (SANDOO et al., 2010). A síntese endotelial do NO é mediada pela enzima NO sintase, que converte o aminoácido L-arginina para o NO (CERQUEIRA; YOSHIDA, 2002). O NO desempenha importante papel na regulação do tônus vascular e da homeostasia (LIANG et al., 2010).

Ao penetrar na célula muscular o NO liga-se ao grupo heme da enzima guanilato ciclase solúvel (sGC) com consequente formação de cGMP (monofosfato cíclico de guanosina) a partir da conversão do GTP (trifosfato de guanosina) (BONAVENTURA et al., 2004), promove abertura de canais de  $K^+$  e fechamento dos canais de cálcio operados por voltagem (VOCC's), o que causa diminuição dos níveis do íon  $[Ca^{2+}]_i$  intracelular, promovendo inativação da MLCK resultando no efeito vasorelaxante (WONG et al., 2017; ZAGO; ZANESCO, 2006).

**Figura 1-** Síntese do NO e sua sinalização no relaxamento da célula muscular lisa vascular.



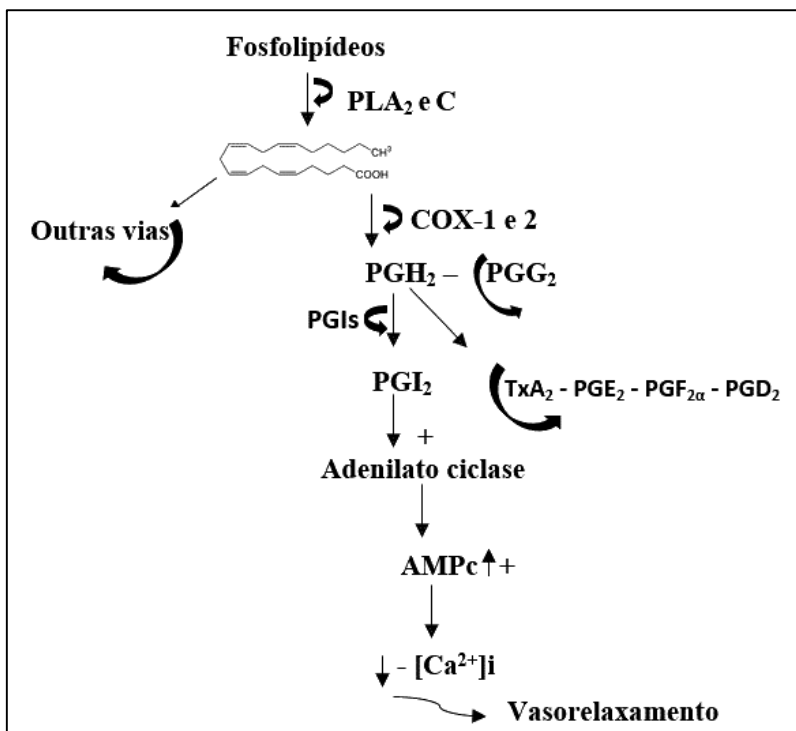
### 2.5.1.2. Prostaciclina

As prostaglandinas são importantes mediadores inflamatórios. Das quais destacam-se as prostaglandinas  $PGE_2$  e a  $PGI_2$ , por se apresentarem como potentes agentes vasodilatadores além de potencializarem o aumento de permeabilidade induzido por mediadores como bradicinina e histamina (MENDES et al., 2012). A prostaciclina ( $PGI_2$ ) é um eicosanoide derivado do ácido araquidônico, que é liberado dos fosfolipídios

presentes na membrana das células por fosfolipase ativada (ROY et al., 1985; BELTOWSKI et al., 2014). Por ação da enzima cicloxigenase formam-se os endoperóxidos cíclicos PGG<sub>2</sub> e PGH<sub>2</sub>, este, por ação da prostaciclina sintase, origina nas células endoteliais a prostaciclina PGI<sub>2</sub>, um potente vasodilatador, juntamente com vários outros prostanoides (MONCADA, 2006).

A ação vasorelaxante da PGI<sub>2</sub> depende usualmente de receptores específicos presentes na membrana das células musculares lisas vasculares, o estímulo aos receptores da prostaciclina leva à estimulação da adenilato ciclase produzindo um aumento da AMPc e estimulação da proteína quinase dependente de AMPc (PKA). No músculo liso vascular a PKA tem efeitos semelhantes à PKG, podendo ativar canais de K<sup>+</sup> sensíveis ao ATP induzindo hiperpolarização e estimulando a saída de Ca<sup>2+</sup> do citosol, que por sua vez induz ao relaxamento da musculatura lisa vascular (SPIER et al., 2007; BELTOWSKI et al., 2014).

**Figura 02:** Cascata de síntese da prostaglandina I<sub>2</sub> (prostaciclina) e sua sinalização no relaxamento da célula muscular lisa vascular.



## 2.6. CANAIS DE Ca<sup>+</sup> e CANAIS DE K<sup>+</sup>

As células musculares lisas vasculares são responsáveis por determinar o tônus dos vasos sanguíneos, participando da regulação do processo de contração e relaxamento

da musculatura lisa vascular, depende de um complexo arcabouço de estímulos ocasionado por diversos fatores vasodilatadores e vasoconstrictores, tais como: hormônios, neurotransmissores, fatores relaxantes e contractuante derivados do endotélio e até mesmo a força física/mecânica exercida pela pressão sanguínea na parede dos vasos, o chamado shear stress (VALSECCHI et al., 2017).

Os canais iônicos exercem um importante papel na determinação do tônus vascular, cuja regulação depende da concentração intracelular de  $\text{Ca}^+$ , substâncias vasoconstrictoras promovem o influxo de  $\text{Ca}^+$  enquanto que substâncias vasorelaxadoras atuam de modo contrário (KERKHOF et al., 2017). As principais vias para o aumento intracelular de  $\text{Ca}^+$  nas células musculares são os canais de cálcio operados por voltagem (VOCC's), canais de cálcio operados por receptor (ROCC's), e a liberação de  $\text{Ca}^+$  do retículo sarcoplasmático, por meio da ativação dos receptores sensíveis à rianodina (RyR) e receptores sensíveis ao inositol trifosfato ( $\text{IP}_3$ ), presentes na membrana do retículo (MOJIMINIYI et al., 2008).

A elevação significativa dos níveis intracelulares de  $\text{Ca}^+$  capaz de gerar mudanças no tônus vascular é determinada pela ativação dos VOCC's (KIM et al., 2008). A concentração intracelular de  $\text{Ca}^+$  ainda depende da via trocador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{+2}$ , regulado pelo gradiente eletroquímico de sódio e controlado pela  $\text{Na}^+\text{K}^+\text{ATPase}$  (KIM et al., 2008; BLAUSTEIN; HAMLIN, 2010).

Os canais de  $\text{Ca}^{2+}$  permitem a passagem de íons  $\text{Ca}^{2+}$  para o citoplasma através de um poro seletivo que é aberto em resposta à despolarização da membrana celular (CATTERAL, 2011). O fluxo de  $\text{Ca}^{2+}$  cria uma corrente interna despolarizante e a acumulação resultante de  $\text{Ca}^{2+}$  no citoplasma pode atuar como um gatilho químico para a secreção de hormônios e neurotransmissores, contração muscular e uma variedade de outros eventos sensíveis ao  $\text{Ca}^{2+}$  (FLAVELL; GREENBERG, 2008).

Os canais de  $\text{K}^+$  são proteínas transmembranares que possuem uma ação importante em diversos processos fisiológicos, incluindo tônus vascular, repolarização cardíaca, liberação de neurotransmissores, secreção hormonal, e excitabilidade celular (KUANG et al., 2015).

A literatura aponta quatro tipos principais de canais de  $\text{K}^+$  expressos nas células do músculo liso vascular: Canais de potássio ativados por voltagem ( $\text{Kv}$ ), importantes reguladores do potencial de membrana em resposta aos estímulos despolarizantes; Canais de potássio dependentes do ATP ( $\text{Kir6.x}$ ), alvos de uma grande variedade de estímulos vasodilatadores; Canais de potássio ( $\text{Kir3.x}$ ), retificadores de influxo, regulam o



potencial de membrana das células musculares e; Canais de potássio de alta condutância ativados pelo cálcio ( $K_{Ca1.x}$ ,  $K_{Ca4.x}$ ,  $K_{Ca5.x}$ ), respondem a alterações da concentração de  $Ca^{2+}$  intracelular (WULFF et al., 2009; SANDHIYA et al., 2009; TIAN et al., 2014). Os dois principais canais de  $K^+$  expressos nas células musculares vasculares são os  $K_v$  e os  $K_{Ca}$  de alta condutância (FELETOU et al., 2009; CARVALHO-DE-SOUZA et al., 2013; LYNCH et al., 2013; KUANG et al., 2015; FANG-WEM et al., 2017; BALAJTHY et al., 2017).

A atividade dos canais de potássio ( $K^+$ ) constitui um mecanismo essencial na regulação do potencial de membrana das células musculares lisas vasculares, sendo um determinante importante do tônus vascular (SANDHIYA et al., 2009). Drogas que ativam canais de  $K^+$  representam uma nova e importante estratégia terapêutica no combate a hipertensão arterial (LYNCH et al., 2013).

## 2.7. CONSIDERAÇÕES SOBRE O PROCESSO EXCITAÇÃO-CONTRAÇÃO NO MUSCULO LISO

A atividade fisiológica do sistema circulatório depende principalmente da musculatura lisa vascular (KATOUE et al., 2006). O estado contrátil deste tecido é determinado pela concentração intracelular de  $Ca^{+2}$ , sendo que o aumento do  $[Ca^{2+}]_i$  é o evento chave para ativação da maquinaria contrátil das células musculares lisas (ALONSO-CARBAJO et al., 2017).

O processo de excitação e contração do musculo liso vascular gera um sinal que é transmitido na membrana plasmática e desencadeia vários estímulos que resultam na contração, a transmissão do sinal é realizada por meio de acoplamento eletromecânico ou farmacomecânico, ambos estímulos resultam no aumento intracelular do cálcio (PAIVA; FARIAS, 2005).

No acoplamento eletromecânico ocorre a entrada de íons (exemplo:  $Na^+$ ,  $K^+$ ,  $Cl^-$ ) que conduzem à a despolarização da membrana plasmática, alterando o gradiente eletroquímico e promovendo a abertura de canais de cálcio operados por voltagem (VOCC's), que por sua vez permite a difusão de  $Ca^{2+}$  para o interior da célula (GUIBERT et al., 2008). Dois tipos de canais de  $Ca^{2+}$  foram identificados na membrana de células musculares lisas: canais de longa duração (tipo L) e canais transitórios (tipo T) (PAIVA; FARIAS, 2005). Os canais de  $Ca^{+2}$  independentes de voltagem são identificados em diferentes músculos lisos, os mais bem caracterizados são os canais ativados por receptores purinérgicos, estimulados pelo ATP (GUIBERT et al., 2008)

A abertura dos canais do tipo L ocorre por despolarização da membrana celular, enquanto que o fechamento ocorre quando a membrana é repolarizada ou hiperpolarizada. Devido à ausência de drogas seletivas para os canais do tipo T, estes são pouco estudados (MOROTTI et al., 2017).

O acoplamento farmacomecânico ocorre de forma independente da despolarização da membrana celular, contudo envolve a interação de agonistas com os receptores de membrana acoplados à proteína G (PAIVA; FARIAS, 2005). A subunidade alfa da proteína G ativa as fosfolipase C e A<sub>2</sub>, que por sua vez hidrolisam o fosfatidilinositol 2,5-bifosfato, liberando inositol 1,4,5 trifosfato (IP<sub>3</sub>) e diacilglicerol (DAG) (BOLLANG, 2016; STAUDT et al., 2016). O DAG ativa a proteína quinase C (PKC), que é responsável pelo aumento da condutância iônica dos canais de Ca<sup>2+</sup> tipo L e dos canais de K<sup>+</sup> (MOCHLY-ROSEN et al., 2012). Ao passo que o IP<sub>3</sub> sensibiliza os receptores do IP<sub>3</sub> no RS induzindo a liberação de Ca<sup>2+</sup> internamente. Ainda ocorre liberação de cálcio do retículo sarcoplasmático a partir da ativação dos receptores de rianodina (RyRs) (CAMMANUEL; VALDIVA, 2014). Contribuição significativa ao aumento do [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> é dado pelos canais de cálcio operados por receptor (ROCC's) (OLIVEIRA et al., 2006).

A processo inicial para que ocorra a contração propriamente dita acontece quando o [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> liga-se a calmodulina, formando o complexo Ca<sup>2+</sup>-calmodulina. Que por sua vez permite a interação com a quinase da cadeia leve da miosina (MLCK) (PAIVA; FARIAS, 2005). A associação da Ca<sup>2+</sup>-calmodulina com a MLCK altera a conformação do complexo, deslocando a sequência auto inibitória da MLCK, ativando a quinase e causando a fosforilação da miosina de cadeia leve (MLC), expondo os sítios de ligação da miosina com a actina, a ligação é seguida pela mudança no ângulo de orientação do complexo actina-miosina, permitindo o deslizamento dos filamentos de miosina sobre a actina, logo a contração do músculo ocorre (WEBB, 2003; PAIVA; FARIAS, 2005).

## 2.8. *Acmella oleracea*

A espécie *Acmella oleracea* é uma planta nativa da América do Sul, de ocorrência em diversos países, inclusive em países asiáticos, acreditando-se que tenham sido levadas por colonizadores portugueses para suas colônias em Macau de onde se espalhou para outras regiões da Ásia, apresenta disseminado cultivo e uso frequente na culinária e medicina tradicional na região norte do Brasil (ROMÃO et al., 2015).

O gênero *Acmella* é composto de mais de 60 espécies que são amplamente distribuídas em regiões tropicais e subtropicais do mundo, como a África, América, Bornéu, Índia, Sri Lanka e da Ásia (SAHU et al., 2011). *A. oleracea* é cultivada em área úmida, tem baixa taxa de germinação ou propagação vegetativa pobre (TIWARI et al., 2011), suas flores e folhas têm sabor picante e quando mastigadas apresenta uma sensação de formigamento e dormência (WONGSAWATKUL et al., 2008).

O Jambu, como é conhecida vulgarmente no estado do Acre, é uma planta pertencente à família Asteaceae, mede aproximadamente 40 a 60 centímetros de altura, é semiereta ou quase rasteira (BOONEN et al., 2009). No Brasil é cultivada durante todo o ano como planta ornamental, comensal ou medicinal (ROMÃO et al., 2015). Todas as partes da planta são utilizadas (flores, folhas, raízes e caules) em diversas práticas terapêuticas (LENG et al., 2011).

As flores de *A. oleracea* são utilizadas com frequência no combate a dores de dentes e males da garganta, sendo empregada industrialmente em cremes dentais e gomas de mascar (REVILLA, 2002). É muito difundida como temperos em pratos típicos da região norte brasileira (LEY et al., 2006). A planta contém um grupo diversificado de recurso altamente valioso e prontamente disponíveis de metabólitos bioativos, por exemplo, alcalóides, taninos, óleos essenciais e flavonoides, alguns elencados no Quadro 1 (JAGAN et al., 2012).

**Quadro 1:** Usos tradicionais e aplicações etnofarmacológicas de *A. oleracea*

Cuidados de Saúde	Tratamento	Referências
Medicinal	Reumatismo, febre, diurético, gripe, tosse, doença da raiva, tuberculose, antimalárico, antibacteriano, larvicida, antisséptico, anti-inflamatório e antiviral.	Bunyapraphatsara; Chokeychareunporn, 1999; Farnsworth; Bunyapraphatsara, 1992; Yadav; Singh, 2010; Haw; Keng, 2003.
	Antifúngico, imunomodulador, anestésico local e digestivo.	Tiwari et al., 2011; Sahu et al., 2011; Leng et al., 2011; Sahu et al., 2011; Tiwari et al., 2011; Leng et al., 2011; Sahu et al., 2011.
Dental	Controle da obesidade	Yuliana et al., 2011.
	Picada de cobra	Tiwari et al., 2011.
	Dor de dente	Haw e Keng, 2003; Tiwari et al., 2011.
	Pasta de dentes	Savadi et al., 2010
	Doença periodontal	Abascal e Yarnell, 2001; Sahu et al., 2011; Shimada; Gomi, 1995.
	Estomatite aftosa recorrente	Abascal; Yarnell, 2010.
Cosméticos	Relaxante muscular de ação rápida Antirrugas	Belfer, 2007; Demarne; Passaro, 2009; Schubnel, 2007.

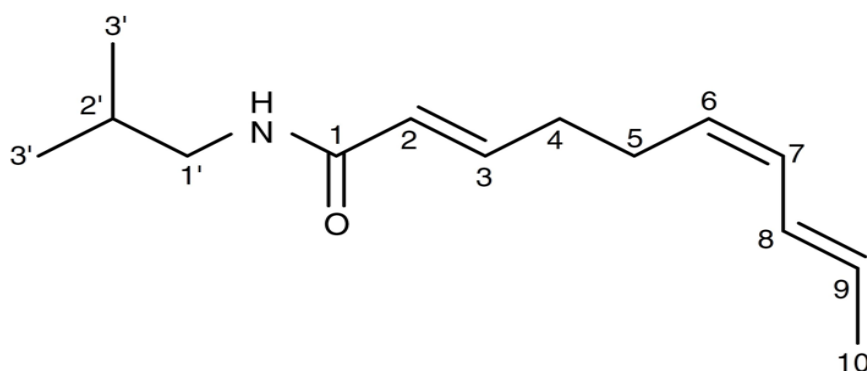
### 2.8.1. Composição química de *A. oleracea*

Diversas substâncias bioativas presentes em *A. oleracea* já foram identificadas. São exemplos: N-alquilamidas, N-isobutilamidas (BOONEN et al., 2009). Spilantol, principal constituinte bioativo presente na planta (YASUDA et al., 1980). Flavonoides e alcaloides (ROMÃO et al., 2015). Ácido valínico, ácido transferúlico e ácido isoferúlico (PRACHAYASITTIKUL et al., 2009). Consideráveis níveis de saponinas triterpênicas (ANSARI; MUKHARYA, 1987). Como resultado de estudos anteriores fitoquímicos, vários compostos alquilamidas (HARALD et al., 1985; NAKATANI; NAGASHIMA, 1992; RAMSEWAK; ERICKSON, 1999), ácido 3-acetilauritólico,  $\beta$ -sitostenona, escopoletina, ácido sílico (DUBEY et al., 2013).

**Quadro 2:** Algumas substâncias fotoquímicas de *Acmella oleracea*

Nome químico	Referências
Spilanthol	Ramsewak et al., 1999.
Ácido undeca-2E, 7Z, 9E-trienoico isobutilamida 2E, 7Z, 9E-Ácido undecatrienóico-N isobutilamida	
Undeca-2E-en-8,10-isobutilamida do ácido di-sônico	
2E-N-(2- Metilbutil) -2-undeceno-8,10-di-dinamida	Nakatani; Nagashima, 1992.
2E,7Z-N- Isobutil-2,7-tridecadieno-10,12-di-dinamida	
7Z-N- Isobutil-7-trideceno-10,12-di-dinamida	
$\beta$ -Sitosterol	Krishnaswamy et al., 19775.
$\beta$ -Amirina	
$\alpha$ -Amirina	
Germacreno-D	
Limoneno	Baruah; Leclercq, 1993.
Myrecene	
(Z)- $\beta$ -Ocimene	
$\beta$ -Carifileno	Boonen et al., 2010.
Stigmasterol	Tiwari; Kakkar, 1990.
3- Ácido acetilaleuritólico	Prachayasittikul et al., 2009.
Ácido valínico	
$\beta$ -Sitostenona	
Escopoletina	
Ácido trans-ferrúlico	
Ácido trans-isoferrúlico	

**Figura 03:** Spilanthol ( $C_{14}H_{23}NO$ , 221,339 g / mol) é um composto bioativo que é encontrado em muitas plantas diferentes que são usadas como remédios tradicionais em todo o mundo (PRACHAYASITTIKUL et al., 2013).



### 2.8.2. Atividades biológicas *A. oleracea*

A literatura tem apresentado diversas atividades biológicas para *A. oleracea* tais como: atividade bactericida (PERES et al., 1997); inibição na vitalidade de vermes machos adultos de *Onchocerca gutturosa* (NYASSE et al., 2006); efeito anestésico local (CHAKRABORTY et al., 2010); atividade anti-inflamatória e analgésica (CHAKRABORTY et al., 2010); ação antifúngica (RANI; MURTY, 2006); efeito diurética com aumento acentuado na urina de Na<sup>+</sup> e K<sup>+</sup> com acentuada redução da osmolaridade na urina (RATNASOORIYA et al., 2004); atividade antimalárica (SPELMAN et al., 2011); inibição da lipase pancreática (EKANEM et al., 2007); ação vasorelaxante e antioxidante (WONGSAWATKUL et al., 2008); potente ação antinociceptiva e antioxidante (HOSSAIN et al., 2012).

*A. oleracea* ainda apresenta ação larvicida, antiviral, antisséptica e cicatrizante (LI-CHEN et al., 2008); ação afrodisíaca em ratos (SHARMA et al., 2011); atividade imunomoduladora (WU et al., 2008); ação inseticida (JONDIKO, 1986). O extrato da raiz de *A. oleracea* também apresentou eficácia no tratamento contra infecção por HIV/AIDS (BAJARANG, 2007). Constituintes de *A. oleracea* são utilizados em formulações anti-dor de dente com ação na cura de infecções de garganta (PANDEY et al., 2007). Atualmente *A. oleracea* vem sendo utilizado como ingrediente ativo de formulações empregadas na cura de infecções orais, microbianas, cárie dentária, periodontite e na redução de placas dentárias (ADLER, 2006).

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1. GERAL

Investigar atividades biológicas do extrato hidroalcoólico de *Acmella oleracea* principalmente sobre alguns parâmetros cardiovasculares de ratos Wistar machos normotensos.

#### 3.2. ESPECÍFICOS

1 - Avaliar a toxicidade do Extrato Hidroalcoólico de *Acmella oleracea* em ratos machos.

2 - Verificar os efeitos do Extrato Hidroalcoólico de *Acmella oleracea* sobre a pressão arterial média e a frequência cardíaca de ratos machos normotensos.

3 - Analisar os efeitos do Extrato Hidroalcoólico de *Acmella oleracea* sobre artéria aorta isolada de rato normotenso.

4 - Avaliar o envolvimento de algumas vias enzimáticas e de receptores no efeito do Extrato Hidroalcoólico de *Acmella oleracea* sobre artéria aorta de ratos.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 COLETA E IDENTIFICAÇÃO BOTÂNICA

O material vegetal foi coletado em área de cultivo de hortaliças localizada no Km 07 do ramal São João, da estrada do Quixadá, a 14 Km de distância do centro da cidade de Rio Branco, Acre, Brasil, nas coordenadas geográficas 9°54'45.7"S 67°43'59.7"W. A espécie foi identificada pelo Herbário Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Marlene Freitas da Silva (MFS) do Centro de Ciências Sociais e Educação (CCSE) da Universidade do Estado do Pará e uma exsicata foi produzida e depositada no herbário da Universidade Federal do Acre sob o código/número UFACPZ20441.

### 4.2 OBTENÇÃO DO EXTRATO

Partes aéreas da planta foram secas em estufa com temperatura controlada (40 °C), após a secagem o material passou por processo de trituração a seco, em liquidificador industrial (RODRIGUES et al., 2011). 1600 gramas de material seco e triturado foram acondicionado em béqueres de 2 litros e em seguida adicionado etanol 70% GL, na proporção de 1 L de etanol para cada 200 gramas do material vegetal, cada béquer foi envelopado com papel alumínio para proteção da luz, armazenado nestas condições por 72 horas, sendo movimentado a cada 24 horas com um bastão de vidro (SANTOS et al., 2013). Após este período foi filtrado com papel filtro, para coleta somente do extrato líquido, sendo feito uma primeira filtração para separação do material vegetal, seguida de outras duas filtrações, após lavagem da biomassa com o etanol para completa retirada do extrato (SOARES et al., 2008), mantido sempre em temperatura ambiente.

O extrato hidroalcoólico foi concentrado em Evaporador Rotativo, sob pressão reduzida com temperatura a 40 °C. O concentrado obtido no evaporador rotativo foi posteriormente liofilizado para obtenção somente do extrato hidroalcoólico de *Acmella oleracea*, denominado EHAO.

Para os ensaios farmacológicos, o extrato hidroalcoólico de *A. oleracea* (EHAO) foi diluído minutos antes do início do experimento, em água destilada, para os experimentos *in vitro*, e em solução salina a 0,9% para os experimentos *in vivo*, de acordo com protocolos experimentais descritos no item 4.3.



### 4.3. ESTUDO FARMACOLÓGICO

#### 4.3.1. Animais

Foram utilizados ratos machos (*Rattus norvegicus*) albinus da linhagem Wistar, normotensos, com idades entre 08 e 14 semanas, apresentando entre 250 a 350 g de peso corporal. Os animais eram provenientes do biotério do Núcleo de Biologia Experimental (Nubex) da Universidade de Fortaleza e, mantidos no Laboratório de Fisiofarmacologia da UFAC - LAPFFAR.

Os animais foram aclimatados na sala de manutenção de animais em experimentação do LAPFFAR por um período de 10 a 20 dias antes dos experimentos. Foram controladas as condições de temperatura ( $21 \pm 1^\circ\text{C}$ ), iluminação em ciclo claro/escuro de 12 horas. Os animais eram mantidos em gaiolas de polipropileno, com acesso livre à comida e água apropriadas.

Todos os procedimentos 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, com aprovação do Comitê de Ética no Uso dos Animais, da Universidade Federal do Acre, registrado sob o número de processo 23107.018517/2016-38.

#### 4.3.2. Substâncias utilizadas

Para realização dos experimentos foram empregadas as seguintes drogas: tiopental sódico (Cristália), sal sódico de heparina (Roche), L (-) fenilefrina (FEN), sulfato de atropina, cloridrato de acetilcolina (ACh),  $\text{N}^G$ -nitro-L-arginina-metil éster (L-NAME), nitroprussiato de sódio (NPS), indometacina (Indo), formol (formalina). As soluções estoques de indometacina eram dissolvidas juntamente com bicarbonato de sódio ( $\text{NaHCO}_3$ ) a 5% em água destilada. As demais soluções estoques foram dissolvidas em água destilada. Todas as soluções foram mantidas a  $0^\circ\text{C}$  e, imediatamente antes dos experimentos, diluídas em salina ou em água destilada, para os ensaios “*in vivo*” ou “*in vitro*”, respectivamente (CUNHA, 2004).

#### 4.3.3. Soluções nutritivas

As soluções nutritivas usadas nos experimentos tinham  $\text{pH} = 7,3$ , foram aeradas com uma mistura gasosa composta de 95 % de  $\text{O}_2$  e 5 % de  $\text{CO}_2$  e mantidas a uma

temperatura constante de 37 °C.

Para obtenção das soluções de KCl 20mM e KCl 80mM, após o preparo da solução normal de Krebs Henseleit, foi retirado um volume necessário e adicionado maior concentração de KCl até atingir a concentração desejável para obter KCl 20mM e 80 mM em frascos distintos.

Para o preparo da solução nutritiva de Krebs Henseleit (KHS) usou-se as substâncias nas concentrações em milimolar (mM), descritas na Tabela 1.

**Tabela 1** – Substâncias e suas concentrações utilizadas para o preparo das solução nutritiva de Krebs Henseleit (KHS).

Compostos químicos	Nome	Gramas/litro	Concentração
NaCl	Cloreto de sódio	6,7	118,00 mM
NaHCO <sub>3</sub>	Bicarbonato de sódio	2,1	25,00 mM
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> H <sub>2</sub> O	Fosfato de potássio	0,17	1,1 mM
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	Cloreto de cálcio dihidratado	0,308	2,5 mM
KCl	Cloreto de potássio	0,37	4,5 mM
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	Sulfato de magnésio	0,144	5,7 mM
C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>	Glicose	2,0	11,00 mM

#### 4.3.4. Ensaio toxicológico

A toxicidade do EHAO foi determinada com o objetivo de viabilizar a realização dos ensaios farmacológicos pelo uso de doses seguras, tomando-se por parâmetros, a dose capaz de provocar a morte de 50% dos animais (DL<sub>50</sub>), além das alterações comportamentais descritas na literatura (OECD, 2001; VALADARES, 2006).

##### 4.3.4.1 Determinação da toxicidade aguda

Para verificar a toxicidade aguda do EHAO em ratos Wistar machos foi administrado as doses de 2000 mg/kg e 5000 mg/kg (v.o) em grupos distintos de animais (n=6). Além de um grupo de animais controle que recebeu apenas veículo (salina 0,9%). Os animais foram observados durante os primeiros 180 minutos e a cada 12 h durante os 3 primeiros dias após a administração do extrato. Foram observados os parâmetros comportamentais descritos por Almeida et al (1999): atenção, alerta, analgesia, atividade motora espontânea, locomoção, sedação, micção, diarreia, convulsão, coma e morte. Sendo adotada a seguinte nomenclatura: (0) sem efeito/sem alterações comportamentais,

(-) efeito diminuído, (+) efeito presente, (++) e efeito intenso (Apêndice I). No final dos experimentos, os animais foram eutanasiados com dose tóxica de tiopental sódico.

### **3.3.5. Investigações farmacológicas *in vivo***

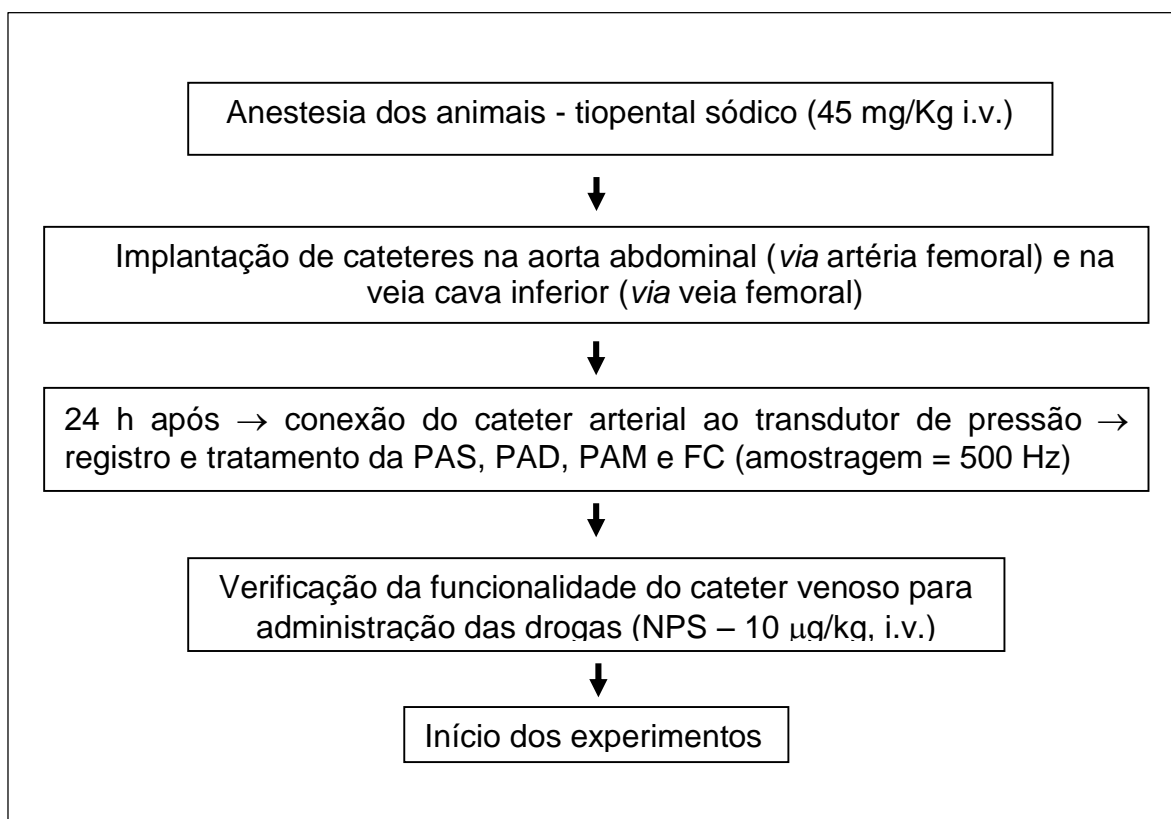
#### **3.3.5.1. Registro das variações da PA e da FC em ratos não-anestesiados**

Os procedimentos cirúrgicos e as medidas de pressão sanguínea arterial (PA) e de frequência cardíaca (FC) foram realizados de acordo com metodologia descrita por (SMITH; HUTCHINS, 1980; ISHIYAMA et al., 1993; OLIVEIRA et al., 1996; SCHANAIDER; SILVA, 2004), em ratos não-anestesiados e com livre movimentação. Conforme mostrado no Quadro 3, os animais foram anestesiados com tiopental sódico (45 mg/Kg, i.v.) e a aorta abdominal e veia cava inferior foram canuladas, *via* artéria femoral e veia femoral esquerdas, respectivamente, com cateteres polietileno (PE), constituídos por um segmento de PE-10 (diâmetro interno 0,28 mm, diâmetro externo 0,61 mm) fundido por aquecimento a uma extensão de PE-50 (diâmetro interno 0,58 mm, diâmetro externo 0,96 mm). Após a inserção e fixação, os cateteres (arterial e venoso) foram preenchidos com solução salina heparinizada, conduzidos subcutaneamente e exteriorizados através de incisão na região cervical posterior (*scapulae*) do animal. O cateter arterial foi utilizado para registros da PA e o venoso para administração das drogas.

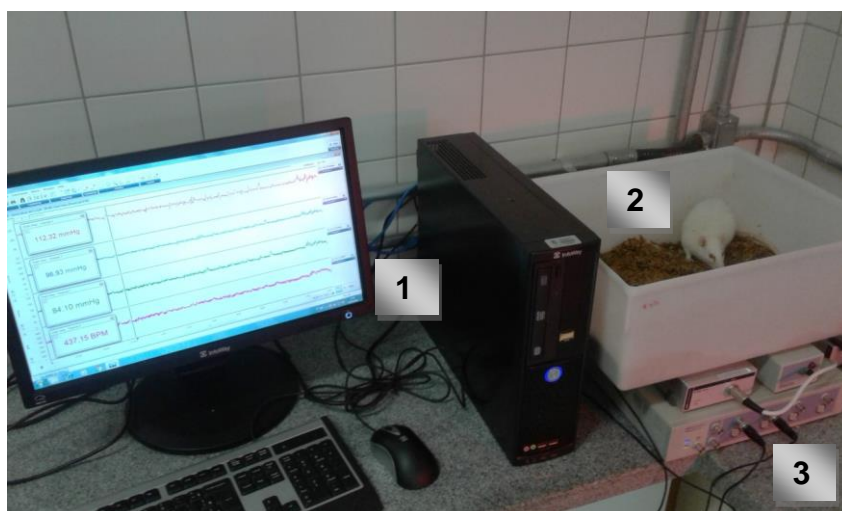
A PA e a FC de ratos não-anestesiados, vinte e quatro horas após o ato cirúrgico, foram registradas pela conexão do cateter arterial a um transdutor de pressão pré-calibrado (BP Transducer/Cable Kit, MLT1199, ADInstruments, Sydney, Australia). O transdutor foi acoplado a um amplificador registrador (PowerLabs 8/35, ADInstruments, Sydney, Australia) e conectado a um computador equipado com um software de análise de dados (LabChart, V.6.1, ADInstruments, Sydney, Australia) (Figura 4). Para cada ciclo cardíaco, foi calculada a pressão arterial sistólica (PAS), diastólica (PAD) e média (PAM), e o intervalo de pulso, referido como frequência cardíaca (FC).

No dia do experimento, após um período mínimo de 30 minutos para estabilização dos parâmetros cardiovasculares, foi injetado nitroprussiato de sódio – NPS (10 µg/kg, i.v.) para checar o posicionamento e a funcionalidade do cateter venoso, o que foi evidenciado pela diminuição da pressão arterial devido ao efeito vasorelaxante do NPS (Quadro 3).

**Quadro 3:** Representação esquemática do preparo dos animais para realização dos experimentos *in vivo*.



**Figura 4:** Sistema de aquisição de dados de pressão arterial e frequência cardíaca em ratos não anestesiados.



(1) computador equipado com LabChart, v.6.11, (2) animal conectado ao sistema de aquisição de dados, (3) amplificador registrador.

### 3.3.5.2. Avaliação das variações da PA e da FC induzidas pela administração do EHAO em ratos não- anestesiados

Antes do experimento, ratos normotensos não-anestesiados ficaram por período de 30 minutos em aclimatação para minimização do estresse, estabilização dos parâmetros cardiovasculares, refletindo assim, maior fidelidade das variações dos parâmetros estudados frente a administração do extrato. Conforme mostrado no Quadro 4, quinze minutos depois da aplicação do NPS o EHAO foi administrado cumulativamente e em doses crescentes (5, 20, 40 e 80 mg /kg, i. v.). Cada dose seguinte era aplicada somente após retomados os níveis basais de PA e FC. As variações na PAM e FC foram registradas, obtendo-se uma curva dose-resposta. O extrato da planta foi testado em experimentos separados, nunca no mesmo animal. Os valores de PAM e FC foram computados antes (valores da linha de base) e logo após a administração do EHAO (depois). As variações para cada dose foram expressas em percentagem, calculadas pela seguinte fórmula:

$$\text{Resposta PAM (\%)} = \frac{(\text{PAM depois} - \text{PAM antes}) \times 100}{\text{PAM antes}}$$

Ou

$$\text{Resposta FC (\%)} = \frac{(\text{FC depois} - \text{FC antes}) \times 100}{\text{FC antes.}}$$

**Quadro 4:** Esquema representativo da administração de doses crescentes (5, 20, 40 e 80 mg/kg) do EHAO em ratos normotensos não-anestesiados.

30 min.	↓	15 min.	↓	↓	↓	↓
ESTABILIZAÇÃO	NPS	5	20	40	80	
	(10 µg/kg)	[EHAO] mg/kg				

### 4.3.6. Investigações farmacológicas *in vitro*

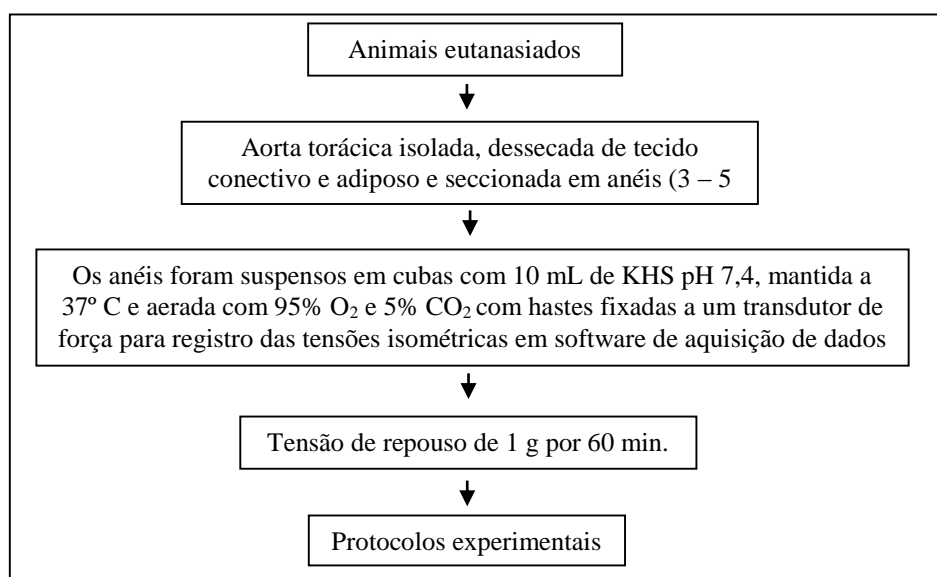
#### 4.3.6.1 Obtenção e preparo dos anéis de aorta de rato

Os ratos foram sacrificados por concussão cerebral seguida de secção dos vasos cervicais. Após uma incisão tóraco-abdominal seguindo a linha alba, a porção torácica proximal da aorta foi isolada, dessecada de tecidos adjacentes e seccionada em anéis

medindo entre 3 e 5 mm, que foram mantidos em cubas de 10 mL, contendo KHS, pH 7,4, a 37 °C aerados com uma mistura carbogênica de 95 % de O<sub>2</sub> e 5 % de CO<sub>2</sub> e montados em hastes de aço inoxidável inseridas no lúmen da artéria para produzir tensão, sendo uma das hastes fixada em um suporte e a haste maior conectada a um transdutor de força (Panlab TRI 210, Espanha), o qual foi conectado a um software de aquisição de dados para banho de órgãos (Protowin, V.1.1, Panlab, Espanha) para o registro das contrações isométricas, sob uma tensão inicial de 1g por um período de 60 minutos. Durante este tempo de equilíbrio, o meio nutritivo foi trocado a cada 15 minutos, para prevenir a interferência de metabólitos (ALTURA; ALTURA, 1970).

Para obtenção de anéis sem endotélio, foi feita a remoção da camada endotelial dos anéis por atrito mecânico entre as paredes internas do vaso com uma haste de platina envolvida por delgada camada de algodão (ALTURA; ALTURA, 1970).

**Quadro 5:** Representação esquemática da obtenção, preparo e montagem de anéis de aorta isolada de rato na realização dos protocolos experimentais “*in vitro*”.



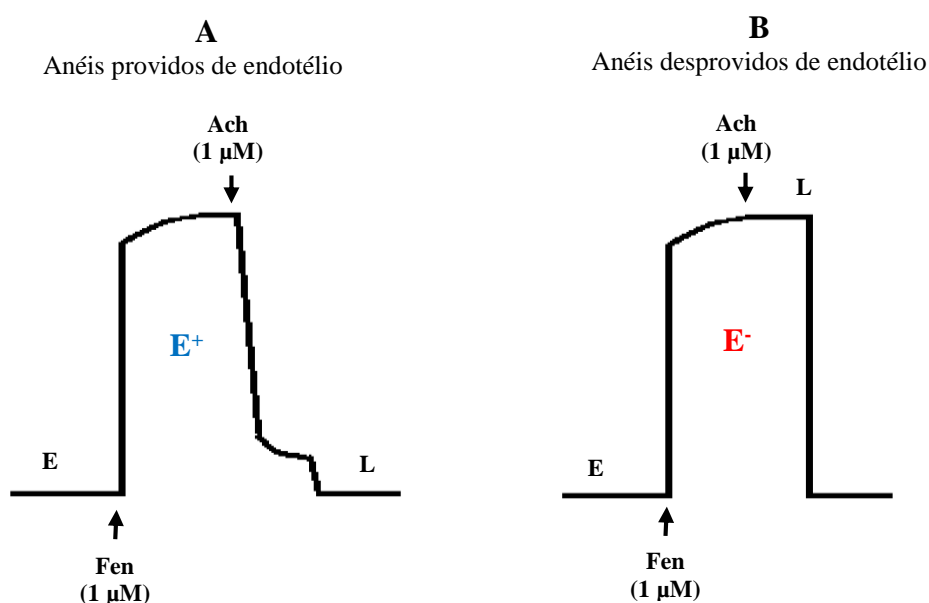
#### 4.3.6.2. Protocolos experimentais para os estudos *in vitro*

##### 4.3.6.2.1. Verificação da presença ou ausência do endotélio

A verificação da presença ou ausência de endotélio nos anéis foi feita através da adição de 1 μM de ACh sobre o platô da fase tônica sustentada da contração induzida por 1 μM de FEN (FURCHGOTT; ZAWADSKI, 1980), ficando estabelecido como anéis

dotados de endotélio funcional aqueles cujos percentuais de relaxamento induzidos pela ACh foram iguais ou superiores a 85% e desprovidos de endotélio, os anéis com relaxamentos induzidos pela ACh, sobre a contração tônica da FEN, menores que 5% (n= 8 anéis) (Figura 5A e 5B).

**Figura 5:** Esquema representativo do protocolo experimental para verificação da presença (a) ou ausência (b) do endotélio vascular em anéis de artéria aorta torácica de rato pré-contráídos com 1  $\mu\text{M}$  de FEN.



E = estabilização (60 min.) e L = lavagem com preparação de KHS.

#### 4.3.6.2.2. Curva concentração resposta para o EHAO em aorta

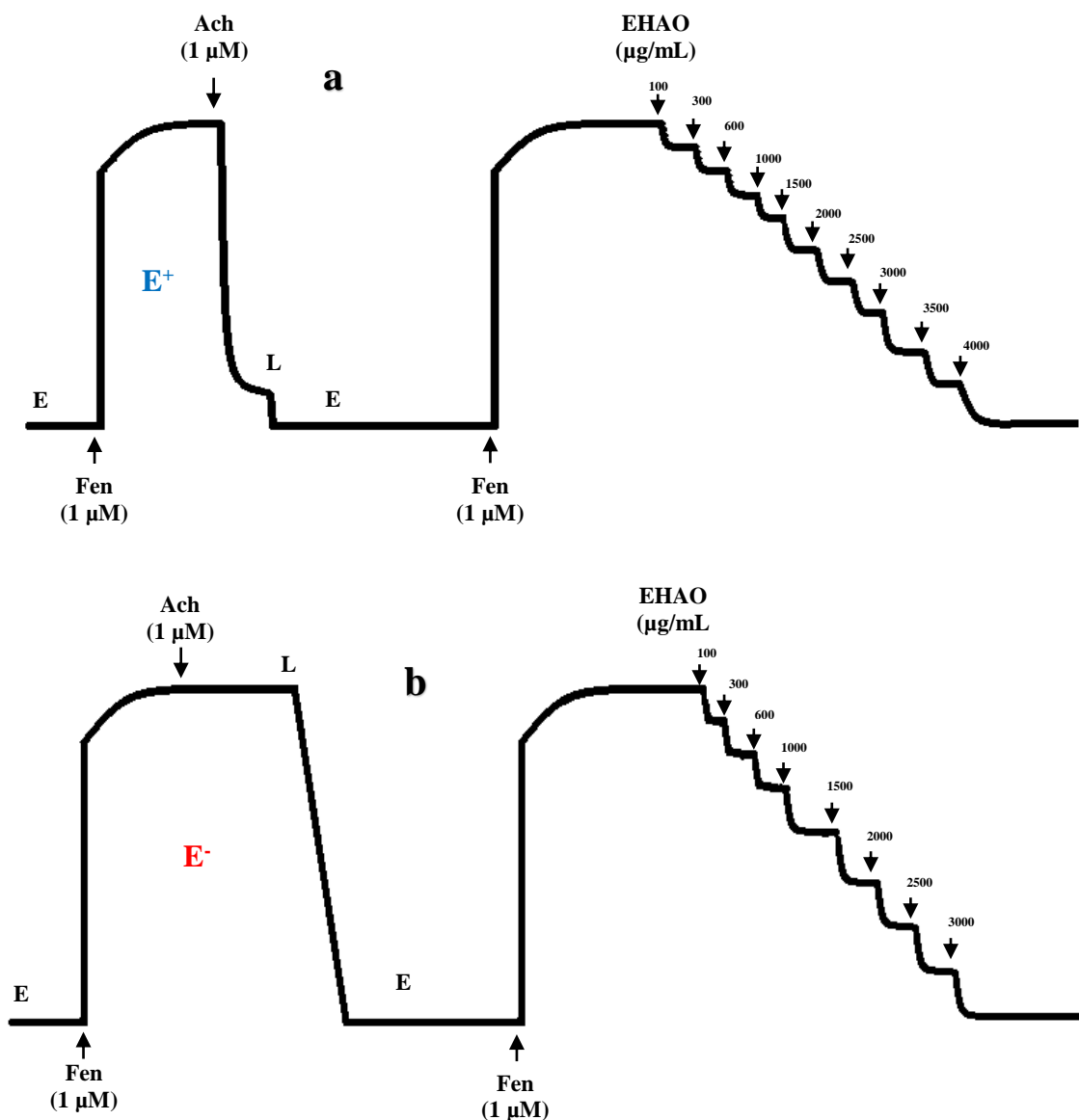
Concentrações crescentes do EHAO (100, 300, 600, 1000, 1500, 2000, 2500, 3000, 3500 e 4000  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) eram adicionadas nas cubas, contendo as preparações com anéis providos de endotélio e anéis desprovidos de endotélio em KHS, 5 a 10 minutos após a sustentação da fase tônica de uma segunda contração induzida por FEN (1  $\mu\text{M}$ ). A porcentagem de relaxamento foi determinada através da comparação dos valores da contração da FEN antes e após adição cumulativa do extrato. Os valores individuais de  $\text{EC}_{50}$  foram calculados (n= 8 anéis).

#### 4.3.6.2.3. Avaliação da influência do endotélio funcional no efeito relaxante do EHAO em artéria aorta

Para avaliar a participação do endotélio no efeito do EHAO, concentrações crescentes de EHAO (100, 300, 600, 1000, 1500, 2000, 2500, 3000, 3500 e 4000  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )

foram adicionadas cumulativamente nas cubas contendo os anéis aórticos, uns providos e outros desprovidos de endotélio funcional (Figura 6a e 6b, respectivamente), pré-contraindidos com FEN (1  $\mu$ M), para obtenção de curvas concentração–resposta. As respostas foram analisadas, sendo os valores de EC<sub>50</sub> das curvas individuais calculados e comparados estatisticamente (n= 8 anéis).

**Figura 6:** Esquema representativo do protocolo experimental para avaliação da influência do endotélio funcional no efeito relaxante do EHAO em anéis de artéria aorta torácica isolada de ratos normotensos, pré-contraindidos com 1  $\mu$ M de FEN.



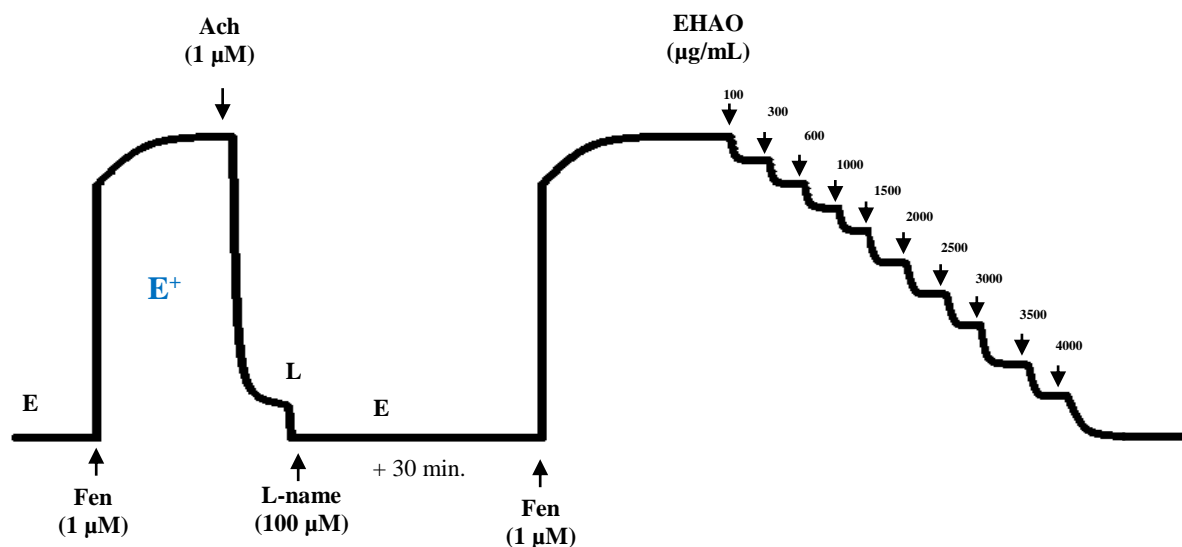
E = estabilização (60 min.) e L = lavagem com preparação de KHS. Endotélio presente (a) e endotélio ausente (b).



#### 4.3.6.2.4. Avaliação do efeito da inibição da síntese do NO (L-NAME) sobre a resposta relaxante induzida pelo EHAO em aorta torácica de rato

Para avaliar a participação do óxido nítrico no efeito do EHAO, após a verificação da presença do endotélio, era adicionado às cubas contendo anéis de aorta providos de endotélio, por 30 minutos, 100  $\mu\text{M}$  de L-NAME, um inibidor competitivo da sintase do NO (MONCADA; HIGGS, 1993; MONCADA et al., 1988; RAMOS et al., 2006). Na sequência obtinha-se uma nova contração induzida pela FEN (1  $\mu\text{M}$ ), na fase tônica da qual era adicionado concentrações crescentes e cumulativa do EHAO (100, 300, 600, 1000, 1500, 2000, 2500 e 3000  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) (Figura 7). As respostas induzidas pelo EHAO antes e após a incubação com L-NAME foram estimadas, sendo os valores individuais de  $\text{EC}_{50}$  calculados e comparados estatisticamente ( $n= 8$  anéis).

**Figura 7:** Esquema representativo do protocolo experimental para verificação do efeito da inibição da síntese do NO por L-NAME sobre a resposta relaxante induzida por concentrações crescentes e cumulativas do EHAO (100- 3000  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) em anéis de artéria aorta torácica de rato normotenso, pré-contraídos com 1  $\mu\text{M}$  de FEN.



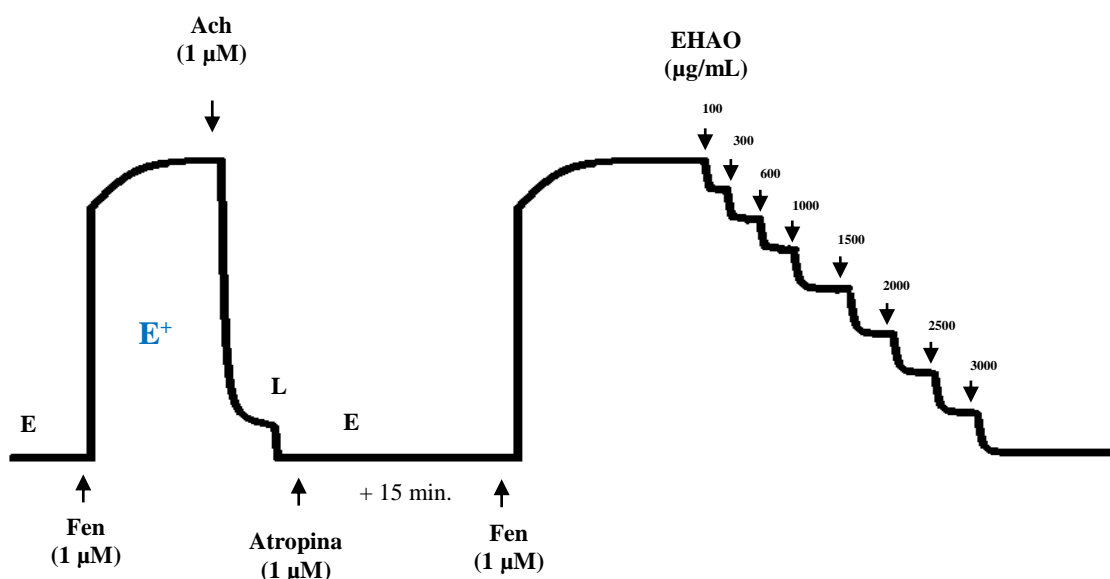
E = estabilização (60 min.) e L = lavagem com preparação de KHS.

#### 4.3.6.2.5. Avaliação do efeito do bloqueio muscarínico (atropina) sobre a resposta relaxante induzida pelo EHAO em artéria aorta de rato

Para avaliar a participação dos receptores muscarínicos no efeito do EHAO, atropina (1  $\mu\text{M}$ ), um antagonista de receptores muscarínicos não seletivo (MOREIRA, 2010) foi adicionada às cubas contendo anéis de artéria aorta isolada de rato normotenso providos de endotélio funcional, ficando incubada por 15 min. Na sequência era induzida uma nova contração pela FEN (1  $\mu\text{M}$ ), na fase tônica da qual era adicionado

concentrações crescentes e cumulativa do EHAO (100, 300, 600, 1000, 1500, 2000, 2500 e 3000  $\mu\text{g/mL}$ ) (Figura 8). As respostas induzidas pelo EHAO antes e após a incubação com atropina foram estimadas e os valores individuais de  $EC_{50}$  foram calculados e comparados estatisticamente ( $n=8$  anéis).

**Figura 8:** Esquema representativo do protocolo experimental para avaliação do efeito relaxante induzido por concentrações crescentes e cumulativas do EHAO (100- 3000  $\mu\text{g/mL}$ ) em anéis de artéria aorta torácica de rato normotenso, pré-contraídos com FEN (1  $\mu\text{M}$ ) após antagonismo muscarínico por Atropina.

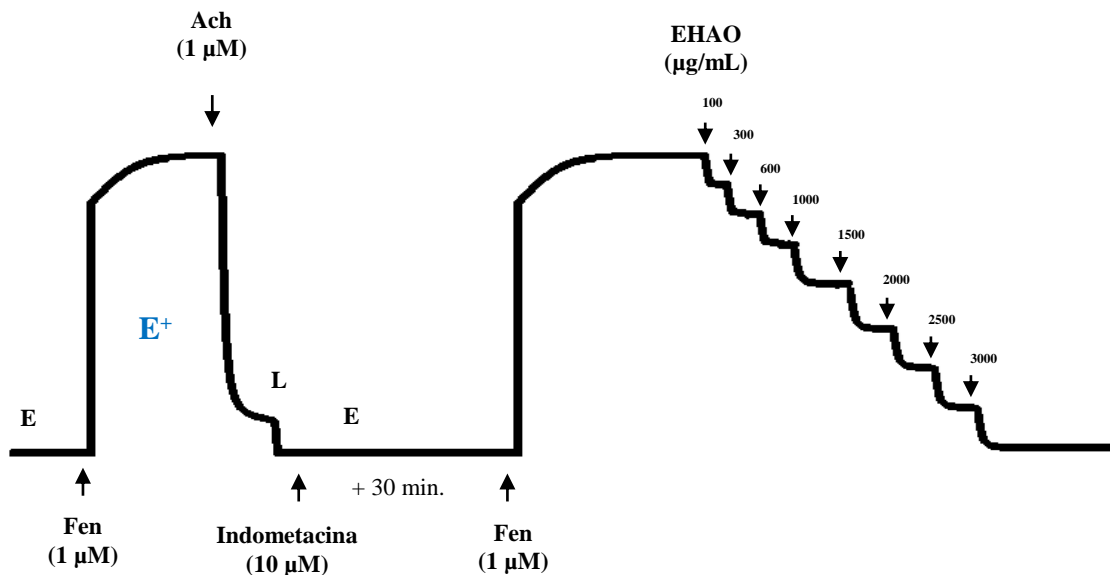


E = estabilização (60 min.) e L = lavagem com preparação de KHS.

#### 4.3.6.2.6. Avaliação do efeito da inibição da COX (indometacina) sobre a resposta relaxante induzida por EHAO em aorta de rato

Para verificar a possível influência de fatores relaxantes derivados da cascata do ácido araquidônico no efeito do EHAO, foi adicionado indometacina (10  $\mu\text{M}$ ), um inibidor não seletivo da enzima cicloxigenase (CLARK; FUCHS, 1997; BATLOUNI, 2001; LÓPEZ et al., 2001), por 30 minutos, nas cubas contendo anéis de artéria aorta isolada de rato normotenso, providos de endotélio. Na sequência obtinha-se uma nova contração induzida pela FEN (1  $\mu\text{M}$ ), na fase tônica da qual era acionado concentrações crescentes e cumulativa de EHAO (100, 300, 600, 1000, 1500, 2000, 2500, 3000, 3500 e 4000  $\mu\text{g/mL}$ ), (Figura 9). As respostas induzidas pelo EHAO antes e após a incubação com indometacina foram estimadas e os valores individuais de  $EC_{50}$  foram calculados e comparados estatisticamente ( $n=8$  anéis).

**Figura 9:** Esquema representativo do protocolo experimental para verificar a possível influência de fatores relaxantes derivados da cascata do ácido araquidônico no efeito do EHAO (100- 4000  $\mu\text{g/mL}$ ) em anéis de artéria aorta de rato com endotélio intacto, pré-contraindidos com FEN (1  $\mu\text{M}$ ).

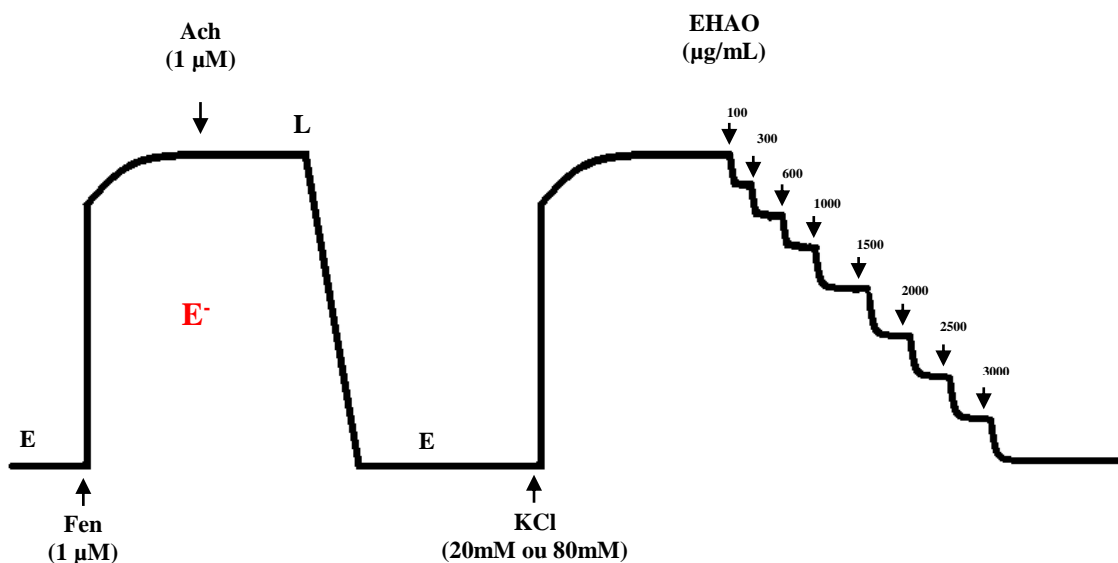


E = estabilização (60 min.) L = lavagem da preparação com KHS.

#### 4.3.6.2.7. Avaliação da atividade do EHAO sobre contrações induzidas por KCl em aorta de rato

Para verificar se ocorria uma possível participação de canais de  $\text{Ca}^{2+}$  operados por voltagem (VOCC's) e de canais de  $\text{K}^+$  no efeito do EHAO, após os procedimentos prévios relativos ao equilíbrio das preparações e verificação do endotélio vascular, em experimentos distintos, foram obtidas contrações induzidas por KCl nas concentrações 20mM e KCl 80mM, um agente ativador da contratilidade do músculo liso vascular (BATLOUNI, 2001), sobre o platô das quais foram feitas adições cumulativas do EHAO (100, 300, 600, 1000, 1500, 2000, 2500 e 3000  $\mu\text{g/mL}$ ) (Figura 10). As respostas do EHAO sobre as contrações induzidas por cada uma das concentração do agente KCl foram estimadas e os valores individuais de  $\text{EC}_{50}$  foram calculados e comparados estatisticamente (n= 8 anéis).

**Figura 10:** Esquema representativo do protocolo experimental para avaliar o efeito do EHAO (100- 4000  $\mu\text{g/mL}$ ) em anéis de aorta torácica isolados de rato, munido de endotélio, pré-contraídos com KCl 20mM e KCl 80mM.



E = estabilização (60 min.) L = lavagem da preparação com KHS.

#### 4.4. Análise Estatística

Os valores médios foram todos obtidos a partir de experimentos com um “n” igual a 8 e estão expressos graficamente como média  $\pm$  erro padrão da média (e.p.m.). As  $EC_{50}$  foram calculadas a partir de regressão não-linear. As comparações das médias foram feitas pelo Teste *t* de *Student* ou quando mais adequado, para as comparações múltiplas, foi usada a Análise de Variância (ANOVA). As análises e representações estatísticas foram realizadas por meio do GraphPad Prism 6.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, EUA).

## 5. RESULTADOS

### 5.1 TOXICIDADE

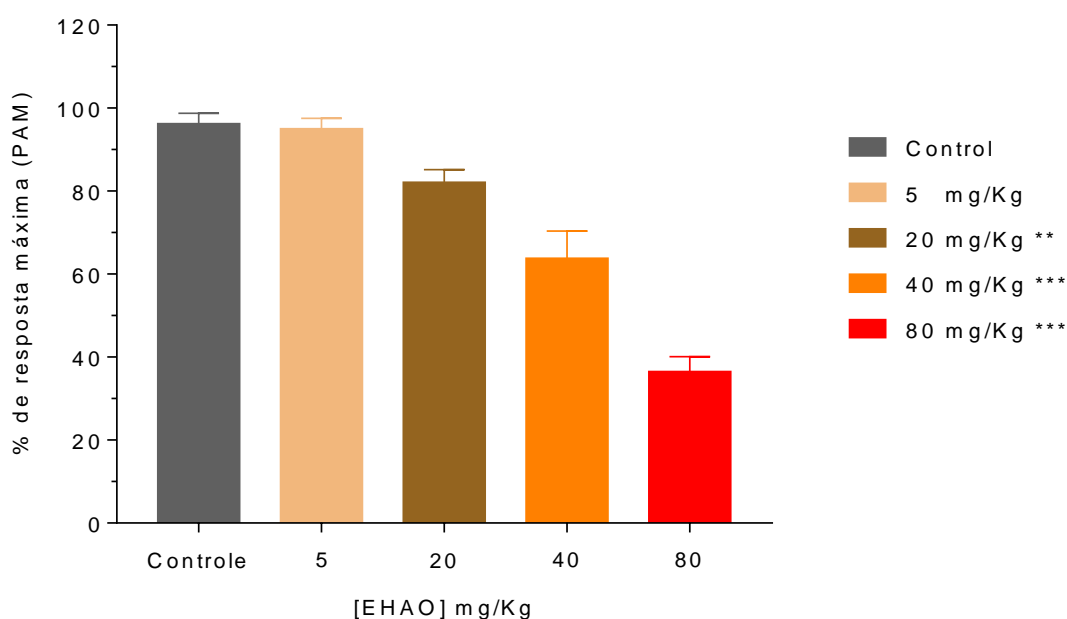
A administração aguda, por via oral, das concentrações de 2000 mg/kg e 5000 mg/kg do EHAO em grupos diferentes de ratos wistar machos, com nove semanas de idade e massa corporal de 270g, não ocasionou a morte de nenhum animal ( $n = 6$ ), não sendo possível, neste caso, determinar a  $DL_{50}$ . Pelo *screening* hipocrático (Apêndice I), durante os 14 seguintes à administração das concentrações do EHAO, definidas acima, não foram observadas qualquer alteração comportamental diferente ao grupo controle e que pudesse ser originada pelo EHAO. Os anéis continuaram reativos a um novo estímulo dado pela FEN após concluídas as abordagens experimentais.

### 5.2. ESTUDO *IN VIVO* DAS ATIVIDADES CARDIOVASCULARES DO EHAO EM RATOS NORMOTENSOS NÃO ANESTESIADOS

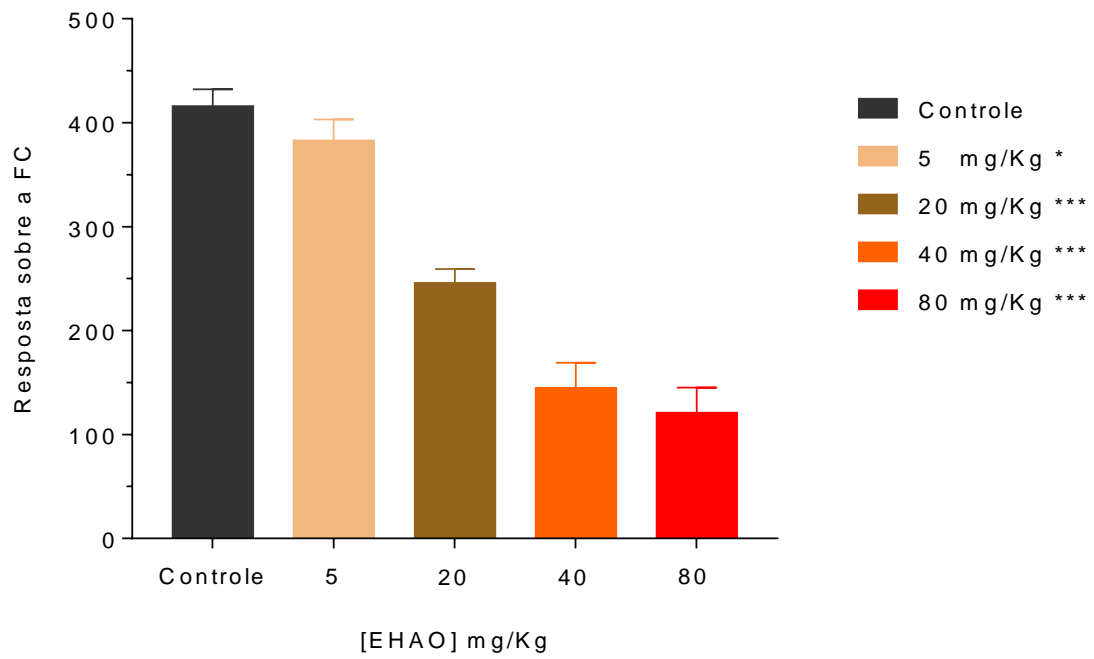
#### 5.2.1. Efeito do EHAO sobre a pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC) em ratos normotensos não-anestesiados

Doses do EHAO (20, 40 e 80 mg/kg, i.v.), induziram, de maneira dependente da dose, significativo ( $p < 0,01$ ) efeito hipotensor. Doses do EHAO (5, 20, 40 e 80 mg/kg, i.v.), induziram, de maneira dependente da dose, significativo ( $p < 0,01$ ) efeito bradicárdico. Os valores médios  $\pm$  e.p.m ( $n = 7$ ) das resposta para hipotensão e bradicardia foram: ( $95,03 \pm 0,94$ ;  $82,1 \pm 1,16$ ;  $63,8 \pm 2,49$ ;  $36,5 \pm 1,36$ ), ( $383 \pm 7,66$ ;  $246 \pm 4,97$ ;  $145 \pm 9,15$ ;  $121 \pm 9,17$ ), respectivamente, e estão representados nas Figuras 11 e 12, respectivamente.

**Figura 11:** Resposta de doses crescentes do EHAO (5, 20, 40 e 80 mg/Kg), administrado i.v, sobre a pressão arterial média (PAM) de ratos Wistar machos normotensos ( $n = 7$ ).



**Figura 12:** Resposta de doses crescentes do EHAO (5, 20, 40 e 80 mg/Kg), administrado i.v, sobre a frequência cardíaca (FC) de ratos Wistar machos normotensos (n= 7).

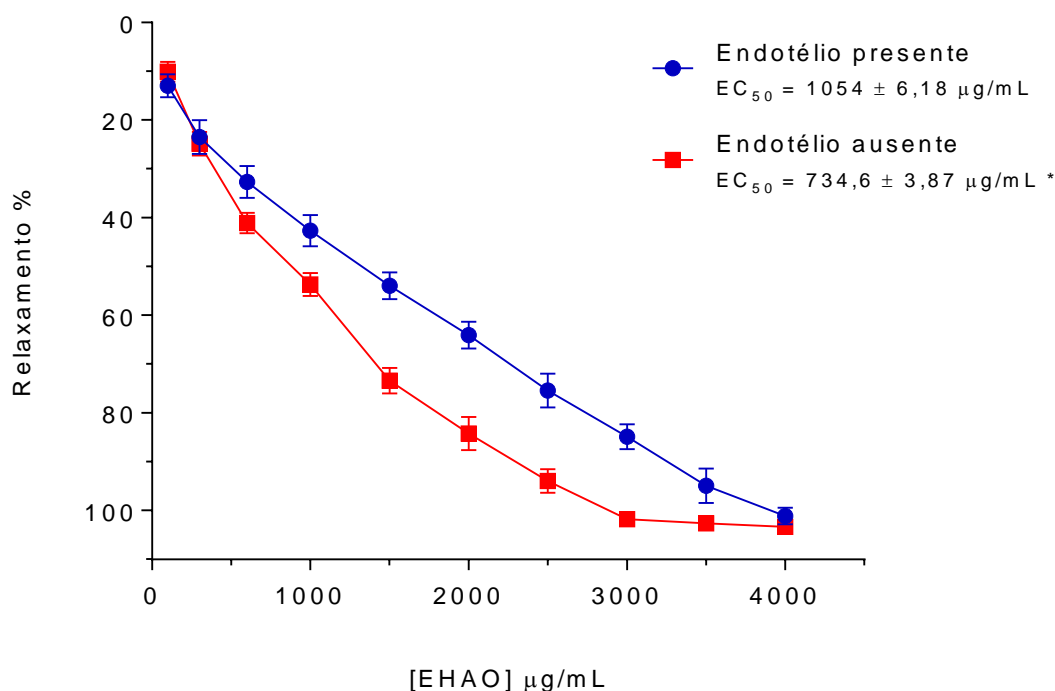


### 5.3 ESTUDO FARMACOLÓGICO *IN VITRO* EM ARTÉRIA AORTA ISOLADA DE RATO

#### 5.3.1 Efeito relaxante do EHAO sobre contrações induzidas por fenilefrina (1 $\mu$ M) em artéria aorta isolada de ratos normotensos com e sem endotélio

A adição de concentrações cumulativas crescentes do EHAO (100, 300, 600, 1000, 1500, 2000, 2500, 2500, 3000, 3500 e 4000  $\mu$ g/mL) induziram significativo ( $P < 0,05$ ) relaxamento concentração dependente em anéis de artéria aorta de ratos com e sem endotélio ( $E^+$  e  $E^-$ ), relaxando em 100% a contração pela FEN, com  $EC_{50} = 1054 \pm 6,18$   $\mu$ g/mL para os anéis com endotélio. E quando removido totalmente o endotélio ( $E^-$ ) o efeito relaxante do EHAO se pronunciou mais potente com  $EC_{50} = 734,6 \pm 3,87$   $\mu$ g/mL, (Figura 13).

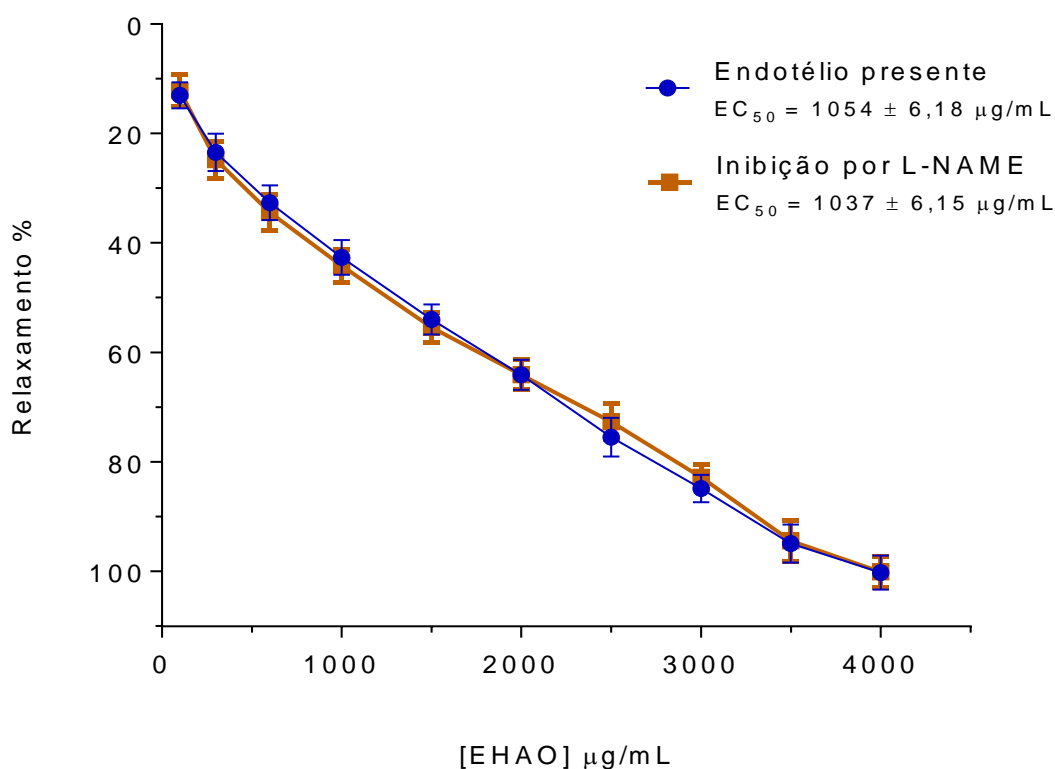
**Figura 13:** Curva concentração resposta para o EHAO (100, 300, 600, 1000, 1500, 2000, 2500, 3000, 3500 e 4000  $\mu$ g/mL) em anéis de artéria aorta torácica isolada de rato, com e sem endotélio funcional, pré-contraídos com FEN (1  $\mu$ M). Os valores estão expressos como média  $\pm$  e.p.m. ( $n = 8$ ) da porcentagem de relaxamento induzido pelo EHAO. \* $p < 0,05$   $E^-$  versus  $E^+$ .



### 5.3.2. Efeito do EHAO em artéria aorta isolada de ratos normotensos após a inibição da via de produção do óxido nítrico

A incubação de L-NAME (100  $\mu$ M), um inibidor competitivo não seletivo da síntese do óxido nítrico, por 30 minutos nos anéis de artéria aorta isolada de ratos normotensos, com endotélio intacto, pré-contraídos com FEN (1  $\mu$ M), não inibiu o relaxamento induzido por concentrações cumulativas crescentes do EHAO (100, 300, 600, 1000, 1500, 2000, 2500, 3000, 3500 e 4000  $\mu$ g/mL, n= 8), com  $EC_{50} = 1037 \pm 6,15$   $\mu$ g/mL), (Figura 14).

**Figura 14:** Influência da pré-incubação com L-NAME (100  $\mu$ M) sobre o efeito relaxante induzido por concentrações crescentes e cumulativas do EHAO (100, 300, 600, 1000, 1500, 2000, 2500, 3000, 3500 e 4000  $\mu$ g/mL) em anéis de artéria aorta isolada de rato normotensos, com endotélio intacto, pré-contraídos com FEN (1  $\mu$ M). Os valores estão expressos como média  $\pm$  e.p.m. (n= 8) da porcentagem de relaxamento induzido pelo EHAO.

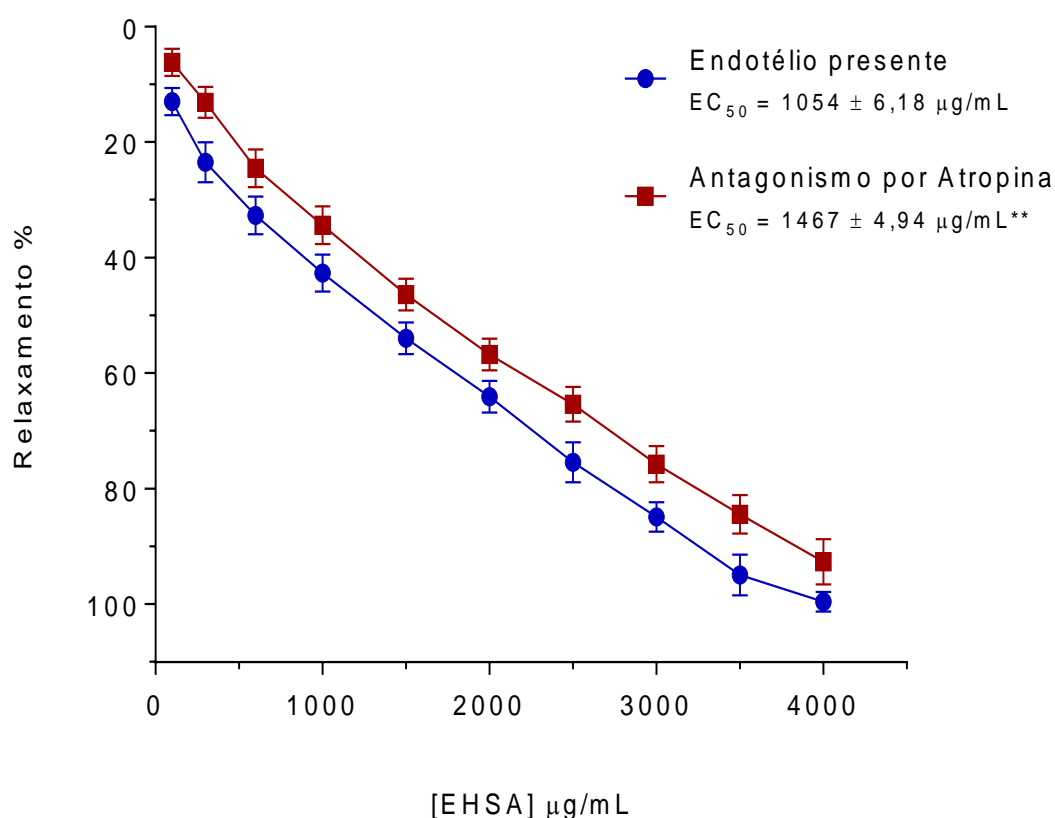




### 5.3.3. Efeito do EHAO frente ao antagonismo dos receptores muscarínicos pela Atropina em artéria aorta isolada de rato normotenso

O efeito relaxante induzido por concentrações crescentes e cumulativas do EHAO (100, 300, 600, 1000, 1500, 2000, 2500, 3000, 3500 e 4000  $\mu\text{g/mL}$ ,  $n = 8$ ) em anéis de artéria aorta torácica, isolada de rato normotenso, pré-contraídos com FEN (1  $\mu\text{M}$ ), foi inibido significativamente ( $p > 0,01$ ) após o antagonismo muscarínico com pré-incubação de (1  $\mu\text{M}$ ) de atropina, um antagonista de receptores muscarínico não seletivo, com  $\text{EC}_{50} = 1467 \pm 4,94 \mu\text{g/mL}$ ,  $E_{\text{max Rel.}} = 92,60\%$ , (Figura 15).

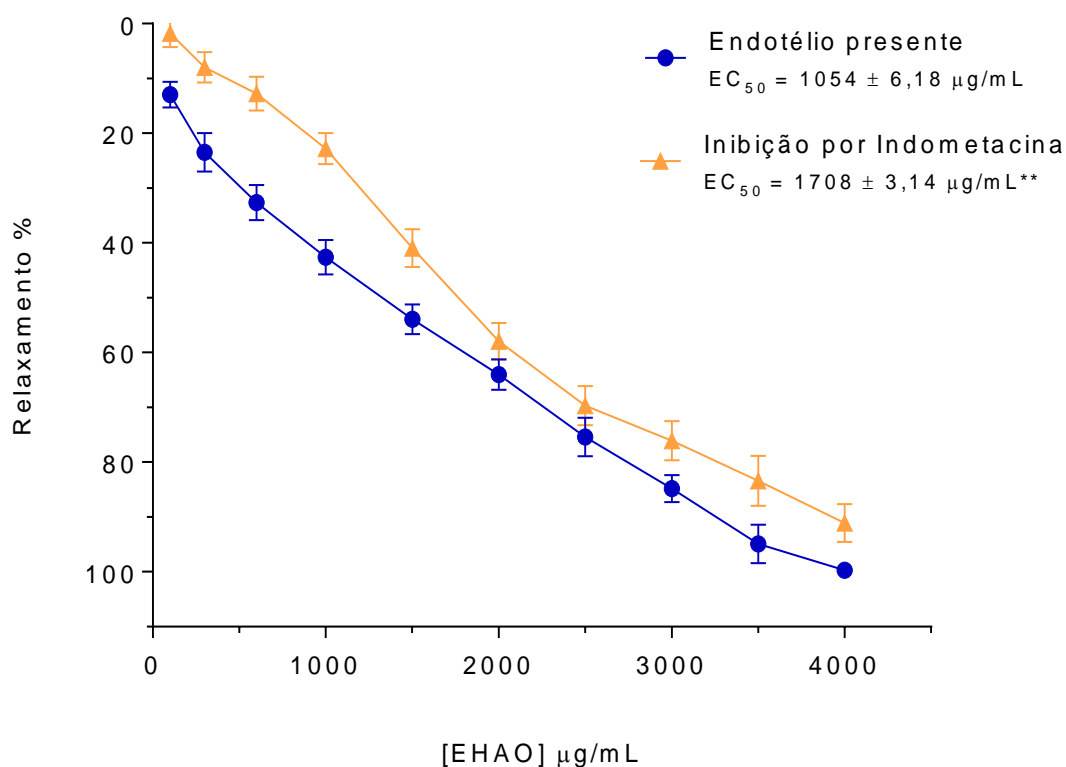
**Figura 15:** Influência da pré-incubação com atropina (1  $\mu\text{M}$ ) sobre o efeito relaxante induzido por concentrações crescentes e cumulativas do EHAO (100, 300, 600, 1000, 1500, 2000, 2500, 3000, 3500 e 4000  $\mu\text{g/mL}$ ) em anéis de artéria aorta isolada de rato, com endotélio intacto (controle  $E^+$ ), pré-contraídos com FEN (1  $\mu\text{M}$ ). Os pontos representam a média  $\pm$  e.p.m. ( $n = 8$ ).  $**p < 0,01$ , antagonismo com atropina *versus* controle  $E^+$ .



### 5.3.4. Efeito do EHAO em artéria aorta de rato normotenso após inibição da COX por Indometacina.

O efeito relaxante induzido por concentrações crescentes cumulativas do EHAO (100, 300, 600, 1000, 1500, 2000, 2500, 3000, 3500 e 4000  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ,  $n = 8$ ) em anéis de artéria aorta, com endotélio intacto, pré-contraídos com FEN (1  $\mu\text{M}$ ) foi inibido significativamente ( $p > 0,01$ ) após pré-incubação de 10 $\mu\text{M}$  de indometacina, um inibidor não seletivo da cicloxigenase (COX), onde o efeito relaxante foi reduzido quando comparado antes da inibição da via de produção das prostacilinas, com  $\text{EC}_{50} = 1708 \pm 3,14$   $\mu\text{g}/\text{mL}$ ,  $E_{\text{max Rel.}} = 91,08\%$ , (Figura 16).

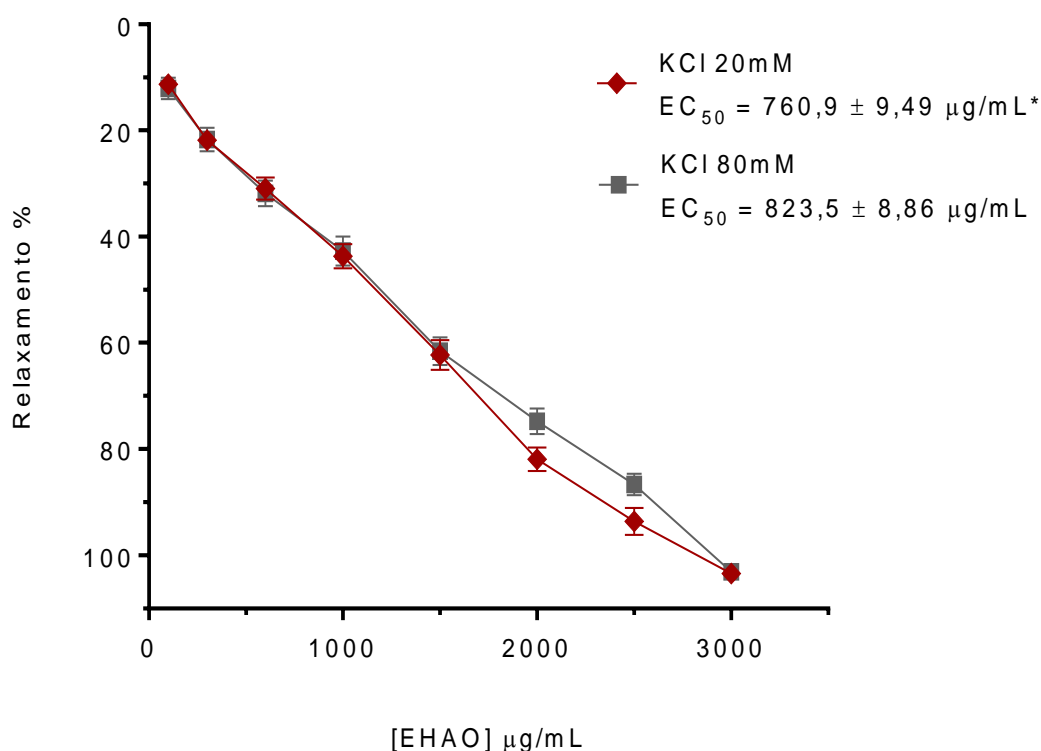
**Figura 16:** Curva concentração resposta do EHAO (100, 300, 600, 1000, 1500, 2000, 2500, 3000, 3500 e 4000  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) em anéis de artéria aorta isolada de rato normotenso, com endotélio intacto, pré-contraídos com FEN (1  $\mu\text{M}$ ), antes e após inibição da cicloxigena (COX) com incubação de Indometacina (10  $\mu\text{M}$ ). Os pontos representam a média  $\pm$  e.p.m. ( $n = 8$ ). \*\* $p < 0,01$  inibição com indometacina *versus* controle ( $E^+$ ).



### 5.3.5 Efeito relaxante do EHAO em artéria aorta de rato sobre contrações induzidas por KCl

O EHAO promoveu relaxamento de forma concentrações dependente (100, 300, 600, 1000, 1500, 2000, 2500, 3000  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) em anéis de artéria aorta isolada de rato normotenso, desprovidos de endotélio, pré-contraídos com solução despolarizante KCl 20mM ou KCl 80mM. Os valores das  $\text{EC}_{50}$  observadas nas preparações com KCl 20mM e KCl 80mM foram  $(760,9 \pm 9,49 \mu\text{g}/\text{mL}$  e  $823,5 \pm 8,86 \mu\text{g}/\text{mL}$ , respectivamente), significativamente ( $p < 0,05$ ) diferentes entre si (Figura 17).

**Figura 17:** Curva concentração resposta do EHAO (100- 3000  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) em anéis de artéria aorta isolada de rato normotenso, sem endotélio, pré-contraídos com KCl 20mM ou KCl 80mM. Os pontos representam a média  $\pm$  e.p.m. ( $n = 8$ ). \* $p < 0,05$  KCl 20mM *versos* KCl 80mM.



## 6. DISCUSSÃO

A não existência de mortes entre os grupos de animais e a falta de alterações observadas pela aplicação do screening hipocrático (Apêndice I), indicou a inexistência de efeitos letais ou mesmo alterações comportamentais induzidas pelo EHAO. Isso propiciou uma boa margem de segurança ao uso das concentrações usadas nos experimentos. A reatividade dos anéis ao estímulo dado pela FEN após concluídas cada abordagem experimental confirma o baixíssimo grau de toxicidade do extrato.

A partir das investigações *in vivo* em ratos normotensos não-anestesiados verificou-se importante efeito bradicárdico e hipotensor frente a administração do EHAO.

É bem descrito na literatura que a regulação autonômica primária da função do nodo sinoatrial é por ação vagal via estimulação de receptores muscarínicos cardíacos (RESTREPO, 2007; KARAKIULAKIS; ROTH, 2012). A estimulação destes receptores induz intensa bradicardia seguida por uma hipotensão devida à diminuição do débito cardíaco. Estes receptores são predominantemente do subtipo M<sub>2</sub> e estão acoplados à proteína G inibitória (G<sub>i</sub>), quando estimulados inibem a atividade da adenil ciclase, diminuem a concentração de AMPc, diminuem a concentração de Ca<sup>2+</sup>, por diminuição da atividade dos canais de Ca<sup>2+</sup> dependentes da voltagem e aumentam a concentração de K<sup>+</sup>, via canais dependentes de receptores, reduzindo assim a atividade cardíaca com consequente hipotensão (CAULFIELD, 1993; VENTURA et al, 2010; COHEN et al., 2016).

As células musculares lisas cardíacas também apresentam receptores chamados receptores β adrenérgicos (BORTOLOTTI; CONSOLIM-COLOMBO, 2009), atuando em várias funções, entre elas modulação da liberação de hormônios, controle metabólico e regulação cardiovascular (CONSOLIM-COLOMBO et al., 2005; HELFAND et al., 2009). Estes receptores se subdividem em subtipos β<sub>1</sub>, β<sub>2</sub> e β<sub>3</sub> (FORD, 1994; WAGNER, 2009). Todos os três estão ligados às proteínas G (CONSOLIM-COLOMBO, 2009). No entanto, o efeito final da ativação do receptor depende da sua localização no órgão-alvo, o receptor β<sub>1</sub> é o receptor específico que medeia o aumento do débito cardíaco, por aumentar a frequência cardíaca e o volume ejetado em cada batimento (aumento da fração de ejeção) e, por estimular a liberação de renina nas células justaglomerulares, elevando assim a pressão arterial (GARRETT; KAPLAN, 1980; WEIR, 2009).

Tomando-se por base as informações da literatura, reportadas acima, pode-se hipotetizar que o efeito bradicárdico apresentado frente a administração do EHAO

(Figura 12) tenha ocorrido por ativação dos receptores muscarínicos do subtipo  $M_2$  ou por antagonismo dos receptores adrenérgicos  $\beta_1$ .

Informação pacífica na literatura é a de que o receptor muscarínico endotelial subtipo  $M_3$  também exercem importante papel na homeostasia da pressão arterial (LEVEY et al., 1994; WOTTA et al., 1998). Este receptor, que também está ligado à proteína G, quando estimulado induz a ativação de importante cascata de eventos que resultará, conseqüentemente, no efeito hipotensor, a partir da liberação de vários fatores relaxantes derivados do endotélio - FRDEs (XIE et al., 2004; VENTURA et al., 2009). Assim, da mesma forma, é possível supor que o efeito hipotensor apresentado frente a administração do EHAO (Figura 11) tenha sido em decorrência de antagonismo aos receptores muscarínicos endoteliais  $M_3$ .

Preferiu-se avaliar efeitos sobre os parâmetros cardiovasculares em experimentos usando animais não-anestesiados para minimizar as influências da anestesia e do estresse (AMAR et al., 2002; AMAR, 2007). A anestesia e o estresse cirúrgico são capazes de promover alterações nos parâmetros cardiovasculares, pois muitas das complicações que ocorrem nesse período podem funcionar como gatilho para agitações do ritmo cardíaco, causando por exemplo taquicardia, com conseqüente alteração da pressão arterial. (ATLEE, 1997; FISHER, 1997; AMAR, 2007; LORENTZ; VIANNA, 2011). A anestesia altera os valores de PA e FC por modificar o funcionamento dos principais sistemas básicos de regulação da pressão arterial tais como o sistema renina-angiotensina, o sistema nervoso simpático e o barorreflexo, e ainda pode ser responsável pela produção excessiva de espécies reativas de oxigênio, um mecanismo patogênico decorrente do trauma cirúrgico (WEIGAND et al., 2004; FINK, 2005), causa depressão de sinapses do sistema nervoso central e compromete a responsividade autonômica (SANTAMBROGIOA; BRASCHIB, 2007; BARNES; HOLLANDS, 2010).

A pesquisa se desenvolveu principalmente a partir do estudo da reatividade vascular em experimentos *in vitro*. Foram, inicialmente, obtidas curvas de relaxamento em anéis de artéria aorta, isolada de rato normotenso, na presença e na ausência de endotélio funcional, pré-contraídos com 1  $\mu$ M de Fenilefrina, de forma dependente por EHAO (Figura 13). A fenilefrina promove vasoconstrição na musculatura lisa vascular a partir da estimulando dos receptores  $\alpha_1$ -adrenérgicos acoplados à proteína G, ativando a fosfolipase C, o que estimula a síntese com conseqüente aumento do inositol trifosfato (IP<sub>3</sub>) e diacilglicerol (DAG) liberando os estoques intracelular de  $Ca^{2+}$  e ainda

pelo influxo via canal para cálcio operados por receptor (ROCC's) (BONAVENTURA et al, 2004).

Os resultados obtidos neste estudo são compatíveis com dados da literatura, que reportam efeito vasorelaxante induzido por extratos de *A. oleracea*, coletada na Tailândia, em anéis de artéria aorta de rato (WONGSAWATKUL et al., 2008), onde se avaliou o efeito pronunciado em anéis de aorta de rato, com e sem endotélio funcional, na presença e na ausência de inibidores. Wongsawatkul e colaboradores, no mesmo estudo, ainda demonstraram que o efeito vasorelaxante dos extratos etanólico, hexânico, clorofórmico e de acetato de etila obtidos de *A. oleracea* em artéria aorta de rato era abolido totalmente quando se retirava a camada endotelial, e que foi significativamente diminuído quando se incubava L-name e Indometacina.

Ainda que com menor expressão houve relaxamento em anéis com endotélio, demonstrando que não se pode descartar a participação de alguns fatores derivados do endotélio.

Sabe-se que o endotélio exerce importante atividade na regulação do tônus vascular. O endotélio produz uma variedade de substâncias que desempenham papéis importantes que promovem a regulação do tônus vascular. Entre essas substâncias, fatores vasodilatadores, como o óxido nítrico (NO), a prostaciclina (PGI<sub>2</sub>) e o fator hiperpolarizador derivado do endotélio (EDHF), ou fatores vasoconstritores, como tromboxano (TXA<sub>2</sub>) e endotelina-1 (ET-1), têm papéis críticos no controle da homeostase da parede dos vasos sanguíneos (SANDOO et al., 2010). Principalmente, o óxido nítrico (NO) e metabólitos do ácido araquidônico via COX, dentre estes as prostaciclina (BAHIA et al., 2006). Já é pacífico na literatura que, mesmo não existindo inervação colinérgica em muitos vasos sanguíneos a estimulação de receptores muscarínicos presentes nas células endoteliais, mais especificamente os receptores do subtipo M<sub>3</sub>, induz a liberação de fatores relaxantes derivados do endotélio (FRDEs), promovendo um intenso efeito vasorelaxante (BATLOUNI, 2001).

Para investigar a participação do endotélio na resposta vasorelaxante induzida pelo EHAO, foram realizados experimentos na ausência de endotélio funcional. Em tal condição a resposta vasorelaxante induzida por EHAO foi afetada no sentido de que, após a remoção do endotélio o efeito do EHAO se pronunciou mais potente empurrando a curva para esquerda, o que pode ser verificado a partir da diminuição significativa da EC<sub>50</sub> (Figura 13) Os resultados sugerem que a camada endotelial, por mecanismos ainda não identificados, inibe a atividade hipotensora induzida por EHAO em anéis de aorta

isolada de rato normotenso.

Ainda assim, vislumbrando a possibilidade do endotélio ter influências positivas ou negativas no vasorelaxamento observado se faz necessário investigar alguns fatores de relaxamento derivados do endotélio (*via* do NO, das prostaciclínas e a *via* dos receptores muscarínicos endoteliais), cujos os efeitos e mecanismos de ação já são bastante esclarecidos.

Está estabelecido na literatura científica que a liberação de óxido nítrico (NO) pelas células endoteliais leva ao relaxamento da musculatura lisa vascular (SÁ et al., 2015). Muitas substâncias exercem sua atividade vasorelaxante a partir da estimulação da via do NO. A inibição da síntese do NO por L-NAME suprimiu parcialmente o vasorelaxamento induzido por extratos de *A. oleracea* em aorta de rato normotenso (WONGSAWATKUL et al., 2008). A incubação de L-NAME, um inibir da síntese do NO, reverteu o relaxamento induzido por extrato de *Combretum leprosum* em anéis de aorta de rato e coelho (ALVES FILHO et al., 2015).

Sob a suspeita de que o NO poderia estar mediando o efeito relaxante induzido por EHAO nas preparações com endotélio presente, optou-se em realizar abordagem experimento onde se bloqueou a isoenzima óxido nítrico sintase (NOs) por L-NAME, um inibidor não seletivo da sintase do NO (MONCADA e HIGGS, 1993). Comparando os resultados, verifica-se que após a incubação prévia da preparação com L-NAME não ocorreu inibição do efeito relaxante (Figura 14), sugerindo que o NO não participa na resposta vasorelaxamento induzida pelo EHAO.

Os receptores muscarínicos são amplamente distribuídos pelos diferentes sistemas biológicos e suas funções são extremamente diversificadas, já se sabe atualmente que existem 5 subtipos de receptor muscarínico (VENTURA et al., 2010). Ao serem ativados no sistema nervoso periférico exercem funções como redução da frequência cardíaca, contração da musculatura cardíaca, constrição de vias respiratórias e relaxamento de vasos sanguíneos periféricos (TAYLOR; BROWN, 1994). Estudos usando antagonistas seletivos de receptores muscarínicos mostrou que o receptor específico que medeia o efeito de relaxamento de vasos sanguíneos é o sub-tipo M<sub>3</sub> (CAULFIELD, 1993). O M<sub>3</sub> é um receptor de membrana acoplado à proteína G e quando ativado por seus agonistas induz a liberação de fatores relaxantes derivados do endotélio (FRDEs) (SANDIFORD; SLEPAK, 2009).

Existem evidências que muitas substâncias derivadas de plantas medicinais atuam como agonistas dos receptores muscarínicos. O alcalóide arecolina isolado da planta

*Areca catechu* (noz de areca) atua como agonista parcial dos receptores M<sub>1</sub>, M<sub>2</sub>, M<sub>3</sub> e M<sub>4</sub> (YANG et al., 2000; BARTOLINI et al., 2001; XIE et al., 2004). A pilocarpina, extraído das folhas de *Pilocarpus microphyllus* (jaborandi), é um alcalóide parassimpaticomimético, muito utilizado como ferramenta para induzir convulsões em roedores para o estudo da epilepsia, pois atua como agonista muscarínicos (YI et al., 2015). Os extratos de *Achillea millefolium* possuem efeitos procinéticos no abomaso bovino através dos receptores muscarínicos M<sub>3</sub> (MOHSENI et al., 2017).

Para investigar a possível participação dos receptores muscarínicos no efeito relaxante do EHAO em aorta de rato, foram realizados experimentos com anéis de aorta torácica pré-incubados com Atropina (1 µM), um antagonista não seletivo dos receptores muscarínicos (SAWAYER, 1999). Sob essa condição a resposta vasorelaxante induzida pelo EHAO foi atenuada parcialmente e de forma significativa (Figura 15), sugerindo que o efeito relaxante induzido por EHAO, em anéis de artéria aorta de rato normotenso, envolve, em parte, a estimulação dos receptores muscarínicos endoteliais.

Um estudo para determinar os mecanismos envolvidos no efeito relaxante da adrenomedulina (AM) no músculo liso cavernoso de ratos demonstrou o envolvimento de prostanoídes vasodilatadores no efeito relaxante da AM (LEITE et al., 2014). A inibição da cicloxigenase (COX) e da proteína quinase A (PKA) reduziu o relaxamento induzido por Adrenomedulina (AM) em artéria carótida de rato, indicando a participação das prostaciclina no efeito vasorelaxante induzido por AM (PASSAGLIA et al., 2014). O relaxamento induzido pelo fármaco rosiglitazona em artéria pulmonar humana foi atenuado após inibição da cicloxigenase por indometacina, demonstrando o envolvimento das prostaciclina no relaxamento arterial produzido por rosiglitazona (KOZLOWSKA et al., 2013).

O efeito vasorelaxante em aorta torácica de rato causado pela fração butanólica do extrato etanólico de *Gynura procumbens* foi significativamente atenuado com a pré-incubação de inibidor da prostaciclina (indometacina), sugerindo que o efeito vasodilatador de *G. procumbens* pode ser devido à estimulação da produção de prostaciclina (HIEN-KUN et al., 2013).

Para investigar a participação da prostaciclina (PGI<sub>2</sub>) no efeito vasorelaxante do EHAO em aorta de rato, foram realizados experimentos com anéis de aorta, munidos de endotélio funcional, pré-incubados com Indometacina (10 µM), um inibidor não seletivo da cicloxigenase (COX). Sob essa condição a resposta vasorelaxante induzida pelo EHAO foi atenuada parcialmente e de forma significativa (Figura 16), sugerindo que o



efeito relaxante induzido por EHAO, em anéis de artéria aorta de rato normotenso, munidos de endotélio, envolve, em parte, a síntese de prostaciclina (PGI<sub>2</sub>). Esses resultados corroboram com achados anteriores que demonstram inibição parcial do efeito relaxante induzido por extratos de *A. oleracea* em anéis de artéria aorta de rato, munidos de endotélio, após inibição da cicloxigenase (COX) por indometacina (WONGSAWATKUL et al., 2008).

Existem evidências que muitas substâncias derivadas de plantas medicinais alteram o metabolismo do Ca<sup>2+</sup> nas células. Apigenina, flavonoide isolado de *Apium graveolens* relaxa a aorta torácica de ratos principalmente por supressão do influxo de Ca<sup>2+</sup> a partir do bloqueio dos canais de cálcio operados por voltagem (VOCC's) e canais de cálcio operados por receptor (ROCC's) (KO et al., 1991). O efeito vasorelaxante do extrato de *Viscum álbium* foi mediado por uma inibição do influxo de Ca<sup>2+</sup>, bem como pela inibição da mobilização de Ca<sup>2+</sup> dos estoques intracelulares (MOJIMINIYI et al., 2008). Óleo essencial de *Cymbopogon citratus* induziu relaxamento em anéis de artéria aorta isolada de rato por inibição do influxo de Ca<sup>2+</sup> a partir do bloqueio de canais de cálcio operados por voltagem (VOCC's) (MOREIRA et al., 2010). Extrato hidroalcoólico de *Allium cepa* (cebola) induziu relaxamento em anéis aórticos de rato normotenso, pré-contráídos por KCl 80mM, a partir da inibição do influxo de cálcio (NASERI et al., 2008).

É bastante relatado na literatura que o KCl produz contração no músculo liso vascular por despolarização da membrana, causando influxo de Ca<sup>2+</sup> por ativação de VOCC's e subsequente liberação de Ca<sup>+</sup> das reservas intracelulares, mais notavelmente do retículo sarcoplasmático (BRAUNSTEIN et al., 2009; FELLNER; ARENDSHORST, 2010). Enquanto que a vasoconstrição induzida por FEN na musculatura lisa vascular é devida a estímulo dos receptores  $\alpha$ 1-adrenérgicos acoplados à proteína G, ativando a fosfolipase C, o que estimula a síntese com conseqüente aumento do IP3 e DAG liberando os estoques intracelular de Ca<sup>2+</sup> e ainda pelo influxo via canal para cálcio operados por receptor (ROCC's) (BONAVENTURA et al, 2004).

A condutância do potássio rege o potencial da membrana em repouso em células excitáveis e não excitáveis (URREGO et al., 2014). Uma condição para que ocorra o efluxo de K<sup>+</sup> da célula com conseqüente relaxamento da musculatura lisa vascular é a hiperpolarização causada por agentes que abrem os canais de K<sup>+</sup>, (KIRIL et al., 2017). A elevação extracelular moderada (< 40 mM) dos níveis de K<sup>+</sup> impede parcialmente o efluxo do K<sup>+</sup> promovendo a hiperpolarização da membrana celular resultando em conseqüente vasoconstrição (DALAKLIOGLU; OZBEY, 2014).

Drogas que abrem canais de potássio promovendo dilatação da musculatura lisa vascular são efetivas na inibição da contração produzida por moderada elevação dos níveis de  $K^+$  extracelular, pois alterações desse tipo no equilíbrio eletrolítico abrem vários tipos de canais iônicos, porém principalmente canais de potássio (KUANG et al., 2015). Contudo, essas mesmas drogas podem não ser efetivas diante de uma elevação muito alta nos níveis de  $K^+$  ( $> 60$  mM), em decorrência de que nessas condições a literatura informa que se abrem majoritariamente canais de cálcio (OLIVEIRA et al., 2006; KUANG et al., 2015). Tais propriedades permitem estabelecer distinção entre os abridores de canais de  $K^+$  e os bloqueadores de canais  $Ca^{2+}$ , que demonstram comportamento diferenciado nestas circunstâncias (LASKOWSKI, 2017).

Sob a hipótese de que o efeito vasorelaxante do EHAO pudesse estar sendo devido a uma atividade bloqueadora sobre os canais de  $Ca^{2+}$  (VOCCs) ou por abertura de canais de  $K^+$ , foram realizados experimentos usando-se o KCl como agente contractante, nas concentrações 20mM e 80mM. Neste estudo, contrações por KCl nas concentrações 20mM e 80mM, demonstraram que o EHAO induz significativa inibição das contrações induzidas pelo agente contractante, relaxando totalmente as contrações promovidas pelas diferentes concentrações de KCl (Figura 17). O vasorelaxamento das contrações dadas pelo KCl80 e o relaxamento ainda maior sobre as contrações do KCl20, evidenciam que parte do efeito relaxante do EHAO neste estudo parece devido sua atividade também sobre canais de  $K^+$ , promovendo abertura desse tipo de canal, com conseqüente efluxo celular de  $K^+$ , assim como por atuar sobre canais de  $Ca^{2+}$ , promovendo bloqueio a VOCCs impedindo o influxo de  $Ca^{2+}$ . Ambos mecanismos contribuem para hiperpolarização, um dos fatores do vasorelaxamento.

## 7. CONCLUSÃO

Neste estudo, de acordo com as dosagens, concentrações e parâmetros avaliados

- 1) O EHAO não apresenta efeitos tóxicos em ratos Wistar machos.
- 2) EHAO induz efeito hipotensor e bradicárdico em ratos normotensos não-anestesiados.
- 3) O EHAO induziu relaxamento em artéria aorta torácica de rato normotenso.
- 4) O vasorelaxamento induzido pelo EHAO envolve a via de produção das prostaciclina e a participação dos receptores muscarínicos.
- 5) O EHAO induz vasorelaxamento por atuar também na abertura de canais de  $K^+$ , e ainda por bloqueio a VOCCs.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADARAMOYE, O.A; ANJOS, R.M; ALMEIDA, M.M; VERAS, R.C; SILVIA, D.F; OLIVEIRA, F.A et al. Hypotensive and endothelium-independent vasorelaxant effects of methanolic extract from *Curcuma longa* L. in rats. **J ethnopharmacol**, v. 124, n. 3, p. 457-462, 2009.

ALONSO-CARBAJO, L; KECSKES, M; JACOBS, G; PIRONET, A; SYAM, N; VENNEKENS, R. Muscling in on TRP channels in vascular smooth muscle cells and cardiomyocytes. **Cell Calcium**. v.66, p.48-61, 2017.

ALTURA, B. M., ALTURA, B. T. Calcium content and force of drug-induced contractions of arterial muscle during recovery in vitro. **Proc Soc Exp Biol Med**, v. 135, n. 3, p. 739-744, 1970.

ALVES FILHO, F.C; CAVALCANTI, P.M; PASSAGLIA, R.C; BALLEJO, G. Long-lasting endothelium-dependent relaxation of isolated arteries caused by an extract from the bark of *Combretum leprosum*. **Einstein**. v.13, p.395-403, 2015.

AMAR, D. Postthoracotomy atrial fibrillation. **Curr Opin Anaesthesiol**. v.20, n. 1, p. 43-47, 2007.

AMAR, D; ZHANG, H; ROISTACHER, N. The incidence and outcome of ventricular arrhythmias after noncardiac thoracic surgery. **Anesth Analg**. v. 95, n.3, p. 537-543, 2002.

ANDRADE, S. S. A; STOPA, S. R; BRITO, A. S; CHUERI, P. S; SZWARCOWALD, C. L; MALTA, D. C. Prevalência de hipertensão arterial autorreferida na população brasileira: análise da Pesquisa Nacional de Saúde. **Epidemiol Serv Saúde**. v. 24, n. 2, p. 297-304, 2015.

ANDRADE, S.S.A., STOPA, R., BRITO, A.S., CHUERI, P.S., SZWARCOWALD, C.L., MALTA, D.C., Prevalência de hipertensão arterial autorreferida na população brasileira: análise da Pesquisa Nacional de Saúde. **Epidemiol. Serv. Saúde**. v.24, n.2 , p.297-304, 2015.

ANSARI, A.H.; MUKHARYA, D.K.; SAXENA, V.K. Analgesic study of N-isobutyl-4,5-decadienamide isolated from the flowers of *Spilanthes acmella* (Murr). **Indian J Pharm Sci**, v. 50, n. 2, p. 106, 1988.

ATLEE, J. L. Perioperative cardiac dysrhythmias: Diagnosis and management. **Anesthesiology**. v.86, p.1397-1424, 1997.

BAHIA, L; AGUIAR, L.G.K; VILLELA, N.R; BOTTINO, D; BOUSKELA, E. O endotélio na síndrome metabólica. **Arq. Bras. Endocrinol. Metab**. v.50, n. 2, p.291-303, 2006.

BALAJTHY A1, HAJDU P2, PANYI G3, VARGA Z4. Sterol Regulation of Voltage-Gated K<sup>+</sup> Channels. **Curr Top Membr**. v. 80, p. 255-292, 2017.

BARBOSA, A.F., CARVALHO, M.G., SMITH, R.E., SABBA-SRUR A.U.O. Spilanthol: occurrence, extraction, chemistry and biological activities. **Rev. bras. farmacogn.** v.26, n.1, p. 128-133, 2016.

BARNES, B.J; HOLLANDS, J.M. Drug-induced arrhythmias. **Crit Care Med.** v.38, p.S188 -S197, 2010.

BARREIRO, E. J. Produtos naturais bioativos de origem vegetal e o desenvolvimento de fármacos. **Quím. Nova.** v. 13, n. 1, p. 30-39, 1990.

BARREIRO, E. S; BOLZANI, V. S. Biodiversidade: fonte potencial para a descoberta de fármacos. **Quím. Nova,** v. 32, n. 3, p. 679-688, 2009.

BATLOUNI, M. Endothelium and arterial hypertension. **Rev. Bras. Hipertens.** v.8, n.3, p.328-338, 2001.

BECKETT, N.S; PETERS, R; FLETCHER, A.E; STALSSEN, J.A; LIU, L; DUMITRASCU; D, et al. Treatment of hypertension in patients 80 years of age or older. **N Engl J Med.** v. 358, n. 18, p. 1887-1898, 2008.

BELTOWSKI, J; WISNIEWSKA, A.J. Hydrogen Sulfide and Endothelium-Dependent Vasorelaxation. **Molecules.** v.19, p.21183-21199, 2014.

BETTEGA, P.V.C; CZLUSNIAK, G.R; PAIVA, R; NAMBA, E.L; RIBAS, C.R; GRÉGION, A.M.T; ROSA, E.AR. Fitoterapia: dos canteiros ao balcão da farmácia. **Arch Oral Res.** v.7, p.89-97, 2011.

BEVILACQUA, A; CORBO, M.R; SINIGAGLIA, M. In Vitro Evaluation of the Antimicrobial Activity of Eugenol, Limonene, and Citrus Extract against Bacteria and Yeasts, Representative of the Spoiling Microflora of Fruit Juices. **Journal of Food Protection.** v. 73, n 5, p.888-894, 2010.

BOLLAG, W.B. Role of phospholipases in adrenal steroidogenesis. **J Endocrinol.** v.229, n. 1, p.R29-41, 2016.

BONAVENTURA D; OLIVEIRA, S. F; TOGNILOLO, V; TEDESCO, A.C; SILVA, R.S; BENDHACK, L.M. A macrocyclic nitrosyl ruthenium complex is a NO donor that induces rat aorta relaxation. **Nitric Oxide.** v .10, n. 2, p. 83-91, 2004.

BOONEN, J; BAERT, B; ROCHE, N; BURVENICH, C; SPIEGELEER, B. Transdermal behaviour of the N-alkylamide spilanthol (affinin) from *Spilanthes acmella* (Compositae) extracts. **J Ethnopharmacol.** v.127, n. 1, p.77-84, 2010.

BORTOLOTTI, L. A. Hipertensão arterial e insuficiência renal crônica. **Rev Bras Hipertens,** v. 15, n. 3, p. 152-5, 2008.

BORTOLOTTI, L.A; CONSOLIM-COLOMBO, F.M. Betabloqueadores adrenérgicos Adrenergic betablockers. **Rev Bras Hipertens.** v. 16, n.4, p. 215-220, 2009.

BRASIL. Anvisa. **Farmacopeia Brasileira**. Brasília, 2010. 904p. v1. Disponível em: < [http://www.anvisa.gov.br/hotsite/cd\\_farmacopeia/pdf/Volume%201.pdf](http://www.anvisa.gov.br/hotsite/cd_farmacopeia/pdf/Volume%201.pdf) >. Acesso em: 13 de agosto de 2016.

BRAUNSTEIN, T.H; INOUE, R; CRIBBS, L; OIKE, M; ITO, Y; JENSEN, L.J et al. The role of L- and T-type calcium channels in local and remote calcium responses in rat mesenteric terminal arterioles. **J Vasc Res**. v.46, n.2, p.138-151, 2009.

BRAUNSTEIN, T.H; INOUE, R; CRIBBS, L; OIKE, M; ITO, Y; HOLSTEIN-RATHLOU, N.H; JENSEN, L.J. The role of L- and T-type calcium channels in local and remote calcium responses in rat mesenteric terminal arterioles. **J. Vasc. Res**. v.46, p.138-151, 2009.

CALIXTO, J. B; SIQUEIRA JR, J. M. Desafios Desenvolvimento de Medicamentos no Brasil: Desafios Desenvolvimento de Medicamentos no Brasil: Desafios. **Gaz. Méd. Bahia**, v. 78, n. 1, p. 98-106, 2008.

CAMORS, E; VALDIVIA, H.H. CaMKII regulation of cardiac ryanodine receptors and inositol triphosphate receptors. **Front Pharmacol**. v.8, n.5, p.1-13, 2014.

CAMPOS, K.E; BALBI, A.P.C; ALVES, M.J.Q.F. Efeitos do extrato aquoso de cebola (*Allium cepa* L.) sobre a função renal e a pressão arterial em ratos Wistar. *Rev. Bras. Pl. Med., Botucatu*, v.8, n.1, p.24-29, 2005.

CARNEIRO, F. M. et al. Tendências dos estudos com plantas medicinais no Brasil. **Revista Sapiência/UEG**. v. 3, n. 2, p. 44-75, 2014.

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

CARVALHO-DE-SOUZA, J.L; VARANDA, W.A; TOSTES, R.C; CHIGNALIA, A.Z. BK Channels in Cardiovascular Diseases and Aging. **Aging Dis**. v. 4, n. 1, p. 38-49, 2013.

CATTERALL, W.A. Voltage-Gated Calcium Channels. **Cold Spring Harb Perspect Biol**. v.3, n.8, p.1-23, 2011.

CAULFIELD, M.P. Muscarinic receptors-characterization, coupling and function. **Pharmacol Ther**. v.58, n.3, p.319-79, 1993.

CERQUEIRA, N; YOSHIDA, W.B. ÓXIDO NÍTRICO. REVISÃO. **Act. Cirúrg. Bras**. v.17, n. 6, p.417-423, 2002.

CHAKRABORTY, A; DEVI, B.R; SANIEBAM, R; KHUMBONG, S; THOKCHOM, I.S. Preliminary studies on local anesthetic and antipyretic activities of *Spilanthes acmella* Murr. in experimental animal models. **Indian J. Pharmacol**. v.42, n.5, p.277-279, 2010.

CHELOTTI, F. Hipertensão arterial autorreferida: prevalência e fatores associados em Rio Branco, Acre. Rio Branco. Dissertação [Mestre em Saúde Coletiva] – Universidade Federal do Acre; 2009.

CHENG, Y.B; LIU, R.H; YUAN, S.S; WU, Y.C; CHANG, F.R. Alkylamides of *Acmella oleracea*. **Molecules**. v.20, p.6970-6977, 2015.

CHOR, D; RIBEIRO, A. L; CARVALHO, M. S; DUNCAN, B. B; LOTUFO, P. A; NOBRE, A. A, et al. Prevalence, awareness, treatment and influence of socioeconomic variables on control of high blood pressure: results of the ELSA-Brasil Study. **PLOS One**. v.10, n.6, 2015.

CLARK, S. G.; FUCHS, L. C. Role of nitric oxide and Ca<sup>++</sup>-dependent K<sup>+</sup> channels in mediating heterogeneous microvascular responses to acetylcholine in different vascular beds. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 282, n. 3, p. 1473-1479, 1997.

COHEN, J.S; MILES, M.C; DONOHUE, J.F; OHAR, J.A. Dual therapy strategies for COPD: the scientific rationale for LAMA + LABA. **Int J Chron Obstruct Pulmon Dis**. v. 11, p. 785-797, 2016.

CONGER F. D. Endothelial regulation of vascular tone. *Hosp Pract*, 1994; 15:117-26.  
CONSOLIM-COLOMBO, F.M; IRIGOYEN, M.C; KRIEGER, E.M. Sistema nervoso simpático e hipertensão arterial sistêmica - aspectos clínicos. *Rev. bras. Hipertens*. v. 12, n. 4, p. 251-255, 2005.

COSTANZO, Linda S. **Fisiologia**. 5. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2014.

CUNHA, R. M. Efeitos do óleo essencial de *Ocotea duckei* Vattimo sobre parâmetros cardiovasculares de ratos. **Rev. Bras. Ciênc. Saúde**, v. 9, n. 1, p. 69-78, 2005.

DALAKLIOGLU, S; OZBEY, G. Role of different types of potassium channels in the relaxation of corpus cavernosum induced by resveratrol. **Pharmacogn Mag**. v.10, p.47-52, 2014.

DE SMET, P. A. G. M. The role of plant-derived drugs and herbal medicines in healthcare. **Drugs**. v.54, p.801-840, 1997.

DI STASI, L. C; HIRUMA-LIMA, C. A. **Plantas medicinais na Amazônia e na Mata Atlântica**. 2 ed. São Paulo: Editora UNESP, 2002. 601 p.

DIAS, A.M.A; SANTOS, p. I.J. SEABRA, R.N.C; BRAGA, M.E.M; SOUSA, H.C. Spilanthol from *Spilanthes acmella* flowers, leaves and stems obtained by selective supercritical carbon dioxide extraction. **J Supercrit Fluids**. v. 62, p. 62-70, 2012.

DUBEY, S; SIDDHARTHA, M; SINGH, M; SARAF, S.A; SAHA, S. Phytochemistry, Pharmacology and Toxicology of *Spilanthes acmella*: A Review. **Adv Pharmacol Sci**. v.2013, p.1-9, 2013.

DZAU, V.J. Significance of endothelial derived vasoactive substances. **J Vasc Med Biol**. p.43-55, 1989.

EKANEM, A.P; WANG, M; SIMON, J.E; MORENO, D.A. Antiobesity properties of two African plants (*Aframomum meleguetta* and *Spilanthes acmella*) by pancreatic lipase inhibition. **Phytother. Res.** v.21, n.12, p.1253 - 1255, 2007.

FANG-WEN, F; ZE-FANG, H.E; MENG, S; RONG, Y; XIAO-MIN, H; MING-SHENG, Z. Mechanisms underlying rat coronary arterial vasoconstriction induced by blockade of inward rectifier potassium channels with BaCl<sub>2</sub>. **Acta Physiologica Sinica.** v.69, n.2, p.129–134, 2017.

FELETOU, M. Calcium-activated potassium channels and endothelial dysfunction: therapeutic options? **Br J Pharmacol.** v. 156, n. 4, p. 545-562, 2009.

FELIPPI, R.; RIBEIRO DO VALLE, R.M.; SILVA, E.L. Efeito do extrato aquoso de ervamate (*Ilex paraguariensis*) na reatividade vascular de aorta torácica de ratos. In: XIX Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental (FeSBE), Águas de Lindóia-SP, 2005. CD Rom, n. 44104.

FELLNER, S.K; ARENDSHORST, W.J. Complex interactions of NO/cGMP/PKG systems on Ca<sup>2+</sup> signaling in afferent arteriolar vascular smooth muscle. **Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.** v.298, p. H144-H151, 2010.

FERREIRA, D.M; SILVA, L.M., MENDES, D.A., CABRINI, D.A., NASCIMENTO, A.M., LACOMINI, M et al. Rhamnogalacturonan from *Acmella oleracea* (L.) R.K. Jansen: Gastroprotective and Ulcer Healing Properties in Rats. **PLoS One.** v.9, n.1, e84762, 2014.

FERREIRA, V. P; PINTO, A. C. Fitoterapia no mundo atual. **Quím. Nova,** v. 33, n. 9, p. 1829, 2010.

FINK, M.P. **O papel das citocinas como mediadores da resposta inflamatória.** Em: Townsend JR CM, Beauchamp RD, Evers BM, Mattox KL – Sabiston: Tratado de Cirurgia, 2ª Ed, Elsevier: São Paulo, 2005, pp 45-66.

FISHER, M. D. Perioperative cardiac dysrhythmias. **Anesthesiology.** v.86, p. 1397-1424, 1997.

FLAVELL, S.W; GREENBERG, M.E. Signaling mechanisms linking neuronal activity to gene expression and plasticity of the nervous system. **Annu Rev Neurosci.** v.31, p.563–590, 2008.

FOGLIO, M.A; QUEIROGA, C.L; SOUZA, I.M.O; RODRIGUES, A.A.F. Plantas medicinais terapêuticas: um modelo multidisciplinar. **MultiCiênicas.** v.7, p.1-8, 2006.

FONSECA, M.C.M. Epamig pesquisa, produção de Plantas Medicinais para Aplicação no SUS. **Espaço para o produtor,** Viçosa, 2012.

FORD, A.P; WILLIAMS, T.J; BLUE, D.R; CLARKE, D.E. Alpha 1-adrenoceptor classification: sharpening Occam's razor. **Trends Pharmacol Sci.** v. 15, n. 6, p. 167-70, 1994.



FURCHGOTT, R.F; ZAWADSKI, J.V. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. **Nature**, v. 288, p. 373-376, 1980.

GARRETT, B.N; KAPLAN, N.M. Plasma renin activity suppression: duration after withdrawal from beta-adrenergic blockade. **Arch Intern Med**. v. 140, n. 10, p.1316-1318, 1980.

GHELARDINI, C; GALEOTTI, N; LELLI, C; BARTOLINI, A. M1 receptor activation is a requirement for arecoline analgesia. **Farmacolo**. v.56, n.7, p.201-206, 2003.

GILBERT, B; FAVORETO, R. *Acmella oleracea* (L.) R. K. Jansen (Asteraceae) – Jambu. **Revista Fitos**. v. 5, n. 1, 2010.

GOVERNO BRASILEIRO. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância de Doenças e Agravos Não Transmissíveis e Promoção da Saúde. Vigitel 2016: vigilância de fatores de risco e proteção para doenças crônicas por inquérito telefônico. Brasília: Ministério da Saúde; 2016. <<http://portalarquivos.saude.gov.br/images/pdf/2017/abril/17/Vigitel.pdf>>(Acessado em 20 de janeiro de 2018).

GUIBERT, C; DUCRET, T; SAVINEAU, J.P. Voltage-independent calcium influx in smooth muscle. **Prog Biophys Mol Biol**. v.98, n.1, p.10-23, 2008.

GUIDO, F.V.C; ANDRICOPULO, A.D; OLIVA, G. Planejamento de fármacos, biotecnologia e química medicinal: aplicações em doenças infecciosas. **Estud. av**. v. 24, n. 70, 2010.

GUIDO, F. V. C; ANDRICOPULO, A. D; OLIVA, G. Planejamento de fármacos, biotecnologia e química medicinal: aplicações em doenças infecciosas. **Estud. av**. v. 24, n. 70, 2010.

GUYTON, A.C.; HALL, J.E. **Tratado de Fisiologia Médica**. 12ª ed. Rio de Janeiro, Elsevier Ed., 2011.

HARALD, G; OTMAR, H; ANDREAS, W. New amides from *Spilanthes oleracea*. **Monatsh. Chem**. v.116, n.2, p. 273-277, 1985.

HELFAND, M; PETERSON, K; CHRISTENSEN, V; DANA, T; THAKURTA, S. Drug Class Review: Beta Adrenergic Blockers: Final Report Update 4. **Drug Class Reviews**. [Internet]. 2009.

HENRIQUES, A. T.; KERBER, V. A.; MORENO, P. R. H. Em Farmacognosia: da planta ao medicamento; Simões, C. M. O. E.; Schenkel, E. P.; Gosmann, G.; de Mello, J. C. P.; Mentz, L. A.; Petrovick, P. R., eds.; 1ª ed., Ed. UFRGS e UFSC: Porto Alegre/Florianópolis, 1999, cap.29.

HOSSAIN, H., SHAHID-UD-DAULA, A.F.M., JAHAN, I.A., NIMMI, I., HASAN, K., HAG, M.M. Evaluation of antinociceptive and antioxidant potential from the leaves of *Spilanthes paniculata* growing in Bangladesh. **Int J Pharm and Phytopharm Res**. v.1, n.4, p.178–186, 2012.

HOSTETTMANN, K.; QUEIROZ, E. F.; VIEIRA, P. C. **Princípios ativos de plantas superiores** – Série de textos da escola de verão em química, São carlos: EDUFSCAR, vol. 6, 152 p, 2003.

ISHIYAMA, Y; KITAMURA, K; ICHIKI, Y; NAKAMURA, S; KIDA, O; KANGAWA, K. et al. Hemodynamic effects of a novel hypotensive peptide, human adrenomedullin, in rats. **Eur. J. Pharmacol.** v. 241, n. 2-3, p. 271-273, 1993.

JAGAN, R.N; SUBASH, K.R; KUMAR, K.S. Role of phytotherapy in gingivitis: A review. **Int. J. Pharm.** v.8, n.1, p.1-5, 2012.

JEPPS, T.A; CHADHA, P.S; DAVIS, A.J; HARHUN, M.I; COCKERILL, G.W; OLESEN, S.P et al: Downregulation of Kv7.4 channel activity in primary and secondary hypertension. **Circulation.** v. 124, n. 5, p. 602-611, 2011.

JONDIKO, I.J.O. A mosquito larvicide in *Spilanthes mauritiana*. **Phytochemistry.** v.25, n.10, p.2289 – 2290, 1986.

KARAKIULAKIS, G; ROTH, M. Muscarinic receptors and their antagonists in COPD: anti inflammatory and antiremodeling Effects. **Mediators Inflamm.** v. 2012, p.9, 2012.

KATOUE, M.G; KHAN, I; ORIOWO, M.A. Pregnancy-induced modulation of calcium mobilization and down-regulation of Rho-kinase expression contribute to attenuated vasopressin-induced contraction of the rat aorta. **Vascul Pharmacol.** v.44, n.3, p.170-176, 2006.

KATZ, A.M; HAGER, W.D; MESSINEO, F.C; PAPPANO, A.J. Cellular actions and pharmacology of the calcium channel blocking drugs. **Am J Med.** v.77, n.2B, p.2-10, 1984.

KATZ, A.M. Calcium channel diversity in the cardiovascular system. **J Am Coll Cardiol.** v.28, n.2, p.522-539, 1996

KATZ, A.M. Molecular basis of calcium channel blockade. **Am J Cardiol.** v.69, n.13, p.17E-22E, 1992.

KATZ, A.M. Molecular biology of calcium channels in the cardiovascular system. **Am J Cardiol.** v.80, n.9A, p.17I-22I, 1997.

KERKHOF, M; GIORGI, C; MARCHI, S; SEITAJ, B; PARYS, J.B; BITTREMIEUX, M. Alterations in Ca<sup>2+</sup> Signalling via ER-Mitochondria Contact Site Remodelling in Cancer. **Adv Exp Med Biol.** v.997, p.225-254, 2017.

KIECHELE, F.L; MALINSKI, T. Nitric oxide: biochemistry, pathophysiology, and detection. **Am J Clin Pathol.** v.100, n.5, p.567-75, 1993.

KIM, H.R; APPEL, S; VETTERKIND, S; GANGOPADHYAY, S.S; MORGAN, K.G. Smooth muscle signaling pathways in health and disease. **J. Cell Mol. Med.** v.12, n.6A, p.2165-2180, 2008.

KOZLOWSKA, H; KUCZKO, M.B; SCHLICKER, E; KOZLOWSKI, M; KLOZA, M; MALINOWSKA, B. Relaxation of human pulmonary arteries by PPAR $\gamma$  agonists. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* v.386, p.445-453, 2013.

KUANG, Q; PURHONEN, P; HEBERT, H. Structure of potassium channels. *Cell. Mol. Life Sci.* v.72, p.3677-3693, 2015.

LASKOWSKI, M; ANDERSON, C; ELIASSON, E; GOLUBINSKAYA, V; NILSSON, H. Potassium-Channel-Independent Relaxing Influence of Adipose Tissue on Mouse Carotid Artery. *J. Vasc. Res.* v.54, p.51-57, 2017.

LATERZA, M. C; AMARO, G; NEGRÃO, C. E; RONDON, M. U. P. B. Exercício físico regular e controle autonômico na hipertensão arterial. *Revista Socerj*, v. 21, n. 5, p. 320-328, 2008.

LEITE, L.N; GONZAGA, N.A; TIRAPELLI, D.P.C; TIRAPELLI, L.F; TIRAPELLI, C.R. Pharmacological characterization of the relaxant effect induced by adrenomedullin in rat cavernosal smooth muscle. *Braz. J. Med. Biol. Res.* v.47, p.876-885, 2014.

LENG, T.C; PING, N.S; LIM, B.P; KENG, C.L. Detection of bioactive compounds from *Spilanthes acmella* (L.) plants and its various in vitro culture products. *J Med Plant Res.* v.5, n.3, p.371-378, 2011.

LEVEY, A.I; EDMUNDS, S.M; HEILMAN, C.J; DESMOND, T.J; FREY, K.A. Localization of muscarinic M3 receptor protein and M3 receptor binding in rat brain. *Neuroscience.* v.63, n. 1, p.207-221, 1994.

LEY, J.P; BLINGS, M; KRAMMER, G; REINDERS, G; SCHMIDT, C.O; BERTRAM, H.J. Isolation and synthesis of acmellonate, a new unsaturated long chain 2ketol ester from *Spilanthes acmella*. *Nat. Prod. Res.* v. 20, n. 9, p. 798–804, 2006.

LI, R; ANDERSEN, I; ALEKE, J; GOLUBINSKAYA, V; GUSTAFSSON, H; NILSSON, H. Reduced anti-contractile effect of perivascular adipose tissue on mesenteric small arteries from spontaneously hypertensive rats: role of Kv7 channels. *Eur J Pharmacol.* v.698, n.3, p.310–315, 2013.

LIANG, C.F; SHAN AU, A.L; LEUNG, S.W.S; JACOBUS NG, K.F; FÉLÉTOU, M; KWAN, Y.W et al. Endothelium-derived nitric oxide inhibits the relaxation of the porcine coronary artery to natriuretic peptides by desensitizing big conductance calcium-activated potassium channels of vascular smooth muscle. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* v.334, n.1, p.223-231, 2010.

LI-CHEN, W.U. et al. Anti-inflammatory Effect of Spilanthol from *Spilanthes acmella* on Murine Macrophage by Down-Regulating LPS-Induced Inflammatory Mediators. *J Agric Food Chem.* v. 56, n. 7, p. 2341–2349, 2008.

LIMA, S.G; HATAGIMA, A; SILVA, N.L.C.L. Sistema Renina-Angiotensina: é Possível Identificar Genes de Suscetibilidade à Hipertensão?. *Arq. Bras. Cardiol.* v.89, n. 6, p. 427-433, 2007.

- LOPES, G.A.D; FELICIANO, L.M; DINIZ, R.E.S; ALVES, M.J.F. Plantas medicinais: indicação popular de uso no tratamento de hipertensão arterial sistêmica (HAS). **Rev. Ciênc. Ext.** v.6, n.2, p.143-155, 2010.
- LORENTZ, M.N; VIANNA, B.S.B. Disritmias Cardíacas e Anestesia. **Rev Bras Anesthesiol.** v. 61, n.6, p. 798-813, 2011.
- LYNCH, F.M; WITHERS, S.B; YAO, Z; WERNER, M.E; EDWARDS, G; WESTON, A.H et al. Perivascular adipose tissue-derived adiponectin activates BK Ca channels to induce anticontractile responses. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* v.304, p.H786–H795, 2013.
- LYONS C. R. The role of nitric oxide in inflammation. **Adv. Immunol.** v. 60, p. 323-371, 1995.
- MACIEL, M.AM; PINTO, A.C; VEIGA JÚNIOR, V.F; ECHEVARRIA, A. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Quím. Nova**, v.25, n.3, p.429-438, 2002.
- MALTA, D.C; BERNAL, R.T.I; ANDRADE, S.S.C.A; SILVA, M.M.A; MELENDEZ, G.V. Prevalence of and factors associated with self-reported high blood pressure in Brazilian adults. **Rev. Saúde Públ.** v.51, n.1, p.1-11, 2017.
- MARTELLI, A. Redução das concentrações de cloreto de sódio na alimentação visando a homeostase da pressão arterial. **Rev. Eletrônica Gest., Educ. Tecnol. Ambient**, v. 18, n. 1, p. 428-436, 2014.
- MARTINS, W.M.O; PAIVA, F. S; BANTEL, C.A. Etnoconhecimento de plantas de uso medicinal na microrregião do vale do Juruá, Acre, Brasil. **Enciclopédia Biosfera.** V.9, p. 2540, 2013.
- MARTINS-DA-SILVA, REGINA CÉLIA V. **Coleta e identificação de espécimes botânicos.** 1º ed. Belém: Embrapa Amazônia Oriental, 2002.
- MARVIN, H; MALONE, M. H.; ROBICHAUD. R. C. A hippocratic screening for pure or crud drug materials. **Lloydia**, v.25, p. 332-332, 1962.
- MENDES, G.M; RODRIGUES-DAS-DORES, R.G; CAMPIDELI, L.C. Evaluation of the content of antioxidants, flavonoids and phenolic compounds in culinary preparations. **Rev. Bras. Pl. Med.** 17, n.2, p.297-304, 2015.
- MENDES, R.T; STANCZYK, C.P; SORDI, R; OTUKI, M.F; SANTOS, F.A; FERNANDES, D. Inibição seletiva da ciclo-oxigenase-2: riscos e benefícios. **Rev Bras Reumatol.** v.52, n.5, p.767-782, 2012.
- MOCHLY-ROSEN, D; DAS, K; GRIMES, K.V. Protein kinase C, an elusive therapeutic target?. **Nat Rev Drug Discov.** v.11, n.12, p.937-957, 2012.

MOHSENI, M; MAHAM, M; NAGHADEH, B.D; AMIN, G.J. Does Achillea millefolium extracts possess prokinetic effects on the bovine abomasum through M3 muscarinic receptors?. **Vet. Res. Forum.** v.8, p.115-120, 2017.

MOJIMINIYI, F.B; OWOLABI, M.E; IGBOKWE, U.V; AJAGBONNA, O.P. The vasorelaxant effect of *Viscum album* leaf extract is mediated by calcium-dependent mechanism. **Niger J Physiol Sci.** v.23, n.1-2, p.115-20, 2008.

MONCADA, SALVADOR; HIGGS, ANNIE. The L-arginine-nitric oxide pathway. **N Engl J Med**, v. 329, n. 27, p. 2002-2012, 1993.

MONTANARI, C. A; BOLZANI, V. S. Planejamento racional de fármacos baseado em produtos naturais. **Quím. Nova [online]**. vol.24, n.1, pp.105-111, 2001.

MOREIRA, F.V; BASTOS, J.F.A; BLANKI, A.F; ALVES, P.B; SANTOS, M.R.V. Chemical composition and cardiovascular effects induced by the essential oil of *Cymbopogon citratus* DC. Stapf, Poaceae, in rats. **Rev. Bras. Farmacogn.** v.20, n.6, p.904-909, 2010.

MOROTTI, S; NIEVES-CINTRÓN, M; NYSTORIAK, M.A; NAVEDO, M.F; GRANDI, E. Predominant contribution of L-type Cav1.2 channel stimulation to impaired intracellular calcium and cerebral artery vasoconstriction in diabetic hyperglycemia. **Channels (Austin)**. v.11, n.4, p.340–346, 2017.

NAKATANI, N; NAGASHIMA, M. Pungent alkalamides from *Spilanthes acmella* L. var. *oleracea* Clark. **Biosci. Biotechnol. Biochem.** v.56, n.5, p.759–762, 1992.

NASCIMENTO, A.M; SOUZA, L.M; BAGGIO, C.H; WERNER, M.F.P; FERREIRA, D.M; SILVA, L.M, et al. Gastroprotective effect and structure of a rhamnogalacturonan from *Acmella oleracea*. **Phytochemistry**. v.85, p.137-142, 2013.

NASCIMENTO-NETO, R. M; PEREIRA, A. C; COELHO, G. L; KRIEGER, J. E. Sociedade Brasileira de Cardiologia. **Atlas corações do Brasil**. Rio de Janeiro; 2006.

NASERI, M.K; ARABIAN, M; BADAVIDI, M; AHANGARPOUR, A. Vasorelaxant and hypotensive effects of *Allium cepa* peel hydroalcoholic extract in rat. **Pak. J. Biol. Sci.** v.11, p.1569-1575, 2008.

NYASSE, B; NGANTCHOU, I; NONO, J.J; SCHNEIDER, B. Antifilarial activity in vitro of polycarpol and 3-O-acetylaleuritic acid from Cameroonian medicinal plants against *Onchocerca gutturosa*. **Nat. Prod. Res.** v.20, n.4, p.391-397, 2006.

OECD - Guidelines for the Testing of Chemicals. Acute Oral Toxicity - Fixed Dose Procedure. **OECD**, 2001.

OLIVEIRA, A.P; FURTADO, F.F; SILVA, M.S; TAVARES, J.F; MAFRA, R.A; ARAÚJO, D.A et al. Calcium channel blockade as a target for the cardiovascular effects induced by the 8 (17), 12E, 14-labdatrien-18-oic acid (labdane-302). **Vascul. Pharmacol.** v.44, p.338-344, 2006.

OLIVEIRA, D.R; LEITÃO, G.G; COELHO, T.S; SILVA, P.E.A; LOURENÇO, M.C.S; ARQUIMO; LEITÃO, S.G. Ethnopharmacological versus random plant selection methods for the evaluation of the antimycobacterial activity. **Rev. bras. farmacogn.** v. 21, n. 5, p.793- 806, 2011.

OLIVEIRA, E.J; MEDEIROS, I.A; MUKHERJEE, R. Hypotensive and spasmolytic effects of normacusine B from *Strychnos atlantica* root. **Phytomedicine.** v. 3, n. 1, p. 45-49, 1996.

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.M; REES, D.D; ASHTON, D.S; MONCADA, S. L-arginine is the physiological precursor for the formation of nitric oxide in endothelium-dependent relaxation. **Biochem Biophys Res Commun.** v. 153, n. 3, p. 1251-1256, 1988.

PASSAGLIA, P; GONZAGA, N.A; TIRAPELLI, D.P; TIRAPELLI, L.F; TIRAPELLI, C.R. Pharmacological characterisation of the mechanisms underlying the relaxant effect of adrenomedullin in the rat carotid artery. **J. Pharm. Pharmacol.** v.66, p.1734-1746, 2014.

PERES, M.T; MONACHE, F.D; CRUS, A.B; PIZZOLATTI, M.G; YUNES, R.A. Chemical composition and antimicrobial activity of *Croton urucurana* Baillon (Euphorbiaceae). **J. Ethnopharmacol.** v.56, n.3, p.223-226, 1997.

PIRIZ, M.A; LIMA, C.A.B; JARDIM, V.M.R; MESQUITA, M.K; SOUZA, A.D.Z; HECK, R.M. Plantas medicinais no processo de cicatrização de feridas: uma revisão de literatura. **Rev. Bras. Pl. Med.** v.16, n.3, p.628-636, 2014.

PRACHAYASITTIKUL, S; SUPHAPONG, S; WORACHARTCHEEWAN, A; LAWUNG, R; RUCHIRAWAT, S; PRACHAYASITTIKUL, V. Bioactive Metabolites from *Spilanthes acmella* Murr. **Molecules,** v. 14, n.2, p. 850-867, 2009.

PRACHAYASITTIKUL, V; PRACHAYASITTIKUL, S; RUCHIRAWAT, S; PRACHAYASITTIKUL, V. High therapeutic potential of *spilanthes acmella*: a review. **EXCLI J.** v. 12, p.291-312, 2013.

RADOVANOVIC, C.A.T; SANTOS, L.A; CARVALHO, M.D.B; MARCON, S.S. Arterial hypertension and other risk factors associated with cardiovascular diseases among adults. **Rev. Latino-Am. Enfermagem.** v.22, n. 4, p. 547-553, 2014.

RAMSEWAK, R.S; ERICKSON, A.J; NAIR, M.G. Bioactive N-isobutylamides from the flower buds of *Spilanthes acmella*. **Phytochemistry.** v.51, n.6, p.729-732, 1999.

RANI, S.A; MURTY, S.U. Antifungal potential of flower head extract of *Spilanthes acmella* Linn. **Afr J Biomed Res.** v.9, n.1, p.67- 69, 2006.

RATNASOORIYA, W.D; PIERIS, K.P.P; SUMARATUNGA, U; JAYAKODY, J.R.A.C. Diuretic activity of *Spilanthes acmella* flowers in rats. **J. Ethnopharmacol.** v.91, n.2-3, p. 317-320, 2004.

RESTREPO, R.D. Use of inhaled anticholinergic agents in obstructive airway disease. **Respir. Care.** v. 52, p. 833-851, 2007.

REVILLA, J. **Apontamentos para a cosmética amazônica.** 2.ed. Manaus. SEBRAEAM/INPA, 2002.

ROMÃO, N. F; SILVA, F. C; FERRAZ, A. B. F. Análise fitoquímica e potencial antioxidante do extrato das flores de *Spilanthes acmella*.. v. 2, n. 2, p 23-32, 2015. **South American Journal of Basic Education, Technical and Technological**

ROY, L; KNAPP, H.R; ROBERTSON, R.M; FITZGERALD, G.A. Endogenous biosynthesis of prostacyclin during cardiac catheterization and angiography in man. **Circulation.** v.71, n.3, p.434-440, 1985.

SÁ, D.S; FERNANDES, A.F; SILVA, C.D; COSTA, P.P; FONTELES, M.C; NASCIMENTO, N.R et al. Non-nitric oxide based metallovasodilators: synthesis, reactivity and biological studies. **Danton Trans.** v.44, n.30, p. 13633-13640, 2015.

SAHU, J; JAIN, K; JAIN, B; SAHU, R.K. A review on phytopharmacology and micropropagation of *Spilanthes acmella*. **PhOL.** v.2, p. 1105-1110, 2011.

SANDHIYA, S; DKHAR, S. A. Potassium channels in health, disease & development of channel modulators. **Indian J Med Res.** v. 129, n. 3, p. 223-232, 2009.

SANDIFORD, S; SLEPAK, V. G5-RGS7 selectively inhibits muscarinic M3 receptor signaling via the interaction between the third intracellular loop of the receptor and the DEP domain of RGS7. **Biochemistry.** v.48, n.10, p.2282-9, 2009.

SANDOO, A; ZANTEN, J.J.C.S.V; METSIOS, G.S; CARROLL, D; GEORGE, D.K. The Endothelium and Its Role in Regulating Vascular Tone. **Open Cardiovasc Med J.** v.4, p.302-312, 2010.

SANDOO, A; ZANTEN, J.J.C.S.V; METSIOS, G.S; CARROLL, D; GEORGE, D.K. The Endothelium and Its Role in Regulating Vascular Tone. **Open Cardiovasc Med J.** v.4, p.302-312, 2010.

SANJULIANI, A; TORRES, M.R.S.G; PAULA, L.N; BASSAN, F.F. Eixo reína-angiotensina-aldosterona: Bases fisiológicas e fisiopatológicas. **Rev. HUPE.** v.10, n.3, p.21-30, 2011.

SANTAMBROGIOA, L; BRASCHIB, A. Conduction abnormalities and anaesthesia. **Curr Opin Anaesthesiol.** v. 20, p. 269-273, 2007.

SANTOS, P.L; BURIOLA, P.M; RAFAELA, M; NUNES, P.G.V; ZANIN, K.A. Utilização de extratos vegetais em proteção de plantas. **Enciclopédia Biosfera.** v. 9, n. 17, p. 2562-2576, 2013.

SARMIENTO, J.G; JANIS, R.A; COLVIN, R.A; TRIGGLE, D.J; KATZ, A.M. Binding of the calcium channel blocker nitrendipine to its receptor in purified sarcolemma from canine cardiac ventricle. **J Mol Cell Cardiol.** v.15, n.2, p.135-137, 1983.

SAWYER, B.D; BYMASTER, F.P; CALLIGARO, D.O; FALCONE, J; MITCH, C.H; SHANNON, H.E. Direct pharmacological comparison of the muscarinic receptors mediating relaxation and contraction in the rabbit thoracic aorta. **Gen Pharmacol.** v.32, n. 4, p.445-452, 1999.

SBC. 7ª Diretriz Brasileira de Hipertensão Arterial. **Arq Bras Cardiol.** v. 107, n. 3 (Supl.3), 81-83, 2016.

SCALA, L. C; BRAGA, F. D Jr; CASSANELLI, T; BORGES, L. M; WEISSHEIMER, F. L. Hipertensão arterial e atividade física em uma capital brasileira. **Arq Bras Cardiol.** v.105, n.3, 2015.

SCHANAIDER, A; SILVA, P.C. Uso de animais em cirurgia experimental. **Acta Cir Bras,** v. 19, n. 4, p. 441-447, 2004.

SHU, Y.Z. Recent natural products based drug development: A pharmaceutical industry perspective. **J. Nat. Prod.** v.61, p. 1053-1071, 1998.

SILVA, I.C; MOURA, R.B. Espécies de Asteraceae e Lamiaceae Usadas na Medicina Popular da Região Sudeste para Problemas Respiratórios: O Que as Evidências Científicas Indicam. **Rev. Fitos.** v.6, n. 1, p. 21-28, 2011.

SILVA, P. **Farmacologia.** 6.ed. Rio de Janeiro: Guanabara, 2002. 334p.

SILVERTHORN, Dee U; **Fisiologia Humana – Uma abordagem integrada.** 7ª ed. Porto Alegre, Artmed. 2017.

SIVIERO, A; DELUNARDO, T.A; HAVERROTH, M; OLIVEIRA, L.C; MENDONÇA, A.M.S. Plantas medicinais em quintais urbanos de Rio Branco, Acre. **Rev. Bras. Pl. Med.** v.14, n.4, p. 598-610, 2012.

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

SMITH, T. L; HUTCHINS, P. M. Anesthetic effects on hemodynamics of spontaneously hypertensive and Wistar-Kyoto rats. **Am J Physiol.** v. 238, n. 4, p. H539-544, 1980.

SOARES, S.P; VINHOLIS, A.H.C; CASEMIRO, L.A; SILVA, M.L.A; CUNHA, W.R; MARTINS, C.H.G. Atividade antibacteriana do extrato hidroalcoólico de *Stryphnodendro adstringens* sobre microrganismos da cárie dental. **Rev. odonto ciênc.** v. 23, n. 2, p. 141-144, 2008.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA. V Diretrizes Brasileiras de Hipertensão Arterial. **Arq Bras Cardiol,** v. 89, n. 3, 2007.

SOUSA, F.C; CITÓ, M.C.O; FÉLIX, F.H.C; VASCONCELOS, S.M.M; FONTENELES, M.M; VIANA, G.S.B et al. Plantas medicinais e seus constituintes bioativos: Uma revisão da bioatividade e potenciais benefícios nos distúrbios da ansiedade em modelos animais. **Rev. Bras. Farmacog.** v.18, n. 4, p. 642-654, 2008.



SPELMAN, K; DEPOIX, D; MCCRAY, M; MOURAY, E; GRELLIER, P. The traditional medicine *Spilanthes acmella*, and the alkylamides spilanthol and undeca-2E-ene-8,10-diynoic acid isobutylamide, demonstrate in vitro and in vivo anti-malarial activity. **Phytother Res.** v. 27, n. 7, p. 1098-1101, 2011.

SPELMAN, K; DEPOIX, D; MCCRAY, M; MOURAY, E; GRELLIER, P. The Traditional Medicine *Spilanthes Acmella*, And The Alkylamides Spilanthol And Undeca-2e-Ene-8,10-Diynoic Acid Isobutylamide, Demonstrate In Vitro And In Vivo Anti-Malarial Activity. **Phytother Res.** v.25, p.1098-1101, 2011.

SPIER, S.A; DELP, M.D; STALLONE, J.N; DOMINGUEZ, J.M; MULLER-DELP, J.M. Exercise training enhances flow-induced vasodilation in skeletal muscle resistance arteries of aged rats: role of PGI<sub>2</sub> and nitric oxide. **Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.** v.292, p.H3119-H3127, 2007.

STANSKI, C; NOGUEIRA, M.K.F.S; LUZ, C.F.P. Palinologia de espécies de Asteraceae de utilidade medicinal para a região dos Campos Gerais, Ponta Grossa, PR, Brasil. **Hoehnea.** v.43, n.3, p. 349-360, 2016.

STANSKI, C; NOGUEIRA, M.K.F.S; LUZ, C.F.P. Palinologia de espécies de Asteraceae de utilidade medicinal para a região dos Campos Gerais, Ponta Grossa, PR, Brasil. **Hoehnea.** v.p.43, 349-360, 2016.

STAUDT., E; RAMASAMY, P; PLATTNER, H; SIMON, M. Differential subcellular distribution of four phospholipase C isoforms and secretion of GPI-PLC activity. **Biochim Biophys Acta.** v. 1858, n.12, p.3157-3168, 2016.

TANIA, M.P; CASTILO, B.D.D; LOBATO, A.B.R; SILVA, R.R; SILVA, S.S.M.A. Antioxidant and cytotoxic potential of aqueous crude extract of *Acmella oleracea* (L.) RK Jansen. **J Chem Pharm Res.** v. 7, p.562-569, 2015.

TANIA, M.P; CASTILO, B.D.D; LOBATO, A.B.R; SILVA, R.R; SILVA, S.S.M.A. Antioxidant and cytotoxic potential of aqueous crude extract of *Acmella oleracea* (L.) RK Jansen. **J Chem Pharm Res.** v.7, p.562-569, 2015.

TAYLOR P, BROWN JH. Nicotinic receptors. In: siegel gj, agranoff bw, albers rw, editors. Basic neurochemistry: molecular, cellular, and medical aspects (Philadelphia): **Raven Press.** p. 248-54, 1994.

TIAN, C; ZHU, R; ZHU, L; QIU, T; CAO, Z; KANG, T. Potassium channels: structures, diseases, and modulators. **Chem Biol Drug Des.** v. 83, n. 1, p. 1-26, 2014.

TIWARI, K.L., JADHAV, S.K., JOSHI, V. An updated review on medicinal herb genus *Spilanthes*. **J.Integr.Med.** v.9, n.11, p.1170-1178, 2011.

TIWARI, K.L; JADHAV, S.K; JOSHI, V. An updated review on medicinal herb genus *Spilanthes*. **J.Integr.Med.** v.9, p.1170-1178, 2011.

TORRES, M. R. S. G.; SANJULIANI, A. F. Does calcium intake affect cardiovascular risk factors and/or events?. **Clinics**, v. 67, n. 7, p. 839-844, 2012.

URREGO, D; TOMCZAK, A.P; ZAHED, F; STU"HMER, W; PARDO, L.A. Potassium channels in cell cycle and cell proliferation. **Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.** v.369, p.1-9, 2014.

URREGO, D; TOMCZAK, A.P; ZAHED, F; STU"HMER, W; PARDO, L.A. Potassium channels in cell cycle and cell proliferation. **Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.** v.369, p.1-9, 2014.

USTULIN, M; FIGUEIREDO, B.B; TREMEA, C; POTT, V.J; BUENO, N.R; OLIVEIRA, R. Plantas medicinais comercializadas no Mercado Municipal de Campo Grande-MS. **Rev. Bras. Farmacogn.** v.19, n.3, p.805-813, 2009.

VALADARES, M. C. Acute toxicity evaluation: strategies post "DL50 test era". **Rev. Eletrônica farm.** 3, 93-98, 2006.

VALSECCHI, F; KONRAD, C; D'AURELIO, M; RAMOS-ESPIRITU, L.S; STEPANOVA, A; MANFREDI, G. Distinct intracellular sAC-cAMP domains regulate ER Ca<sup>2+</sup> signaling and OXPHOS function. **J Cell Sci.** v.130, n. 21, p.3713-3727, 2017.

VARGAS, F.S; ALMEIDA, P.D.O; BOLETI, A.P.A; PEREIRA, M.M; SOUZA, T.P; VASCONCELOS, M.C et al. Antioxidant activity and peroxidase inhibition of Amazonian plants extracts traditionally used as anti-inflammatory. **BMC Complement. Altern. Med.** v.16, p.2-8, 2006.

VENTURA, A.L; ABREU, P.A; FREITAS, R.C.C; SATHLER, P.C; LOUREIRO, N; CASTRO, H.C. Cholinergic system: revisiting receptors, regulation and the relationship with Alzheimer disease, schizophrenia, epilepsy and smoking. **Rev. Psiqu. Clín.** v.37, p.66-72, 2010.

VENTURA, A.L; ABREU, P.A; FREITAS, R.C.C; SATHLER, P.C; LOUREIRO, N; CASTRO, H.C. Cholinergic system: revisiting receptors, regulation and the relationship with Alzheimer disease, schizophrenia, epilepsy and smoking. **Rev. Psiqu. Clín.** v.37, p.66-72, 2010.

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

WAGNER, C.A. Hydrogen sulfide: a new gaseous signal molecule and blood pressure regulator. **J Nephrol.** v.22, n. 2, p. 173-176, 2009.

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

WEIGAND, M.A; HORNER, C; BARDENHEUER, H.J; BOUCHON, A. The systemic inflammatory response syndrome. *Best Pract Res Clin Anaesthesiol.* v.18, p.455-475, 2004.

WEIR, M.R. Beta-blockers in the treatment of hypertension: are there clinically relevant differences? **Postgrad Med.** v.121, n. 3, p.90-8, 2009.

WENNMALM, A. Endothelial nitric oxide and cardiovascular disease. **J Int Med**, v. 235, p. 317-27, 1994.

WESTON, A.H; EGNER, I; DONG, Y; PORTER, E.L; HEAGERTY, A.M; EDWARDS, G. Stimulated release of a hyperpolarizing factor (ADHF) from mesenteric artery perivascular adipose tissue: involvement of myocyte BK Ca channels and adiponectin. **Br J Pharmacol**. v.169, n.7, p.1500–1509, 2013.

WONG, C.M; AU, C.L; TSANG, S.Y; LAU, C.W; YAO, X; CAI, Z; CHUNG, A.C. Role of inducible nitric oxide synthase in endothelium-independent relaxation to raloxifene in rat aorta. **Br. J. Pharmacol**. v.174, p.718-733, 2017.

WONG, C.M; AU, C.L; TSANG, S.Y; LAU, C.W; YAO, X; CAI, Z; CHUNG, A.C. Role of inducible nitric oxide synthase in endothelium-independent relaxation to raloxifene in rat aorta. **Br. J. Pharmacol**. v.174, p.718-733, 2017.

WONGSAWATKUL, O; ISARANKURA-NA-AYUDHYA, C; SATAYAVIVAD, J; RUCHIRAWAT, S; PRACHAYASITTIKUL, V. Vasorelaxant and Antioxidant Activities of *Spilanthes acmella* Murr. **Int J Mol Sci**, v. 9, n. 12, p. 2724-2744, 2008.

WOTTA, D.R; WATTENBERG, E.V; LANGASON, R.B; EL-FAKAHANY, E.E. M1, M3 and M5 muscarinic receptors stimulate mitogen-activated protein kinase. **Pharmacology**. v.56, n.4, p.175-86, 1998.

WRIGHT, J.T. Jr; WILLIAMSON, J.D; WHELTON, P.K; SNYDER, J.K; SINK, K.M; ROCCO, M.V; et al; SPRINT Research Group. A Randomized trial of intensive versus standard blood-pressure control. **N Engl J Med**. v. 373, n. 22, p. 2103-2116, 2015.

WU, L.C; FAN, N.C; LIN, M.H; CHU, I.R; HUANG, S.J; HU, C.Y et al. Anti-inflammatory Effect of Spilanthol from *Spilanthes acmella* on Murine Macrophage by Down-Regulating LPS-Induced Inflammatory Mediators. **J Agric Food Chem**. v.56, n.9, p.2341 - 2349, 2008.

WU, L.C; FAN, N.C; LIN, M.H; CHU, I.R; HUANG, S.J; HU, C.Y; HAN, S.Y. Anti-inflammatory Effect of Spilanthol from *Spilanthes acmella* on Murine Macrophage by Down-Regulating LPS-Induced Inflammatory Mediators. **J Agric Food Chem**. v.56, p.2341-2349, 2008.

WULFF, H; CASTLE, N.A; PARDO, L.A. Voltage-gated potassium channels as therapeutic targets. **Nat Rev Drug Discov**. v. 8, n. 12, p. 982-1001, 2009.

XIE, D.P; CHEN, L.B; LIU, C.Y; ZHANG, C.L; LIU, K.J; WANG P.S. Arecoline excites the colonic smooth muscle motility via M3 receptor in rabbits. **Chin J Physiol**. v.47, p.89-94, 2004.

XIE, D.P; CHEN, L.B; LIU, C.Y; ZHANG, C.L; LIU, K.J; WANG P.S. Arecoline excites the colonic smooth muscle motility via M3 receptor in rabbits. **Chin J Physiol**. v.47, p.89-94., 2004.

YANG, Y.R; CHANG, K.C; CHEN, C.L; CHIU, T.H. Arecoline excites rat locus coeruleus neurons by activating the M2-muscarinic receptor. **Chin. J. Physiol.** v.43, p.23-28, 2000.

YASUDA, I; TAKEYA, K; ITOKAWA, H. The Geometric Structure of Spilanthol. **Chem Pharm Bull**, v.28, n.7, p.2251-2253, 1980.

YI, F; DECAN, E; STOLL, K; MARCEAU, E; DEISSEROTH, K; LAWRENCE, J.J. Muscarinic excitation of parvalbumin-positive interneurons contributes to the severity of pilocarpine-induced seizures. **Epilepsia.** v.56, p.297-309, 2015.

YUNES, R. A.; CALIXTO, J. B., **Em Plantas medicinais sob a ótica da química medicinal moderna.** 1a ed.; Ed. Argos: Chapecó, 2001.

ZAGO, A.S; ZANESCO, A. Nitric Oxide, Cardiovascular Disease and Physical Exercise. **Arq. Bras. Cardiol.** v.87, n.6, p.e264-e270, 2006.

ZHAO, T; ZHANG, H; JIN, C; QIU, F; WU, Y; SHI, L. Melatonin mediates vasodilation through both direct and indirect activation of BKCa channels. **J Mol Endocrinol.** v.59, n.3, p.219-233, 2017.

ZHAO, D; QI, Y; ZHENG, Z; WANG, Y; ZHANG, X. Y; LI, H. J, et al. Dietary factors associated with hypertension. **Nat Rev Cardiol.** v. 8, n. 8, p. 456-65, 2011.

## 9. ANEXOS

ANEXO I: Comprovante de identificação botânica da planta, realizado pelo herbário Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Marlene Freitas da Silva (MFS) da Universidade do Pará.

06/03/2018

Gmail - Re: Fotos Jambu - Convite para colaborar



Efraim Ferreira &lt;efraimferreira17@gmail.com&gt;

### Re: Fotos Jambu - Convite para colaborar

4 mensagens

Mfs Herbario <herbario.mfs@gmail.com>  
 Para: Efraim Ferreira <efraimferreira17@gmail.com>

28 de fevereiro de 2018 10:41

Caro Efraim, Bom dia,

As imagens que você enviou foram analisadas por comparação com amostras presentes em nossa coleção e imagens do nosso banco de dados pela nossa equipe.

Após nossa avaliação podemos atestar que as imagens se referem a *Acmella oleracea* (L.) R.K.Jansen.

Entretanto recomendamos que o seu material seja depositado em um herbário, seja ele da sua própria instituição, de uma instituição local ou ate mesmo enviado para nós para que possa receber um número de Voucher. Dependendo da banca ou da revista a qual você pretende submeter, o voucher é de caráter obrigatório e para dar esse número é preciso do material testemunho.

Desculpe pela demora

Att.:

Herbário MFS

Livre de vírus. [www.avast.com](http://www.avast.com).

**HERBÁRIO PROF<sup>a</sup> DR<sup>a</sup> MARLENE FREITAS DA SILVA (MFS)**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS SOCIAIS E EDUCAÇÃO (CCSE)**  
**UNIVERSIDADE DO ESTADO DO PARÁ**  
**PRÉDIO CASTELINHO, TERCEIRO PISO**  
 TV. DJALMA DUTRA, 156 - TELÉGRAFO. CEP: 66.050-540 BELÉM-PA  
 TELEFONE: (91) 4009-9567  
<https://paginas.uepa.br/herbario/>

Em 18 de janeiro de 2018 16:08, Efraim Ferreira (via Google Drive) <efraimferreira17@gmail.com> escreveu:

Efraim Ferreira convidou você para **contribuir** na seguinte pasta compartilhada:

 **Fotos Jambu**



Pasta com Fotos do Jambu.

Abrir

Google Drive: tenha todos os seus arquivos a seu alcance em qualquer dispositivo.  
 Google Inc. 1600 Amphitheatre Parkway, Mountain View, CA 94043, USA



## ANEXO II: Certificado da Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA/UFAC

	<b>UNIVERSIDADE FEDERAL DO ACRE</b> <b>Comitê de Ética no Uso dos Animais</b>														
<b>CERTIFICADO</b>															
<p>Certifico que a proposta intitulada “<b>ATIVIDADES CARDIOVASCULARES DE <i>Spilanthès acmella</i> AMAZÔNICA</b>”, registrada com o número de processo <b>23107.018517/2016-38</b> e número de protocolo <b>25/2016</b>, sob responsabilidade de <b>Efraim dos Santos Ferreira</b> – que envolve a produção manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA – UFAC) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO ACRE, em reunião de <b>05/04/2017</b>.</p>															
<table border="1"> <thead> <tr> <th>Finalidade</th> <th>( ) Ensino (x) Pesquisa Científica</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Vigência da autorização</td> <td>01/12/2016 até 03/10/2017</td> </tr> <tr> <td>Espécie/linhagem/raça</td> <td><i>Rattus norvegicus</i>/Wistar(albinos)</td> </tr> <tr> <td>Nº de animais</td> <td>Nº 46</td> </tr> <tr> <td>Peso/Idade</td> <td>8 – 14 semanas 250 – 350g</td> </tr> <tr> <td>Sexo</td> <td>Macho</td> </tr> <tr> <td>Origem</td> <td>Biotério do Núcleo de Biologia Experimental (Nubex) da Universidade de Fortaleza, mantidos no Laboratório de Fisiofarmacologia/Bionorte/UFAC.</td> </tr> </tbody> </table>	Finalidade	( ) Ensino (x) Pesquisa Científica	Vigência da autorização	01/12/2016 até 03/10/2017	Espécie/linhagem/raça	<i>Rattus norvegicus</i> /Wistar(albinos)	Nº de animais	Nº 46	Peso/Idade	8 – 14 semanas 250 – 350g	Sexo	Macho	Origem	Biotério do Núcleo de Biologia Experimental (Nubex) da Universidade de Fortaleza, mantidos no Laboratório de Fisiofarmacologia/Bionorte/UFAC.	
Finalidade	( ) Ensino (x) Pesquisa Científica														
Vigência da autorização	01/12/2016 até 03/10/2017														
Espécie/linhagem/raça	<i>Rattus norvegicus</i> /Wistar(albinos)														
Nº de animais	Nº 46														
Peso/Idade	8 – 14 semanas 250 – 350g														
Sexo	Macho														
Origem	Biotério do Núcleo de Biologia Experimental (Nubex) da Universidade de Fortaleza, mantidos no Laboratório de Fisiofarmacologia/Bionorte/UFAC.														
 <hr/> <b>Prof. Dr. Henrique Jorge de Freitas</b> Coordenador CEUA/UFAC Portaria nº670 de 06 de março de 2015															

## ANEXO III: Comprovante de submissão do artigo ao Journal of Ethnopharmacology.

01/03/2018

MS Landing



Home Reports



JEP\_2018\_741 | Research Paper

## Endothelial and ion channel participation in vasorelaxant activity of the hydroalcoholic extract of *Acmella oleracea* (L.) R.K.Jansen on rat aorta



efraim santos ferreira | Universidade Federal do Acre - UFAC, efraimferreira17@gmail.com, Brazil.

Status: **With Editor (0 days)** | Submitted: **01/Mar/2018**

Overview



Files



Messages

**Other Authors** [Show Details](#)

Dionatas Ulises de Oliveira Meneguetti (UFAC), Renildo Moura Cunha (UFAC), Eduardo Andrade Gonçalves (UFAC), Natacha Pinheiro M Brozzo (UFAC)

Contact Ed

### Abstract

Ethnopharmacological relevance: *Acmella oleracea* is a medicinal plant, endemic in the Northern region of Brazil, which has been used frequently as a remedy by local populations and which has a diverse group of highly valuable and readily available resource of bioactive metabolites. However, the vasorelaxant potential of the Amazonian species has not yet been investigated, much less some pharmacological pathways involved in the vasorelaxant activity and even the toxic effects of the species. Objectives: The aim of this study was to investigate the vasorelaxant activity of the hydroalcoholic extract of *Acmella oleracea* (HEAO), a species of Amazonian occurrence, on rat aorta artery, and some of the possible mechanisms of action involved, besides investigating the toxicity of the species. Materials and Methods: The extract of aerial parts of the plant was prepared by maceration in 70% ethanol; for each 200g of the vegetal material, 1L of the solvent was used, proceeding the filtration and rotary evaporation. Different groups of animals received (v.o) doses of 2000 mg/kg and 5000 mg/kg of HEAO and then DL50 and behavioral parameters of animals were verified. The aortic artery rings isolated from normotensive rats were assembled in an organ bath system. After stabilization for 1 hour and procedures for vascular endothelial examination, a contraction induced by 1µM of phenylephrine / vat was done and, in the plateau of this contraction, cumulative administration of increasing concentrations of HEAO (100 - 4000 µg/mL) was done in the presence and absence of endothelium, before and after: inhibition of NO production by L-name, antagonism of muscarinic receptor by Atropine, inhibition of prostacyclin by Indomethacin, and on contraction induced by KCL20mM and KCL80mM. N = 8 was used for each test. Data analysis was done using ANOVA, non-linear regression and t of student of Graphpad Prism 6.0. Results: The administration of the HEAO concentrations did not cause the death of any animal. It was not possible to calculate DL50 and also did not produce significant behavioral changes. Incubation of the HEAO induced significant relaxation (P< 0.01) in a concentration-dependent manner in rings with and without endothelium contracted with FEN or KCL. Inhibition of NO synthesis did not inhibit vasorelaxation, whereas muscarinic receptor antagonism and inhibition of prostacyclin synthesis significantly inhibited HEAO-induced relaxation in rings containing endothelium. Discussion: Preliminary tests, DL50 and hippocratic screening suggest the absence of lethal or behavioral toxic effects induced by HEAO. The results suggest that HEAO seems to induce relaxation in the rat aorta artery independently of the nitric oxide pathway; however, the effect occurs through the muscarinic receptor pathway, through the production of prostacyclin pathway, also inducing blockage to voltage-operated calcium channels (VOCC's) as well as the opening of K<sup>+</sup> channels. Conclusion: EHAO has no toxic effects in rats; it induces significant relaxation in intact aortic artery or without endothelium independent of the participation of NO, but involves in its vasorelaxant effect the action of the prostacyclin, the activity from the endothelial muscarinic receptors, and also of ion channels like K<sup>+</sup>, opening this, and blocking voltage-operated Ca<sup>+</sup> channels (VOCCs). It is necessary to deepen the investigation of the effects presented in this study to make safe use of *A. oleracea* in the treatment of SAH.

### Taxonomy

Pharmacology, Pharmaceutics

### Keywords

[https://www.evisse.com/evisse/faces/pages/mslanding/MsLanding.jspx?\\_adf.ctrl-state=1ax7xj1oh\\_462](https://www.evisse.com/evisse/faces/pages/mslanding/MsLanding.jspx?_adf.ctrl-state=1ax7xj1oh_462)

1/1

## ANEXO IV: Qualis Periódicos - Plataforma Sucupira - Capes.

Estratégia - Google Drive x PDF para JPG - Convert x Plataforma Sucupira x Journal of Ethnopharma x

Seguro | https://sucupira.capes.gov.br/sucupira/public/consultas/coleta/veiculoPublicacaoQualis/listaConsultaGeralPeriodicos.jsf

Apps Getran AC Português para Con- E Submissão E ScienceDirect - Art: Revisão da Classe di E MS Landing E Aterragem MS Bevilacqua A, et al. | Outros favoritos

**PLATAFORMA Sucupira** ACESSO RESTRITO

INÍCIO >> Qualis >> Qualis Periódicos

**Qualis Periódicos**

\* Evento de Classificação:  
CLASSIFICAÇÕES DE PERIÓDICOS QUADRIÊNIO 2013-2016

Área de Avaliação:  
-- SELECIONE --

ISSN:  
 0378-8741

Título:  
 Journal of Ethnopharmacology

**Periódicos**

ISSN	Título	Área de Avaliação	Classificação
0378-8741	JOURNAL OF ETHNOPHARMACOLOGY	ANTROPOLOGIA / ARQUEOLOGIA	B2
0378-8741	JOURNAL OF ETHNOPHARMACOLOGY	BIODIVERSIDADE	A1
0378-8741	JOURNAL OF ETHNOPHARMACOLOGY	BIOTECNOLOGIA	A2
0378-8741	JOURNAL OF ETHNOPHARMACOLOGY	FARMÁCIA	A2
0378-8741	JOURNAL OF ETHNOPHARMACOLOGY	GEOCIÊNCIAS	B1
0378-8741	JOURNAL OF ETHNOPHARMACOLOGY	INTERDISCIPLINAR	A1
0378-8741	JOURNAL OF ETHNOPHARMACOLOGY	MATERIAIS	B2
0378-8741	JOURNAL OF ETHNOPHARMACOLOGY	MEDICINA I	A2
0378-8741	JOURNAL OF ETHNOPHARMACOLOGY	MEDICINA II	A2



ANEXO V: Artigo submetido à Journal of Ethnopharmacology – Elsevier.

## Endothelial and ion channel participation in vasorelaxant activity of the hydroalcoholic extract of *Acmella oleracea* (L.) R.K.Jansen on rat aorta.

Efraim S. Ferreira <sup>a,\*</sup>, Natacha P.M. Brozzo <sup>a</sup>, Eduardo A. Gonçalves <sup>b</sup>,  
Dionatas O. Meneguetti <sup>a,c\*</sup>, Renildo M. Cunha <sup>a,d</sup>.

<sup>a</sup> Graduate Program in Science, Innovation and Technology for the Amazon, Federal University of Acre, Rio Branco, Acre, Brazil.

<sup>b</sup> Professor at the Health and Sports Science Center of the Federal University of Acre, Rio Branco, Acre, Brazil.

<sup>c</sup> Professor at the College of Application - CAp of the Federal University of Acre, Rio Branco, Acre, Brazil.

<sup>d</sup> Professor at the Center for Biological and Nature Sciences of the Federal University of Acre, Rio Branco, Acre, Brazil.

\* Corresponding author: efrainferreira17@gmail.com (E.S Ferreira), dionatas@icbusp.org (D.O Meneguetti).

**Ethnopharmacological relevance:** *Acmella oleracea* is a medicinal plant, endemic in the Northern region of Brazil, which has been used frequently as a remedy by local populations and which has a diverse group of highly valuable and readily available resource of bioactive metabolites. However, the vasorelaxant potential of the Amazonian species has not yet been investigated, much less some pharmacological pathways involved in the vasorelaxant activity and even the toxic effects of the species. **Objectives:** The aim of this study was to investigate the vasorelaxant activity of the hydroalcoholic extract of *Acmella oleracea* (HEAO), a species of Amazonian occurrence, on rat aorta artery, and some of the possible mechanisms of action involved, besides investigating the toxicity of the species. **Materials and Methods:** The extract of aerial parts of the plant was prepared by maceration in 70% ethanol; for each 200g of the vegetal material, 1L of the solvent was used, proceeding the filtration and rotary evaporation. Different groups of animals received (v.o) doses of 2000 mg/kg and 5000 mg/kg of HEAO and then DL<sub>50</sub> and behavioral parameters of animals were verified. The aortic artery rings isolated from normotensive rats were assembled in an organ bath system. After stabilization for 1 hour and procedures for vascular endothelial examination, a contraction induced by 1µM of phenylephrine / vat was done and, in the plateau of this contraction, cumulative administration of increasing concentrations of HEAO (100 - 4000 µg/mL) was done in the presence and absence of endothelium, before and after: inhibition of NO production by L-name, antagonism of muscarinic receptor by Atropine, inhibition of prostacyclin by Indomethacin, and on contraction induced by KCL20mM and KCL80mM. N = 8 was used for each test. Data analysis was done using ANOVA, non-linear regression and t of *student* of Graphpad Prism 6.0. **Results:** The administration of the HEAO concentrations did not cause the death of any animal. It was not possible to calculate DL<sub>50</sub> and also did not produce significant behavioral changes. Incubation of the HEAO induced significant relaxation (P< 0.01) in a concentration-dependent manner in rings with and without endothelium contracted with FEN or KCL. Inhibition of NO synthesis did not inhibit vasorelaxation, whereas muscarinic receptor antagonism and inhibition of prostacyclin synthesis significantly inhibited HEAO-induced relaxation in rings containing endothelium. **Discussion:** Preliminary tests, DL<sub>50</sub> and hippocratic screening suggest the absence of lethal or behavioral toxic effects induced by HEAO. The results suggest that HEAO seems to induce relaxation in the rat aorta artery independently of the nitric oxide pathway; however, the effect occurs through the muscarinic receptor pathway, through the production of prostacyclin pathway, also inducing blockage to voltage-operated calcium channels (VOCC's) as well as the opening of K<sup>+</sup> channels. **Conclusion:** EHAO has no toxic effects in rats; it induces significant relaxation in intact aortic

artery or without endothelium independent of the participation of NO, but involves in its vasorelaxant effect the action of the prostacyclin, the activity from the endothelial muscarinic receptors, and also of ion channels like K<sup>+</sup>, opening this, and blocking voltage-operated Ca<sup>+</sup> channels (VOCCs). It is necessary to deepen the investigation of the effects presented in this study to make safe use of *A. oleracea* in the treatment of SAH.

Keywords: *Acmella oleracea*. Vasorelaxant. Rat aorta.

## 1. Introduction

The use of plants for the purpose of preventing, alleviating or curing pathological processes is a widespread culture from the earliest civilizations to the present day. This tradition continues to be used by a large part of the world population, due to the easy access of the population to plants in relation to allopathic medicines (Bettega et al., 2011; Calixto and Siqueira, 2008).

In Brazil, due to its richness of plant species, the medicinal practice based on plant use is very frequent (Ferreira and Pinto, 2010; Piriz et al., 2014), since the country has the largest variety of plant species on the planet, with about 55 thousand species already cataloged, as well as a rich ethnopharmacological knowledge in the use of medicinal plants, which is transmitted between the generations (Fonseca, 2012; Martins et al., 2013).

The biodiversity of the Amazon forest presents approximately 30 thousand species cataloged, corresponding to around 10% of all the world's forests, having a vast number of species with therapeutic properties that have not yet been explored by the scientific community (Foglio et al., 2006; Martins et al., 2013). Ethnopharmacological knowledge of local populations may provide important findings of pharmacologically active substances (Oliveira et al., 2011; Piriz et al., 2014).

Among the species of plants that occur in the Amazon region, the Asteraceae family has attracted interest among researchers, since it comprises approximately 25,000 species belonging to 1,600 genres. This makes it one of the most important sources of species used for therapeutic purposes (Ribeiro et al., 2010; Silva and Moura, 2011). Some of the main genres of this family are: *Achillea*, *Baccharis*, *Bidens*, *Elephantopus*, *Gochnatia*, *Helianthus*, *Matricaria*, *Mikania*, *Vernonia*, *Acmella* (Stanski et al., 2016; Silva e Moura, 2011), with emphasis on the genre *Acmella*, composed of more than 60 species that are widely distributed throughout tropical and subtropical regions of the world (Sahu et al., 2011; Tiwari et al., 2011) the species *Acmella oleracea* being the main representative in the ethnopharmacological use (Gilbert and Favoreto, 2010).

The species *A. oleracea* (*Spilanthes acmella*; *Spilanthes oleracea*; *Pyrethrum spilanthus*) is a plant belonging to the family Asteraceae, which has semi-erect or near ground features, measuring approximately 40 to 60 centimeters in height (Boonen et al., 2010). In the Northern region of Brazil, the species is popularly known as *jambu*, *agrião-do-Pará*, *abecedária*, *agrião-bravo*, *agrião-do-norte*, *botão-de-ouro* and *dor de dente plant* (Nascimento et al., 2013; Tania et al., 2015).

In the state of Acre-Brazil, *A. oleracea* is cultivated throughout the year as an ornamental, commensal or medicinal plant, being a component of typical dishes of local cuisine and mainly traditional medicine for the cure of many diseases (Gilbert e Favoreto, 2010; Romão et al., 2015; Siviero et al., 2012). All parts of the plant are used in several therapeutic practices, with emphasis on flowers and leaves, which have a spicy taste and, when chewed, produce a sensation of tingling and numbness (Barbosa et al., 2016; Cheng et al., 2015; Ferreira et al., 2014; Leng et al., 2011).

*A. oleracea* has a highly valuable and readily available diversified group of secondary metabolites, for example: alkaloids, tannins, essential oils and flavonoids (Boonen et al., 2010; Jagan et al., 2012). Spilantol, an olefinic alkaloid, is the main bioactive constituent present in the plant (Yasuda et al., 1980), besides having several other compounds with biological actions (Ansari et al., 1988; Dubey et al., 2013; Harald et al., 1985; Nakatani e Nagashima, 1992; Prachayasittikul et al., 2009; Romão et al., 2015; Ramsewak et al., 1999).

The literature has described several biological activities for *A. oleracea*, such as: anti-inflammatory, analgesic, antifungal, antimalarial, antiviral, antiseptic, healing and local anesthetic effects (Chakraborty et al., 2010; Rani e Murty, 2006; Spelman et al., 2011; Wu et al., 2008). It also works with immunomodulatory, antinociceptive, antioxidant, insecticidal, pancreatic lipase inhibitor and diuretic activity (Hossain et al., 2012; Jondiko, 1986; Ratnasooriya et al., 2004; Wu et al., 2008), among other biological actions (Ekanem et al., 2007; Nyasse et al., 2006; Peres et al., 1997; Sharma et al., 2011; Wongsawatkul et al., 2008).

SAH is the most frequent cardiovascular disease (CVD) in the world population and is directly associated with the risk of developing fatal CVD, renal failure and other complications that cause problems mainly to the circulatory system (Andrade et al., 2014; Malta et al., 2017; Mendes et al., 2015). The World Health Organization (WHO) estimates that there are currently around 600 million people affected by SAH in the world, with 7.1 million deaths annually from the disease. Studies show that in 2025 the prevalence of SAH in the world population will be approximately 29% (Mendes et al., 2015; Radovanovic et al., 2014; Sousa e Passarelli Júnior, 2014).

Data from the Brazilian Ministry of Health reveal that more than 30 million Brazilians suffer from arterial hypertension (Brazilian Government, 2016). In Brazil, studies indicate that the estimate of hypertension prevalence in the urban population ranges from 21.4% to 24.1% (Andrade et al., 2015; Malta et al., 2017; Radovanovic et al., 2014). In the Amazon region, the prevalence of SAH in the population is 22.3%, being more frequent in the elderly population and more commonly in men, associated with old age and obesity. A case study in the State of Acre revealed a prevalence of 20.4% in the local population and association of the disease with old age, obesity, hypercholesterolemia and diabetes mellitus. The Vigitel / 2016 telephone survey, carried out by the Ministry of Health, indicated that 23% of the population of Rio Branco had a diagnosis of arterial hypertension (Chelotti, 2009; Brazilian Government, 2016).

In this sense, hypertension has become a public health problem of global proportions, which demands economic and scientific efforts to find solutions to fight the disease and minimize its deleterious effects on the human body. The widespread use of *A. oleracea* by traditional medicine in curing arterial hypertension (Leng et al., 2011; Romão et al., 2015; Wongsawatkul et al., 2008) has aroused the scientific interest in proving the information reported on the pharmacological effects regarding SAH. Based on this information, the main objective of the present study is to investigate the vasorelaxant potential of the *Acmella oleracea* species in the rat aorta artery and to investigate the toxic effects of the plant, thus allowing the safe use of the species as an ethnomedicinal product for therapeutic approaches in arterial hypertension and its cardiovascular complications.

## 2. Materials and Methods

### 2.1. Plant material

The plant material was collected at the São João branch, Km 07 of the Quixadá road, in the city of Rio Branco, Acre, Brazil. Identified by Herbal Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Marlene Freitas da Silva (MFS) of Centro de Ciências Sociais e Educação (CCSE) of Universidade do Estado do Pará.

#### 2.1.1. Preparation of hydroalcoholic extract of *Acmella oleracea* (HEAO)

Aerial parts of *A. oleracea* were dehydrated in greenhouse at 40 °C and crushed in a blade mill. The extract was prepared by percolation: 1L of 70% ethanol for each 200 g of the plant material. After filtration, it was processed in rotary evaporator, lyophilized to obtain the dry extract (Rodrigues et al., 2011), packed in an amber glass bottle and kept under refrigeration.

### 2.2. Drugs and solutions

Sigma's standard drugs were used: L (-) phenylephrine (FEN), atropine sulfate, acetylcholine hydrochloride (ACh), NG-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME), indomethacin (Indo). The stock solutions of indomethacin were prepared together with sodium bicarbonate (NaHCO<sub>3</sub>) at 5% in distilled water, while the other drugs were diluted in distilled water, all stored at 0 °C (Cunha, 2005). When used, both the FEN and the ACh were always in the concentration of 1 μM.

The perfusion medium that was used was the nutrient solution of Krebs Henseleit (KHS), containing in mM: NaCl (118.4); KCl (4.75); KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (1.18); NaHCO<sub>3</sub> (25); MgSO<sub>4</sub> (1.18); CaCl<sub>2</sub> (1.9) and glucose (5). The nutrient solution had pH adjusted between 7.3 and 7.4 via HCl 1M or NaOH 1M. To obtain solutions of KCL 20 mM and KCL 80 mM, after preparation of the normal KHS solution, a required volume was withdrawn and a higher concentration of Potassium Chloride was added until reaching the desired concentration to obtain solutions of KCL 20 mM and KCL 80 mM. Both the Krebs solution and the KCL depolarizing solution were permanently aerated with a gaseous mixture composed by 95% O<sub>2</sub> and 5 % of CO<sub>2</sub> and maintained at a constant temperature of 37 °C.

In all experiments, the concentrations of FEN and Ach were 1  $\mu$ M and the concentrations of HEAO, used cumulatively in all experimental approaches, were invariably 100, 300, 600, 1000, 1500, 2000, 2500, 3000, 3500 and 4000  $\mu$ g/ml, for an "n" always equal to 8. After the end of the experiments it was made a last wash with the solution Krebs Henseleit and after her, an incubation of Fen (1  $\mu$ M) with the objective of evaluating the reactivity of the organ.

### 2.3. Animals

The protocols for animal manipulation were conducted according to the ethical guidelines of CONCEA and approved by the Ethics Committee on the Use of Animals of the Federal University of Acre, registered under the process number 23107.018517/2016-38.

*Rattus norvegicus*, albinus, normotensive of the Wistar lineage were used between 8 and 14 weeks of age, and 250g to 350g of weight. The animals were purchased from the Experimental Biology Nucleus (NUBEX) of the University of Fortaleza. Before the experiments, they were acclimatized in the LAPFFAR / UFAC environment room for periods of 10 to 20 days, under temperature conditions ( $23 \pm 2^\circ\text{C}$ ), 12-hour light / dark cycle lighting and *ad libitum* feeding.

### 2.4. Experimental Protocols

#### 2.4.1. Toxicological test

In order to evaluate the oral acute toxicity of HEAO in male Wistar rats, doses of 2000 mg/kg and 5000 mg/kg (v.o) were administered in different groups of animals (n=6), in addition to a control animal group that received vehicle only (0.9% saline). The animals were observed during the first 180 minutes and every 12 hours during the first 3 days after administration of the extract, taking as parameters the dose capable of causing the death of 50% of the animals (DL50), besides the behavioral changes in the exposed animals. At the end of the experiments, the animals were euthanized with a toxic dose of thiopental sodium (Almeida et al., 1999; Valadares, 2006; OECD Test Guideline 420, 2001).

#### 2.4.2. Obtaining and preparing the rat aorta artery rings

The rats were sacrificed by concussion followed by sectioning of the cervical vessels. After a thoracoabdominal incision, the proximal thoracic portion of the aorta was isolated, desiccated from adjacent tissues and sectioned into rings measuring between 3 and 5 mm, mounted between two stainless steel rods that were inserted into the lumen of the artery, a fixed rod in one lower bracket and the other connected to an isometric force transducer (Panlab TRI 210, Spain), coupled to an amplifier / recorder, connected to a computer containing a software (Protowin, V.1.1, Panlab, Spain) for recording and storing isometric voltage variation data. The preparations contained in 10 ml vats, containing Krebs Henseleit nutrient solution (pH 7.3 at 37  $^\circ\text{C}$ ) were permanently aerated with a carbogenic mixture (95% O<sub>2</sub> and 5% CO<sub>2</sub>) and underwent a stabilization for 60 minutes, period in which the Krebs solution was changed every 15 minutes to

prevent interference of metabolites (Altura and Altura, 1970; Furchgott and Zawadzki, 1980) and the tension given in the aortic rings was maintained at 1g. To obtain rings without endothelium, the endothelial layer was removed by mechanical friction between the inner walls of the vessel with a platinum rod wrapped in a thin layer of cotton.

#### 2.4.3. Verification of the presence of vascular endothelium

The analysis was carried out from the addition of 1  $\mu\text{M}$  of ACh on the contraction plateau induced by 1  $\mu\text{M}$  of FEN (Bonaventura et al, 2004; Furchgott and Zawadzki, 1980), being established as rings endowed with functional endothelium ( $\text{E}^+$ ); those with relaxation percentages induced by ACh incubation on the tonic contraction of FEN were equal to or greater than 85%, whereas rings without endothelium ( $\text{E}^-$ ), those with ACh-induced relaxation percentages of less than 5%.

#### 2.4.4. Verification of the effect of HEAO on rat aorta artery in function of the vascular endothelium.

After observing the preliminary stabilization protocols for the preparations containing the aortic rings, the vasorelaxation percentages in function of the extract were determined by the cumulative addition of HEAO (100, 300, 600, 1000, 1500, 2000, 2500, 3000, 3500 and 4000  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) on a second contraction given by FEN in the vats containing distinct preparations, some with ( $\text{E}^+$ ) rings and others with ( $\text{E}^-$ ) rings.

#### 2.4.5. Verification of the influence of endothelium-derived relaxing factors and muscarinic participation on the effect of HEAO on rat aorta artery.

In order to evaluate the participation of some endothelium-derived relaxing factors, in the HEAO effect, after the stabilization phase, in different experiments the incubation of L-NAME was done for 30 minutes (Moncada and Higgs, 1993; Moncada et al., 2006) for inhibition of the NO synthesis enzyme or indomethacin for 30 minutes (Clark and Fuchs, 1997; Batlouni, 2001), for inhibition of the prostacyclin production enzyme or 1  $\mu\text{M}$  of atropine for 15 minutes (Mitchelson et al., 1989; Moreira et al., 2010) to antagonize the action of muscarinic receptors. After the respective times, a new contraction with FEN was induced and the cumulative additions of HEAO (100, 300, 600, 1000, 1500, 2000, 2500, 3000, 3500 and 4000  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) were made in the plateau of the tonic phase. Responses induced by HEAO before and after incubation of the inhibitors and antagonist were calculated.

#### 2.4.5. Verification of the influence of HEAO on the ion channel activity of the smooth muscle membrane of the aorta isolated from normotensive rats.

In order to verify the involvement of voltage-operated  $\text{Ca}^{2+}$  channels (VOCC's) and / or  $\text{K}^+$  channels in the HEAO effect, after checking the absence of the vascular endothelium and the previous procedures of stabilization of the preparations, in different experiments, contractions induced by elevation of the extracellular concentration of  $\text{K}^+$  were obtained. A solution of KCL 20mM or KCL

80mM, instead of the normal Krebs solution, was added to the vats containing ( $E^-$ ) rings to produce contractions, on which vascular smooth muscle contraction activator agent works (Batlouni, 2001) and cumulative additions of HEAO were made (100, 300, 600, 1000, 1500, 2000, 2500, 3000, 3500 and 4000  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). The HEAO responses on contractions induced by each of the concentrations of the KCL agent were calculated.

## 2.5. Statistical analysis

Mean values were all obtained from experiments with an "n" always equal to 8 and are graphically expressed as mean  $\pm$  standard error of the mean (e.p.m.). The  $EC_{50}$  were calculated from non-linear regression. The comparisons of the means were done by the Student's *t*-test or, when more appropriate, for the multiple comparisons, Variance Analysis (ANOVA) was used. Statistical analyzes and representations were performed using GraphPad Prism 6.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA).

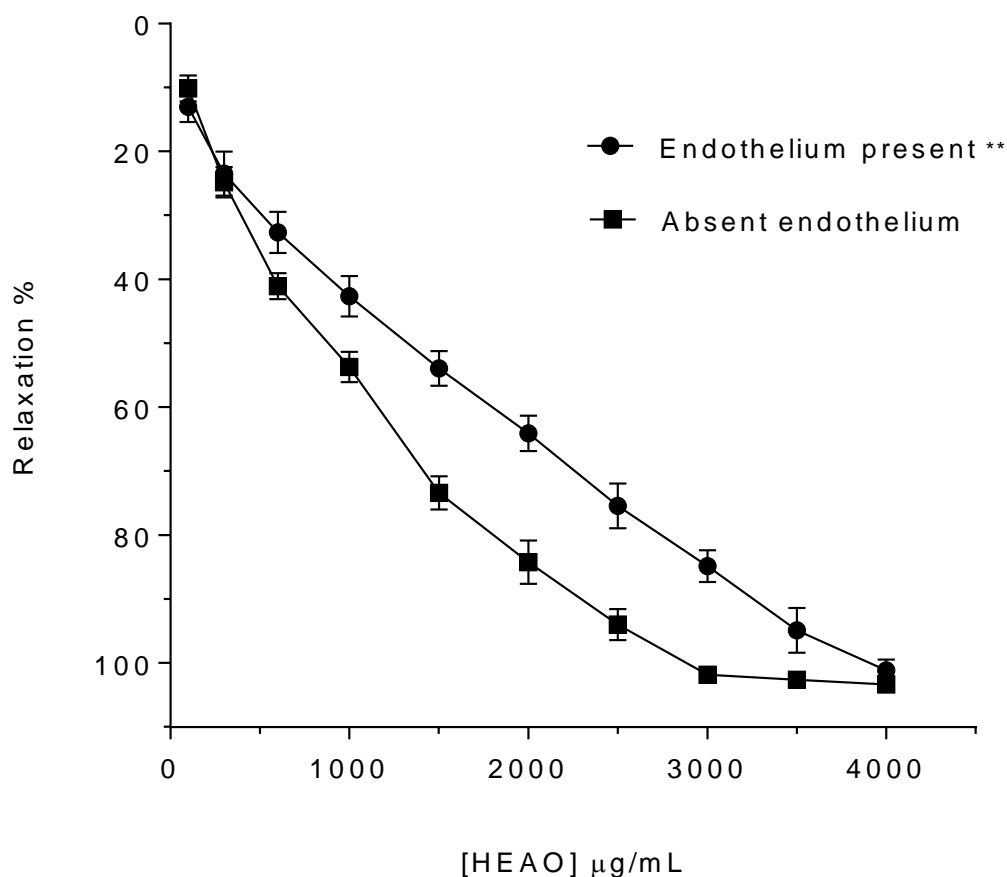
## 3. Results

### 3.1. Acute toxicity assessment

The administration of the 2000 mg / kg and 5000 mg / kg concentrations of HEAO in different groups of male Wistar rats did not cause the death of any animal ( $n = 8$ ). In this case, it was not possible to determine  $DL_{50}$  by hippocratic screening described by Almeida et al., 1999. During the 14 days following exposure to the extract, no significant behavioral changes were observed.

### 3.2. Influence of endothelium on the relaxing effect of HEAO on aortic artery of normotensive rats

The addition of increasing cumulative HEAO concentrations (100, 300, 600, 1000, 1500, 2000, 2500, 3000, 3500 and 4000  $\mu\text{g} / \text{mL}$ ) induced significant relaxation ( $p < 0.01$ ) and, in the dependent concentration mode, in aortic artery rings, it completely inhibited the contraction given by FEN (1  $\mu\text{M}$ ), presenting  $CE_{50} = 1054 \pm 6.18 \mu\text{g} / \text{mL}$  in the presence of vascular endothelium, and  $734.6 \pm 3.87 \mu\text{g} / \text{mL}$  in the rings without endothelium (Figure 1).

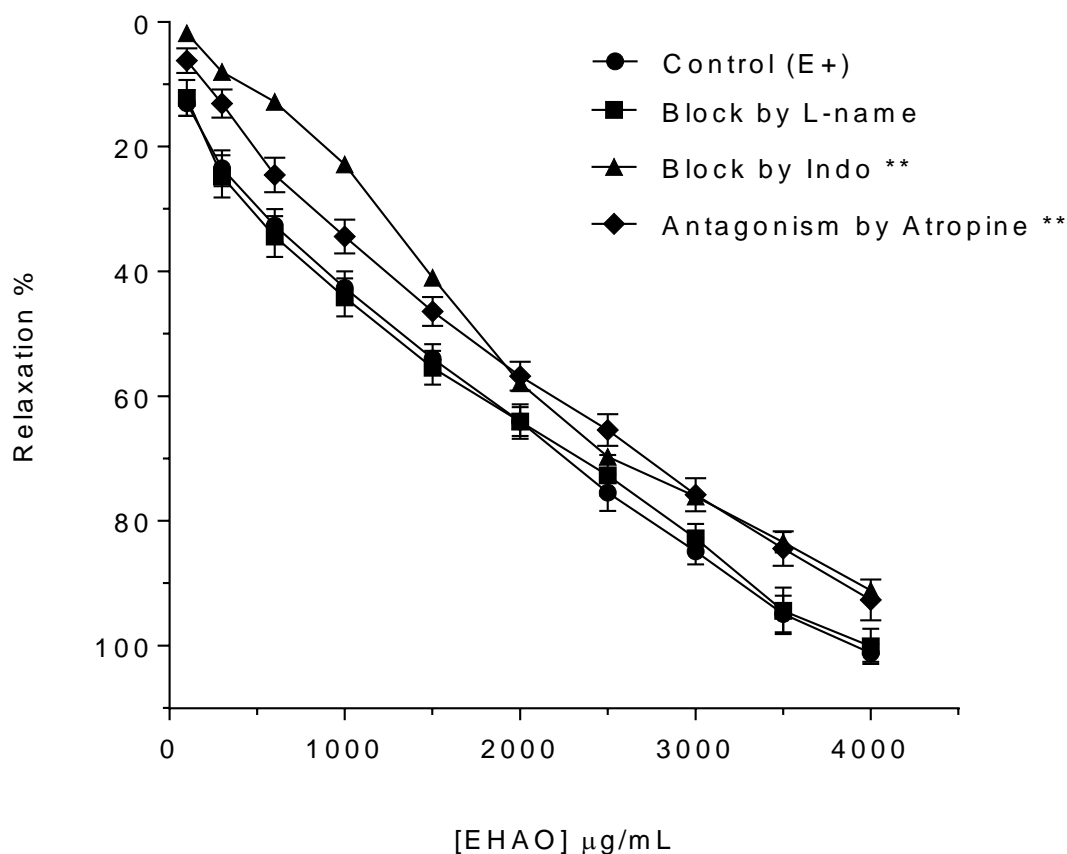


**Figure 1:** Response concentration curve for HEAO (100, 300, 600, 1000, 1500, 2000, 2500, 3000, 3500 and 4000) in rat isolated thoracic aortic artery rings, with and without functional endothelium, pre-contracted with FEN (1  $\mu\text{M}$ ). The dots represent the mean  $\pm$  e.p.m. and \*\* $p < 0.01$  versus (E-).

### 3.3. Involvement of NO, muscarinic receptors and prostacyclin in the relaxing response induced by HEAO in rat isolated aortic artery.

The relaxing effect on FEN induced contractions (1  $\mu\text{M}$ ) through the incubation of increasing cumulative HEAO concentrations (100, 300, 600, 1000, 1500, 2000, 2500, 3000, 3500 and 4000  $\mu\text{g/mL}$ ) in experimental assemblies containing intact endothelium aortic artery rings did not decrease after inhibition of NO synthesis. On the other hand, the inhibition of the prostacyclin synthesis pathway and muscarinic receptor antagonism significantly decreased ( $p < 0.01$ ) the HEAO-induced vasorelaxation ( $1054 \pm 6.18 \mu\text{g/mL}$ ) observed prior to any blockade given by atropine incubation or indomethacin, with a significant increase in the values of  $\text{CE}_{50}$  for  $1323 \pm 8.84 \mu\text{g/mL}$  and  $1521 \pm 13.63 \mu\text{g/mL}$ , respectively (Figure 2).

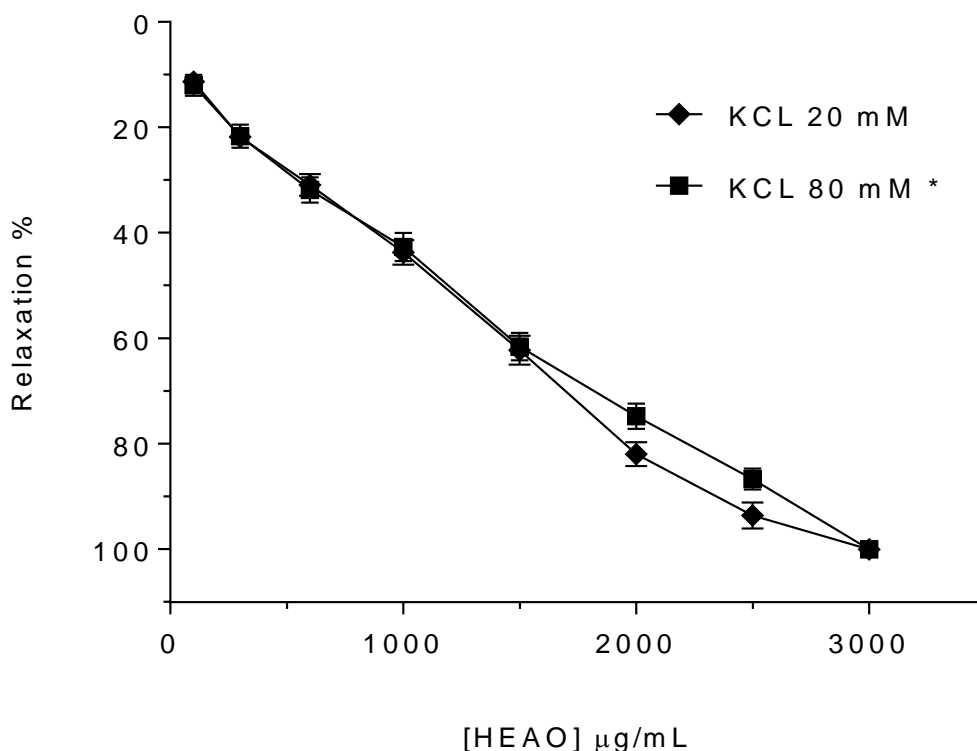




**Figure 2:** Response concentration curve of HEAO (100, 300, 600, 1000, 1500, 2000, 2500, 3000, 3500 and 4000) in aortic artery rings, with intact endothelium, pre-contracted with FEN (1  $\mu\text{M}$ ), before and after inhibition of NO, inhibition of prostacyclin and muscarinic receptor antagonism. The dots represent the mean  $\pm$  e.p.m. and \*\* $p < 0.01$  versus (E<sup>+</sup>).

### 3.4. Involvement of ion channels in the relaxing effect of HEAO on normotensive rat isolated aortic artery

The HEAO induced relaxation in a concentration dependent manner (100, 300, 600, 1000, 1500, 2000, 2500, 3000, 3500 and 4000  $\mu\text{g/mL}$ ) in endothelium-free aortic artery rings, pre-contracted with a depolarizing solution of KCL 20 mM or KCL 80 mM. The values of  $\text{EC}_{50}$  observed in the preparations with different concentrations of KCL were significantly different from each other ( $p < 0.05$ ),  $947.7 \pm 5.26 \mu\text{g/mL}$  and  $970.7 \pm 5.37 \mu\text{g/mL}$ , respectively (Figure 3).



**Figure 3:** Response concentration curve for HEAO (100, 300, 600, 1000, 1500, 2000, 2500, 3000, 3500 and 4000  $\mu\text{g/mL}$ ) in aortic artery rings, without endothelium, on the contractions given by KCL 20 mM or KCL 80 mM. The dots represent the mean  $\pm$  e.p.m. and \* $p < 0.05$  versus KCL 20 Mm.

#### 4. Discussion

The sum of the preliminary tests taken,  $DL_{50}$  and hippocratic screening, indicate the absence of lethal toxic effects, or even behavioral effects, induced by HEAO, which is relative to non-maleficance. This provided a good margin of safety for *in vitro* tests since the highest dose used to induce maximum effect in the vasorelaxation was about 1250 times lower than the highest dose used in the verification of acute toxicity without toxic effects, suggesting that the concentrations used are safe and that the observed effects are processed by the normal physio-pharmacological pathways of vasorelaxation.

From the analysis of vascular reactivity regarding *in vitro* experiments, this study demonstrated mainly that the HEAO has vasorelaxant effect in aorta artery of normotensive rat. These results are consistent with a previous study carried out by Wongsawatkul et al. (2008) that demonstrated significant relaxation in rat aortic rings, using the same species collected in Thailand.

The findings of this study demonstrate that the vasorelaxant effect of EHAO occurs both in the rings endowed with vascular endothelium and in the rings devoid of the endothelial cell layer, with greater effectiveness in endothelial absence, suggesting that the endothelial cell layer inhibits - but does not abolish - the vasorelaxant effect induced by HEAO concentrations in the rat aorta artery, by mechanisms not yet investigated in this study.

It is known that, under physiological conditions, the endothelial layer is capable of producing and releasing various substances essential for the regulation of vascular tone: antioxidant factors, anti-inflammatory substances, prostacyclin and natriuretic peptides. Among the various functions of the endothelium, those related to vasomotricity include: synthesis of vasodilatory and antiplatelet substances (endothelium-derived relaxing factor - EDRF, endothelium dependent hyperpolarizing factor - EDHF, prostacyclin – PGI<sub>2</sub>); synthesis of vasoconstricting substances and activators of platelet aggregation or contraction factors derived from the endothelium - EDCF (Bahia et al., 2006; Batlouni et al., 2001; Sandoo et al., 2010).

Although with less expression, there was also significant relaxation in rings with intact endothelium, demonstrating that the participation of some relaxing factors derived from the endothelium cannot be discarded. It is important to investigate whether some endothelium-derived relaxation factors, for their already well-understood activities and mechanisms of action, could be influencing the HEAO activity, notably nitric oxide (NO), prostacyclin (PGI<sub>2</sub>) and endothelial muscarinic receptors, in special M<sub>3</sub> (Liang et al., 2010; Otani et al., 2016).

There is evidence that many substances derived from medicinal plants act as agonists of endothelial muscarinic receptors (Batlouni et al., 2001; Mohseni et al., 2017; Xie et al., 2004; Yi et al., 2015; Yang et al., 2000). A study using selective muscarinic receptor antagonists has shown that the specific receptor mediating the relaxation effect of blood vessels is the M<sub>3</sub> subtype (Caulfield, 1993). M<sub>3</sub> is a membrane receptor coupled to G protein which, when activated by its agonists, induces the release of endothelium-derived relaxing factors (FRDEs), especially NO and PGI<sub>2</sub>, and thus induce vasorelaxation (Birdsall et al., 1999; Paterson e Nordberg, 2000; Sandiford e Slepak, 2009; Ventura et al., 2010). In this study, the antagonism of muscarinic receptors significantly attenuated the vasorelaxing effect of HEAO on rat aorta (Figure 2). The results suggest that the extract acts as an agonist of M<sub>3</sub> muscarinic receptors, activating these receptors and inducing vasorelaxation.

It is well reported in the literature that the release of NO by endothelial cells leads to relaxation of vascular smooth muscle (Dias et al., 2009; Sá et al., 2015; Vargas et al., 2016; Zago e Zanesco 2006). In physiological conditions, NO is the first of the factors derived from the endothelium to be released and to induce vasorelaxation (Sá et al., 2015).

It is known that many substances derived from plants also exert vasorelaxant activity from the stimulation of the NO pathway (Alves Filho et al., 2015; Wong et al., 2017; Wongsawatkul et al., 2008). Upon penetration into the smooth muscle cell, NO binds to the soluble guanylate cyclase (sGC) heme group with consequent formation of cGMP from the conversion of GTP, which activates PKG that, in turn, promotes the opening of K<sup>+</sup> channels, closure of the voltage-operated calcium channels (VOCC's) and the reuptake of Ca<sup>2+</sup> in the SERCA, reducing the levels of intracellular Ca<sup>2+</sup> and causing consequent vasorelaxation (Bonaventura et al., 2004; Liang et al., 2010; Wong et al., 2017; Zago e Zanesco, 2006). In this study, comparing the results before and after the inhibition of nitric oxide synthase enzyme, it was observed that, with the inhibition of NO production, there was no decrease in the relaxing effect of HEAO on the aorta artery (Figure

2), suggesting that NO seems not involved in the vasorelaxant response induced by HEAO.

The involvement of prostacyclin (PGI<sub>2</sub>) in the vasorelaxant effect induced by plant-derived substances is already well described in the literature (Kozłowska et al., 2013; Leite et al., 2014; Passaglia et al., 2014). Prostacyclin represents other factors that, in healthy animals, are released early by the vascular endothelium (Ng et al., 2013). The vasorelaxant action of prostacyclin (PGI<sub>2</sub>) depends on specific receptors present on the smooth muscle cell membrane. The stimulation of PGI<sub>2</sub> receptors leads to the activation of adenylate cyclase by raising cAMP levels, which stimulates cAMP-dependent protein kinase (PKA), in vascular smooth muscle PKA plays a role similar to PKG and can activate K<sup>+</sup> channels sensitive to ATP inducing hyperpolarization and also stimulating the output of Ca<sup>2+</sup> of the cytosol which, in turn, induces vascular smooth muscle relaxation (Beltowski et al., 2014; Spier et al., 2007).

A recent study to determine the mechanisms involved in the relaxing effect of adrenomedullin on rat cavernous smooth muscle has demonstrated the involvement of vasodilatory prostanoids (Leite et al., 2014). Inhibition of cyclooxygenase (COX) reduced the relaxation induced by Adrenomedullin in rat carotid artery, indicating the participation of prostacyclin in the vasorelaxant effect induced by AM (Passaglia et al., 2014). In this study, the significantly lower vasorelaxation of preparations containing aortic artery rings after incubation of indomethacin, a COX-1 inhibitor, is strongly indicative of the involvement of this pathway in the HESA-induced relaxing effect (Figure 3).

Potassium conductance governs the membrane potential at rest in excitable and non-excitable cells (Urrego et al., 2014). It is known that moderately elevated extracellular concentrations of K<sup>+</sup> (< 40 mM) in the extracellular medium generates a membrane potential capable of opening a great diversity of ion channels but, above all, it opens channels of K<sup>+</sup>. This partially prevents the efflux of K<sup>+</sup>, opposing the hyperpolarization of the cell membrane resulting in consequent vasoconstriction, whereas very high elevations (> 60 mM) in the levels of K<sup>+</sup> in the outer space of the smooth muscle cell create a potential capable of opening, almost exclusively, voltage-operated calcium channels (VOCC's). Such properties make it possible to distinguish between substances that open K<sup>+</sup> channels and those that block VOCC's, which demonstrate differentiated behavior in each of these circumstances (Dalaklioglu e Ozbey, 2014; Hristov et al., 2017; Kuang et al., 2015; Laskowski, 2017; Oliveira et al., 2006).

Several plant substances produce vasorelaxation by altering the metabolism of Ca<sup>2+</sup> and / or K<sup>+</sup> in smooth muscle cells. Such substances act by blocking voltage-operated calcium channels (VOCC's) and / or receptor-operated calcium channels (ROCC's) on the cell membranes or the sarcoplasmic reticulum, or by opening channels of K<sup>+</sup> on the cell membrane, promoting hyperpolarization and, thus, by some of these mechanisms, causing relaxation in the blood vessels (Braunstein et al., 2009; Fellner e Arendshorst, 2010; Moreira et al., 2010; Mojiminiyi et al., 2008; Naseri et al., 2008). In this study, KCL contractions at 20 mM and 80 mM concentrations demonstrated that HEAO induces significant inhibition of contractions induced by the contracting agent,

totally relaxing the contractions promoted by the different concentrations of KCL. The vasorelaxation of the contractions given by KCl80, and the even greater relaxation on the contractions of KCl20, show that part of the vasorelaxant effect of HEAO in rat aorta was also due to the blockade of  $Ca^{2+}$  channels and, more markedly, by the opening of  $K^+$  channels.

## **5. Conclusion**

HEAO shows no toxic effects in male Wistar rats. HEAO induces significant relaxation in intact or without endothelium thoracic aorta artery of normotensive rats, appearing to induce vasorelaxation, regardless of the participation of NO. However, part of the vasorelaxation induced by HEAO is due to the participation of prostacyclin and to the activity from endothelial muscarinic receptors. Going even further, the HEAO seems to induce vasorelaxation also by opening  $K^+$  channels and by blocking  $Ca^+$  channels operated by voltage (VOCCs). However, it is necessary to carry out studies with other models and other approaches, in addition to the in-depth verification of the mechanisms involved in the HEAO activity, to make products and metabolites of this plant as promising as their potentials indicate from this simple preliminary study.

## **Acknowledgment**

The authors thank the Coordination of Improvement of Higher Education Personnel (Capes) for the financial support granted to this work through the scholarship granting.

To the professionals of the Prof. Dr. Marlene Freitas da Silva (MFS) Herbarium of the University of the State of Pará (UEPA), for the support given in the botanical identification of the plant that was object of study of this work.

## References

- Almeida, R.N., Falcão, A.C.G.M., Diniz, R.S.T., Quintans-Júnior, L.J., Polari, R.M., Barbosa-Filho, J.M., Agra, M.F., Duarte, J.C., Ferreira, C.D., Antonioli A.R., Araújo, C.C., 1999. Metodologia para avaliação de plantas com atividade no sistema nervoso central e alguns dados experimentais. *Rev. Bras. Farm.* 80, 72-76.
- Altura, B.M., Altura, B.T., 1970. Calcium content and force of drug-induced contractions of arterial muscle during recovery in vitro. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 135, 739-744.
- Alves Filho, F.C., Cavalcanti, P.M., Passaglia, R.C., Ballejo, G., 2015. Long-lasting endothelium-dependent relaxation of isolated arteries caused by an extract from the bark of *Combretum leprosum*. *Einstein.* 13, 395-403.
- Andrade, D.O., Santos, S.P.O., Vilela-Martin, J.F., 2014. Inflammation, endothelial dysfunction and acute events in hypertension. *Rev Bras Hipertens.* 21, 129-133.
- Andrade, S.S.A., Stopa, R., Brito, A.S., Chueri, P.S., Szwarcwald, C.L., Malta, D.C., 2015. Prevalência de hipertensão arterial autorreferida na população brasileira: análise da Pesquisa Nacional de Saúde, 2013. *Epidemiol. Serv. Saúde.* 24, 297-304.
- Ansari, A.H., Mukharya, D.K., Saxena, V.K., 1988. Analgesic study of N-isobutyl-4,5-decadienamide isolated from the flowers of *Spilanthes acmella* (Murr). *Indian J Pharm Sci.* 50, 106.
- Bahia, L., Aguiar, L.G.K., Villela, N.R., Bottino, D., Bouskela, E., 2006. O endotélio na síndrome metabólica. *Arq. Bras. Endocrinol. Metab.* 50, 291-303.
- Barbosa, A.F., Carvalho, M.G., Smith, R.E., Sabba-Srur A.U.O., 2016. Spilantol: occurrence, extraction, chemistry and biological activities. *Rev. bras. farmacogn.* 26, 128-133.
- Batlouni, M., 2001. Endothelium and arterial hypertension. *Rev. Bras. Hipertens.* 8, 328-338.
- Beltowski, J., Wisniewska, A.J., 2014. Hydrogen Sulfide and Endothelium-Dependent Vasorelaxation. *Molecules.* 19, 21183-21199.
- Bettega, P.V.C., Czlusniak, G.R., Paiva, R., Namba, E.L., Ribas, C.R., Grégion, A.M.T., Rosa, E.A.R., 2011. Fitoterapia: dos canteiros ao balcão da farmácia. *Arch Oral Res.* 7, 89-97.
- Birdsall, N.J., Farries, T., Gharagozloo, P., Kobayashi, S., Lazareno, S., Sugimoto, M., 1999. Subtype-selective positive cooperative interactions between brucine analogs and acetylcholine at muscarinic receptors: functional studies. *Mol. Pharmacol.* 55, 778-786.

Bonaventura, D., Oliveira, F.S., Togniolo, V., Tedesco, R.S.S., Bendhack, L.M., 2004. A macrocyclic nitrosyl ruthenium complex is a NO donor that induces rat aorta relaxation. *Nitric. Oxide.* 10, 83-91.

Boonen, J., Baert, B., Burvenich, C., Blondeel, P., De Saeger, S., De Spiegeleer, B., 2010. Transdermal behaviour of the N-alkylamide spilanthol (affinin) from *Spilanthus acmella* (Compositae) extracts. *J Pharm Biomed Anal.* 127, 77–84.

Braunstein, T.H., Inoue, R., Cribbs, L., Oike, M., Ito, Y., Holstein-Rathlou, N.H., Jensen, L.J., 2009. The role of L- and T-type calcium channels in local and remote calcium responses in rat mesenteric terminal arterioles. *J. Vasc. Res.* 46, 138-151.

Calixto, J.B., Siqueira Júnior, J.M., 2008. Desafios Desenvolvimento de Medicamentos no Brasil: Desafios Desenvolvimento de Medicamentos no Brasil: Desafios. *GMBahia.* 78, p. 98-106.

Caulfield M.P., 1993. Muscarinic receptors-characterization, coupling and function. *Pharmacol. Ther.* 58, 319-379.

Chakraborty, A., Devi, B.R., Saniebam, R., Khumbong, S., Thokchom, I.S., 2010. Preliminary studies on local anesthetic and antipyretic activities of *Spilanthus acmella* Murr. in experimental animal models. *Indian J. Pharmacol.* 42, 277-279.

Chelotti, F. Hipertensão arterial autorreferida: prevalência e fatores associados em Rio Branco, Acre. Rio Branco. Dissertação [Mestre em Saúde Coletiva] – Universidade Federal do Acre; 2009.

Cheng, Y.B., Liu, R.H., Yuan, S.S., Wu, Y.C., Chang, F.R., 2015. Alkylamides of *Acmella oleracea*. *Molecules.* 20, 6970-6977.

Clark, S.G., Fuchs, L.C., 1997. Role of nitric oxide and Ca<sup>++</sup>-dependent K<sup>+</sup> channels in mediating heterogeneous microvascular responses to acetylcholine in different vascular beds. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 282, 1473-1479.

Cunha, R.M., Farias, S.R.Q., Santos, M.R.V., Ribeiro, E.A.N., Medeiros, I.A., 2005. Cardiovascular effects induced by essential oil of *Ocotea Duckei* Vattimo in Rats. *Rev. Bras. Ciênc. Saúde.* 9, 69-78.

Dalaklioglu, S., Ozbey, G., 2014. Role of different types of potassium channels in the relaxation of corpus cavernosum induced by resveratrol. *Pharmacogn Mag.* 10, 47-52.

Dias, R.G., Negão, C.E., Krieger, M.H., 2009. Nitric Oxide and the Cardiovascular System: Cell Activation, Vascular Reactivity and Genetic Variant. *Arq. Bras. Cardiol.* 96, 68-75.

Dubey, S., Siddhartha, M., Singh, M., Saraf, S.A., Saha, S., 2013. Phytochemistry, Pharmacology and Toxicology of *Spilanthes acmella*: A Review. *Adv Pharmacol Sci.* 2013, 1-9.

Ekanem, A.P., Wang, M. Simon, J.E., Moreno, D.A., 2007. Antiobesity properties of two African plants (*Afromomum melegueta* and *Spilanthes acmella*) by pancreatic lipase inhibition. *Phytother. Res.* 21, 1253–1255.

Fellner, S.K., Arendshorst, W.J., 2010. Complex interactions of NO/cGMP/PKG systems on Ca<sup>2+</sup> signaling in afferent arteriolar vascular smooth muscle. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 298, H144-H151.

Ferreira, D.M., Silva, L.M., Mendes, D.A., Cabrini, D.A., Nascimento, A.M., Lacomini, M., Cipriani, T.R., Santos, A.R., Werner, M.F., Baggio, C.H., 2014. Rhamnogalacturonan from *Acmella oleracea* (L.) R.K. Jansen: Gastroprotective and Ulcer Healing Properties in Rats. *PLoS One.* 9, e84762.

Ferreira, V. P., Pinto, A. C., 2010. Fitoterapia no mundo atual. *Quím. Nova*, 33, p. 1829.

Foglio, M.A., Queiroga, C.L., Souza, I.M.O., Rodrigues, A.A.F., 2006. Plantas medicinais terapêuticas: um modelo multidisciplinar. *MultiCiências.* 7, 1-8.

Fonseca, M.C.M. Epamig pesquisa, produção de Plantas Medicinais para Aplicação no SUS. Espaço para o produtor, Viçosa, 2012.

Furchgott, R.F., Zawadzki, J.V., 1980. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature*, 288, 373-376.

Gilbert, B., Favoreto, R., 2010. *Acmella oleracea* (L.) R. K. Jansen (Asteraceae) – Jambu. *Revista Fitos*, 5, 83-91.

Governo Brasileiro. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância de Doenças e Agravos Não Transmissíveis e Promoção da Saúde. *Vigitel 2016: vigilância de fatores de risco e proteção para doenças crônicas por inquérito telefônico*. Brasília: Ministério da Saúde; 2016. <<http://portalarquivos.saude.gov.br/images/pdf/2017/abril/17/Vigitel.pdf>>(Acessado em 20 de janeiro de 2018).

Harald, G., Otmar, H., Andreas, W., 1985. New amides from *Spilanthes oleracea*. *Monatsh. Chem.* 116, 273-277.

Hossain, H., Shahid-Ud-Daula, A.F.M., Jahan, I.A., Nimmi, I., Hasan, K., Hag, M.M., 2012. Evaluation of antinociceptive and antioxidant potential from the leaves of *Spilanthes paniculata* growing in Bangladesh. *Int J Pharm and Phytopharm Res.* 1, 178–186.

Hristov, K.L., Parajuli, S.P., Provence, A., Rovner, E.S., petkov, G. V., 2017. Nongenomic modulation of the large conductance voltage- and Ca<sup>2+</sup>-activated



K<sup>+</sup> channels by estrogen: A novel regulatory mechanism in human detrusor smooth muscle. *Physiol. Rep.* 5, 13351-13362.

Jagan, R.N., Subash, K.R., Kumar, K.S., 2012. Role of phytotherapy in gingivitis: A review. *Int. J. Pharm.* 8, 1-5.

Jondiko, I.J.O., 1986. A mosquito larvicide in *Spilanthes mauritiana*. *Phytochemistry*. 25, 2289–2290.

Kozłowska, H., Kuczko, M.B., Schlicker, E., Kozłowski, M., Kloza, M., Malinowska, B., 2013. Relaxation of human pulmonary arteries by PPAR $\gamma$  agonists. *Naunyn-Schmiedeberg Arch. Pharmacol.* 386, 445-453.

Kuang, Q., Purhonen, P., Hebert, H., 2015. Structure of potassium channels. *Cell. Mol. Life Sci.* 72, 3677-3693.

Laskowski, M., Anderson, C., Eliasson, E., Golubinskaya, V., Nilsson, H., 2017. Potassium-Channel-Independent Relaxing Influence of Adipose Tissue on Mouse Carotid Artery. *J. Vasc. Res.* 54, 51-57.

Leite, L.N., Gonzaga, N.A., Tirapelli, D.P.C., Tirapelli, L.F., Tirapelli, C.R., 2014. Pharmacological characterization of the relaxant effect induced by adrenomedullin in rat cavernosal smooth muscle. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 47, 876-885.

Leng, T.C., Ping, N.S., Lim, B.P., Keng, C.L., 2011. Detection of bioactive compounds from *Spilanthes acmella* (L.) plants and its various in vitro culture products. *J Med Plant Res.* 5, 371-378.

Liang, C.F., Shan Au, A.L., Leung, S.W.S., Jacobus Ng, K.F., Félétou, M., Kwan, Y.W., Man, R.Y.K., Vanhoutte, P.M., 2010. Endothelium-derived nitric oxide inhibits the relaxation of the porcine coronary artery to natriuretic peptides by desensitizing big conductance calcium-activated potassium channels of vascular smooth muscle. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 334, 223-231.

Malta, D.C., Bernal, R.T.I., Andrade, S.S.C.A., Silva, M.M.A., Melendez, G.V., 2017. Prevalence of and factors associated with self-reported high blood pressure in Brazilian adults. *Rev. Saúde Públ.* 51, 1-11.

Martins, W.M.O., Paiva, F. S.; Bantel, C. A., 2013. Etnoconhecimento de plantas de uso medicinal na microrregião do vale do Juruá, Acre, Brasil. *Enciclopédia Biosfera.* 9, p. 2540.

Mendes, G.M., Rodrigues-Das-Dores, R.G., Campideli, L.C., 2015. Evaluation of the content of antioxidants, flavonoids and phenolic compounds in culinary preparations. *Rev. Bras. Pl. Med.* 17, 297-304.

Mitchelson, F., Choo, L.K., Darrwh, S., 1989. Muscarinic receptor differentiation. *Pharmac. Ther.* 16, 523-528.

- Mohseni, M., Maham, M., Naghadeh, B.D., Amin, G.J., 2017. Does *Achillea millefolium* extracts possess prokinetic effects on the bovine abomasum through M3 muscarinic receptors?. *Vet. Res. Forum.* 8, 115-120.
- Mojiminiyi, F.B., Owolabi, M.E., Igbokwe, U.V., Ajagbonna 2008. The vasorelaxant effect of *Viscum album* leaf extract is mediated by calcium-dependent mechanism. *Niger J. Physiol. Sci.* 23, 115-120.
- Moncada, S., 2006. Adventures in vascular biology: a tale of two mediators. *Phil. Trans. R. Soc. B.* 361, 735-759.
- Moncada, S., Higgs, A., 1993. The L-arginine-nitric oxide pathway. *N. Engl. J. Med.* 329, 2002-2012.
- Moreira, F.V., Bastos, J.F.A., Blanki, A.F., Alves, P.B., Santos, M.R.V., 2010. Chemical composition and cardiovascular effects induced by the essential oil of *Cymbopogon citratus* DC. Stapf, Poaceae, in rats. *Rev. Bras. Farmacogn.* 20, 904-909.
- Nakatani, N., Nagashima, M., 1992. Pungent alkalamides from *Spilanthes acmella* L. var. *oleracea* Clark. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 56, 759-762.
- Nascimento, A.M., Souza, L.M., Baggio, C.H., Werner, M.F.P., Ferreira, D.M., Silva, L.M., Sasaki, G.L., Gorin, P.A.J., Lacomini, M., Cipriani, T.R., 2013. Gastroprotective effect and structure of a rhamnogalacturonan from *Acmella oleracea*. *Phytochemistry.* 85, 137-142.
- Naseri, M.K., Arabian, M., Badavi, M., Ahangarpour, A., 2008. Vasorelaxant and hypotensive effects of *Allium cepa* peel hydroalcoholic extract in rat. *Pak. J. Biol. Sci.* 11, 1569-1575.
- Ng, H.K., Poh, T.F., Lam, S.K., Hoe, S.Z., 2013. Potassium channel openers and prostacyclin play a crucial role in mediating the vasorelaxant activity of *Gynura procumbens*. *BMC Complement Altern. Med.* 13, 2-11.
- Nyasse, B., Ngantchou, I. Nono, J.J., Schneider, B., 2006. Antifilarial activity in vitro of polycarpol and 3-O-acetylaleuritic acid from Cameroonian medicinal plants against *Onchocerca gutturosa*. *Nat. Prod. Res.* 20, 391-397.
- Oliveira, A.P., Furtado, F.F., Silva, M.S., Tavares, J.F., Mafra, R.A., Araújo, D.A., Cruz, J.S., Medeiros, I.A., 2006. Calcium channel blockade as a target for the cardiovascular effects induced by the 8 (17), 12E, 14-labdatrien-18-oic acid (labdane-302). *Vascul. Pharmacol.* 44, 338-344.
- Oliveira, D.R., Leitão, G.G., Coelho, T.S., Silva, P.E.A., Lourenço, M.C.S., Arquimio., Leitão, S.G., 2011. Ethnopharmacological versus random plant selection methods for the evaluation of the antimycobacterial activity. *Rev. bras. farmacogn.* 21, 793- 806.

Organisation for Economic Cooperation and Development. Guidelines for the Testing of Chemicals. Acute Oral Toxicity - Fixed Dose Procedure. Paris: OECD, 2001.

Otani, S., Nagaoka, T., Omae, T., Tanano, I., Kamiya, T., Ono, S., Hei, T.W., Kuo, L., Yoshida, A., 2016. Histamine-Induced Dilation of Isolated Porcine Retinal Arterioles: Role of Endothelium-Derived Hyperpolarizing Factor. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 57, 4791-4798.

Passaglia, P., Gonzaga, N.A., Tirapelli, D.P., Tirapelli, L.F., Tirapelli, C.R., 2014. Pharmacological characterisation of the mechanisms underlying the relaxant effect of adrenomedullin in the rat carotid artery. *J. Pharm. Pharmacol.* 66, 1734-1746.

Paterson, D., Nordberg, A., 2000. Neuronal nicotinic receptors in the human brain. *Prog. Neurobiol.* 61, 75-111.

Peres, M.T., Monache, F.D., Crus, A.B., Pizzolatti, M.G., Yunes, R.A., 1997. Chemical composition and antimicrobial activity of *Croton urucurana* Baillon (Euphorbiaceae). *J. Ethnopharmacol.* 56, 223-226.

Piriz, M.A., Lima, C.A.B., Jardim, V.M.R., Mesquita, K.K., Souza, A.D.Z., Heck, R.M., 2014. Plantas medicinais no processo de cicatrização de feridas: uma revisão bibliográfica. *Rev. Bras. Pl. Med.* 16, 628-636.

Prachayasittikul, S. Suphamong, S., Worachartcheewan, A., Lawung, R., Ruchirawat, S., Prachayasittikul, V., 2009. Bioactive Metabolites from *Spilanthes acmella* Murr. *Molecules*, 14, 850-867.

Radovanovic, C.A.T., Santos, L.A., Carvalho, M.D.B., Marcon, S.S., 2014. Arterial hypertension and other risk factors associated with cardiovascular diseases among adults. *Rev. Latino-Am. Enfermagem.* 22, 547-553.

Ramsewak, R.S., Erickson, A.J., Nair, M.G., 1999. Bioactive N-isobutylamides from the flower buds of *Spilanthes acmella*. *Phytochemistry.* 51, 729-732.

Rani, S.A., Murty, S.U., 2006. Antifungal potential of flower head extract of *Spilanthes acmella* Linn. *Afr J Biomed Res.* 9, 67-69.

Ratnasooriya, W.D., Pieris, K.P.P., Sumaratunga, U., Jayakody, J.R.A.C., 2004. Diuretic activity of *Spilanthes acmella* flowers in rats. *J. Ethnopharmacol.* 91, 317-320.

Ribeiro, A.O., Silva, A.F., Castro, A.H.F., 2010. Identificação de espécies da família Asteraceae, revisão sobre usos e triagem fitoquímica do gênero *Eremanthus* da Reserva Boqueirão, Ingaí-MG. *Rev. Bras. Pl. Med.* 12, 456-465.

Rodrigues, T.S., Guimarães, S.F., Rodrigues-Das-Dôres, R.G., Gabriel, J.V., 2011. Methods estimated drying and percentage of extracts in leaves

of *Plectranthus barbatus* (Brazilian bold) and *P. ornatos* (false bold). *Rev. Bras. Plantas med.* 13, 587-590.

Romão, N.F., Silva, F.C., Viana, R.N., Ferraz, A.B.F., 2015. Phytochemical analyses and antioxidant potential of *Spilanthus acmella* flowers extract. *South American Journal of Basic Education, Technical and Technological.* 2, 23-32.

Sá, D.S., Fernandes, A.F., Silva, C.D., Costa, P.P., Fonteles, M.C., Nascimento, N.R., Lopes, L.G., Souza, E.H., 2015. Non-nitric oxide based metallovasodilators: synthesis, reactivity and biological studies. *Dalton Trans.* 44, 13633-13640.

Sahu, j., Jain, K., Jain, B., Sahu, R.K., 2011. A review on phytopharmacology and micropropagation of *Spilanthus acmella*. *PhOL.* 2, 1105-1110.

Sandiford S.L., Slepak V.Z., 2009. G5-RGS7 selectively inhibits muscarinic M3 receptor signaling via the interaction between the third intracellular loop of the receptor and the DEP domain of RGS7. *Biochemistry.* 48, 2282-2289.

Sandoo, A., Zanten, J.J.C.S.V., Metsios, G.S., Carroll, D., George, D.K., 2010. The Endothelium and Its Role in Regulating Vascular Tone. *Open Cardiovasc Med J.* 4, 302-312.

Sharma, V., Boonen, J., Chauhan, N.S., Thakur, M., Spiegeleer, B., Dixit, V.K., 2011. *Spilanthus acmella* ethanolic flower extract: LC-MS alkylamide profiling and its effects on sexual behavior in male rats. *Phytomedicine.* 18, 1161–1169.

Silva, I.C., Moura, R.B., 2011. *Lamiaceae* and *Asteraceae* Species Used in Southeast Brazil by Folk Medicine for Respiratory Diseases: What do the Scientific Evidences Say. *Rev. Fitos.* 6, 21-28.

Siviero, A.; Delunardo, T.A.; Haverroth, M.; Oliveira, L.C.; Mendonça, A.M.S., 2012. Plantas medicinais em quintais urbanos de Rio Branco, Acre. *Rev. Bras. Pl. Med.* 14, 598-610.

Sousa, M.G., Passarelli Júnior, O., 2014. Hypertensive emergencies: epidemiology, definition and classification. *Rev. Bras. Hipertens.* 21, 134-139.

Spelman, K., Depoix, D., Mccray, M., Mouray, E., Grellier, P., 2011. The Traditional Medicine *Spilanthus Acmella*, And The Alkylamides Spilanthol And Undeca-2e-Ene-8,10-Diynoic Acid Isobutylamide, Demonstrate In Vitro And In Vivo Anti-Malarial Activity. *Phytother Res.* 25, 1098-1101.

Spier, S.A., Delp, M.D., Stallone, J.N., Dominguez, J.M, Muller-Delp, J.M., 2007. Exercise training enhances flow-induced vasodilation in skeletal muscle resistance arteries of aged rats: role of PGI<sub>2</sub> and nitric oxide. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 292, H3119-H3127.

Stanski, C., Nogueira, M.K.F.S., Luz, C.F.P., 2016. Palinologia de espécies de Asteraceae de utilidade medicinal para a região dos Campos Gerais, Ponta Grossa, PR, Brasil. *Hoehnea.* 43, 349-360.

Tania, M.P., Castelo, B.D.D., Lobato, A.B.R., Silva, R.R., Silva, S.S.M.A., 2015. Antioxidant and cytotoxic potential of aqueous crude extract of *Acmella oleracea* (L.) RK Jansen. *J Chem Pharm Res.* 7, 562-569.

Tiwari, K.L., Jadhav, S.K., Joshi, V., 2011. An updated review on medicinal herb genus *Spilanthes*. *J.Integr.Med.* 9, 1170-1178.

Urrego, D., Tomczak, A.P., Zahed, F., Stühmer, W., Pardo, L.A., 2014. Potassium channels in cell cycle and cell proliferation. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 369, 1-9.

Valadares, M. C., 2006. Acute toxicity evaluation: strategies post "DL50 test era". *Rev. Eletrônica farm.* 3, 93-98.

Vargas, F.S., Almeida, P.D.O., Boleti, A.P.A., Pereira, M.M., Souza, T.P., Vasconcelos, M.C., Nunez, C.V., Pohlit, A.M., Lima, E.S., 2016. Antioxidant activity and peroxidase inhibition of Amazonian plants extracts traditionally used as anti-inflammatory. *BMC Complement. Altern. Med.* 16, 2-8.

Ventura, A.L., Abreu, P.A., Freitas, R.C.C., Sathler, P.C., Loureiro, N., Castro, H.C., 2010. Cholinergic system: revisiting receptors, regulation and the relationship with Alzheimer disease, schizophrenia, epilepsy and smoking. *Rev. Psiq. Clín.* 37, 66-72.

Wong, C.M., Au, C.L., Tsang, S.Y., Lau, C.W., Yao, X., Cai, Z., Chung, A.C., 2017. Role of inducible nitric oxide synthase in endothelium-independent relaxation to raloxifene in rat aorta. *Br. J. Pharmacol.* 174, 718-733.

Wongsawatkul, O., Prachayasittikul, S., Ayudhya, C.I., Satayavivad, J., Ruchirawat, S., Prachayasittikul, V., 2008. Vasorelaxant and antioxidant activities of *Spilanthes acmella* Murr. *Int. J. Mol. Sci.* 9, 2724-2744.

Wu, L.C., Fan, N.C., Lin, M.H., Chu, I.R., Huang, S.J., Hu, C.Y., Han, S.Y., 2008. Anti-inflammatory Effect of Spilanthol from *Spilanthes acmella* on Murine Macrophage by Down-Regulating LPS-Induced Inflammatory Mediators. *J Agric Food Chem.* 56, 2341-2349.

Xie, D.P., Chen, L.B., Liu, C.Y., Zhang, C.L., Liu, K.J., Wang P.S., 2004. Arecoline excites the colonic smooth muscle motility via M3 receptor in rabbits. *Chin J Physiol.* 47, 89-94.

Yang, Y.R., Chang, K.C., Chen, C.L., Chiu, T.H., 2000. Arecoline excites rat locus coeruleus neurons by activating the M2-muscarinic receptor. *Chin. J. Physiol.* 43, 23-28.

Yasuda, I., Takeya, K., Itokawa, H., 1980. The Geometric Structure of Spilanthol. *Chem. Pharm. Bull.* 28, 2251-2253.

Yi, F., Decan, E., Stoll, K., Marceau, E., Deisseroth, K., Lawrence, J.J., 2015. Muscarinic excitation of parvalbumin-positive interneurons contributes to the severity of pilocarpine-induced seizures. *Epilepsia*. 56, 297-309.

Zago, A.S., Zanesco, A., 2006. Nitric Oxide, Cardiovascular Disease and Physical Exercise. *Arq. Bras. Cardiol.* 87, e264-e270.

ANEXO VI: Resumos apresentados e publicados em anais de congressos e revistas.

Resumo I: Efeito farmacológico do extrato hidroalcoólico de *Spilanthes Acmella* amazônica frente a contrações induzidas por fenilefrina em anéis de aorta isolada de ratos normotensos.



**EFEITO FARMACOLÓGICO DO EXTRATO HIDROALCÓOLICO DE *Spilanthes acmella* AMAZÔNICA FRENTE A CONTRAÇÕES INDUZIDAS POR FENILEFRINA EM ANÉIS DE AORTA ISOLADA DE RATOS NORMOTENSOS**

Efraim dos santos Ferreira<sup>1</sup>. Natacha Pinheiro Melo Brozzo<sup>1</sup>. Eduardo Andrade Gonçalves<sup>1</sup>. Renildo Moura da Cunha<sup>1</sup>.

1. Universidade Federal do Acre – UFAC.

**Introdução:** São fartas as reportagens sobre o uso popular, aplicações etnomedicinais e mesmo estudos científicos de espécies de plantas medicinais no combate a moléstias que afetam humanos. Este estudo avaliou o potencial vasorelaxante do extrato hidroalcoólico de *Spilanthes acmella* (EHSA) da região amazônica brasileira, sob a hipótese de possuir potencial atividade hipotensora arterial. **Metodologia:** O EHSA foi obtido por maceração, infusão em etanol 70%, rota- evaporação e liofilização. Os anéis de artéria aorta isolada de ratos normotensos foram montados em banho de órgãos isolados e estabilizados durante 60 minutos a uma tensão inicial de 1g. Após o período era incubado 1 $\mu$ M de fenilefrina (Fen) e, sobre o platô da contração, adicionado 1 $\mu$ M de acetilcolina para verificação da presença ou ausência de endotélio vascular, verificado o endotélio, os anéis eram novamente lavados e estabilizados. Sobre o platô de uma nova contração da Fen 1 $\mu$ M era feita a adição cumulativa de concentrações crescentes do EHSA em preparações com e sem endotélio (n=8). Para análise estatística utilizou-se ANOVA Two-Way e teste t de Bonferroni, do Graphpad Prism 7.0. **Resultados e Discussão:** Concentrações cumulativas do EHSA (100 - 4000 $\mu$ g/mL) induziram significativo (P < 0,0001) relaxamento concentração dependente, sendo o Log EC50 3.02 $\pm$ 0.015  $\mu$ g/mL e 2.63 $\pm$ 0.019 $\mu$ g/mL para as preparações com e sem endotélio funcional, respectivamente. **Conclusão:** O estudo evidenciou efeito relaxante de EHSA sobre a musculatura lisa vascular de artéria aorta de ratos normotensos, com efeito mais potente nos anéis desprovidos de endotélio funcional, sendo recomendados mais estudos no sentido da compreensão dos mecanismos de ação.

## Resumo II: Efeito relaxante de *Spilanthes acmella* amazônica em artéria aorta de ratos normotensos.



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ACRE  
COLÉGIO DE APLICAÇÃO  
FÓRUM DE EDUCAÇÃO, SAÚDE E MEIO AMBIENTE NO ENSINO BÁSICO TÉCNICO E TECNOLÓGICO  
Construção de Saberes



### EFEITO RELAXANTE DE *Spilanthes acmella* AMAZÔNICA EM ARTÉRIA AORTA ISOLADA DE RATOS NORMOTENSOS

Efraim S. Ferreira<sup>1\*</sup>, Natacha P. M. Brozzo<sup>2</sup>, Eduardo A. Gonçalves<sup>3</sup>, Renildo Moura da Cunha<sup>4</sup>.

1. Mestrando do PPG/CITA da Universidade Federal do Acre (UFAC);
2. Mestrando do PPG/CITA da Universidade Federal do Acre (UFAC);
3. Docente da Universidade Federal do Acre (UFAC);
4. Docente da Universidade Federal do Acre (UFAC) / Orientador;

\*Autor correspondente:  
efraimferreira17@gmail.com

#### Introdução

A elevação da pressão arterial representa um forte fator de risco para o surgimento de diversas doenças associadas ao sistema cardiovascular, demandando enormes custos sociais e econômicos em decorrência de suas complicações, sendo a insuficiência cardíaca crônica sua principal comorbidade (SBC, 2012).

São fartas as reportagens sobre o uso popular, aplicações etnomedicinais e mesmo estudos científicos de espécies de plantas medicinais no combate a moléstias que afetam os humanos. Subsidiada no conhecimento popular, a medicina tradicional emprega diversas plantas no combate da hipertensão arterial e problemas relacionados ao sistema cardiovascular (LOPES et al., 2010).

Nesse sentido, o presente estudo avaliou o efeito relaxante da espécie vegetal *Spilanthes acmella* amazônica (Jambu) em artéria aorta torácica isolada de ratos normotensos sob a hipótese de apresentar atividade hipotensora e na presença de um inibidor da síntese do óxido nítrico, a saber, L-NAME. Objetivando assim, a produção de conhecimento científico capaz de embasar a cultura etnomedicinal de *S. acmella* no combate à hipertensão arterial.

#### Material e Métodos

O extrato hidroalcoólico de *Spilanthes acmella* (EHSA) foi obtido por secagem do material vegetal, maceração, pesagem, infusão em etanol 70%, filtragem e rota- evaporação.

Os anéis de artéria aorta isolada de ratos (*Rattus norvegicus*) machos normotensos eram montados em banho de órgãos isolados contendo solução de Krebs-Henseleit com pH 7,3, gás carbogênico (95% O<sub>2</sub> e 5% CO<sub>2</sub>) e temperatura

controlada em 37°C, estabilizados durante 60 minutos por lavagem a cada 15 minutos a uma tensão inicial de 1g. Após o período de 1 hora era incubado 1µM de fenilefrina (Fen) e, sobre o platô da sua contração, adicionado 1µM de acetilcolina para verificação da presença ou ausência de endotélio vascular, verificado o endotélio, os anéis eram novamente lavados e estabilizados. Para verificar a curva concentração resposta do EHSA (100-4000µg/mL), sobre o platô de uma nova contração da Fen (1µM) era feita a adição cumulativa de concentrações crescentes do EHSA em preparações contendo anéis com e sem endotélio (n=8).

Em nova montagem, após verificação do endotélio e estabilização, L-NAME (100 µM), um inibidor da síntese do NO (MONCADA; HIGGS, 1993), era incubado por 30 minutos em preparações contendo anéis com endotélio intacto. Em seguida realizado uma nova contração com Fen (1µM) na fase tônica da qual era adicionado, cumulativamente, concentrações crescentes (100-4000µg/mL) do EHSA. Para análise estatística utilizou-se ANOVA Two-Way e teste t de Bonferroni, do Graphpad Prism 7.0

#### Resultados e Discussão

Concentrações cumulativas do EHSA (100 – 4000 µg/mL) induziram significativo (P< 0,0001) relaxamento concentração dependente, sendo o Log EC50 = 3.02±0.015 µg/mL e 2.63±0.019µg/mL para as preparações com e sem endotélio funcional, respectivamente. Estudo anterior (WONGSAWATKUL et al., 2008) revelou que *S. acmella* de origem tailandesa tem potencial atividade relaxante em anéis de artéria aorta de ratos com endotélio preservado.

A incubação de L-NAME (100 µM) por 30 minutos nos anéis aórticos com endotélio intacto, não inibiu o relaxamento induzido por concentrações cumulativas do EHSA, mas nas concentrações de (100-1000 µg/mL, n=8) a curva concentração resposta foi inclinada para a direita com diferença estatística significativa para p< 0,05. A partir da concentração de (1.500 - 3.000 µg/mL n=8) o relaxamento se tornou mais acentuado modificando a curva e inclinando-a para a esquerda com diferença estatística significativa para p< 0,05. Com Log EC50 = 3,06 ± 0,012 µg/mL, diferença significativa (p< 0,0001).

#### Conclusões

O estudo evidenciou efeito relaxante significativo do EHSA sobre a musculatura lisa



### Resumo III: Efeito relaxante de *Spilanthes acmella* amazônica em artéria aorta de rato.



Universidade Federal do Acre  
XXVI Seminário de Iniciação Científica da UFAC  
Cruzeiro do Sul, Acre dias 19 e 20 de outubro de 2017 e Rio Branco, Acre dias 24 e 25 de outubro de 2017



#### **EFEITO RELAXANTE DE *Spilanthes acmella* amazônica EM ARTÉRIA AORTA DE RATO**

Efraim dos Santos Ferreira<sup>1</sup>; Natacha Pinheiro Melo Brozzo<sup>2</sup>; Eduardo Andrade Gonçalves<sup>2</sup>; Elionardo Barroso<sup>2</sup>; Mc O'nill Dias<sup>2</sup>; Renildo Moura da Cunha<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal do Acre, Rio Branco/Acre, efraimferreira17@gmail.com

<sup>2</sup>Universidade Federal do Acre, Rio Branco/Acre

**RESUMO:** Este estudo avaliou o potencial vasorelaxante do extrato hidroalcoólico de *Spilanthes acmella* Mur. (EHSA) em aorta de rato e, alguns mecanismos de ação envolvidos no efeito. O EHSA foi obtido por metodologia pacificada na literatura. Os anéis de artéria aorta isolada de ratos normotensos foram montados em banho de órgãos isolados, após estabilizados era incubado 1 $\mu$ M de FEN e, sobre a contração 1 $\mu$ M de Ach para verificar a presença de endotélio. O efeito de concentrações crescentes cumulativas do EHSA (100 – 4000  $\mu$ g/mL) foi avaliado sob várias condições: na presença e ausência de endotélio, bloqueio de NO, antagonismo de receptor muscarínico, inibição da prostaciclina e sob contração por KCL (n = 8). ANOVA, regressão não linear e t de student, do Graphpad Prism 6.0 foram utilizados. A incubação do EHSA induziu significativo (P < 0,0001) relaxamento concentração dependente em anéis com e sem endotélio pré-contraídos com FEN ou KCL, o bloqueio da síntese do NO não inibiu o vasorelaxamento, o antagonismo dos receptores muscarínicos e a inibição da prostaciclina inibiu significativamente o relaxamento induzido por EHSA em anéis contendo endotélio, se compatibilizando com resultados obtidos em estudo anterior (WONGSAWATKUL et al., 2008). O efeito relaxante do EHSA em aorta de rato independe da via do NO, é depende parcialmente da ativação de receptores muscarínicos e da indução de prostaciclina, e opera bloqueando canais de cálcio operados por voltagem (VOCC's) e ainda abrindo canais de K<sup>+</sup>.

**PALAVRAS-CHAVE:** *Spilanthes acmella*, Vasorelaxante, Aorta de rato

**AGRADECIMENTOS:** Ao professor Renildo Moura da Cunha (orientador), À Natacha Pinheiro Melo, Ao Professor Eduardo Andrade, À Universidade Federal do Acre.

## Resumo IV: Atividade vasorelaxante do extrato hidroalcoólico de *Acmella oleracea* em artéria aorta de rato



### Atividade vasorelaxante do extrato hidroalcoólico de *Acmella oleracea* em artéria aorta de rato

FERREIRA, Efraim S. <sup>1,\*</sup>, BROZZO, Natacha P.M. <sup>1</sup>, GONÇALVES, Eduardo A. <sup>3</sup>, LOPES, Roberta F<sup>2</sup>, MENEGUETTI, Dionatas O. <sup>1,4\*</sup>, CUNHA, Renildo M. <sup>1,5</sup>.

<sup>1</sup> Programa de Pós-Graduação em Ciência, Inovação e Tecnologia para a Amazônia, Universidade Federal do Acre, Rio Branco, Acre, Brasil.

<sup>2</sup> Programa de Pós-Graduação da Rede de Biodiversidade e Biotecnologia da Amazônia Legal - Bionorte

<sup>3</sup> Professor do Centro de Ciências da Saúde e do Desporto da Universidade Federal do Acre, Rio Branco, Acre, Brasil.

<sup>4</sup> Professor do Colégio de Aplicação-CAP da Universidade Federal do Acre, Rio Branco, Acre, Brasil.

<sup>5</sup> Professor do Centro de Ciências Biológicas e da Natureza da Universidade Federal do Acre, Rio Branco, Acre, Brasil.

\* Autor correspondente: efrainferreira17@gmail.com (E.S Ferreira),

**Introdução:** *Acmella oleracea* é uma planta que tem sido utilizada pelas populações tradicionais como remédio.

**Objetivo:** Este estudo buscou avaliar o potencial vasorelaxante do extrato hidroalcoólico de *Acmella oleracea* (EHAO), sob a hipótese de possuir atividade relaxante em aorta de rato. **Metodologia:** O extrato de partes aéreas da planta foi preparado por maceração em etanol 70%. Os anéis de artéria aorta isolada de ratos normotensos foram montados em um sistema de cubas para banho de órgãos. Após estabilização por 1h. e realizados os procedimentos para verificação do endotélio vascular, era feita uma contração induzida por 1 $\mu$ M de fenilefrina/cuba e no platô dessa contração era feita a administração cumulativa de concentrações crescentes do EHAO (100 - 4000  $\mu$ g/mL) na presença e ausência de endotélio, antes e após inibição da produção de NO por L-name 100 $\mu$ M, antagonismo de receptor muscarínico por atropina 1 $\mu$ M e inibição da produção de prostaciclina por Indometacina. Foi adotado n= 8 para cada teste. A análise dos dados foi feita através da ANOVA, regressão não linear e *t* de *student* do Graphpad Prism 6.0. **Resultados:** A incubação do EHAO induziu relaxamento significativo ( $P < 0,01$ ) de modo concentração dependente tanto em anéis providos quanto em anéis desprovidos de endotélio contraídos com FEN ou KCL. A inibição da síntese do NO não inibiu o vasorelaxamento induzido pelo EHAO, já o antagonismo dos receptores muscarínicos e a inibição da síntese da prostaciclina inibiram significativamente ( $p < 0,01$ ) o relaxamento induzido pelo EHAO em anéis contendo endotélio.

**Discussão:** A supressão total das contrações induzidas por FEN sugere que o EHAO apresenta efeito vasorelaxante na musculatura lisa vascular. A não inibição do vasorelaxamento após a incubação de L-name sugere a não participação da via do NO neste efeito. A diminuição significativa no efeito vasorelaxante após inibição da prostaciclina e após o antagonismo dos receptores muscarínicos sugere envolvimento parcial de tais metabólitos no efeito vasorelaxante induzido pelo EHAO. **Conclusão:** O efeito relaxante do EHAO em aorta de rato independe da via do NO, em parte passa pela via dos receptores muscarínicos bem como pela via da produção das prostacilinas.

**Palavras-chave:** *Spilanthes acmella.*, Vasorelaxante., Aorta de rato.

## 10. APÊNDICE

Apêndice I: Parâmetros comportamentais avaliados em ratos no estudo da toxicidade após administração aguda, via oral, de 2000 ou 5000 mg/kg do EHAO.

ATIVIDADE FARMACOLÓGICA	(0) sem efeito, (-) efeito diminuído, (+) efeito presente, (++) efeito intenso.							
	0	1 h	2h	3 h	24 h	48 h	72 h	15 dias
<b>1- SNC</b>								
<b>a) Estimulante</b>								
Hiperatividade								
irritabilidade								
Agressividade								
Tremores								
convulsões								
Piloereção								
Movimento intenso das vibrissas								
Outras _____								
<b>b) Depressora</b>								
Ptose palpebral								
Sedação								
Ataxia								
Reflexo do endireitamento								
Analgesia								
Resposta ao toque diminuído								
Perda do reflexo corneal								
<b>c) Outros comportamento</b>								
Ambulação								
Limpeza								
Levantar								
Escalar								
Vocalizar								
Sacudir a cabeça								
Contorções abdominais								
Abdução das patas do trem posterior								
<b>2- SN Autônomo</b>								
Diarreia								
Constipação								
Defecação								
Respiração forçada								
Lacrimajamento								
Micção								
Salivação								
Cianose								
Força para agarrar								
<b>3- Morte</b>								